

CD8⁺ T 세포 특이 Epitope 발현 Recombinant Vaccinia Virus와 DNA Vaccine을 이용한 Prime-boost 접종법에 의하여 유도되는 in vivo CTL Activity

전북대학교 수의과대학 미생물학교실, 생체안전성 연구소

한영우 · 박성옥 · 김아름 · Abi G. Aleyas · Junu A. George · 윤현아 · 어성국*

In vivo CTL Activity Induced by Prime-boost Vaccination using Recombinant Vaccinia Virus and DNA Vaccine Expressing Epitope Specific for CD8⁺ T Cells

**Young Woo Han, Seong Ok Park, A Rum Kim, Abi G. Aleyas,
Junu A. George, Hyun A Yoon and Seong Kug Eo***

*Laboratory of Microbiology, College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute,
Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*

Received : November, 27, 2006

Accepted : January, 30, 2007

DNA vaccine approaches have been applied to generate the protective immunity against various pathogens. However, the strength of immune responses induced by DNA vaccine is weak compared with conventional vaccines. The prime-boost vaccination using DNA vaccine and other viral vector has been suggested as one way to circumvent this limitation. In the present study, we used in vivo CTL activity assay to determine CD8⁺ T cell-mediated immunity induced by prime-boost vaccination with a DNA vaccine (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA) and recombinant vaccinia virus (VVgB₄₉₈₋₅₀₅) expressing gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope peptide (SSIEFARL) of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein B (gB). The most potent in vivo CTL activity was induced in mice received VVgB₄₉₈₋₅₀₅ when both gB₄₉₈₋₅₀₅ and VVgB₄₉₈₋₅₀₅ were used at priming step and boosted with the alternative vaccine vector expressing whole antigen protein (gBw). Priming with vaccine vector expressing gBw followed by the use of VVgB₄₉₈₋₅₀₅ at boosting step also induced strong in vivo CTL activity. We also examined in vivo CTL activity after immunization of mice with epitope-expressing vaccine vector at both priming and boosting step. Curiously, in vivo CTL activity mediated by CD8⁺ T cells was strongly elicited at memory stage when animals were primed with VVgB₄₉₈₋₅₀₅ and subsequently boosted with gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA. Because the use of VVgB₄₉₈₋₅₀₅ at priming followed by boosting with gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA induced most optimal immunity, these results suggest that the order of vaccine type should be carefully considered when used vaccine type expressing only epitope for prime-boost vaccination.

Key Words: Prime-boost vaccination, in vivo CTL activity, CD8⁺ T cells, DNA vaccine, Recombinant vaccinia virus, Herpes simplex virus

*교신저자: 어성국. 561-756, 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14, 전북대학교 수의과대학 미생물학교실
Phone: 063-270-3882, Fax: 063-270-3780, e-mail: vetvirus@chonbuk.ac.kr

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

서 론

CD4⁺ T 세포와 더불어 CD8⁺ T 세포는 적응 면역 (adaptive immunity)의 중요한 방어 면역의 축으로 바이러스 및 세포 내 세균 감염뿐만 아니라 각종 암에 대하여 숙주를 보호하는 주요한 방어 면역 기구이다. CD8⁺ T 세포는 림프절에서 항원을 인식하면 활성화되어 IFN- γ 와 TNF- α 를 생산함으로써 바이러스의 증식을 억제하거나, 접촉에 의한 cytolytic effect에 의하여 표적세포를 살해함으로써 바이러스가 숙주 내에서 확산 (dissemination)되는 것을 저해한다 (28). CD8⁺ T 세포가 완전하게 활성화되기 위해서는 MHC class II 분자와 peptide epitope을 인식하는 CD4⁺ T helper 세포의 "help"를 필요로 한다 (2,4,7,22,24). 한편 CpG와 같은 immunostimulatory oligodeoxynucleotide (ODN)과 또는 선천성 면역 (innate immunity)을 자극하는 각종 활성화 신호 (activation signal)는 CD4⁺ T helper 세포없이 CD8⁺ T 세포의 활성을 유도할 수 있는 것으로 보고되었다 (23,26). 말초 조직에서 활성화된 CD8⁺ T 세포는 감염된 표적세포의 표면에 발현된 MHC class I과 peptide epitope을 인식하여 표적세포를 제거한다. 이와 같은 CD8⁺ T 세포에 의하여 인식되는 peptide epitope은 8-11 아미노산 잔기로 이루어져 있으며, 연구 결과에 의하면 CD8⁺ T 세포의 특이 epitope만을 이용한 예방 접종은 T 세포 특이 epitope에 대한 경쟁과 epitope에 의하여 자극되는 "suppressive" regulatory T 세포가 유도되지 않는다는 잇점을 갖고 있다 (9,15,20). 그러나, CD8⁺ T 세포 특이 epitope peptide만을 이용한 예방 접종은 매우 약한 CD8⁺ T 세포 반응을 유도함으로써 각종 면역증강제 (CpG 등)와 함께 투여함으로써 CD8⁺ T 세포의 반응을 증가시키려는 연구가 진행 중이며, 또한 CD8⁺ T 세포의 epitope peptide를 발현하는 minigene 형태의 DNA vaccine, recombinant vaccinia virus 또는 adenovirus를 제작하여 epitope 특이 CD8⁺ T 세포 반응을 유도하려는 시도가 이루어져 왔다 (1,27).

DNA vaccine은 항원 특이 CD4⁺ T 세포 반응뿐만 아니라 CD8⁺ T 세포 매개성의 cytotoxic T-lymphocyte (CTL) 반응을 유도할 수 있는 예방 접종법으로 많은 연구자들에게 관심을 일으켰다. 특히 DNA vaccine은 생바이러스와 같이 항원제시 세포 (antigen-presenting cell; APC) 내에서 항원 유전자를 발현함으로써 바이러스 감염 및 각종 암에 유효한 Th1-type CD4⁺ T 세포 반응과 CTL 반응을 유도할 수 있다 (17). 그러나 DNA vaccine에 의하여 유도되는 면역 반응의 정도는 생바이러스를 이용한 백신 또는 다른 단백질 백신과 비교하여 낮게 유도되어, DNA vaccine의 면역원성을 증가시킬 수 있는 다양한 방법이 시도되어 왔다 (10,11). 그와 같은 DNA

vaccine의 한계성을 극복하기 위한 방법 중 최근 DNA vaccine과 다른 형태의 백신, 즉 recombinant vaccinia virus 또는 adenovirus를 이용한 prime-boost 접종에서 믿을 만한 결과를 얻어내고 있다 (3,13,18). 그와 같은 recombinant viral vector는 체액성 및 세포성 면역을 강하게 유도할 수 있는 잇점을 갖고 있어 vaccinia, rabies virus, canarypox virus, Semliki Forest virus 등 다양한 viral vector가 시도되었다 (3,13,18). 이와 같은 viral vector 중 vaccinia virus는 강력한 세포성 면역을 유도할 수 있음이 보고되었고, 최근에는 CD8⁺ T 세포의 epitope peptide만을 발현할 수 있는 recombinant vaccinia virus가 제작되어 CTL 반응 유도에 대한 결과가 발표된 바 있다 (3,13).

CD8⁺ T 세포 반응의 정도를 측정하기 위해서는 면역화된 실험동물이나 사람으로부터 분리된 면역세포를 CD8⁺ T 세포의 특이 epitope peptide로 자극하여 세포 내에서 생산되는 IFN- γ 또는 TNF- α 를 측정하거나, 5~7일간 epitope peptide로 자극된 APC를 이용하여 항원 특이 CD8⁺ T 세포를 증폭시킨 다음 ⁵¹Cr로 표지화된 표적세포와 혼합함으로써 세포 밖으로 유리되는 ⁵¹Cr 양을 측정함으로써 ex vivo/in vitro CTL activity가 측정되었다 (3,16). 최근 CD8⁺ T 세포 특이 epitope peptide로 처리된 표적세포를 형광물질로 염색한 후 직접 생체 내에 주입하여 epitope 특이 CD8⁺ T 세포에 의한 표적세포의 살해 정도를 추적함으로써 CD8⁺ T 세포 매개성 in vivo CTL activity 측정법이 고안되었다 (14,25). 이러한 in vivo CTL activity 측정법은 이전의 ex vivo/in vitro CTL activity 측정법과는 다르게 생체로부터 얻은 항원 특이 CD8⁺ T 세포를 배양할 필요가 없으므로 생체 내의 직접적인 CTL activity를 보여줄 수 있다. 본 연구에서는 이와 같은 in vivo CTL activity 측정법을 이용하여 epitope 발현 DNA vaccine/recombinant vaccinia virus와 전체 항원 단백질 발현하는 DNA vaccine 또는 recombinant vaccinia virus를 이용한 heterologous prime-boost 접종 후 CD8⁺ T 세포 매개성 면역 반응을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 실험동물은 5~6주령의 C57BL/6 (H-2^b) 암컷 생쥐를 (주)다물 사이언스 (대전)에서 공급받아 사용하였다. 구입된 실험동물은 전북대학교 수의과대학 실험 동물실에서 유지되어 관리 규정에 맞추어 실험에 사용하였다.

2. 바이러스

면역에 사용된 herpes simplex virus type 1 (HSV-1)의 전체 glycoprotein B (gB) 또는 CD8⁺ T 세포 특이 epitope gB₄₉₈₋₅₀₅

(SSIEFARL) 발현 recombinant vaccinia virus는 CV-1 세포(ATCC, Manassas, VA USA)에서 증식시켰다. 간단히 기술하면, recombinant vaccinia virus, VVgBw (전체 gB 단백질 발현) 및 VVgB₄₉₈₋₅₀₅ (gB 단백질의 CD8⁺ epitope SSIEFARL만 발현)를 CV-1 세포에 0.01 (multiplicity of infection) moi의 양으로 감염시키고 바이러스 흡착을 위해 1시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 바이러스 흡착 후, 2% fetal bovine serum (FBS)을 함유한 배지를 넣고 48~72시간 동안 배양하여 바이러스의 증식을 유도하였다. 배양세포의 80~90% 정도의 세포 병변 현상이 나타나면 세포와 배지를 회수하여, 3회의 freezing-thawing에 의하여 바이러스를 유리하였다. 바이러스 농축은 50,000×g에서 원심 분리하여 이루어졌으며, plaque assay에 의하여 바이러스 양을 측정된 후 -80°C에 보관하여 사용하였다.

3. DNA vaccine의 준비

HSV-1 gB의 CD8⁺ T 세포 epitope 발현 DNA vaccine (mini-gene, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA)과 전체 gB 단백질 발현 DNA vaccine (gBw DNA)는 이전에 기술한 polyethylene glycol (PEG) precipitation 방법에 준하여 준비하였다 (3,16,27). 간단히 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 extraction 과정을 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.

4. 면역 방법

각 실험군당 6~7마리의 실험동물 C57BL/6 생쥐를 준비하고, 전체 gB 단백질 발현 DNA vaccine (gBw DNA), gB epitope gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL) 발현 DNA vaccine (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA), 또는 recombinant vaccinia virus (VVgBw), VVgB₄₉₈₋₅₀₅를 이용하여 근육내 주입하였다. 또 다른 시험군은 전체 gB 단백질 발현 gBw DNA 또는 VVgBw로 면역화하였다. DNA vaccine는 생쥐 당 100 µg을 주입하였고, recombinant vaccinia virus는 10⁶ plaque-forming unit (pfu)를 주입하였다. 이와 같이 면역된 생쥐들은 10일 후 다시 다른 형태의 vaccine을 같은 방법에 의하여 boosting하였다. 마지막 boosting 후 2주제 (acute phase) 또는 5주제 (memory phase)에 표적세포를 준비하여 in vivo CTL activity를 측정하였다 (Fig. 1A).

5. In vivo CTL activity 측정

In vivo CTL activity 측정은 이전에 발표된 방법에 준하여 조건을 확립하였다 (14,25). 같은 haplotype을 갖는 면역화되지 않은 C57BL/6 생쥐로부터 비장세포를 준비하여 세포를 헤아린 후, 동일한 세포 수에 해당되는 만큼 두 부분으로 나누고 그 중 한쪽에 gB₄₉₈₋₅₀₅ peptide (2 µg/ml)를 처리하였다. 45분 배양한 후 peptide를 처리한 비장세포는 5 µM carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)로 10분간 처리하였다. CFSE를 넣어준 세포에 동일 양의 FBS를 넣어 세포의 염색을 중지시키고 10% FBS를 포함한 RPMI 배지로 세 번 세척하여 과량의 CFSE를 제거하여 표적세포 (CFSE^{high})를 준비하였다. 마찬가지로, 표적세포에 대한 대조세포를 준비하기 위하여 epitope peptide gB₄₉₈₋₅₀₅를 처리하지 않은 비장세포에 0.5 µM CFSE로 같은 방법에 의하여 형광 염색하여 대조세포 (CFSE^{low})를 준비하였다. 같은 세포 수의 형광 염색된 표적세포와 대조세포를 섞어 혼합한 다음 면역화된 C57BL/6 실험동물에 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 5~7시간 후 면역화된 실험동물로부터 비장을 꺼내어 적혈구는 hypotonic 0.83% ammonium chloride 용액을 이용하여 제거하고, 준비된 비장세포는 complete RPMI 배지에 재부유한 후 epitope peptide로 처리된 표적세포 CFSE^{high}/gB₄₉₈₋₅₀₅와 epitope peptide로 처리되지 않은 대조세포 CFSE^{low}/No peptide의 분포를 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다. 주입된 표적세포와 대조세포의 수가 동일하기 때문에, 첫번째 면역화되지 않은 실험동물 내에서의 in vivo CTL activity는 다음의 식에 의하여 계산하였다.

The percentage of killing of target cells in non-immunized mice;

$$[(\text{percentage of CFSE}^{\text{low}} - \text{percentage of CFSE}^{\text{high}}) \times 100] / \text{percentage of CFSE}^{\text{low}}$$

또한, 면역화되지 않은 실험동물에서의 in vivo CTL activity를 기초로 면역화된 실험동물 내에서의 in vivo CTL activity를 다음의 식에 의거하여 계산되었다.

The percentage of killing of target cells in immunized mice;

$$\text{Ratio} = (\text{percentage of CFSE}^{\text{low}} / \text{percentage of CFSE}^{\text{high}})$$

$$\text{Percentage specific lysis} = [1 - (\text{ratio non-immunized} / \text{ratio immunized}) \times 100]$$

결 과

1. In vivo CTL activity 측정 조건 확립

항원 발현 DNA vaccine 또는 recombinant vaccinia virus에

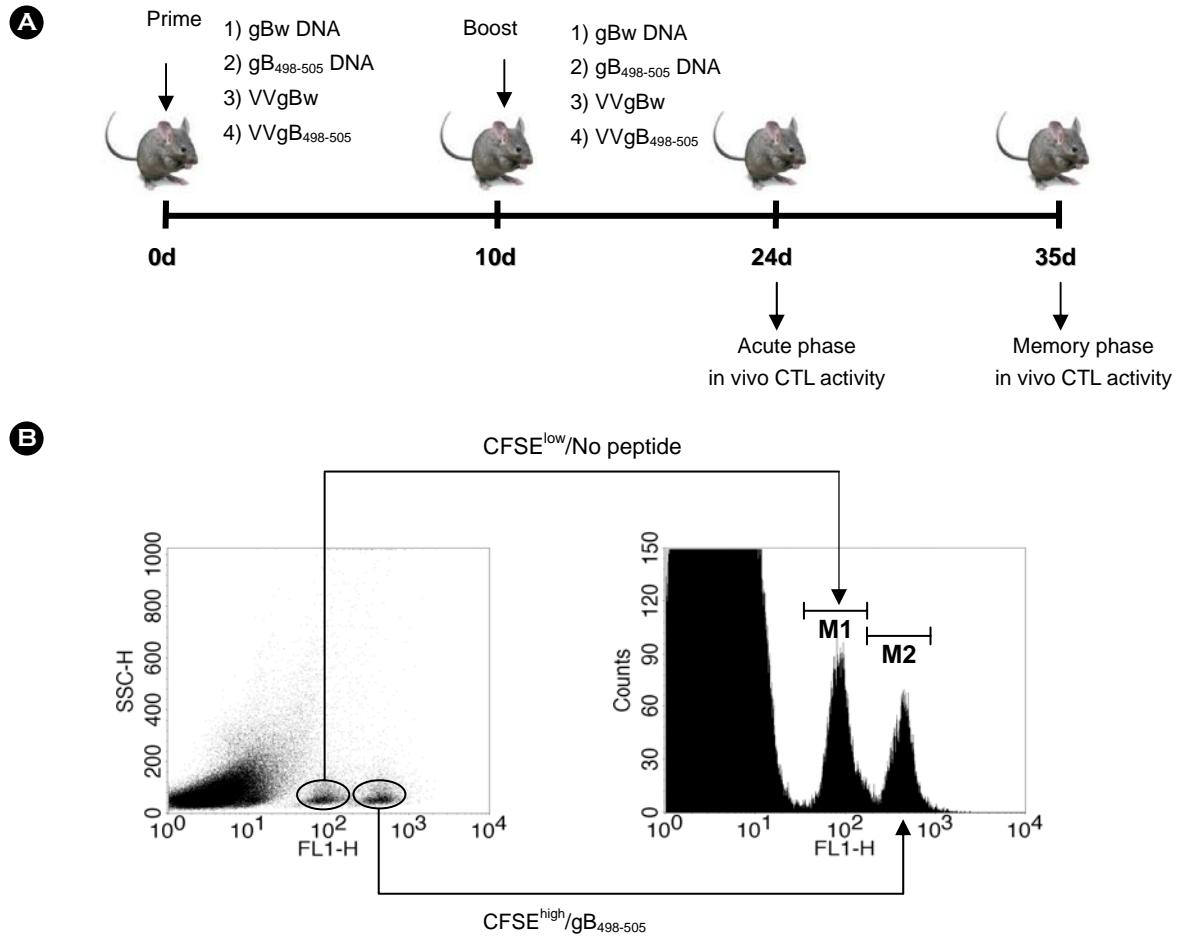


Figure 1. (A) Diagram for prime-boost immunization. C57BL/6 ($n=6\sim7$) were immunized i.m. with VVgB₄₉₈₋₅₀₅, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA, VVgBw, or gBw DNA, and boosted via the same route with the alternative vaccine type. Two (acute phase) and five (memory phase) weeks later, in vivo CTL killing activity was determined. **(B)** In vivo CTL killing assay for determining immunity mediated by epitope-specific CD8⁺ T cells. Splenocytes from naïve C57BL/6 mice ($n=6\sim7$) were evenly split into two populations. One was pulsed with gB₄₉₈₋₅₀₅ peptide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then labeled with a high concentration (5.0 μM) of CFSE (CFSE^{high}/gB₄₉₈₋₅₀₅). The other was incubated without epitope peptide and labeled with a low concentration (0.5 μM) of CFSE (CFSE^{low}/No peptide). An equal number of cells from each population were mixed together and adoptively transferred into mice immunized with prime-boost protocols. Both CFSE^{high}/gB₄₉₈₋₅₀₅ and CFSE^{low}/No peptide cells were analyzed with the flow cytometry 5 h after adoptive transfer. The histogram shows the reduced peak of CFSE^{high}/gB₄₉₈₋₅₀₅ due to cytolysis by epitope-specific CD8⁺ T cells.

의하여 면역화된 C57BL/6 생쥐에서 in vivo activity를 측정하기 위하여 면역화되지 않은 naïve C57BL/6로부터 비장세포를 준비하여 항원 epitope peptide gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL)로 처리하여 5 μM CFSE로 형광 염색된 표적세포 CFSE^{high}/gB₄₉₈₋₅₀₅와 그의 대조세포인 gB₄₉₈₋₅₀₅로 처리되지 않고 0.5 μM CFSE로 염색한 CFSE^{low}/No peptide와 같은 세포 수를 면역화된 생쥐의 꼬리 정맥에 주입하고, 5시간 후에 비장세포를 준비하여 CFSE^{high}/gB₄₉₈₋₅₀₅와 CFSE^{low}/No peptide 세포를 유세포 분석기로 분석하였다. 그 결과 CFSE^{high}/gB₄₉₈₋₅₀₅ 표적세포와 CFSE^{low}/No peptide 대조세포는 두 개의 세포 집단으로 나누어져 각각의 세포 집단에 존재하는 세포 분포를 분석할 수 있었고, 표적세포 CFSE^{high}/gB₄₉₈₋₅₀₅만이 면역화된

실험동물 생체 내에 존재하는 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope 특이 CD8⁺ T 세포 매개성 in vivo CTL 반응에 의하여 검출되는 세포 수가 감소하는 것이 관찰되었다 (Fig. 1B).

2. Priming시 epitope 발현 vaccine 이용

HSV-1의 gB 단백질의 immunodominant epitope peptide gB₄₉₈₋₅₀₅ (SSIEFARL)를 발현하는 DNA vaccine (gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA) 또는 recombinant vaccinia virus (VVgB₄₉₈₋₅₀₅)를 이용하여 heterologous prime-boosting 접종을 시도하였다. Priming시 gB₄₉₈₋₅₀₅ 또는 VVgB₄₉₈₋₅₀₅를 이용하고 boosting시 전체 gB 단백질을 발현하는 gBw DNA 또는 VVgBw를 사용하여 나타나는 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope 특이 CD8⁺ T 세포 반응을 in vivo

CTL activity 측정법에 의하여 결정하였다. 그 결과 priming 시 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope을 발현하는 recombinant vaccinia virus를 이용하고, boosting시 전체 항원 발현 DNA vaccine을 사용한 prime-boost 접종법이 가장 강력한 in vivo CTL killing 활성을 나타내었다 (Fig. 2A). 다음은 전체 항원 발현 gBw DNA를 이용하여 priming하고 VVgBw로 boosting하였을 때 14 일째에 in vivo CTL activity를 보여주었다. gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA-VVgBw와 VVgBw-gBw DNA는 비슷한 수준의 activity를 보여 주었다. 한편, boosting 후 5주째 memory stage에서 in vivo CTL activity를 측정하였을 때 이와 같은 killing 활성에 약간의 변화가 나타났다 (Fig. 2B). gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope 발현 vaccinia virus로 priming하고 gBw DNA로 boosting하였을 때 여전히 가장 높게 측정되었으나, gBw DNA-VVgBw protocol은 memory stage에서 가장 낮게 측정되었다. 대신 gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA로 priming하고 VVgBw로 boosting한 것이 두 번째로

in vivo CTL activity를 보여주어, priming시 epitope 발현 vector를 이용하는 것이 memory stage에서 보다 높은 in vivo CTL activity를 보여주는 것으로 사료되며, 특히 vaccinia viral vector를 이용하는 것이 보다 높은 in vivo CTL activity를 나타내었다.

3. Boosting시 epitope 발현 백신 이용

Priming시 전체 gB 단백질을 발현하는 vaccine vector를 이용하고 boosting시 epitope gB₄₉₈₋₅₀₅를 발현하는 vaccine vector를 이용할 때 나타나는 in vivo CTL activity를 측정하였다. 그 결과 priming시 gB 단백질을 발현하는 DNA vaccine, gBw DNA를 사용하고 boosting시 gB₄₉₈₋₅₀₅ 발현 vaccinia virus를 이용할 때 가장 높은 in vivo CTL activity를 보여주었다 (Fig. 3A). 다른 prime-boost 접종법들은 서로 비슷한 수준의 활성을 보여주었고, memory stage에서 in vivo CTL activity를 측

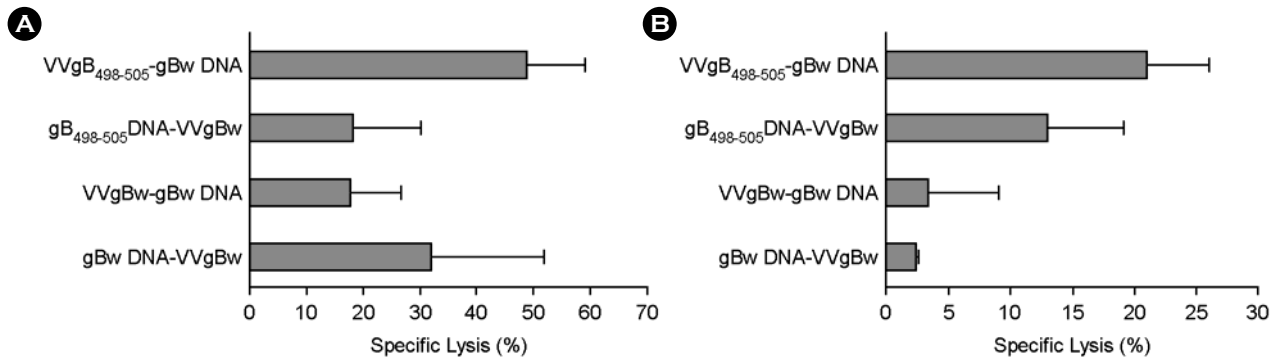


Figure 2. In vivo CTL killing activity of C57BL/6 mice immunized with prime-boost protocols using recombinant vaccinia virus (VVgB₄₉₈₋₅₀₅) and DNA vaccine (gB₄₉₈₋₅₀₅) expressing gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope peptide at priming. C57BL/6 (n=6~7) were immunized i.m. with VVgB₄₉₈₋₅₀₅, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA, VVgBw, or gBw DNA and boosted via the same route with either gBw DNA or VVgBw. Two (**A**; acute phase) and five (**B**; memory phase) weeks later, in vivo CTL killing activity was determined. The graphs show the average and standard deviation (SD) of three to four mice per experiment.

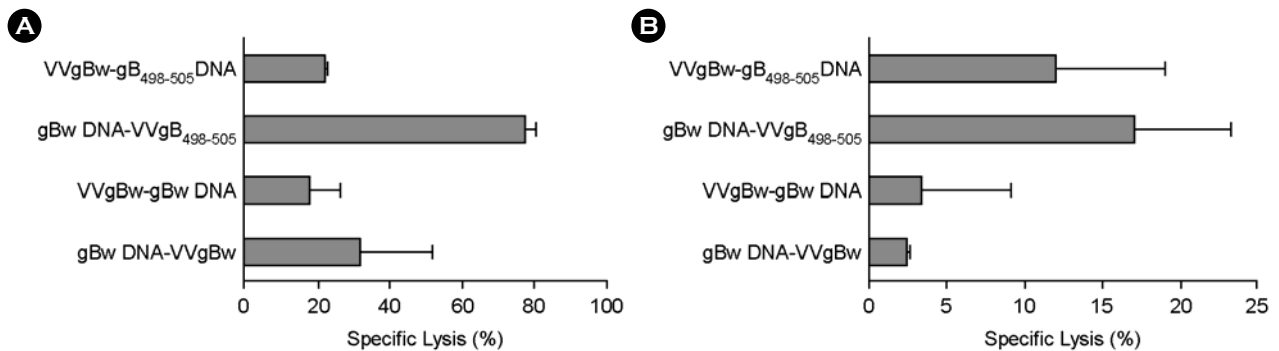


Figure 3. In vivo CTL killing activity of C57BL/6 mice immunized with prime-boost protocols using recombinant vaccinia virus (VVgB₄₉₈₋₅₀₅) and DNA vaccine (gB₄₉₈₋₅₀₅) expressing gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope peptide at boosting. C57BL/6 (n=6~7) were immunized i.m. with either VVgBw or gBw DNA, and boosted via the same route with VVgB₄₉₈₋₅₀₅, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA, VVgBw, or gBw DNA. Two (**A**; acute phase) and five (**B**; memory phase) weeks later, in vivo CTL killing activity was determined. The graphs show the average and standard deviation (SD) of three to four mice per experiment.

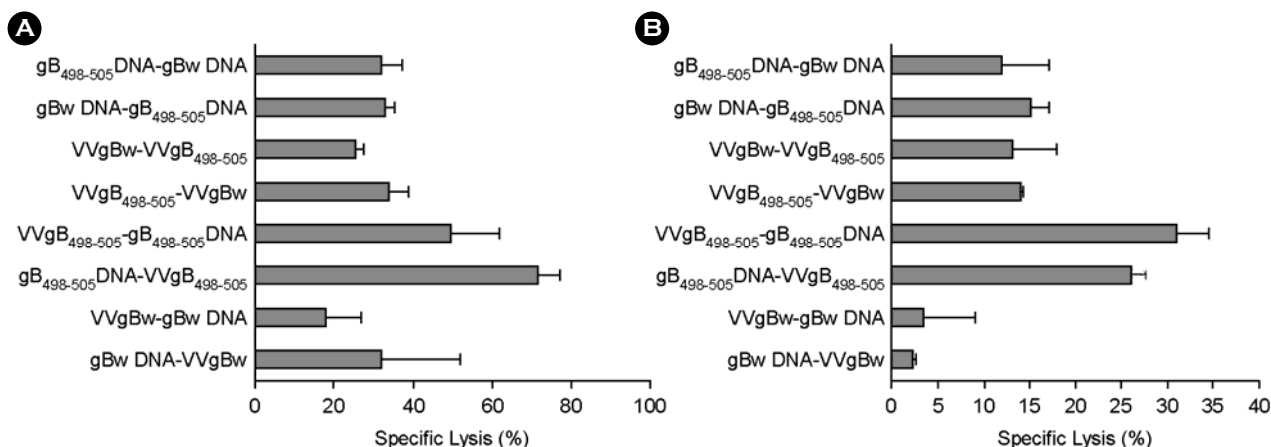


Figure 4. In vivo CTL killing activity of C57BL/6 mice immunized with prime-boost protocols using recombinant vaccinia virus (VVgB₄₉₈₋₅₀₅) and DNA vaccine (gB₄₉₈₋₅₀₅) expressing gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope peptide at priming and boosting. C57BL/6 (n=6~7) were immunized i.m. with VVgB₄₉₈₋₅₀₅, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA, VVgBw, or gBw DNA, and boosted via the same route with the alternative vaccine type. Two (A; acute phase) and five (B; memory phase) weeks later, in vivo CTL killing activity was determined. The graphs show the average and standard deviation (SD) of three to four mice per experiment.

정하였을 때 약간의 변화를 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B). Priming시 gBw DNA를 사용하고 boosting시 VVgB₄₉₈₋₅₀₅를 이용한 접종법이 여전히 가장 높은 활성을 보여주었으나, 다른 나머지 접종법 중 priming시 VVgBw를 사용하고 boosting시 gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA를 사용한 접종법이 memory stage에서 두 번째로 높은 활성을 보여주었다. 한편, gBw DNA-VVgB₄₉₈₋₅₀₅ 접종법을 앞서 수행한 VVgB₄₉₈₋₅₀₅-gBw DNA 접종법과 비교하면 2주째 (acute phase)에서는 gBw DNA-VVgB₄₉₈₋₅₀₅ 접종법이 보다 높게 나타났지만, memory stage에서는 비슷한 수준의 in vivo CTL activity를 보여주었다. 따라서, priming시 또는 boosting시 epitope gB₄₉₈₋₅₀₅ peptide를 발현하는 vaccine vector를 이용하는 것이 보다 높은 활성을 보여주는 것으로 사료되면, 특히 vaccinia viral vector를 이용하는 것이 우수한 in vivo CTL activity를 보여주는 것으로 사료된다.

4. Priming과 boosting시 epitope 발현 vaccine 이용

마지막으로, priming과 boosting시 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope peptide를 발현하는 vaccine vector를 이용하였을 때 나타나는 in vivo CTL activity를 앞서 수행한 priming 또는 boosting시 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope 발현 vector를 이용한 접종법과 비교하였다. 그 결과 priming시 epitope 발현 DNA vaccine, gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA를 이용하고 boosting시 VVgB₄₉₈₋₅₀₅를 이용한 접종법이 2주째에 가장 높은 in vivo CTL activity를 나타내었다 (Fig. 4A). 다음은 반대의 접종법 즉, VVgB₄₉₈₋₅₀₅-gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA 접종법이 우수한 in vivo activity를 나타내었다. 이와 같은 급성기의 in vivo CTL activity는 memory stage에서 변화가 나타났다. 따라서, priming시 VVgB₄₉₈₋₅₀₅를 이용하고 boosting시 gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA

를 이용한 접종법이 34% 정도의 in vivo CTL activity를 보여준 반면, 급성기에 가장 높은 활성을 보여주었던 gB₄₉₈₋₅₀₅ DNA-VVgB₄₉₈₋₅₀₅ 접종법은 두 번째로 높은 in vivo CTL activity를 나타내었다 (Fig. 4B). 전체 gB 단백질 발현 vaccine vector를 이용한 접종법에서는 2~5% 정도의 아주 낮은 in vivo CTL activity를 보여주었으며 나머지 다른 접종법들은 10~15% 정도 수준의 in vivo CTL activity를 나타내었다. 따라서, 이와 같은 결과는 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope 발현 vaccine vector를 이용하여 prime-boost 접종에 이용할 경우 모두 priming과 boosting시에 epitope 발현 vector를 이용하는 것이 우수한 in vivo CTL activity를 보여주고, vaccine vector type의 접종 순서에 따라 CD8⁺ T 세포 매개성 in vivo CTL activity가 다르게 나타날 수 있음을 의미한다.

고 찰

림프절에서 활성화된 CD8⁺ T 세포에 의한 cytotoxic activity는 각종 바이러스 및 intracellular bacteria 등에 의한 감염을 비롯하여 악성 종양에 대한 방어 면역 구축하는데 중요한 적응 면역의 축을 차지한다 (28). DNA vaccine의 출현은 각종 질병에 대한 vaccine 개발 연구에 많은 변화를 유도하였다 (6,8). DNA vaccine의 장점중의 하나는 항원 단백질을 이용한 vaccine과 달리 DNA vaccine에 도입된 항원에 대하여 세포성 면역이 자연 바이러스 감염과 같이 세포 내에서 MHC class I pathway를 거쳐 CD8⁺ T 세포의 활성을 유도한다는 것이다 (6,8). 그러나, 가끔 DNA vaccine에 의하여 유도되는 세포성 면역은 바이러스나 각종 암에 대하여 충분한

방어 면역을 구축하는데 미흡하다는 결과들이 나오고, 특히 영장류에 이용할 때 DNA vaccine에 의하여 유도되는 면역 반응이 극히 저조하다는 결과를 보여주었다 (6,8). 그래서 DNA vaccine에 의하여 유도되는 면역 반응의 특성을 변화시키고 증강시키기 위한 많은 노력이 이루어져 왔다 (10,11).

최근 DNA vaccine과 다른 형태의 vaccine type, 즉 recombinant vaccinia virus 또는 adenovirus와 같은 viral vector를 이용한 prime-boost 접종법은 DNA vaccine에 의하여 유도되는 열악한 면역 반응을 증강시키고 보다 실용적인 접근이 가능해졌다 (3,13,18). 이와 같은 prime-boost 접종법은 근육주사로 DNA vaccine을 priming시 이용하고, boosting시 다른 형태의 vaccine, 즉 recombinant vaccinia virus를 이용한 접종법이 가장 우수한 세포성 면역 반응을 유도할 수 있음이 밝혀졌다 (5,12,19,21). 그러나, 이와 같은 접종법을 비강 투여와 같은 점막 조직에 적용하면 systemic immunity와 mucosal immunity를 동시에 유도할 수 있지만 가장 강력한 면역 반응을 유도하기 위해서는 priming시 DNA vaccine의 근육주사와는 다른 recombinant vaccinia virus를 이용하여야 한다는 것이다 (3).

또한, 본 연구에서도 이와 같은 prime-boost 접종법에 항원을 HSV-1의 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope만을 발현하는 vaccine vector를 적용하였다. 그 결과 이전에 발표된 prime-boost 접종법과는 다른 결과를 얻을 수 있었다. 첫 번째는 priming과 boosting시 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope peptide 발현 vaccine vector를 모두 이용할 경우 vaccinia viral vector를 priming시 사용하고, boosting시 사용하여야 가장 우수한 in vivo CTL activity를 얻을 수 있었다. 이런 prime-boost 접종법은 기존에 발표된 결과와는 반대의 prime-boost 접종법을 보여 주는 것으로 사료된다 (3). 또한, 그와 같은 prime-boost 접종법은 memory stage에서도 가장 우수한 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope 특이 in vivo activity를 보여 주었다. 두 번째는 priming 또는 boosting시 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope 발현 vaccine vector를 한번만 이용할 경우에는 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope 발현 recombinant vaccinia virus (VVgB₄₉₈₋₅₀₅)를 이용한 것이 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope 발현 DNA vaccine을 이용하는 것보다 우수한 in vivo activity를 얻을 수 있었다. 이와 같은 결과는 기존의 priming시 DNA vaccine에 의하여 유도되는 일차 면역 반응의 특성이 boosting시 사용되는 viral vector에 의하여 증강되어 보다 우수한 반응이 유도됨으로써, DNA vaccine에 의하여 유도된 일차 면역 반응의 질적 우수성에 대한 보고들과는 다르게 나타난 것으로 보다 심도 있는 결과들이 모아져야 할 것으로 사료된다.

CD8⁺ T 세포에 의한 면역 반응을 분석하기 위한 방법 중 자극된 항원 특이 CD8⁺ T 세포로부터 생산되는 IFN- γ , TNF- α 의 세포내 축적을 유세포 분석을 이용한 intracellular cytokine

staining법과 MHC class I tetramer를 이용한 염색법, ⁵¹Cr를 이용한 CTL activity 측정법 등이 사용되어 지고 있다 (3,16). 이러한, 방법들은 모두 면역화된 실험동물이나 사람으로부터 얻은 면역세포를 자극하거나 시험관 배양함으로써 분석되는 ex vivo/in vitro 분석법으로 생체 내에서의 직접적인 항원 특이 CD8⁺ T 세포 매개성 면역 활성을 보여주는데 미흡하다고 사료된다. 생화학적 기술의 발달로 MHC class I에 결합하는 CD8⁺ T 세포의 epitope peptide 아미노산 서열이 밝혀지면서 보다 정교한 CD8⁺ T 세포에 대한 분석법이 이루어지고 있다 (14,25). 본 연구 논문에서 이용한 형광물질 CFSE와 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope peptide를 이용한 in vivo CTL response는 생체 내에서 특이적으로 유도됨을 알 수 있고, 항원 특이 CD8⁺ T 세포 매개성 면역 반응의 기능을 직접적으로 반영할 수 있는 분석법으로 여겨진다.

⁵¹Cr를 이용한 in vitro CTL activity 측정 및 intracellular cytokine staining, MHC class I tetramer 분석법을 이용하여 gB₄₉₈₋₅₀₅ epitope peptide 발현 vaccine vector를 이용한 prime-boost 접종 후의 CD8⁺ T 세포 매개성 면역 반응이 분석된 연구에서 priming시 VVgBw를 이용하고 boosting시 VVgB₄₉₈₋₅₀₅를 이용하였을 때 가장 우수한 CD8⁺ T 세포 반응을 보여주는 것으로 나타났다 (16). 이러한 결과는 본 연구와 다소 다르게 나타난 것으로 ex vivo/in vitro 분석법과 in vivo CTL activity 측정에서 도출되는 결과들이 다르게 반영될 수 있음을 보여주는 것으로 사료된다. 여기서 이용한 in vivo CTL killing 활성 측정과 면역화된 실험동물로부터 얻어진 CD8⁺ T 세포 매개성 반응 intracellular cytokine staining 및 MHC class I tetramer 염색법과의 보다 심도 있는 관련성들이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 도출된 결론은 epitope 발현 vaccine vector를 이용한 prime-boost 접종시 사용되는 vaccine vector type에 따라 나타나는 CD8⁺ T 세포 매개성 면역 반응이 다르게 나타날 수 있음을 의미하고, 그러한 CD8⁺ T 세포 매개성 면역 활성을 강력하게 유도하기 위해서는 접종 순서를 주의 깊게 고려하여야 할 것으로 여겨진다. 이러한 결과들은 CD8⁺ T 세포 특이 epitope 발현 vaccine vector를 이용한 최적의 prime-boost 접종법을 확립하는데 도움을 줄 것이다.

참 고 문 헌

- 1) An LL, Whitton JL: A multivalent minigene vaccine, containing B-cell, cytotoxic T-lymphocyte, and Th epitopes from several microbes, induces appropriate responses in vivo and confers protection against more than one pathogen. *J Virol* **71**: 2292-302, 1997.

- 2) **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.
- 3) **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.
- 4) **Fernando GJ, Khammanivong V, Leggatt GR, Liu WJ, Frazer IH:** The number of long-lasting functional memory CD8⁺ T cells generated depends on the nature of the initial nonspecific stimulation. *Eur J Immunol* **32**: 1541-1549, 2002.
- 5) **Fuller DH, Corb MM, Barnett S, Steimer K, Haynes JR:** Enhancement of immunodeficiency virus-specific immune responses in DNA-immunized rhesus macaques. *Vaccine* **15**: 924-926, 1997.
- 6) **Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA:** DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* **18**: 927-974, 2000.
- 7) **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.
- 8) **Kirman JR, Seder RA:** DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory? *Curr Opin Immunol* **15**: 471-476, 2003.
- 9) **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.
- 10) **Lee S, Gierynska M, Eo SK, Kuklin N, Rouse BT:** Influence of DNA encoding cytokines on systemic and mucosal immunity following genetic vaccination against herpes simplex virus. *Microbes Infect* **5**: 571-578, 2003.
- 11) **Lee Y, Eo SK, Rouse RJ, Rouse BT:** Influence of CCR7 ligand DNA preexposure on the magnitude and duration of immunity. *Virology* **312**: 169-180, 2003.
- 12) **Letvin NL, Montefiori DC, Yasutomi Y, Perry HC, Davies ME, Lekutis C, Alroy M, Freed DC, Lord CI, Handt LK, Liu MA, Shiver JW:** Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9378-9383, 1997.
- 13) **Moss B:** Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* **252**: 1662-1667, 1991.
- 14) **Mueller SN, Jones CM, Smith CM, Heath WR, Carbone FR:** Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus. *J Exp Med* **195**: 651-656, 2002.
- 15) **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.
- 16) **Park OS, Yoon HA, Aleyas AG, Lee JH, Chae HS, Eo SK:** CD8⁺ T cell-mediated immunity induced by heterologous prime-boost vaccination based on DNA vaccine and recombinant vaccinia virus expressing epitope. *Immune Network* **5**: 89-98, 2005.
- 17) **Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR:** Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol* **70**: 6119-6125, 1996.
- 18) **Randrianarison-Jewtoulkoff V, Perricaudet M:** Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals* **23**: 145-157, 1995.
- 19) **Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, Manson KH, Kalish ML, Lifson JD, Rizvi TA, Lu S, Hu SL, Mazzara GP, Panicali DL, Herndon JG, Glickman R, Candido MA, Lydy SL, Wyand MS, McClure HM:** Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat Med* **5**: 526-534, 1999.
- 20) **Schirmbeck R, Stober D, El-Kholy S, Riedl P, Reimann J:** The immunodominant, Ld-restricted T cell response to hepatitis B surface antigen (HBsAg) efficiently suppresses T cell priming to multiple Dd-, Kd-, and Kb-restricted HBsAg epitopes. *J Immunol* **168**: 6253-6262, 2002.
- 21) **Sedegah M, Jones TR, Kaur M, Hedstrom R, Hobart P, Tine JA, Hoffman SL:** Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7648-7653, 1998.
- 22) **Shedlock DJ, Shen H:** Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**: 337-339, 2003.
- 23) **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.
- 24) **Sun JC, Bevan MJ:** Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**: 339-342, 2003.

- 25) **Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT:** CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* **198**: 889-901, 2003.
 - 26) **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.
 - 27) **Yu Z, Karem KL, Kanangat S, Manickan E, Rouse BT:** Protection by minigenes: a novel approach of DNA vaccines. *Vaccine* **16**: 1660-1667, 1998.
 - 28) **Zinkernagel RM:** Immunology taught by viruses. *Science* **271**: 173-178, 1996.
-