

갑상선 수질암 환자의 말초 혈액 단핵구로부터 수지상세포 분화와 종양특이 자가 세포독성 T 세포 활성화 유도

고신대학교 의과대학 외과학교실

김 정 훈

Induction of Autologous Cancer-specific Cytotoxic T Lymphocytes using Dendritic Cells from Patients with Medullary Thyroid Carcinoma

Jeong-Hoon Kim, M.D.

Purpose: Recent studies suggest that immunization with autologous dendritic cells (DCs) results in a protective immunity and a rejection of established tumors for various human malignancies. It has been reported that a dense infiltration of DCs correlates with a favorable prognosis for several types of cancer. The purpose of this study is to determine whether DCs are generated from peripheral blood monocytes by using cytokines such as granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), TNF- α , Flt-3 ligand and IL-4 and to determine if cytotoxic CD8⁺T cells are activated against medullary thyroid carcinoma (MTC) tissue by the DCs.

Methods: Peripheral bloods were obtained from two patients with MTC. Mononuclear cells were cultured in the presence of GM-CSF, Flt-3 ligand, TNF- α and IL-4 for 14 days to establish DCs. At day 16, the differentiated cells were analyzed morphologically using electron microscopy. The immunophenotypic features of DCs such as expression of CD1a, CD83, and CD86 were analyzed by immunofluorescent microscopy. At day 15, DCs were incubated with either thyroid cancer tissue or normal thyroid tissue for an additional 7 days.

Results: The generated DCs showed the classic morphology of DCs including multiple processes and a profuse cytoplasm. Activated cytotoxic T lymphocytes (CTLs) were observed with prominent pseudopods. The CTLs activated

by DCs bound to the MTC were observed by scanning electron microscopy. However, normal tissues were free from CTL binding.

Conclusion: We could generate DCs from peripheral blood mononuclear cells. Furthermore, these DCs activate CTLs that are able to attach to MTC tissue. These results suggest that DCs can be used as an adjuvant for immunotherapy of MTC. This study represents the basis for the development of new therapeutic strategies not only for MTC but also for other malignancies. (*Korean J Endocrine Surg* 2006;6: 55-62)

Key Words: Dendritic cells, Medullary thyroid carcinoma
중심 단어: 수지상 세포, 갑상선 수질암

Department of Surgery, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

서 론

갑상선 수질암은 갑상선 부여포세포(parafollicular C-cell)에서 기원하고, RET-암유전자의 돌연변이로 발생된다.(1) 산발형(56%)과 가족형(44%)의 형태로 발현되며 전체 갑상선암의 5~10%를 차지한다.(2) 갑상선외에 전이된 경우 5년 생존율이 50%이하로 보고되고 있다.(3) 악성종양이 진행되는 것은 종양자체가 환자의 면역반응을 회피하거나, 그에 저항할 수 있는 기전을 소유하고 있기 때문이다. 그러므로 숙주의 방어능력이 저하됨에 기인하는 것으로, 종양세포가 숙주면역반응을 회피하는 방법을 밝혀내어 면역회피기전을 억제시키고 숙주의 면역반응을 극대화시키면 악성종양의 진행을 차단할 뿐만 아니라 암을 치료할 수 있을 것이다.

인체종양이 면역반응을 회피하는 면역회피(immune escape) 기전에는 먼저 주조직적합복합체(major histocompatibility complex, MHC)분자 발현의 저하, 종양항원이 발현되지 않는 암세포로의 변화, 면역억제 물질 생산, 종양항원에 대한 숙주의 내성(tolerance) 유도 등이 있다. 특히 이러한 면역회피는 주로 종양항원이 발현되어 있는 세포를 죽일 수 있는

책임저자 : 김정훈, 부산시 서구 암남동 34번지
☎ 620-030, 고신대학교병원 외과
Tel: 051-990-6462, Fax: 051-246-6093
E-mail: gskjh@hanafos.com

게재승인일 : 2006년 12월 29일

이 논문은 2006년 고신대학교 의과대학 연구비 일부를 지원 받았음.

세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)가 항원을 인식하는 과정에서 발생한다.(4-6)

수지상세포는 생체 내에서 가장 강력한 항원제시세포로 알려져 있는 백혈구로서 다른 항원제시세포에 비해 주조직 적합 펩타이드(MHC)복합체가 10배에서 100배 더 많이 발현되어 있다.(7-9) 수지상세포의 면역학적 특성에 비추어 볼 때 수지상세포는 특정한 종양백신(specific tumor vaccine)을 생산하는데 필요한 세포로(cellular adjuvant) 주목 받고 있을 뿐 아니라, 수지상세포를 이용하여 능동면역을 증가시키는 방법을 이용하는 것이 이전의 수동면역에 비해 훨씬 더 효율적인 것으로 알려져 있다.(10-13) 이런 종양면역학적인 측면에서 볼 때, 자가 수지상 세포를 이용하여 효과적인 항암면역능을 유도하는 세포면역치료요법이 악성종양의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 수지상세포를 이용한 면역치료는 악성흑색종, 전립선암, 림프종, 유방암, 난소암, 백혈병 및 다발성골수종에서 시도되고 있다.(14-18)

갑상선암 중 분화도가 좋은 유두암이나 여포암의 경우 갑상선 절제술 외 보조요법으로 방사성요오드치료를 이용하면 전이성 암종의 치료가 가능하다. 만약 갑상선 수질암인 경우, 갑상선 자체 내에만 국한되어 있는 예에서는 갑상선 전 절제술 및 중앙경부 림프절 광청술(central neck dissection)로 치료될 수 있다.(19) 그러나 갑상선 수질암은 진단 당시 경부림프절이나 원격전이가 동반되어 있는 예가 많고, 수술 후 추적조사중 혈청 calcitonin이나 carcinoembryonic antigen (CEA)이 상승되어 나타나는 경우, 지속적인 전이성 암종이 존재하는 것을 의미한다.(20,21) 갑상선 수질암의 전이성 암종은 수술적 제거가 가능한 경우에는 외과적 절제를 시행함으로써 완치를 기대할 수 있다. 그러나 외과적 절제가 불가능한 위치에 전이성 암종이 존재하거나 종양표지자는 증가하였으나 어떤 영상진단방법으로도 그 위치를 알 수 없는 환자에게는 항암화학요법이나 외부방사선 조사 치료를 계획하게 되는데, 이들은 치료효과가 매우 미미한 것으로 알려져 있다.(19) 따라서 갑상선 수질암환자의 생존을 향상을 위해서는 다른 보조요법의 개발이 필요하다.

본 연구에서는 갑상선 수질암 환자의 말초혈액 단핵구에서 수지상세포의 분화를 유도시키고 분화된 수지상세포에 의해 활성화된 자가 세포독성 T세포가 수질암 조직에 대하여 특이적으로 활성화 되어 항암치료의 보조요법으로 사용할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

방 법

1) 대상

고신대학교 복음병원에서 갑상선 수질암으로 진단된 환자 2예의 말초 혈액을 50 ml씩 채집하였으며, 갑상선절제술 후 환자에서 획득한 악성종양조직과 그 주변의 정상조직으로부터 얻은 정상조직을 대상으로 연구를 시행하였다.

2) 방법

(1) 말초혈액에서 단핵구의 분리: 2예의 갑상선 수질암 환자의 말초혈액 50 ml를 heparinized tube에 채취하여 1시간 이내에 Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma, USA)를 이용하여 단핵구를 분리하였다. 즉 Ficoll-Hypaque위에 혈액을 중층시키고 1,800 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 계면층(interface)의 단핵구를 파스퇴르 피펫으로 분리하였다. 얻어진 단핵구 분획에 phosphate buffered saline을 섞어 25 ml로 만들고 혈구계로 세포수를 계산한 후 1,200 rpm에서 2분간 원심분리하여 세척한 후 실험에 사용하였다.

(2) 수지상세포 분화유도: 분리한 말초 혈액 단핵구는 각각 2개조로 나누어 X-Vivo 20 배지(BioWhittaker, Maryland, USA)가 들어있는 배양용 플라스크(Corning Inc, Corning NY, T-75cm²)에 옮겼다. 5% CO₂와 95%의 공기가 공급되는 37°C의 배양기에서 배양하였다. 1개의 플라스크에 수지상 세포 분화유도제로 GM-CSF (LG chemical, Korea) 100 ng/ml, Flt3 Ligand (R&D system, Minneapolis, MN, USA) 100 ng/ml, IL-4 (RND system, MN, USA) 50 ng/ml, TNF- α (R&D system, MN, USA)는 20 ng/ml로 최종 농도를 맞춰 배양하였다. 배양액은 매 3~4일마다 교환하였고 그때마다 같은 농도가 되도록 사이토카인을 첨가하여 14일 동안 배양하였다.

(3) 배양된 수지상세포 형태 관찰: 배양 2일째부터 매일 위상차 현미경을 이용하여 세포크기의 변화 및 집락형성 등을 관찰하였다. 14일 동안 배양하였으며 세포가 크고 세포질 내에 과립이나 공포가 없는 풍부한 회색의 세포질을 갖고 장형의 세포질 돌기가 형성된 것을 분화된 수지상세포로 간주하였다.

(4) T 림프구 배양: 각각의 말초혈액 림프구는 수지상세포가 들어있는 X-Vivo 20 배지에서 혼합 배양하였다.

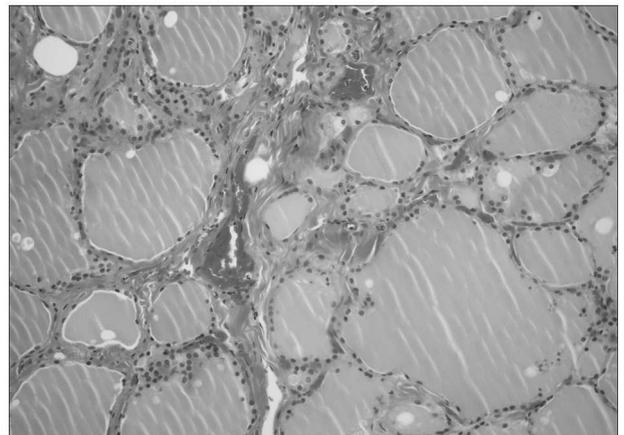


Fig. 1. The micrograph of non-neoplastic thyroid tissue after being fixed with formalin and embedded in paraffin (H&E, $\times 100$).

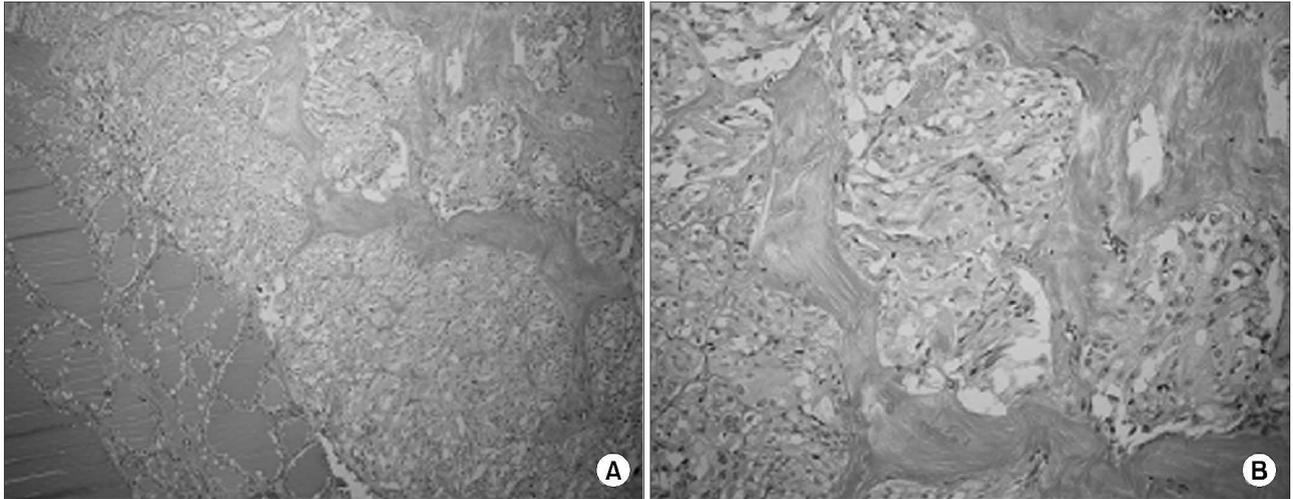


Fig. 2. Pathologic finding of medullary thyroid carcinoma. Round to spindled cells are arranged in clusters, and acinar pattern with intersecting amyloid deposits (A, $\times 100$). Tumor cells contain uniform, round to oval nuclei with finely granular chromatin, and small and visible nucleoli. Cytoplasm has abundant eosinophilic (B, $\times 200$).

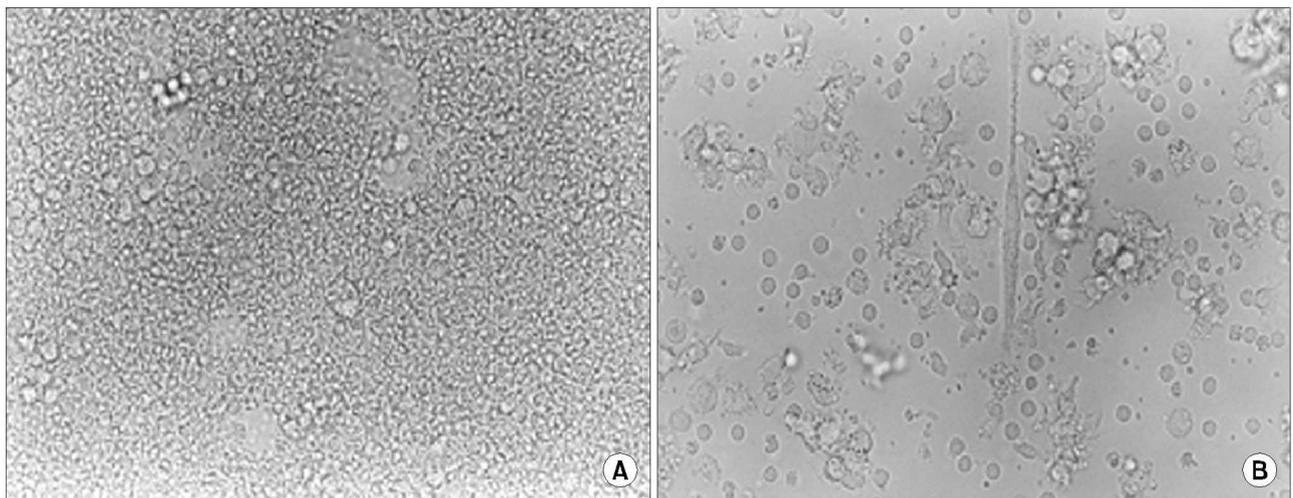


Fig. 3. Morphology of freshly isolated and cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from medullary thyroid carcinoma patient. Light micrograph shows freshly isolated PBMCs on day 1 (A, $\times 400$) and a typical dendritic cell developing from PBMCs after 5 day cultured in GM-CSF, IL-4, Flt3-L, and TNF- α (B, $\times 400$).

(5) 자가 T 세포 활성화 및 갑상선조직의 감작: 갑상선종양과 정상조직은 수술 당시 분리하여 X-Vivo 20배지에 넣어 보관하였다. 14일 동안 배양된 수지상세포와 갑상선암 조직을 함께 혼합 배양을 하였으며 배양 1일째부터 T 림프구를 활성화시키기 위해 1,000 IU/ml의 IL-2 (proleukin, Chiron, USA)를 추가하여 7일간 혼합 배양하였다.

(6) 병리조직학적 검사

① 광학현미경검사: 배양된 조직을 10% 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 후 포매된 조직을 4 μ m 두께로 3장씩 박절하고, 각각을 항온기에서 56~58 $^{\circ}$ C로 30분간 건조

시킨 후 실온에서 파라핀을 제거한 뒤, 다단계 농도의 알코올로 탈수시킨 후 헤마톡실린-에오진 염색을 실시하였다.

② 면역 조직 화학적 검사: 갑상선 조직 여부를 확인하기 위하여 티로글로불린과 T-림프구를 확인하기 위하여 CD45 RO 면역 염색을 실시하였다. 면역 조직 화학적 검사는 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매한 조직을 4 μ m 두께로 2장씩 박절하고, 각각을 항온기에서 56~58 $^{\circ}$ C로 30분간 건조시킨 후 실온에서 파라핀을 제거한 뒤, 다단계 농도의 알코올로 탈수시켰다. 파라핀 절편을 내인성 과산화 효소 활성을 억제하기 위하여 methanol에서 0.3% 과산화 수

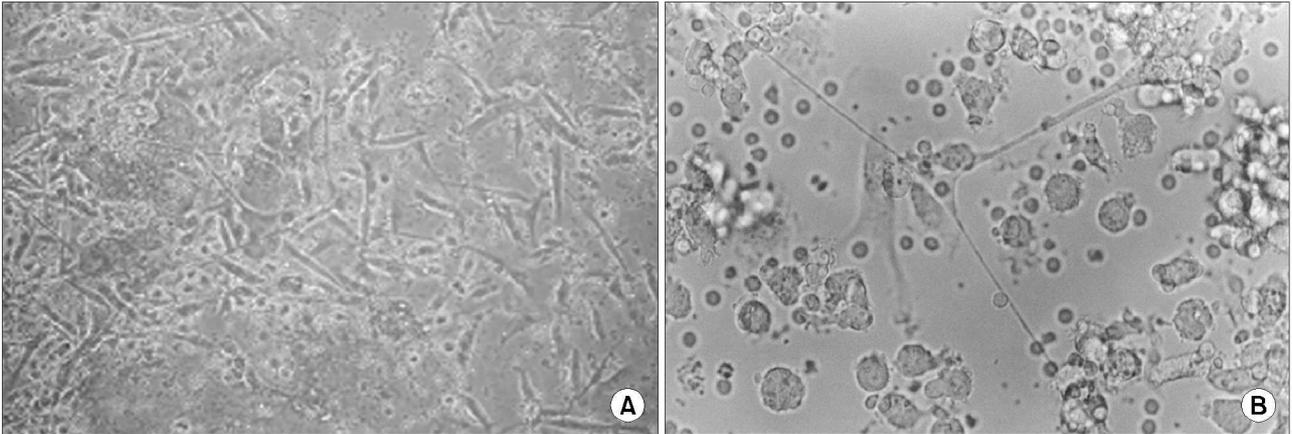


Fig. 4. Light micrographs of freshly isolated PBMCs during culture. Cells were cultured for 8 days (A, $\times 100$, B, $\times 400$) in GM-CSF, IL-4, Flt3-L, and TNF- α . This shows numerous dendritic cells.

소를 사용하여 30분간 처리한 후 인산염 완충액으로 2~3회 세척하였다. 비특이적 반응을 제거하기 위하여 정상 양혈청(Dako kit 1 : 5 Carpinteria, CA, USA)으로 15분간 전처리하였다. 일차 항체인 티로글로불린과 T-세포 항체를 각각의 슬라이드에 상온에서 2시간 반응시킨 후 DAKO-LSAB kit를 이용하여 biotinylated antibody와 과산화수소가 부착된 streptavidin을 결합시켰다. 3-amino-9-ethyl carbazole를 사용하여 3~5분간 발색과정을 거친 후 헤마톡실린으로 대조염색하여 봉입체로 봉입하고 광학 현미경으로 관찰하였다. 음성 대조군으로는 일차 항체 대신에 정상 양혈청을 사용하였다.

③ 주사전자현미경 검사: 3 \times 2 \times 2 mm 크기의 배양된 종양조직 검체를 0.1 M phosphate 완충액에 수세한 후 2.5% glutaraldehyde에 24시간 고정하였다. 후고정은 1% osmium tetroxide로 하였다. 그 후 1시간 증류수에 수세한 후 에탄올을 이용하여 탈수하고, isoamyl acetate로 치환하였다. 임계점건조기를 이용하여 액체 CO₂로 건조한 후 시료대에 부착하였다. 마지막으로 검체를 ion sputter장치 내에서 20 nm gold palladium을 이용하여 증착한 후 감상선종양 세포표면에서의 수지상세포와 T 세포의 분포 및 이동을 주사형 전자현미경(Hitachi, S-520, Japan)으로 15 kV에서 검경하였다.

결 과

1) 정상조직 및 감상선 수질암조직의 광학현미경검사

정상적인 감상선조직으로 확장된 감상선 여포가 관찰되며(Fig. 1), 감상선 수질암조직에서는 둥글거나 방추형세포가 집락을 형성하고, 종양세포의 핵은 미세과립을 포함하고 많은 양의 호산성의 세포질을 보이고 있다(Fig. 2). 배양된 조직에서의 티로글로불린 염색은 음성이었고, 광학현미경에서 감상선 수질암의 조직임을 확인하였다.

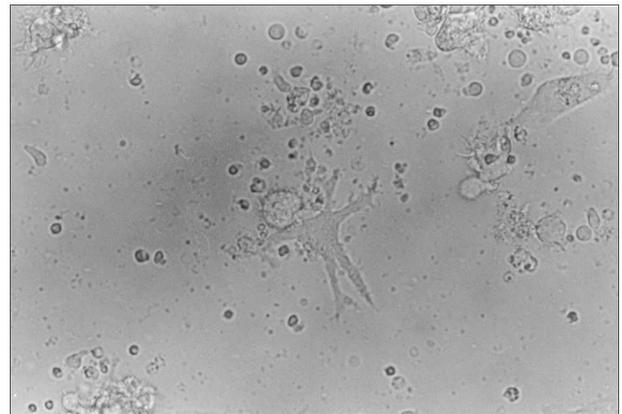


Fig. 5. Light micrographs of freshly isolated PBMCs during culture. Cells were cultured for 16 days ($\times 400$) in Flt3-L, GM-CSF, IL-4, and TNF- α . The generated cells showed a typical morphology of mature DCs including multiple dendrites and profuse cytoplasm at day 16.

2) 환자의 말초혈액 단핵구로부터 수지상세포분화

배양 중 위상차 현미경을 통하여 세포의 형태를 관찰한 결과 세포는 배양 3~4일부터 세포의 크기가 커지며 돌기가 생성되기 시작하였다(Fig. 3). 각각의 배양 플라스크에서의 돌기생성 및 세포질의 변화 등을 매일 사진 촬영으로 기록하였다. 세포가 점차 거대해지고 세포핵이 엷상으로 변하며 세포질 주위로 가늘고 긴 세포질 돌기를 관찰할 수 있었다. 16일 동안 단핵구를 배양해서 유도시킨 결과 전형적인 돌기를 가진 세포질이 풍부한 세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 14일 동안 배양된 수지상세포와 감상선 암조직과 장상조직을 각각 혼합 배양한 후, 배양 1일째부터 T 세포를 활성화시키기 위해서 1,000 IU/ml의 IL-2를 추가하여

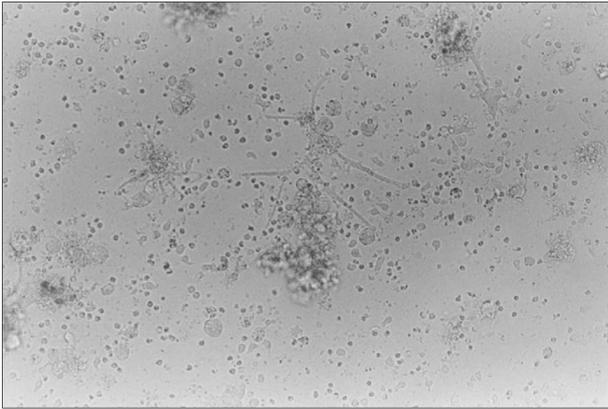


Fig. 6. The morphology of activated T cells. This view shows activated T cells and dendritic cells during culture with IL-2 (original magnification, $\times 400$). Activated T cells show multiple pseudopods and abundant nucleosomes.

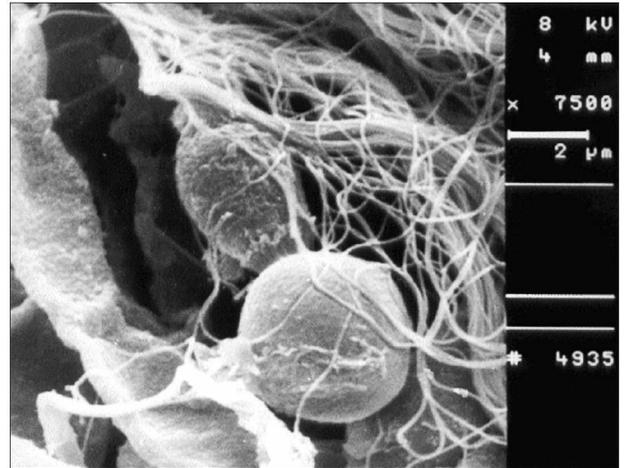


Fig. 8. Scanning electron micrograph of a non-activated T cell which cultured with normal thyroid tissue. This view shows a T cell with less prominent surface structure ($\times 7,500$).

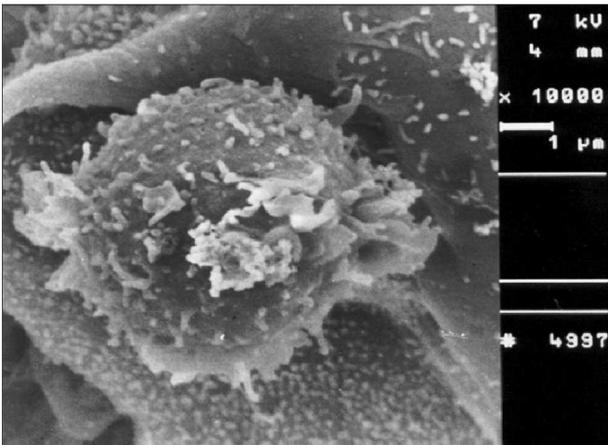


Fig. 7. Scanning electron micrograph of an activated T cell. An activated T cell adheres to the medullary thyroid cancer tissue ($\times 10,000$).

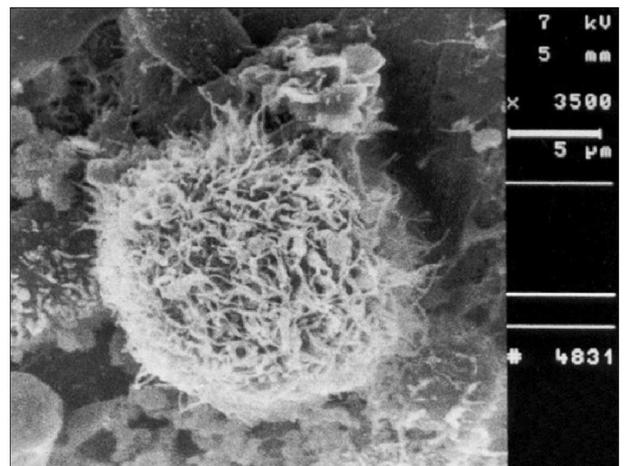


Fig. 9. Scanning electron micrograph of a dendritic cell. The cell attached to the medullary thyroid cancer tissue ($\times 3,500$).

핵질과 세포질이 풍부하게 발달된 것으로 보아 T 세포가 활성화됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

3) 수지상세포에 의한 자가 T 세포 활성화관찰

2명의 환자로부터 채취한 정상조직과 종양조직에 대한 림프구의 반응을 주사전자현미경으로 관찰하였다. 16일 동안 단핵구를 배양해서 유도시킨 결과 전형적인 돌기를 가진 세포질이 풍부한 세포를 관찰 할 수 있었다(Fig. 5). 16일 동안 배양된 수지상세포와 갑상선 암조직과 장상조직을 각각 혼합 배양한 후, 배양 1일째부터 T 세포를 활성화시키기 위해서 1,000 IU/ml의 IL-2를 추가하여 핵질과 세포질이 풍부하게 발달된 것으로 보아 T 세포가 활성화됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 수지상세포를 정상조직으로 감각시킨 대

조균에 비하여 종양조직으로 감각시킨 균에서 배양된 림프구가 보다 더 현저하게 세포독성 T 림프구로 분화되고 활성화되었으며, 세포 표면에도 위족(pseudopodia) 모양의 세포질 돌기가 왕성하게 발달하여 종양조직에 부착하여 있는 것이 관찰되었다(Fig. 7). 반면 정상대조균에서는 수지상세포가 관찰되지 않았고 T세포의 세포질 돌기도 뚜렷하게 발현되지 않았다(Fig. 8).

4) 말초 혈구세포에서 유래된 수지상세포의 종양조직 부착

핵질과 세포질이 풍부하게 발달되고 위족이 잘 형성되어 있는 활성화된 T 세포와 더불어 갑상선 수질암 조직에 부착되어 있는 수지상세포를 관찰하였다(Fig. 9).

고찰

대부분의 고형악성종양은 외과적인 제거가 일차적인 치료이다. 그러나 외형상의 완치적 절제술과 장기간에 걸친 적극적인 항암화학요법 및 방사선 치료에도 불구하고 많은 수의 환자들에서 미세전이에 의한 이차적인 종양이 재발한다.

외과적인 제거 후 미세전이에 의한 이차적인 재발과 관련된 분자외과학적 측면은 보다 복잡한 양상을 보이며, 활성화된 증식성 세포에 특이적으로 일어나는 국소적인 사건인 맥관형성이 유도되는 것은 종양의 형성에 선행되어 일어나며, (22) 종양이 일련의 전이과정을 시작하기 위해서는 원발병소로부터 종양세포가 떨어져 나와야 한다. (23,24) 맥관형성 과정에서 새로 증식된 모세혈관은 기저막이 불완전해서 종양세포가 빠져 나갈 수 있을 만큼 조직구조가 느슨하므로 맥관형성은 암전이에 반드시 선행되어야 할 전구과정이다. (24,25) 이와 같이 유리된 종양세포는 순환계 내에서나 원격전이 부위에서 내피세포를 지나 기저막을 분해해서 뚫고 나가서 다른 조직에 착상하고 또 증식하며 그들 자신의 모세맥관망을 구축하는 과정에서 숙주의 면역감시로부터 벗어나야 한다. (23)

종양 치료에 있어서 종양에 대한 면역반응을 증강시키려는 노력은 지난 수년간 계속되어 왔지만 지금까지 효과적인 수단은 개발되지 못했다. 이전까지 환자의 종양에 대한 면역반응을 증강시키기 위해 사용된 방법은 주로 BCG (Bacille Calmette-Guerin) 같은 비특이적 방법이거나 lymphokine-activated killer cell과 같은 수동면역을 유도하는 방법들이었으며 그 효과는 미미했다. (26) 이에 비해 수지상세포를 사용해서 능동면역을 증강시키는 치료법은 훨씬 더 효율적이다. (26-29) 수지상세포는 독특한 성상(stellate)의 형태 때문에 붙여진 이름으로 생체 내에서 가장 강력한 항원제시 세포로 알려져 있는 백혈구이다. (30) 수지상세포는 항원 특이 T세포에게 항원을 제시할 뿐만 아니라 휴지기의 memory T세포의 증식과 분화를 유도한다. 이러한 강력한 면역활성기능은 다른 항원제시세포(B세포, 대식세포)보다 월등히 많이 발현하고 있는 costimulatory signal 때문이다. (31) 뿐만아니라 수지상세포가 직접 자연살해세포의 기능을 유도한다는 보고에 의하면 이 세포는 선천성 면역과 후천성 면역의 상호관계를 조절하는 기능도 있는 것으로 생각된다. (32)

골수의 전구세포로부터 기원하는 수지상세포는 뇌를 제외한 거의 모든 조직에 산재하며, 말초 단핵구의 1% 이하를 차지한다. (33) 수지상세포의 계통은 그들이 상주하는 해부학적인 구획에 따라 4가지 단계로 구분할 수 있다. 전구세포는 골수와 혈액에, 미성숙 수지상세포는 말초의 림프조직이 아닌 곳에, 성숙단계 과정의 이동 중인 수지상세포는

유입성 림프액과 혈액에, 그리고 성숙한 수지상세포는 2차 림프조직에 존재한다. (34) 전구세포는 골수에서 기원하여 혈액으로 들어가서 림프조직이 아닌 곳에 산재하면서 미성숙 수지상세포로 분화해 간다. 미성숙 수지상세포는 소화관을 포함한 많은 기관의 상피와 간질조직에 존재한다. (35) 이들 미성숙 수지상세포는 항원의 포획과 처리, 구조적 적합체의 생산, 그리고 구조적 적합체-외부 펩타이드의 결합을 생성할 수 있는 능력이 있으나 T세포를 활성화시키는 기능은 거의 없다. 수지상세포는 존재하는 부위에 따라 분류할 수 있다. 피부나 점막부위에 위치한 경우 Langerhans 세포, 심장, 폐, 신장 등의 주요 장기에 분포하는 경우 interstitial 수지상세포, 2차림프조직과 흉선수질에 위치한 경우 interdigitating 수지상세포라고 하며, 혈액 중에 존재하는 수지상세포는 circulating 수지상세포 또는 veiled 세포라고 한다.

2차 림프조직으로 이동해온 수지상세포는 MHC class I 및 II, leukocyte function associated-3 antigen (LFA-3), CD54, CD40, CD80 그리고 CD86 같은 세포표면항원과 costimulatory molecules의 발현증가와 두 종류의 CC chemokine 수용체(CCR1과 CCR5)의 발현 감소로 1차 T 세포의 면역반응을 유발할 수 있는 능력을 가지게 된다. (36) 성숙단계에서 수지상세포는 IFN- α 와 IL-12를 생성하고 다른 macrophage inflammatory protein (MIP)-1 γ , IL-1, IL-6 그리고 IL-15들과 함께 1차적인 면역반응을 유발한다. (37) 수지상 세포에 의해 자극받은 CD4 helper T 세포는 사이토카인을 분비하여 종양이 있는 병소에서 세포독성 T 세포뿐만 아니라 자연살해세포, 항원제시세포, 그리고 다른 염증 세포들을 활성화시킨다. 이러한 특성에 비추어 볼 때 수지상세포는 특정한 종양 백신을 생산하는데 필요한 잠재적인 세포로 주목받고 있다. 1990년대부터 시작된 유전자를 사용한 치료법(gene therapy)에 의해서 유전자가 약리학적인 제제로 사용하게 되었다면 이제는 수지상 세포를 이용한 입양 면역요법의 대두로 세포 자체가 악성종양을 치료하는데 사용할 수 있는 가능성을 보여준다. (38)

수지상 세포가 성숙해 감에 따라 면역반응이 유발되는데 이러한 성숙과정은 여러 요소에 의해서 조절된다. 특히 세균이나 염증 반응 산물, 세균의 세포벽 성분인 다당류, IL-1, GM-CSF, TNF- α 등은 모두 수지상 세포의 성숙을 촉진한다. (39) 여러 연구 결과에 의하면 수지상 세포는 GM-CSF, TNF- α 와 같은 사이토카인이 있는 환경에서 골수 또는 말초 혈액으로부터 배양이 가능하고 단핵구와 동일한 조상세포(progenitor cell)로부터 유래함을 보고하였다. (39-41) 본 연구에서도 GM-CSF, Flt3 Ligand, TNF- α 및 IL-4를 사용하여 수지상 세포의 분화 유도 및 배양하였다. 이 방법은 다른 연구자들이 말초 혈액에서 단구(monocytes)만을 분리하여서 수지상세포로 분화시키는데 비하여 백혈구 분획 전체를 시료로 사용함에 따라 분리과정이 간략하며 그 결과 수지상세

포의 수율이 개선되고 수지상세포의 생육성과 치료 효력이 강화되는 장점이 있다.

종양조직에서 수지상세포의 침윤은 종양의 예후와 관련이 있으며, 폐암, 비인두암, 식도암, 대장암 및 위암 등에서 수지상세포가 침윤한 경우 예후가 양호하다고 알려져 있으며, 갑상선 유두선암에서도 수지상세포가 침윤된 경우 예후가 양호하다고 보고되어 있다. 수지상세포를 이용한 면역치료는 흑색종, 전립선암, 비호지킨 림프종, 유방암, 난소암, 백혈병 및 다발성골수종에서 보고되고 있다.(14-18) 갑상선암에서 수지상세포를 이용한 종양백신 치료는 갑상선 수질암 7예 중 1예에서 매우 부분적인 관해를 보고한 Schott 등의 연구가 있으나 수지상 세포의 종양공격능력에 대한 구체적인 평가가 부족한 상태이다. 본 연구에서는 말초혈액에서 분리한 수지상 세포를 여러 사이토카인을 이용하여 종양세포 및 정상 갑상선세포와 함께 배양하여 보았다. 그 결과 정상조직과 함께 배양한 곳에서는 T세포가 활성화되지 않은 반면, 종양세포와 배양한 측에서는 T세포가 활성화되고 종양조직에 부착되는 것이 확인되었다.

분화도가 좋은 갑상선 유두암 혹은 여포암은 악성도가 낮고 수술적 치료 및 방사성요오드 치료로 원격전이의 치료가 가능하며 지속적인 갑상선호르몬 유지요법으로 그 생존율이 매우 높은 것으로 알려져 있으나 갑상선 수질암은 갑상선외에 전이된 경우 5년 생존율이 50%이하로 보고될 정도로 갑상선암 중 악성도가 높고 외과적 절제 외에는 다른 효과적인 보조요법이 없는 것으로 알려져 있다.(3) 이에 갑상선 수질암 환자의 생존율을 향상시키기 위해 좀 더 사용 가능한 보조요법이 필요하다. 본 연구에서 보여준 수지상세포의 갑상선 수질암 세포에 대한 반응은 이러한 용도로 사용이 가능 할 것으로 생각된다. 그러나 이 연구는 주로 형태학적인 관점에서 설계되고 연구된 것으로 차후 세포의 기능성이나 정량적인 연구가 보완되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서는 갑상선 수질암환자의 말초혈액에서 수지상세포의 분화를 유도할 수 있었고, 수술 중 취득한 악성종양세포와 여러 사이토카인을 함께 배양할 경우 말초혈액에서 수지상 세포의 분화를 유도할 수 있었으며, 이 수지상세포가 T세포의 분화를 증가시키는 것과 수지상세포에 의해 활성화된 세포독성 T세포가 갑상선 수질암 조직에 부착하는 것을 관찰할 수 있었다. 갑상선 수질암의 면역치료에 수지상세포를 이용한 연구를 위해서는 향후 종양세포 파쇄액으로 pulsing한 수지상세포나 갑상선 수질암에 특이적인 항원을 감작시킨 수지상세포를 이용한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

갑상선 수질암 환자의 말초혈액 단핵구에서 수지상세포

를 분화유도시키고 수지상세포의 표현형을 분석해서 분화된 수지상세포가 자가 세포독성 T 세포를 활성화시켜 수질암세포, GM-CSF, Flt3 Ligand, TNF- α 및 IL-4를 사용하여 수지상세포로 분화 유도할 수 있었으며, 갑상선 수질암 조직에 부착되어 있는 수지상세포를 관찰할 수 있었다. 또한 정상 갑상선조직과 갑상선 수질암 조직에 대한 림프구의 반응을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 수지상세포를 종양조직으로 감작시킨 군에서 배양된 림프구가 보다 더 현저하게 세포독성 T 림프구로 분화되고 활성화된 것을 관찰할 수 있었다. 또한 종양으로 감작시킨 세포 표면에도 위족(pseudopodia) 모양의 세포질 돌기가 왕성하게 발달하였으며, 종양조직에 부착하여 있는 부위도 관찰할 수 있었다.

본 연구는 향후 갑상선 수질암의 종양특이항원을 감작시킨 수지상세포를 이용한 입양면역요법에 대한 연구의 기초가 될 수 있을 것으로 생각되며, 갑상선 수질암 환자에서 임상적으로 적용될 경우 외과적 절제 후에 생존율을 향상시킬 수 있는 효과적인 보조항암요법으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363:458-60.
- 2) Frankj DG, William CH, Morris DM, Charles R. Prognostic factor for thyroid carcinoma. *Cancer* 1997;79:564-73.
- 3) Girelli ME, Nacamulli D, Pelizzo MR, Vido DD, Mian C, Piccolo M. Medullary thyroid carcinoma, clinical features and long-term follow up of seventy Eight patients treated between 1969 and 1986. *Thyroid* 1998;8:517-23.
- 4) Boyd CM, Baker JR. The immunology of thyroid cancer. *Endocrino and Metab Clin North Am* 1996;25:159-79.
- 5) Cheever MA, Bernhard H, Gralow JR, Huseby ES, Takahashi M, Chen W. Immunity to oncogenic proteins. *Immunological Reviews* 1995;145:33-60.
- 6) Coulie PG. Human tumor antigens recognized by T cells. New perspectives for anticancer vaccines. *Molecular Med Today* 1997;3:261-8.
- 7) Pardoll DM. Cancer vaccines. *Nat Med* 1998;4:525-31.
- 8) Ockert D, Schmitz M, Hampl M, Rieber EP. Advances in cancer immunotherapy. *Immunol Today* 1999;20:63-5.
- 9) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
- 10) Kolb HJ, Holler E. Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte transfusion. *Curr Opin Oncol* 1997;9:139-45.
- 11) VanVoorhis WC, Valinsky J, Hoffman E, Luban J, Hair LC, Steinman RM. Relative Efficacy of human monocyte and dendritic cell as accessory cell for T cell replication. *J Exp Med* 1996;184:456-72.

- 12) Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton, Yin JA. Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:2764-71.
- 13) Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma, a randomised trial. *Lancet* 2000;356:802-7.
- 14) Tjoa B, Erickson S, Barren III R, Ragde H, Kenny G, Boynton A. In vitro propagated dendritic cells from prostate cancer immunotherapy. *Prostate* 1995;27:63-9.
- 15) Nestle FO, Aljagic S, Gillet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R. Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-32.
- 16) Reichardt VL, Okada CY, Liso A, Benike CJ, Stockerl-Goldstein KE, Engleman EG. diotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma feasibility study. *Blood* 1999;93:2411-9.
- 17) Hsu FJ, Benike F, Fagnoni. Vaccination of patients with B cell lymphoma using autologous antigen- pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:52-8.
- 18) Brugger W, Brossart P, Scheduling S, Stuhler G, Heinrich K, Reichardt V. Approaches to dendritic cell-based immunotherapy after peripheral blood stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 1999;872:363-71.
- 19) Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 2000;88:1149-54.
- 20) Tisell LE, Dille WG, Wells SA Jr. Progression of postoperative residual medullary thyroid carcinoma as monitored by plasma calcitonin levels. *Surgery* 1996;119:34-9.
- 21) van Heerden JA, Grant CS, Gharib H, Hay ID, Ilstrup DM. Long-term course of patients with persistent hypercalcitoninemia after apparent curative primary surgery for medullary thyroid carcinoma. *Ann Surg* 1990;212:395-400.
- 22) Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia. *Nature* 1989;339:58-61.
- 23) Jiang WG, Puntis MCA, Hallett MB. Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis, implications for treatment. *Br J Surg* 1994;81:1576-90.
- 24) Liotta LA, Stracke ML. Tumor invasion and metastases biochemical mechanisms. *Cancer treat Res* 1988;40:223-38.
- 25) Liotta LA, Saidel G, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* 1976;36:889-94.
- 26) Pardoll DM. Cancer vaccines. *Nat Med* 1998;4:525-31.
- 27) Ockert D, Schmitz M, Hampl M, Riever EP. Advances in cancer immunotherapy. *Immunol Today* 1999;20:63-5.
- 28) Nestle FO, Burg G, Dummer R. New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today* 1999;20:5-7.
- 29) Colaco C. DC-based cancer immunotherapy. the sequel. *Immunol Today* 1999;20:197-8.
- 30) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
- 31) Bottomly K. Immunology-T cells and dendritic cells get intimate. *Science* 1999;283:1124-5.
- 32) Fernandez NC, Lozier A, Flament C. Dendritic cells directly trigger NK cell functions. Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999;5:405-11.
- 33) Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNJ. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1999;93:728-36.
- 34) Austyn JM. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 1996;183:1287-92.
- 35) Matsuno K, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y. A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 1996;183:1865-78.
- 36) Sozzani S, Allavena P, D'Amico G. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation. A model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998;161:1083-6.
- 37) Lotze MT. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. *Ann Surg* 1997;226:1-5.
- 38) Brugger W, Schneider A, Schammann T, Dill P, Grunebach F, Buhning HJ. Dendritic cell-based vaccines in patients with hematological malignancies. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:359-62.
- 39) Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and down regulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-18.
- 40) Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992;360:258-61.
- 41) Hart DNJ. Dendritic cells. Unique leukocyte populations, which control the primary immune response. *Blood* 1997;90:3245-87.