

## 다발성골수종 세포주로 부가된 단구-유래 수지상세포를 이용한 골수종 세포주-특이 세포독성 T 림프구의 유도

<sup>1</sup>화순전남대학교병원 암백신팀, <sup>2</sup>전남대학교 의과대학 혈액종양내과,  
<sup>3</sup>순천향대학교 의과대학 혈액종양내과, <sup>4</sup>공주대학교 산업과학대학 특수동물학과

박명숙<sup>1,2</sup> · 박정선<sup>1,2</sup> · 강현규<sup>1,2</sup> · 김상기<sup>1,2,4</sup> · 원종호<sup>3</sup> · 최보화<sup>1,2</sup>  
신시원<sup>1,2</sup> · 주효미<sup>1,2</sup> · 김춘희<sup>1</sup> · 니엔판탄난<sup>1,2</sup> · 조 덕<sup>1</sup> · 남종희<sup>1</sup>  
김영진<sup>1</sup> · 김여경<sup>2</sup> · 양덕환<sup>2</sup> · 정익주<sup>1,2</sup> · 김형준<sup>2</sup> · 이제중<sup>1,2</sup>

### Induction of Myeloma Cell Line-specific Cytotoxic T Lymphocytes using Monocyte-derived Dendritic Cells Pulsed with Myeloma Cell Line Lysates

Myong-Suk Park<sup>1,2</sup>, Jung-Sun Park<sup>1,2</sup>, Hyun-Kyu Kang<sup>1,2</sup>, Sang-Ki Kim, D.V.M.<sup>1,2,4</sup>, Jong-Ho Won, M.D.<sup>3</sup>, Bo-Hwa Choi<sup>1,2</sup>, Shi-Won Shin<sup>1,2</sup>, Xiao-Wei Zhu<sup>1,2</sup>, Chun-Ji Jin<sup>1</sup>, Thanh-Nhan Nguyen Pham<sup>1,2</sup>, Duck Cho, M.D.<sup>1</sup>, Jong-Hee Nam, M.D.<sup>1</sup>, Young-Jin Kim, M.D.<sup>1</sup>, Yeo-Kyeong Kim, M.D.<sup>2</sup>, Deok-Hwan Yang, M.D.<sup>2</sup>, Ik-Joo Chung, M.D.<sup>1,2</sup>, Hyeoung-Joon Kim, M.D.<sup>2</sup> and Je-Jung Lee, M.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Cancer Vaccine Team, Chonnam National University Hwasun Hospital, Jeonnam, <sup>2</sup>Department of Hematology-Oncology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, <sup>3</sup>Department of Hematology-Oncology, Soon Chun Hyang University College of Medicine, Seoul, <sup>4</sup>Department of Companion Laboratory Animal, Science College of Industrial Science, Kongju National University, Gongju, Korea

**Background:** In multiple myeloma (MM), the idiotype (ID) determinant of the paraprotein has been used for immunotherapy using dendritic cells (DCs). However, ID-specific immune responses showed limited clinical responses after the Id vaccination. Therefore, an alternative approach using DCs pulsed with other tumor antigens is required.

**Methods:** We investigated the possibility of immunotherapy for MM using myeloma cell line-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs), that were stimulated *in vitro* by monocyte-derived DCs pulsed with the myeloma cell line lysates. CD14<sup>+</sup> cells isolated from the peripheral blood of HLA-A0201<sup>+</sup> healthy donors were cultured in the presence of GM-CSF and IL-4. On day 6, the immature DCs were pulsed with the myeloma cell line lysates (IM-9: HLA0201<sup>+</sup> and ARH-77: HLA0201<sup>+</sup>), and then maturation of DCs was induced by the addition of TNF- $\alpha$  for 2 days. CTL lines were generated by a 2 time stimulation with DCs to the autologous CD3<sup>+</sup> T cells.

**Results:** DCs pulsed with myeloma cell lysates showed the production of IL-12p70, but less than that of unpulsed DCs. CTLs lines stimulated with the DCs pulsing, for the myeloma cell line lysates, showed potent cytotoxic activities against autologous target cells, but not against HLA-A2<sup>-</sup> cell lines (RPMI-8226). Mature DCs pulsed with the myeloma cell line lysates showed a higher stimulatory capacity for autologous CTL when compared with mature non-pulsed DCs.

접수 : 2006년 1월 31일, 수정 : 2006년 7월 23일

승인 : 2006년 9월 12일

교신저자 : 이제중, 전남 화순군 화순읍 일심리 160번지

☎ 519-809, 화순전남대학교병원 혈액종양내과

Tel: 061-379-7638, Fax: 061-379-7628

E-mail: drjejung@chonnam.ac.kr

본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어연구개발사업인 세포융합연구사업단(SC3290) 및 산업자원부 지방혁신사업(RTI 05-01-01)의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

Correspondence to : Je-Jung Lee, M.D., Ph.D.

Department of Hematology-Oncology, Chonnam National University Hwasun Hospital

160, Ilshim-ri, Hwasun-eup, Hwasun-gun, Jeonnam 519-809, Korea

Tel: +82-61-379-7638, Fax: +82-61-379-7628

E-mail: drjejung@chonnam.ac.kr

**Conclusion:** These results suggest that DCs pulsed with the myeloma cell line lysates can generate potent myeloma cell line-specific CTLs for the myeloma cell-based immunotherapeutic approach in MM. (*Korean J Hematol* 2006;41:186-193.)

**Key Words:** Dendritic cells, Myeloma, Lysate, Cell line

## 서 론

다발성골수종은 B세포 클론에서 유래된 악성 형질 세포 질환으로, 고식적인 항암화학요법 또는 고용량 항암화학요법 및 자가 조혈모세포이식 등의 도입에도 불구하고 여전히 완치가 어려운 질환으로 남아있다.<sup>1,2)</sup> 근래에 동종 골수이식 후 재발한 다발성골수종에서 공여자 림프구 주입술로 임상적인 반응을 유도할 수 있음이 잘 알려져 있다.<sup>3-5)</sup> 이러한 일련의 보고는 임상적으로 매우 중요한 면역-매개성(immune-mediated) 동종 이식편대골수종(graft-versus-myeloma) 효과가 유도될 수 있음을 시사하고 있으며, 이는 다발성골수종에서 면역세포를 이용한 세포면역치료가 새로운 치료 방법 중의 하나로 도입될 수 있는 이론적 근거를 제시하고 있다.<sup>3)</sup>

그동안 다발성골수종에서 수지상세포를 이용한 세포면역치료에 대한 기초연구 및 임상연구가 다양하게 시도되었는데, 대표적으로는 종양항원으로 유전형(idiotype, ID) 단백질을 이용하는 것이다. ID는 B세포 림프종이나 다발성골수종에서 생산되는 면역글로블린에 발현되어 있는 paraprotein의 결정체로서, 종양세포에만 국한되어 있어서 종양-특이 표지자로 간주되며, 면역치료에 있어서 종양항원으로 이용될 수 있다.<sup>5-10)</sup> 종양항원으로 ID가 부가된 수지상세포를 이용하여 세포면역치료를 시행하였을 때, 다발성골수종 환자의 25~100%에서 특이적인 면역반응이 유도되었지만, 임상적인 반응으로는 소수의 환자에서만 M-단백이 감소되는 실망스러운 결과를 보였는데, 이는 종양항원으로 이용된 ID의 항원력이 매우 약해서 이러한 임상 결과를 보인 것으로 생각되고 있다.<sup>11-13)</sup> 따라서 다발성골수종에서 수지상세포를 이용한 세포면역치료의 효과를 증진시키기 위해서는 종양항원으로 이용되는 ID 단백질을 대체할 수 있는 새로운 종양항원이 요구되었으며, 다른 종양에서와 유사하게 환자 골수의 다발성골수종 세포를 직접 이용하는 방법이 있겠다. 근래에 골수종세포 용해질(lysates)을 부가한 수지상세포,<sup>13)</sup> 수지상세포에 골수종세포 RNA를 이입(transfection)시키

는 법,<sup>14)</sup> 골수종-유래 Heat shock protein (Hsp)을 부가한 수지상세포,<sup>15)</sup> 또는 골수종세포와 수지상세포를 융합(fusion)시키는 방법<sup>16-19)</sup> 등이 보고되고 있다.

저자들은 다발성골수종 세포주의 용해질로 부가된 단구-유래 수지상세포로 자극된 골수종-특이 T 림프구를 이용한 세포면역치료의 가능성을 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포주 준비

인간 다발성골수종 세포주로 HLA-A2 양성인 IM-9 (HLA-A0201<sup>+</sup>, HLA-A0205<sup>+</sup>)과 ARH-77 (HLA-A0201<sup>+</sup>) 세포주, HLA-A2 음성인 RPMI-8226 (HLA-A40<sup>+</sup>, HLA-A68<sup>+</sup>) 세포주를 순천향의대 원종호 선생님께서로부터 받았으며, 수지상세포에서 IL-12 생산을 자극하기 위하여 사용된 CD40L-transfected J558 세포주는 Pawel Kalinski (University of Pittsburgh, PA, USA)에게서 받았다. 다발성골수종 세포주는 RPMI-1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS (Gibco-BRL)와 1% penicillin-streptomycin (GIBCO-BRL)을 첨가하여 배양하였으며, CD40L-transfected J558 세포주는 IMDM (Gibco-BRL)에 10% FBS (GIBCO-BRL)와 1% penicillin-streptomycin (GIBCO-BRL)을 첨가하여 배양하였다.

### 2. 단구-유래 미성숙 수지상세포의 제조

HLA-A0201<sup>+</sup> 정상 성인으로부터 헤파린 처리된 튜브에 말초혈액을 100mL 채혈한 후, Ficoll-Hypaque (Lymphoprep<sup>TM</sup>, Nycomed, Oslo, Norway)을 이용한 비중 원침법으로 단핵구를 분리하였다. Mini-Magnetic-activated cell sorting (Mini-MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)을 이용하여 단핵구로부터 CD14<sup>+</sup> 세포를 분리한 후, 배양액 1mL당  $1 \times 10^6$  세포의 농도로 GM-CSF (LG biochemicals, Daejeon, Korea) 50ng/mL, IL-4 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 50ng/mL을 첨가하여 배양하였다. 실험에 사용된 배양액은 RPMI-1640 (Gibco-BRL)에 10% FBS (Gibco-BRL)와 1% peni-

cillin-streptomycin (GIBCO-BRL)을 첨가하여 사용하였다. 배양 2일과 4일째에 동일한 농도의 사이토카인을 추가하였으며, 배양 6일째에 미성숙 수지상세포를 수확하였다.

### 3. 골수종 세포주 용해질(myeloma cell line lysates)의 제조

골수종 세포주 용해질은 HLA-A0201<sup>+</sup> 세포주인 IM-9과 ARH-77을 이용하였으며, 세포를 PBS (Gibco-BRL)로 1,000rpm에서 10분 동안 원심분리기를 이용하여 2회 세척한 후, protease 억제제가 첨가된 PBS 1mL에 재부유하여 동결(질소액)과 해빙(37°C)을 5차례 반복하여 골수종 세포주 용해질을 제조하였으며, 용해질은 SDS-PAGE로 확인하였고, Bradford assay를 사용하여 단백질량을 분석하였다.

### 4. 골수종 세포주 용해질의 부가 및 성숙 수지상세포의 유도

미성숙 수지상세포  $2 \times 10^5$ 당 골수종 세포주 용해질  $10 \mu\text{g}$ 을 부가한 후 2시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시켰다. 이후 새로운 배양액에 TNF- $\alpha$  (R&D systems) 50ng/mL를 첨가하여 2일 동안 배양하여 성숙 수지상세포를 유도하였다.

### 5. 배양된 세포의 형태학적 관찰

배양 후 수확한 세포( $3 \times 10^4$  세포)를 400rpm에서 5분 동안 세포원심분리기를 이용하여 슬라이드에 부착시킨 후, May-Grünwald-Giemsa 염색을 실시하였고, 광학 현미경으로 관찰하였다.

### 6. 유세포분석기를 이용한 면역표현형 분석

수확한 수지상 세포를 마우스 단클론항체를 이용하여 유세포분석기로 면역표현형을 알아보았다. 사용된 항체는 CD14-FITC, HLA-DR-FITC, CD86-FITC, CD40-FITC (fluorescein isothiocyanate), CD54-PE (phycoerythrin), CD1a-PE, CD80-PE, CD83-PE, CD54-PE (PharMingen, San Diego, CA, USA)이었다. 또한 isotype control을 각각 반응시켰으며, 각 튜브당 최소한 5,000개의 세포를 FACS Caliber (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로 얻었으며, 데이터의 분석은 CELLQUEST software (Becton Dickinson)을 이용하였다.

### 7. Interleukin-12p70 분비능

IL-12 분비를 자극하기 위하여 수확한 수지상세포를

well당  $2 \times 10^4$  세포로 96-well plate에 넣은 후에 CD40L-transfected J558 cells을 well당  $5 \times 10^4$  세포를 추가한 후에 배양하였다. 배양 24시간째 얻은 부유액에서 IL-12p70 ELISA (Endogen, Woburn, MA)를 시행하였다.

### 8. 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)의 제조 및 세포독성능(cytotoxicity)

수지상세포의 유도에 이용된 동일한 정상 성인의 말초혈액 단핵구로부터 Mini-MACS (Miltenyi Biotec)를 이용하여 CD3<sup>+</sup> 세포를 분리하였다.

세포독성 T 림프구의 제조는 이전의 보고와 같이 수행하였다.<sup>21-24)</sup> 골수종 세포주 용해질이 부가된 성숙 수지상세포를 수확하여 방사선을 조사(30Gy)한 후, CD3<sup>+</sup> 세포와 1 : 5의 비율로 RPMI1640 배양액에서 2일 동안 배양하였다. 배양 2일 후 세포를 IL-2 (R&D systems) 10ng/mL와 IL-7 (R&D systems) 5ng/mL이 함유된 배양액(RPMI1640 : AIM-V=1 : 1, containing 10% FBS)에서 5일 동안 배양하였다. 배양 7일째 세포를 수확하여 동일한 수지상세포로 다시 한번 자극을 시행한 후 IL-2 (10ng/mL)와 IL-7 (5ng/mL)이 함유된 배양액에서 다시 7일 동안 배양하여 세포독성 T 림프구를 제조하였다. 배양 기간 동안 배양액의 절반을 3~4일 간격으로 교환해 주었다.

제조된 세포독성 T 림프구(작동세포, effector cell: E)의 세포독성 시험은 표적세포(target cell: T)로 다발성골수종 세포주(IM-9, ARH-77, RPMI-8226)를 이용하여 IFN- $\gamma$  release Elispot 측정기로 분석하였다. 작동세포(E)와 표적세포(T)의 비율을 40 : 1, 20 : 1, 10 : 1로 일차 IFN- $\gamma$  단클론항체가 코팅된 nitrocellulose-bottomed 96-well multitestplates (MTP)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 공조배양하였다. 배양 24시간 후 plates를 세척하였고, biotin-conjugated secondary anti-human IFN- $\gamma$  항체를 첨가하여 2.5시간 배양한 후 PBS-Tween buffer로 세척하고 streptavidin-HRP를 2시간 동안 반응시켰다. 반응된 plates를 PBS-Tween과 PBS buffer로 세척한 후 3-amino-9-ethylcarbazol substrate를 15~70분 동안 반응시켰다. 반응은 tap water로 정지시켰으며 AID Elispot-Reader ELR02 (Ebinger Stra  $\beta$ e4 D72479, Stra  $\beta$ berg, Germany)와 computer-assisted video image analysis (CVIA)를 이용하여 세포독성 T 림프구에서 분비된 IFN- $\gamma$  spots을 측정하였다.

## 9. 자가 세포독성 T 림프구 증식 반응(autologous CTL proliferation assay)

골수종 세포주 용해질이 부가된 수지상세포로 자극되어 유도된 세포독성 T 림프구의 자가 수지상세포에 대한 증식력을 측정하기 위해서 [ $^3\text{H}$ ]-methylthymidine incorporation assay를 이용하였다.

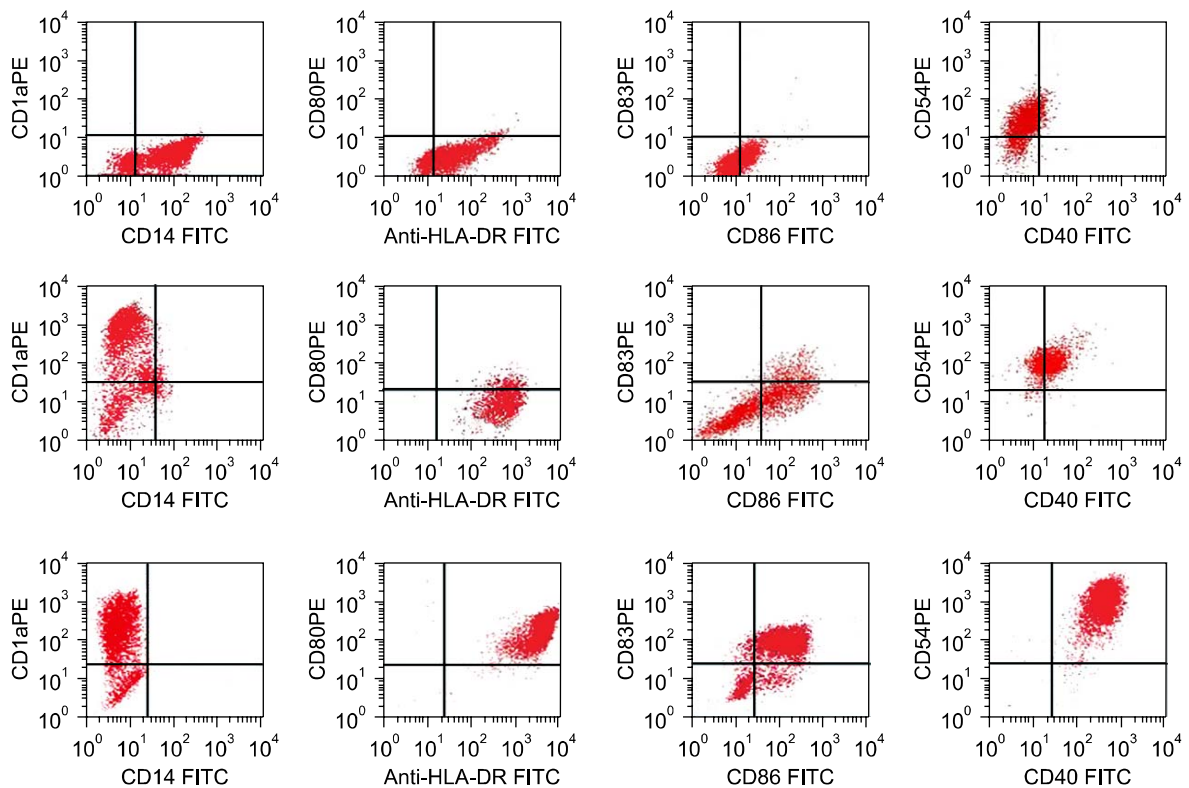
배양 후 수확한 세포독성 T 림프구( $5 \times 10^4/\text{well}$ )를 방사선이 조사된 여러 용량( $3.2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ )의 수지상세포(골수종 세포주 용해질이 부가된 수지상세포와 용해질이 부가되지 않는 수지상세포)와 96-well U bottomed culture plate에서 배양하였다. 배양 5일째에 각 well당  $1 \mu\text{Ci}$  ( $0.037 \text{ MBq}$ ) [ $^3\text{H}$ ]-methylthymidine을 첨가하여 16~18시간 동안 배양한 후, 수확하여 liquid scintillation counter (Beckman, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 데이터를 분석하였고, 그 결과는 평균 cpm ( $\pm$  표준편차)을 구하여 비교하였다.

## 결 과

### 1. 수지상세포의 형태학적 특징 및 면역표현형 발현 양상

CD14<sup>+</sup> 세포를 6일 동안 GM-CSF와 IL-4를 이용하여 배양하였을 때, May-Grünwald-Giemsa 염색에서 세포의 외부를 불규칙한 막이 둘러싸고 있는 전형적인 미성숙 수지상 세포의 특징을 보였으며, TNF- $\alpha$ 를 첨가하여 성숙이 유도된 배양 8일째의 세포는 미성숙 수지상세포보다 크기가 더 컸고 돌기모양이 돌출된 전형적인 성숙 수지상세포의 특징을 보였다. 그러나 미성숙 수지상세포에 골수종세포주 용해질이 부가되어 성숙이 유도된 세포와 부가되지 않는 세포 사이에 형태학적인 차이는 없었다.

유세포분석기를 이용한 면역표현형 검사에서 배양 6일째 수확한 세포는 CD1a, HLA-DR, CD40, CD54의 발현이 증가되었으며, CD80과 CD86의 발현이 약간 증가되었지만, CD14의 발현은 감소하여 전형적인 미성



**Fig. 1.** Phenotypic analysis of monocytes (top panel), immature dendritic cells (DCs) (middle panel), or mature DCs (bottom panel). CD14<sup>+</sup> cells isolated from the MNCs of normal donor by MACS were cultured with a combination of GM-CSF and IL-4. On day 6, the immature DCs (middle panel) were pulsed with tumor antigens, and then maturation was induced by the addition of TNF- $\alpha$  (bottom panel).

숙 수지상세포의 면역 표현형을 보였다(Fig. 1). 8일째 수확한 세포는 CD80, CD83, CD86과 CD40의 발현이 현저하게 증가되어 전형적인 성숙 수지상세포의 면역 표현형을 보였다(Fig. 1). 그러나, 골수종세포주 용해질이 부가되어 성숙이 유도된 세포와 부가되지 않는 세포 사이에 면역 표현형의 발현에 차이는 없었다.

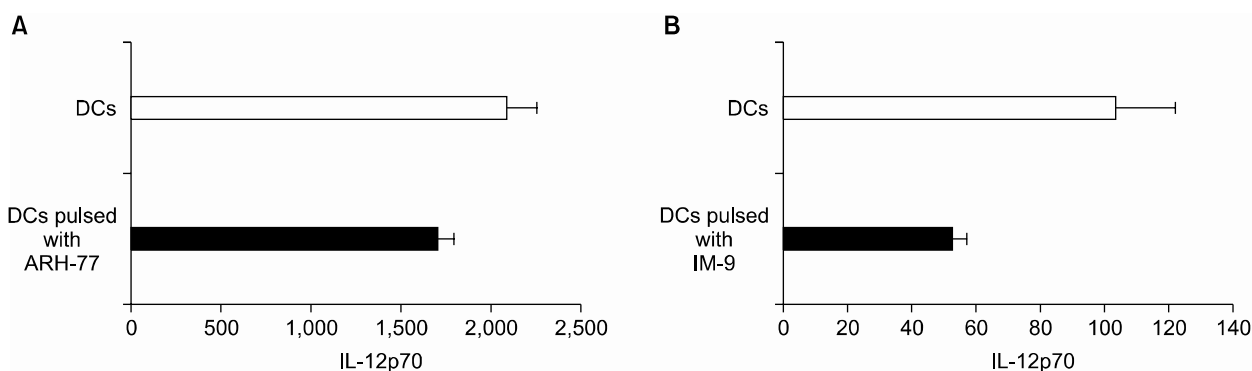
## 2. 수지상세포에서 IL-12p70의 생산

수확한 수지상세포에서 CD40L-transfected J558 세포주를 이용하여 IL-12p70의 생산을 자극하였을 때, 골수종 세포주(IM-9과 ARH-77) 용해질이 부가된 수지상세포에서 IL-12의 분비를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 그러나, 종양항원이 부가된 수지상세포는 종양항원이 부가되지 않는 수지상세포에 비하여 IL-12p70의 분비

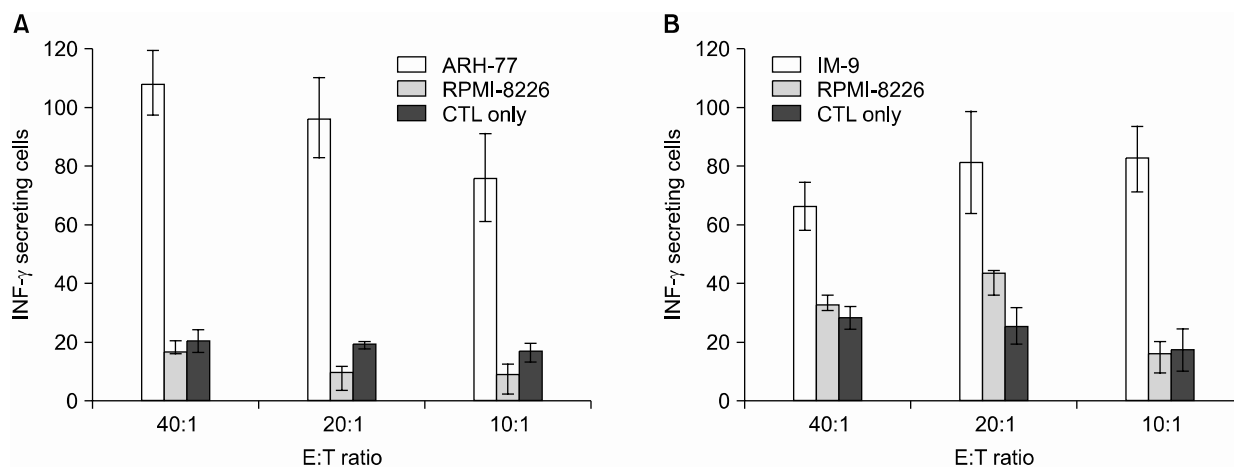
능이 저하되었다.

## 3. 수지상세포로 유도된 세포독성 T 림프구의 강력한 세포독성능

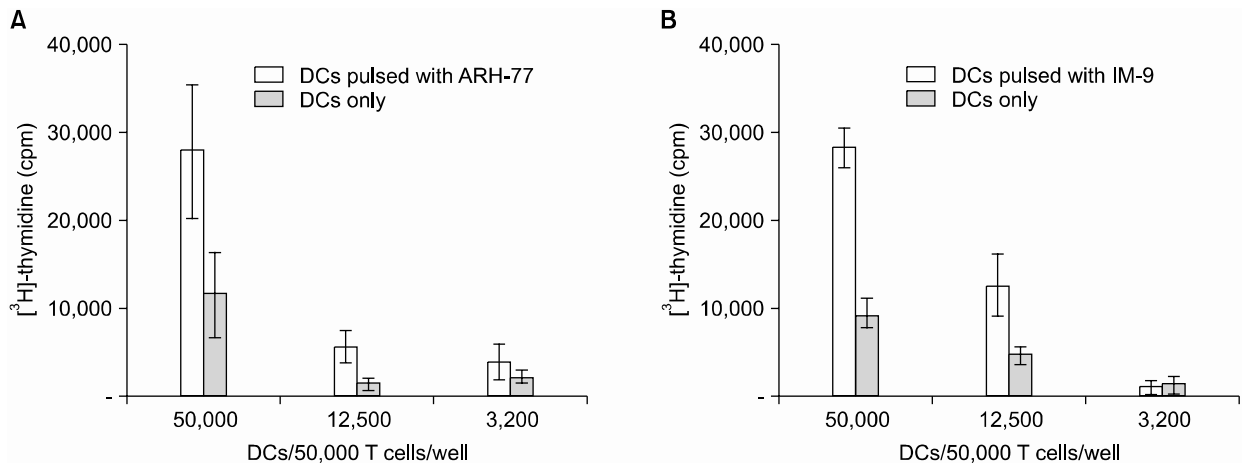
HLA-A0201<sup>+</sup> 정상 공여자의 말초혈액 단구-유래 수지상세포에 골수종 세포주 용해질(IM-9, ARH-77)을 부가한 후에 자가 CD3<sup>+</sup> T 세포를 2차례 자극하여 골수종 세포주-특이 세포독성 T 림프구를 제조하여서 IFN- $\gamma$  Elispot assay을 이용하여 세포독성능을 평가하였다. 표적 세포는 자가 골수종 세포주(IM-9, ARH-77)와 HLA-A2<sup>-</sup>인 RPMI-8226 세포주를 이용하였다. 골수종 세포주(IM-9, ARH-77) 용해질로 부가된 수지상세포로 자극되어 유도된 세포독성 T 림프구는 RPMI-8226 표적세포보다 자가 표적세포(IM-9, ARH-77)에 대해



**Fig. 2.** Production of IL-12 by DCs pulsed with or without myeloma cell line lysates (A: ARH-77, B: IM-9) after the stimulation with CD40L-transfected J558 cells for 24 hr. IL-12p70 concentrations in 24 hr supernatants were determined by ELISA. Results, expressed as mean  $\pm$  SD of duplicate culture, are from one representative experiment of two.



**Fig. 3.** ELISPOT data showing the mean number of spots and standard deviation per  $1 \sim 4 \times 10^5$  T cells. Comparison of IFN- $\gamma$  secreting cells of CTL generated from stimulation with DCs pulsed with ARH-77 lysates (A) or IM-9 lysates (B) against autologous myeloma cell line lysates or RPMI-8226. The data are shown as the mean IFN- $\gamma$  secreting cell ( $\pm$ SD) of duplicate culture from one representative experiment of two.



**Fig. 4.** T cell-stimulatory capacity of DCs with or without myeloma cell line lysates (ARH-77: A, IM-9: B) for CTLs that were generated from stimulation with DCs with myeloma cell line lysates. The data are shown as the mean cpm ( $\pm$ SD) of triplicate cultures from one representative experiment of two.

서 현저한 IFN- $\gamma$  분비능을 보여서, 골수종 세포주-특이 세포독성 T 림프구가 골수종 세포주에 대하여 강력한 세포독성능이 있음을 보여주었다(Fig. 3).

#### 4. 세포독성 T 림프구가 자가 수지상세포에 대하여 강력한 세포증식능력

HLA-A0201<sup>+</sup> 정상 공여자의 단구-유래 수지상세포에 골수종 세포주 용해질(IM-9, ARH-77)을 부가한 후에 제조된 골수종 세포주-특이 세포독성 T 림프구가 자가 수지상세포에 반응해서 세포증식력을 보이는지를 평가하기 위해서 [<sup>3</sup>H]-methylthymidine incorporation assay를 이용하였다. 골수종 세포주 용해질이 부가된 수지상세포로 자극되어 유도된 세포독성 T 림프구는 골수종 세포주 용해질이 부가된 자가 수지상세포로 다시 자극하였을 때 골수종 용해질이 부가되지 않는 수지상세포에 비하여 강력한 T 세포 증식력을 보였다(Fig. 4).

## 고 찰

본 연구에서는 수지상세포에 부가되는 종양항원으로 다발성골수종 세포주의 용해질을 이용하여서 골수종 세포주-특이 세포독성 T 림프구의 유도가 가능하였고, 제조된 세포독성 T 림프구는 자가 골수종 세포주에 특이적인 세포독성을 보였다. Wen 등<sup>13)</sup>도 다발성골수종에서 종양항원으로 종양용해질을 이용하여 보고하였는데, 이들은 환자의 골수 검체로부터 골수종 세포 용해질을 제조하여서 수지상세포에 부가하였을 때 ID 항원을 부가한 수지상세포와 비교하여 골수종

세포에 보다 특이성이 높은 세포독성 T 림프구가 유도되어서, 다발성골수종에서 종양의 항원성이 약한 ID보다 골수종 세포를 직접 이용하는 방법이 더 유용함을 시사하고 있다.

그러나, 근래에 Fiore 등<sup>24)</sup>은 골수종 세포주를 이용하여 종양용해질을 제조하여 수지상세포에 부가하였을 때와는 달리, 환자의 골수종세포를 이용하였을 때는 수지상세포 내로 괴사성 종양용해질의 유입 효율이 매우 낮고, 환자의 골수종세포 용해질이 부가된 수지상세포는 Th1형 유도에 필수적인 사이토카인으로 알려진 IL-12의 분비능은 보이지 않고 오히려 IL-10을 다량 분비하였으며, 이러한 수지상세포로 자극된 T 세포는 세포증식력이 감소될 뿐만 아니라 IFN- $\gamma$ 의 분비능도 감소되어서 효과기 표현형(effector phenotype)보다는 오히려 조절성 표현형(regulatory phenotype)을 보여서, 다발성골수종에서 수지상세포를 이용한 세포치료에 있어서 다발성골수종 세포로부터 괴사성 종양용해질을 제조하여 이용하는 데 문제점이 있음을 제시하였는데, 이러한 보고에 대해서는 향후 후속 연구를 통하여 검증되어야 하겠다.

ID의 약한 항원력을 극복하기 위한 대체 종양항원으로 골수종세포 용해질 이외에도 여러 가지 종양항원에 대한 연구가 있었다. 이 중 가장 활발하게 연구되고 있는 분야가 미성숙 또는 성숙 수지상세포에 다발성골수종 세포를 직접 융합시키는 방법이다. Gong 등<sup>16)</sup>은 마우스 모델에서 골수종세포를 수지상세포에 융합하여서 백신치료를 하였을 때 마우스의 생존이 연장되었고, IL-12에 의해서 이러한 면역반응이 더욱 증가됨을

보고하였다. Raje 등<sup>17)</sup>은 인간 다발성골수종 세포주를 수지상세포에 융합하여서 다발성골수종 세포주-특이 세포독성능의 유도를 보고하였으며, Vasir 등<sup>19)</sup>은 다발성골수종 환자의 골수로부터 골수종세포를 분리하여 수지상세포와 융합하였을 때 IL-12의 분비가 증가되었고, 이러한 융합세포로 자극된 자가 T 세포는 IFN- $\gamma$  분비능과 표적세포인 골수종세포에 대하여 강력한 세포독성능을 보여서, 종양세포와 수지상세포를 융합하는 방법이 향후 암백신 치료에 매력적인 방법이 될 수 있음을 제시하고 있다.

근래 보고된 또 다른 종양항원으로는 고형암에서 이미 많이 연구가 진행되었던 HSP으로, 골수종-유래 Hsp gp96을 제조하여서 수지상세포에 부가하였을 때 정상 세포에는 영향을 미치지 않으면서 골수종세포에만 강력한 살상능을 보이는 골수종-특이 세포독성 T 림프구가 제조됨을 보고하였는데, 이는 이론적으로 동종 종양세포로부터 Hsp를 얻어서 다른 환자에게 백신치료를 시행할 수 있음을 시사하고 있다.<sup>15)</sup>

그러나, 근본적으로 다발성골수종 환자는 정상인에 비해서 말초혈액에 골수성(myeloid) 및 형질세포성(plasmacytoid) 수지상세포의 전구체 숫자가 매우 적고, 또한 다발성골수종 환자의 단구-유래 수지상세포는 정상 대조군에 비해서 HLA-DR, CD40 및 CD80의 발현이 유의하게 낮을 뿐만 아니라 동종 T 세포 자극력도 매우 낮은 단점을 가지고 있는데, 이는 다발성골수종의 병인에 매우 중요하게 관여하는 IL-6가 CD34<sup>+</sup> 수지상세포 전구체의 집락형성을 억제하고 수지상세포로의 분화도 억제하고 있음이 규명되어서, 다발성골수종에서 수지상세포를 이용한 면역치료를 시행함에 있어서 이러한 단점을 극복하기 위한 후속 연구가 필요하겠다.<sup>25)</sup>

결론적으로 다발성골수종 세포주 용해질이 부가된 정상인 단구-유래 수지상세포로 다발성골수종 세포주에 강력한 세포독성능을 지닌 다발성골수종 세포주-특이 세포독성 T 림프구의 제조가 가능하게 되었다. 이는 다발성골수종에서 수지상세포를 이용한 세포면역치료를 있어서 기초적인 토대를 제공하였으며, 향후 다발성골수종 환자의 골수종 세포를 이용한 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경:** 다발성골수종에서 수지상세포를 이용한 세포면역치료의 종양항원으로 유전형 단백질이 널리 이용

되어 왔으나, 유전형-특이 면역반응에 대한 임상 효과는 제한적이었다. 따라서 이를 대체할 수 있는 다른 종양항원에 대한 연구가 필수적이다. 저자들은 다발성골수종 세포주 용해질로 부가된 단구-유래 수지상세포로 자극된 골수종 세포주-특이 세포독성 T 림프구를 이용한 세포면역치료의 가능성을 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

**방법:** HLA-A0201<sup>+</sup> 정상 공여자의 말초혈액으로부터 단구(CD14<sup>+</sup>)를 분리하여 GM-CSF와 IL-4로 6일간 배양하여 유도된 미성숙 수지상세포에 골수종 세포주 용해질(IM-9: HLA0201<sup>+</sup>, ARH-77: HLA0201<sup>+</sup>)을 부가하였고, TNF- $\alpha$ 를 첨가하여 2일간 배양한 후 성숙 수지상세포를 얻었다. 성숙 수지상세포로 자가 CD3<sup>+</sup> T 세포를 2차례 자극한 후 세포독성 T 림프구를 제조하였다.

**결과:** 골수종 세포주 용해질이 부가된 수지상세포는 CD40L-transfected J558 세포주의 자극에 의해서 IL-12p70의 분비를 보였지만, 용해질이 부가되지 않은 수지상세포에 비하여 IL-12p70의 분비능은 낮았다. 골수종 세포주 용해질로 부가된 수지상세포로 자극되어 제조된 세포독성 T 림프구는 HLA-A2<sup>+</sup> 표적세포(RPMI-8226)와 비교하여 자가 표적세포(HLA0201<sup>+</sup>: IM-9 및 ARH-77)에 대하여 강력한 세포독성능을 보였다. 골수종세포주 용해질이 부가된 수지상세포는 용해질이 부가되지 않은 수지상세포와 비교해서 자가 세포독성 T 림프구에 대하여 강력한 증식 능력을 보였다.

**결론:** 골수종 세포주 용해질로 부가된 수지상세포로 강력한 골수종 세포주-특이 세포독성 T 림프구의 제조가 가능하여서, 향후 다발성골수종에서 종양용해질로 부가된 수지상세포를 이용한 세포면역치료의 가능성을 제시해 주었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. N Engl J Med 2004;351:1860-73.
- 2) Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. Lancet 2004; 363:875-87.
- 3) Harrison SJ, Cook G. Immunotherapy in multiple myeloma--possibility or probability? Br J Haematol 2005;130:344-62.
- 4) Tricot G, Vesole DH, Jagannath S, Hilton J, Munshi N, Barlogie B. Graft-versus-multiple myeloma effect: proof of principle. Blood 1996;87:1196-8.
- 5) Perez-Simon JA, Martino R, Alegre A, et al. Chronic

- but not acute graft-versus-host disease improves outcome in multiple myeloma patients after non-myeloablative allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2003;121:104-8.
- 6) Bergenbrant S, Yi Q, Osterborg A, et al. Modulation of anti-idiotypic immune response by immunization with the autologous M-component protein in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 1996;92: 840-6.
  - 7) Osterborg A, Yi Q, Henriksson L, et al. Idiotypic immunization combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in myeloma patients induced type I, major histocompatibility complex-restricted, CD8- and CD4-specific T-cell responses. *Blood* 1998;91:2459-66.
  - 8) Wen YJ, Ling M, Bailey-Wood R, Lim SH. Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1998; 4:957-62.
  - 9) Lim SH, Bailey-Wood R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer* 1999;83:215-22.
  - 10) Reichardt VL, Okada CY, Liso A, et al. Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma-a feasibility study. *Blood* 1999;93: 2411-9.
  - 11) Lim SH, Bailey-Wood R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer* 1999;83:215-22.
  - 12) Osterborg A, Yi Q, Henriksson L, et al. Idiotypic immunization combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in myeloma patients induced type I, major histocompatibility complex-restricted, CD8- and CD4-specific T-cell responses. *Blood* 1998;91:2459-66.
  - 13) Wen YJ, Min R, Tricot G, Barlogie B, Yi Q. Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood* 2002;99:3280-5.
  - 14) 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* 2003;101:977-82.
  - 15) Qian J, Wang S, Yang J, et al. Targeting heat shock proteins for immunotherapy in multiple myeloma: generation of myeloma-specific CTLs using dendritic cells pulsed with tumor-derived gp96. *Clin Cancer Res* 2005;11:8808-15.
  - 16) Gong J, Koido S, Chen D, et al. Immunization against murine multiple myeloma with fusions of dendritic and plasmacytoma cells is potentiated by interleukin 12. *Blood* 2002;99:2512-7.
  - 17) Raje N, Hideshima T, Davies FE, et al. Tumour cell/dendritic cell fusions as a vaccination strategy for multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004;125:343-52.
  - 18) Hao S, Bi X, Xu S, et al. Enhanced antitumor immunity derived from a novel vaccine of fusion hybrid between dendritic and engineered myeloma cells. *Exp Oncol* 2004;26:300-6.
  - 19) Vasir B, Borges V, Wu Z, et al. Fusion of dendritic cells with multiple myeloma cells results in maturation and enhanced antigen presentation. *Br J Haematol* 2005;129:687-700.
  - 20) Lee JJ, Takei M, Hori S, et al. The role of PGE(2) in the differentiation of dendritic cells: how do dendritic cells influence T-cell polarization and chemokine receptor expression? *Stem Cells* 2002;20:448-59.
  - 21) Lee JJ, Nam CE, Nam JH, et al. Generation of cytotoxic donor CD8+ T cells against relapsing leukemic cells following allogeneic transplantation by stimulation with leukemic cell- or leukemic lysate pulsed donor cell-derived dendritic cells. *Leuk Res* 2004;28: 517-24.
  - 22) Lee JJ, Kook H, Park MS, et al. Immunotherapy using autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with leukemic cell lysates for acute myeloid leukemia relapse after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Apher* 2004;19:66-70.
  - 23) Lee JJ, Choi BH, Nam JH, et al. The generation of leukemic dendritic cells from acute myeloid leukemia cells is potentiated by the addition of CD40L at the terminal maturation stage. *J Clin Apher* 2004;19: 130-6.
  - 24) Fiore F, Nuschak B, Peola S, et al. Exposure to myeloma cell lysates affects the immune competence of dendritic cells and favors the induction of Tr1-like regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2005;35:1155-63.
  - 25) Ratta M, Fagnoni F, Curti A, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 2002;100:230-7.