

동종 신경모세포종 중앙항원 탑재로 획득된 수지상세포의 중앙세포살해능

국립암센터 특수암센터 소아종양클리닉, ¹서울대학교 의과대학 소아과학교실, 암연구소

박현진 · 신희영¹ · 안효섭¹

Anti-tumor Cytotoxicity of Allogeneic Neuroblastoma Tumor Antigen-loaded Dendritic Cells

Hyeon Jin Park, M.D., Hee Young Shin, M.D.¹ and Hyo Seop Ahn, M.D.¹

Pediatric Oncology Branch, Specific Organs Cancer Center, National Cancer Center,

¹Department of Pediatrics, Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Despite of aggressive treatments, the long-term survival rate is about 30% in stage 4 neuroblastoma (NBL). Recently, dendritic cell (DC)-based immunotherapy is emerging as a promising tool in cancer treatment. But it is very difficult to get sufficient amount of autologous tumor as the source of tumor antigen in DC-based immunotherapy. The purpose of this study was to test whether DCs loaded with allogeneic NBL tumor antigens can prime effective anti-tumor immune responses.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were differentiated into immature DCs in the presence of GM-CSF and IL-4. As the source of tumor antigens, human neuroblastoma cell lines, SK-N-MC, SK-N-SH, and IMR-32, were used after induction of apoptosis by UV irradiation. The immature DCs were loaded with apoptotic tumor cells, and then cultured with PBMCs for priming the tumor antigen-specific T lymphocytes. The tumor-specific cytotoxicity of T lymphocytes against NBL cells was analysed after coculture.

Results: Incubation of DCs with apoptotic tumor cells effectively loaded DCs with tumor antigens and induced maturation of DCs. The tumor antigen-challenged T lymphocytes effectively killed the NBL cells, which were used as tumor antigens. Furthermore, the T lymphocytes showed a broad ranged cytotoxicity to all of the NBL cell lines, which were not challenged as tumor antigens.

Conclusion: This study showed that the apoptotic NBL tumor cells induced maturation of DCs and could be used as tumor antigens, and DCs loaded with apoptotic NBL tumor cells could induce effective anti-tumor specific cytotoxic T lymphocytes to allogeneic NBL tumors. (*Korean J Hematol* 2007;42: 136-145.)

Key Words: Dendritic cell, Immunotherapy, Allogeneic tumor antigen, Neuroblastoma

접수 : 2007년 3월 5일, 수정 : 2007년 3월 21일

승인 : 2007년 5월 24일

교신저자 : 안효섭, 서울시 종로구 연건동 28번지

☎ 110-744, 서울대학교 의과대학 소아과학교실

Tel: 02-2072-3625, Fax: 02-743-3455

E-mail: hsahn@snu.ac.kr

Correspondence to : Hyo Seop Ahn, M.D.

Department of Pediatrics, Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine

28, Yeongeon-dong, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea

Tel: +82-2-2072-3625, Fax: +82-2-743-3455

E-mail: hsahn@snu.ac.kr

서 론

소아 신경모세포종(neuroblastoma, NBL)은 소아의 중추신경계 외에서 발생하는 고형암 중 가장 흔한 종양으로 발견 당시 이미 골수나 여러 군데 뼈에 전이가 되어 병기가 4기인 경우가 70%에 이른다. 최근 고위험군 NBL의 치료는 고용량 항암화학요법을 그 기본으로 하고 있으며 고용량의 항암화학요법을 가능하게 하기 위해 조혈모세포이식을 시행하게 되고, 이식 후 재발의 원인이 되는 미세잔존암(minimal residual disease)의 제거를 위해 NBL의 분화를 촉진하는 *cis-retinoic acid*와 T 림프구의 활성을 촉진하는 IL-2가 투여된다.^{1,2)} 하지만 이러한 치료법의 개발에도 불구하고 4기 NBL 환자의 생존율 향상은 지난 30년간 거의 미미한 상태로 장기 생존율이 30%밖에 되지 않는다. 따라서 생존율의 향상을 위해 보다 효과적인 치료법의 개발이 요구되어 왔다.

1990년대 이후 종양-특이 항원(tumor-specific antigen) 혹은 종양-관련 항원(tumor-associated antigen), 유전자 등을 이용한 종양 면역요법(immunotherapy)의 개발이 활발하게 진행되어 왔다.³⁾ 최근 종양 면역요법에 매우 중요한 요소가 추가되었는데 바로 강력한 항원제시세포로서 초기면역 유도뿐 아니라 면역조절에 중요하게 관여하는 수지상세포(dendritic cells, DC)의 이용이다.^{4,5)} 암세포는 인체의 면역 감시를 피하는 기전을 가지고 있는데, DC는 바로 이러한 면역 반응의 공백을 해결해 주는 핵심 세포로서 종양항원을 획득하고 세포 내에서 처리하여 MHC에 항원 펩티드를 탐재하여 표현하므로써 종양항원-특이 T 림프구의 활성화를 강력히 유도하며, IL-12를 발현하여 T 림프구의 자멸사를 막고 T 림프구의 분화와 세포살해 T 림프구 활성을 유도할 뿐 아니라 자연살해세포의 활성을 증가시켜 항종양 면역반응을 높이는 것으로 나타났다. 그러므로 DC에 종양-특이 항원을 감작시키고 이를 이용하여 T 림프구를 활성화시킨다면 강력한 종양항원-특이 세포살해 T 림프구를 유도하여 암을 근본적으로 치료할 수 있는 가능성이 보이게 되었다.

종양항원을 탐재한 DC를 이용한 종양 면역치료는 그 효율을 높이기 위해 개선의 여지가 많다. 가장 큰 문제점은 소아기 종양을 포함해서 대부분의 고형 종양에서 정확히 규명된 종양-관련 항원이 없다는 것이다. 따라서 DC를 이용한 종양백신을 만들기 위해서는 특정한 종양항원이 규명되어 있지 않기 때문에 자신의

종양 자체를 항원의 제공원으로 사용해야 하며, 보다 많은 세포살해 T 림프구의 생성을 위해서는 여러 번, 많은 양의 종양 용해물(tumor lysate)로 탐재한 DC를 주입하는 것이 필요하므로 자신의 종양조직을 충분히 보유하고 있어야 하는 어려움이 있다. 또한 종양세포는 종양항원 외에도 다양한 자가항원을 가지고 있기 때문에 자신의 종양에서 획득한 항원을 탐재한 DC를 이용해서 여러 번 반복하여 종양백신을 주입하는 경우 자가면역질환의 발생에 대한 우려가 높아진다. 따라서 NBL뿐만 아니라 여러 종양에서 동종(allogeneic) 종양세포를 이용하는 면역요법이 이루어지고 있으나 그 효과가 만족할 정도는 아니다.⁶⁾ DC를 이용한 면역요법은 진술한 단점을 보완한다면 종양세포에 대한 숙주 자체의 면역반응, 특히 T 림프구 면역반응을 항진하는 것이므로 전이암 및 미세잔존암에 대해서도 치료가 가능하고 고용량의 화학요법 후에도 효과적으로 종양-특이 면역반응을 유도할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

본 연구에서는 말초혈액으로부터 유도된 DC에 NBL의 항원을 탐재하여 유도된 종양-특이 세포살해 T 림프구의 종양-특이 세포살해능을 확인하고, 이 종양-특이 세포살해 T 림프구가 동종 NBL (allogeneic NBL)에서도 효과적인 살해능을 나타내는지 확인하여 NBL에서 DC를 이용한 동종 종양백신의 활용 가능성을 실험적으로 평가하고, 임상적용을 위한 기초자료를 확보하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 말초혈 유래 수지상세포의 분화 유도

10명의 건강한 혈액 공여자의 말초혈을 Ficoll-Paque Plus (d=1.077, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용하여 단핵구 층을 분리하고 두 번 세척 후, 3×10^7 세포를 10% 우태혈청이 포함된 RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 배지에서 2시간 배양하였다. 2시간 배양 후 비부착(non-adherent) 세포를 제거하고 부착세포(adherent cells)를 GM-CSF 100ng/mL (LG Life Sciences Ltd., Seoul, Korea)과 IL-4 100U/mL (Endogen, Woburn, MA, USA)을 포함한 10% 우태혈청 RPMI 1640 배지에서 7일간 배양하여, 말초혈로부터 DC를 분화 유도하였다.^{7,8)} 그 중 일부세포를 취하여 세포표면항원의 발현을 관찰하였다.

2. 면역형광염색과 유세포분석

위 방법으로 얻은 분화된 세포 중 일부를 취하여

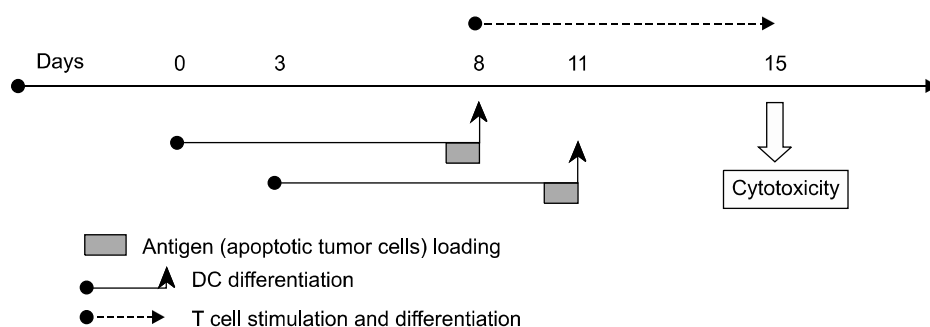


Fig. 1. Scheme of the experimental design for stimulation of T lymphocytes by tumor antigen-loaded dendritic cells.

HLA-DR, CD11c, CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD80, CD86, CD40 (이상 DiNona, Seoul, Korea), CH6^{9,10)} 등 항체로 직접 혹은 간접 면역형광염색을 시행하고 유세포분석기(XL-MCL flow cytometer; Coulter Corp., Miami, FL, USA)로 DC의 세포표면항원의 발현을 분석하였다. 간접 면역형광염색을 약술하면 10⁶개의 DC를 CD11c, CD80, CD86, CD40, CH6, HLA-DR 등 DC 특이 항원에 대한 항체와 4°C에서 20분간 반응시키고 원심분리하여 세포를 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 2회 세척하고 FITC (fluorescein isothiocyanate)가 결합된 염소의 항-마우스 항체(DiNona, Seoul, Korea)를 2차 항체로 하여 4°C에서 15분간 반응시킨 후 PBS로 2회 세척 후 유세포분석기로 측정하였다.

3. 신경모세포종 세포주

NBL 세포주로 SK-N-SH (HTB-11, neuroblastoma), IMR-32 (CCL-127, neuroblastoma), SK-N-MC (HTB-10, neuroepithelioma) 등 3종과 대조 세포주로 K-562 (CCL-243, chronic myelogenous leukemia)와 SK-BR-3 (HTB-30, mammary adenocarcinoma) 세포주를 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하였다. NBL 세포주를 종양항원의 탑재 시 항원 제공원으로 이용하였고, 또한 종양-특이 T 림프구 면역반응의 표적세포(target cell)로 이용하였다.

4. 종양항원 탑재

자외선(ultraviolet, UV)을 조사하여 종양세포의 자멸사를 유도한 후 DC와 함께 배양하여 DC에 종양항원을 탑재시켰다. 즉, NBL 세포주를 UV로 2시간 조사하여 자멸사를 유도한 후, UV 조사된 종양세포를 DC와 함께 16시간 동안 배양하여 종양항원을 DC에 탑재하였다. 항원제공원의 차이에 따른 항종양 면역반응의 차이를 비교하기 위하여 일부의 실험에서는 종양 용해물을 이용하기도 하였다. 종양 용해물은 NBL 세포주를 PBS로 세척한 뒤 재부유하여 액체 질소에서 30초간

얼린 후 37°C 수조에서 4분간 녹이는 방법을 4회 반복하여 얻었고, 종양세포 용해물의 단백량을 측정하고 용해물을 10ug/mL 농도로 DC 배양액에 첨가한 후 16시간 동안 37°C에서 배양하여 종양항원을 DC에 탑재시켰다.

5. 종양항원-탑재 DC에 의한 종양항원-특이 세포살해 T 림프구의 분화 유도

상기 방법에 따라 7일간 체외에서 배양하여 분화시킨 후 종양항원을 탑재한 DC를 말초혈액으로부터 분리된 단핵구와 함께 배양하여 종양항원-특이 세포살해 T 림프구를 시험관 내 방법으로 분화시켰다. DC와 단핵구의 비율은 1 : 10으로 사용하였고, 적절한 T 림프구의 증식 및 분화를 위하여 IL-2 100units/mL (Endogen, Woburn, MA, USA)을 배양액에 첨가하였다. 배양 3일 후에 다시 배양 시작시 첨가한 것과 동수의 종양항원을 탑재한 DC로 T 림프구를 이차로 활성화시키고, 총 7일간 배양한 후에 세포를 수확하여 NBL 세포주(SK-N-MC, SK-N-SH, IMR-32)에 대한 종양항원-특이 세포살해 T 림프구의 세포살해능을 측정하였다(Fig. 1). 또한 자연살해세포 오염에 의한 세포살해능 가능성을 배제하기 위해 K562, SK-BR-3에 대한 세포살해능을 동시에 측정하였다.

6. 세포살해능 분석

Cytotoxicity Detection Kit (LDH release assay; Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 이용하여 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 방법으로 상해를 입거나 죽어가는 세포의 세포질로부터 상층액으로 방출되는 LDH (lactate dehydrogenase)의 활성을 측정하고 formazan salt의 발색 정도로 세포사(cell death) 및 세포 용해(cell lysis) 정도를 정량화하여 종양항원-특이 T 림프구에 의한 종양세포의 살해 정도를 측정하였다.⁸⁾ 효과세포를 표적세포와 일정한 비율로 분주 후 반응 혼합액(reaction mixture; Roche, Mannheim, Ger-

many)을 100uL/well로 첨가하고 15~24°C에서 30분간 빛을 차단한 상태에서 반응시켰다. 1N HCL (50uL/well)을 넣어 효소 반응을 중지시키고 ELISA reader를 이용해 492nm에서 흡광도를 측정하였다. Cytotoxicity (%)는 3중(triplicate)으로 시행하여 측정된 각 검체의 흡광도를 다음의 수식에 따라 계산하여 얻었다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(\text{effector-target cell mix-effector cell control}) - \text{low control}}{\text{high control-low control}} \times 100$$

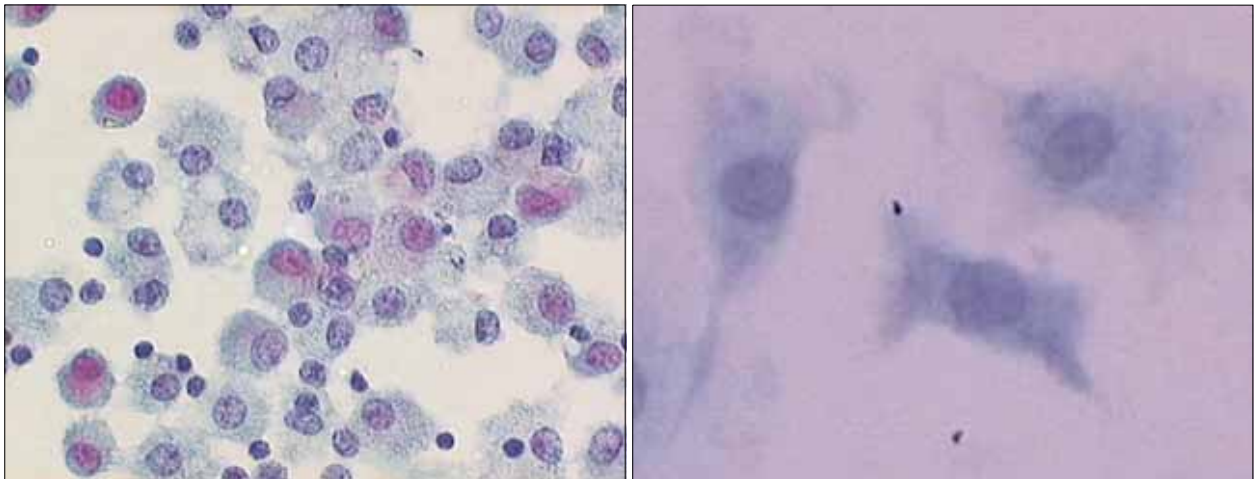


Fig. 2. Photomicrograph of peripheral blood monocyte- derived immature (left, ×400) and mature human dendritic cells (right, ×1,000), Papanicolaou staining.

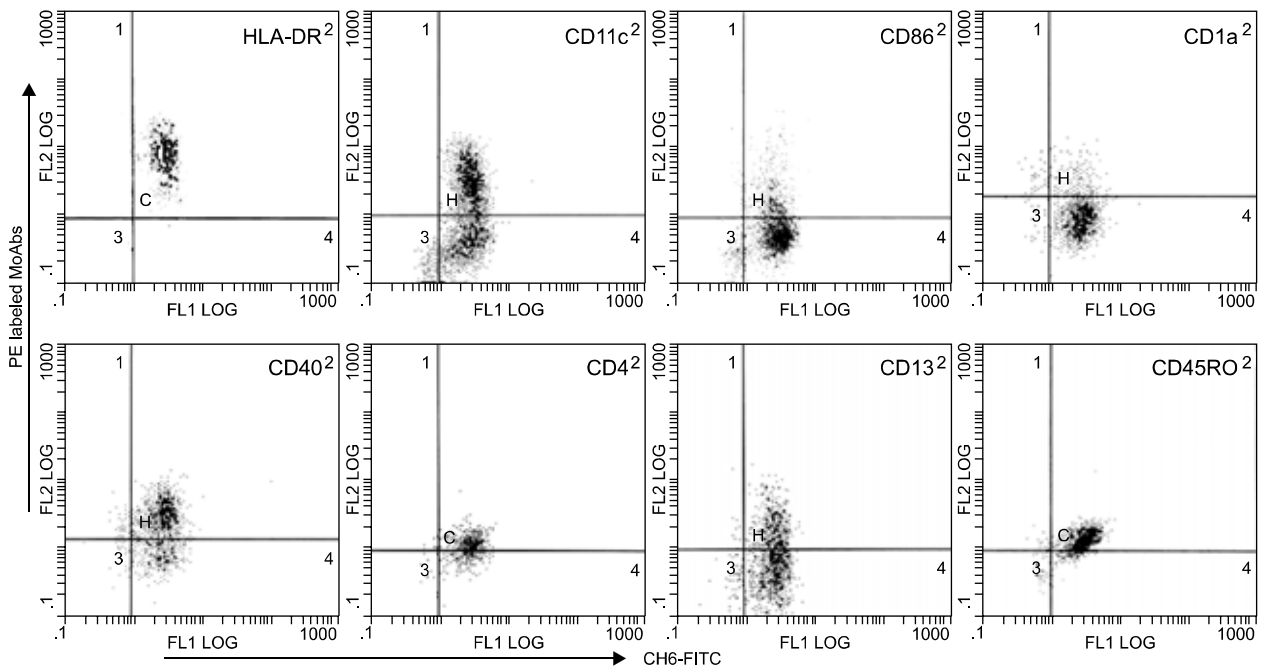


Fig. 3. Phenotypic analysis of peripheral blood monocyte-derived dendritic cells (PB-DC) by two color flow cytometry analysis using MoAb combinations of CH6, a new monoclonal antibody against human dendritic cells, and other markers of human dendritic cells.

결 과

1. 말초혈 단핵구기원 미성숙 DC의 특징

혈액으로부터 분리된 말초혈 단핵구(PBMC)를 세포 배양 용기에서 2시간 동안 배양하면 대부분의 단핵구는 배양용기의 표면에 부착하고, 부착하지 않은 부유 세포를 비교적 약하게 세척하여 제거한 후, GM-CSF와 IL-4를 첨가한 배양액에서 7일간 배양하면 표면에 비교적 많은 세포돌기를 가지는 세포로 분화하였다(Fig. 2). 이 세포들의 특징은 이미 보고된 미성숙 DC의 형태와 동일하였으며, CD11c, CD86, CD80, CD1a, CD40, CH6 등 특징적인 DC 표면항원들을 발현하였다(Fig. 3). 또한 CD4, CD45RO를 발현하였고, MHC class II (HLA-DR)의 발현도 현저하였다.

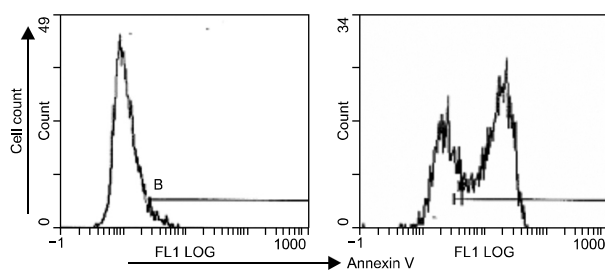


Fig. 4. UV-induced apoptosis of tumor cells (SK-N-MC). Apoptosis of the tumor cells was induced by UV irradiation for 2 hours at room temperature. Apoptosis and cell death were analysed by staining the cells with annexin V.

2. 종양항원 탑재에 의한 미성숙 DC의 분화 및 성숙

본 연구에서는 자멸사를 유도한 종양세포주를 항원의 제공원으로 이용하였다. 상온에서 종양세포주에 2 시간 동안 UV를 조사하면, 현저한 종양세포의 자멸사를 유도할 수 있었다(Fig. 4). 이와 같이 자멸사가 유도된 종양세포주를 미성숙 DC와 16시간 배양한 후, DC의 표현형을 분석한 결과 MHC class II (HLA-DR)와 CD80, CD1a의 발현이 뚜렷이 증가하였고, CD86과 CD40의 발현은 미약한 증가를 보였으며, CD11c와 CD83의 발현은 거의 변화가 없었다(Fig. 5).

3. 종양항원-특이 세포살해 T 림프구의 분화

종양항원-탑재 DC에 의하여 활성화 및 분화된 T 림프구의 종양에 대한 세포살해능을 분석한 결과, 종양-특이 세포살해능이 확인되었으며, DC에 의하여 종양항원으로 제시된 NBL 세포주뿐만 아니라, 동일한 종양기원의 다른 NBL 종양세포주에 대해서도 T 림프구의 종양세포 살해능이 확인되었다. 거의 대부분의 경우 종양항원의 제공원으로 사용한 NBL 세포주에 대한 T 림프구 세포살해능이 다른 NBL 세포주에 대한 세포살해능에 비하여 높았으나, 간혹 종양항원의 제공원이 아닌 다른 NBL 세포주에 대한 T 림프구 세포살해능이 원래의 항원제공원으로 사용된 NBL 세포주에 대한 반응보다도 약간 더 높게 관찰되기도 하였다.

반면 K562, SK-BR-3 등 기원이 다른 종양세포주에 대해서는 세포살해능 정도가 현저히 낮았다(Fig. 6~

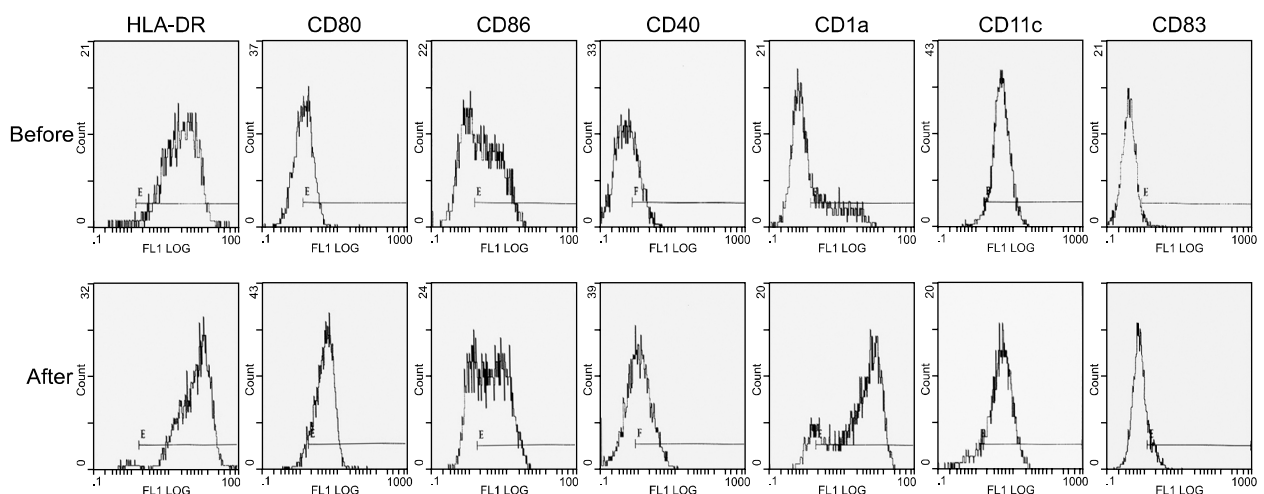


Fig. 5. Immunophenotypic changes of peripheral blood monocyte-derived dendritic cells before and after tumor antigen loading with apoptotic tumor cells (SK-N-SH).

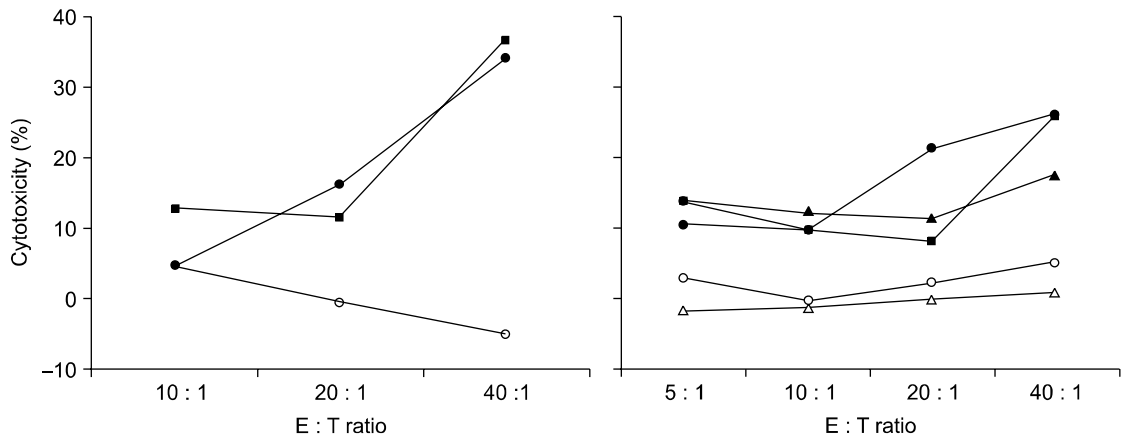


Fig. 6. Tumor-specific cytotoxicity by tumor antigen- challenged T lymphocytes. T lymphocytes were stimulated by tumor (SK-N-MC) antigen-loaded dendritic cells, and analysed for the tumor-specific cytotoxicity against three NBL cell lines; SK-N-MC (●--●), SK-N-SH (■--■), and IMR-32 (▲--▲), and two control cell lines; SK-BR-3 (△--△) and K-562 (○--○) at various effector : target (E : T) ratios.

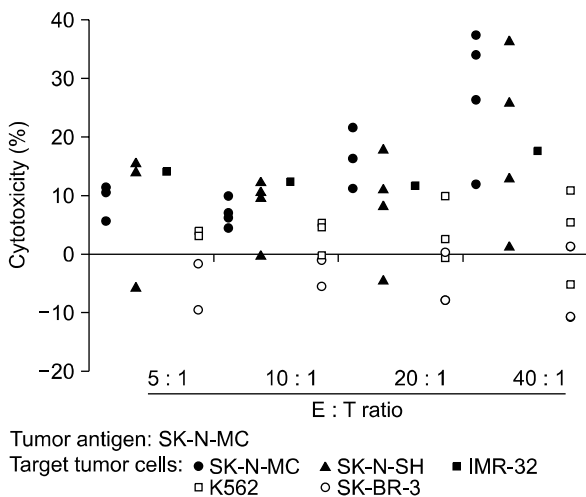


Fig. 7. Tumor-directed cytotoxicity of T lymphocytes against various tumor cell lines at various effector : target (E : T) ratios. T lymphocytes from different donors were stimulated by DCs loaded with apoptotic SK-N-MC cells, and tumor-specific cytotoxic effector function was measured.

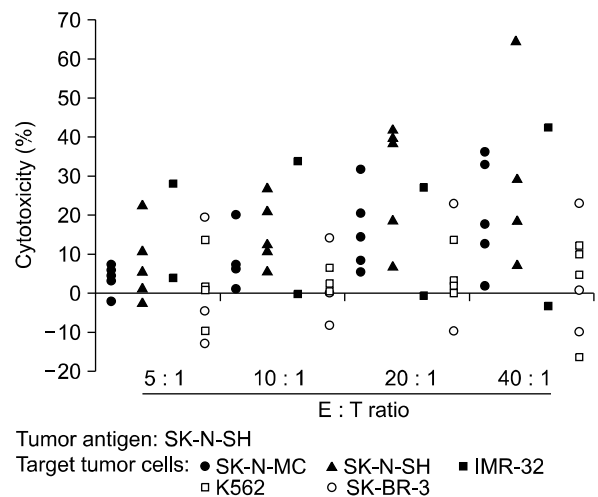


Fig. 8. Tumor-directed cytotoxicity of T lymphocytes against various tumor cell lines at various effector : target (E : T) ratios. T lymphocytes were stimulated by DCs loaded with apoptotic SK-N-SH cells, and tumor-specific cytotoxic effector function was measured.

8). MHC class I 및 II의 발현이 거의 없는 K562와 SK-BR-3 (Fig. 9)를 대상으로 한 세포살해능이, NBL 세포주에 대한 세포살해능과 비교할 때 그 정도가 현저히 낮으므로 NBL 세포주에 대한 세포살해능은 자연살해세포에 의한 것이 아니라, 종양항원-탐재 DC에 의하여 종양항원-특이 세포살해능을 획득한 T 림프구에 의한 것으로 생각된다. 종양에 대한 T 림프구의 세포살해능이 비교적 다양한 E : T ratio에서 확인되었으나, 20 : 1 및 40 : 1에서 가장 높게 관찰되었다.

4. 종양항원의 종류(탐재 방법)에 따른 종양항원-특이 세포살해 T 림프구 유도의 차이

항원 제공원의 차이에 따른 세포살해 T 림프구의 유도 효과를 분석하였다(Fig. 10). 항원 제공원의 차이에 따른 세포살해 T 림프구 유도에 있어서의 차이는 현저하지 않았으며, 자멸사-유도 종양세포주를 항원 제공원으로 이용한 경우에 세포살해 T 림프구를 좀 더 효과적으로 유도할 수 있었다.

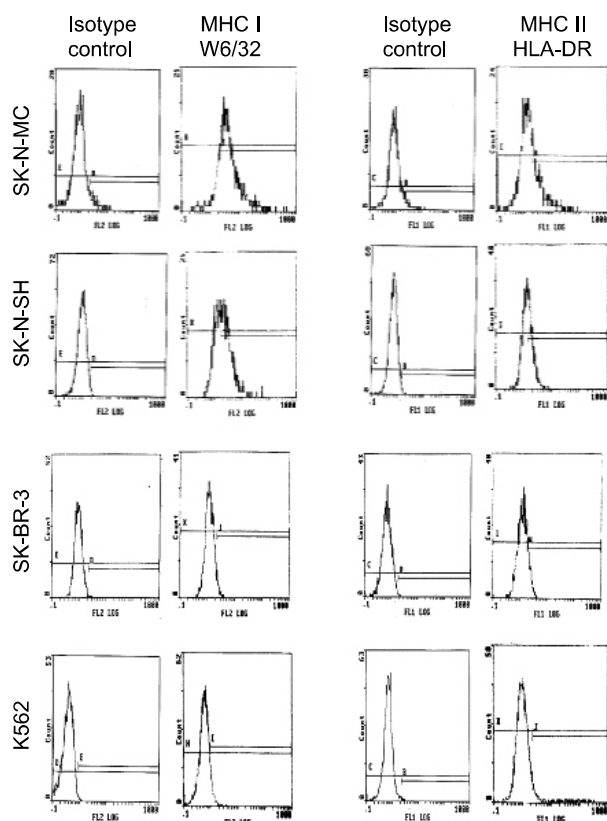


Fig. 9. Expression of MHC class I and II MoAb on various tumor cell lines.

고 찰

DC를 이용한 면역요법은 흑색종 환자에서 처음으로 시도되었으며, 전이가 있는 흑색종 환자에서 펩티드나 종양 용해물을 탑재한 후 DC를 주입하여 장기간 종양의 진행을 막을 수 있었다고 한다.¹¹⁾ 이후 DC를 이용한 면역요법은 다양한 방법으로 여러 종양에서 시행되었으며 현재도 계속되고 있다.^{12,13)} DC를 이용한 면역요법의 효과를 향상시키고, 보다 용이하게 환자에게 적용시키기 위해서 각 단계마다 여러 가지 방법들이 모색되어 왔다. 이런 면역요법의 커다란 장애 중의 하나는 충분한 양의 종양항원을 계속 이용할 수 있을 만큼 환자 개개인의 종양을 충분한 양 획득하기가 어렵다는 점이다. 따라서 다른 사람의 종양을 면역원(immunogen)으로 사용하고자 시도되었으며, 이럴 경우 다양한 종양-관련 항원을 언제라도 제공할 수 있으며, 많은 환자에게 필요한 백신을 생산할 수 있고, 종양-특이 항원에 대한 면역반응보다 훨씬 강한 종양에 대한 반응을 유발시킬 수 있다는 것이다.¹⁴⁾

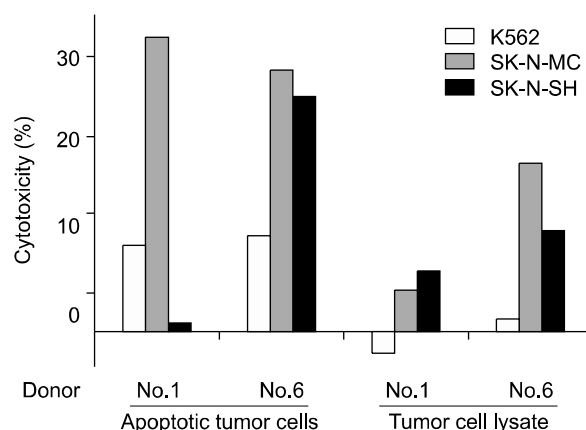


Fig. 10. Comparison of the extent of cytotoxicity in relation with different antigen sources.

한편, 다른 사람의 종양을 면역원으로 사용할 때의 문제점으로는 동종 종양세포(주) 자체는 종양세포와 환자의 MHC가 일치하지 않으므로 종양항원이 환자의 면역계에 의해 효과적으로 인지되지 못하며, 동종 MHC 분자를 가지는 세포는 숙주의 이형반응(alloreactive) T 림프구에 의해 빠르게 제거된다는 점이다.¹⁵⁾ 이러한 항원제시와 관련된 문제는 면역반응이 주입된 종양세포에 대한 직접적인 반응이 아니라, 숙주의 항원제시세포-DC, 대식세포 등에 의해 제시되는 종양으로부터 유래한 종양-특이 항원에 의해 유도될 수 있다면 환자와 종양세포 간의 MHC의 일치는 무의미하다고 할 수 있다. 이는 종양에 대한 면역 반응을 시발하는데 필요한 CD4, CD8 T 림프구를 자극(priming)하는 것이 주입된 종양세포 자체에 의한 것이라기보다 항원제 공세포에 의한 것이라고 할 수 있다.¹⁶⁾

NBL 세포는 태아의 신경상피계(neuroectoderm)에서 유래하였으므로 출생 후에는 더 이상 정상적으로는 존재하지 않는 항원을 지니고 있어 동종 종양백신의 좋은 표적이 될 수 있으며,^{17,18)} 실제로 체외에서 자가 신경모세포를 살해할 수 있는 세포살해 T 림프구를 생성할 수 있었고,¹⁹⁾ 신경모세포의 세포표면 항원에 대한 단클론항체로 생체 내에서 상당한 반응을 볼 수 있었다.²⁰⁾

Bowman 등은 실제로 재발한 NBL 환아에게 IL-2 유전자를 발현시킨 종양세포(IL-2 gene modified allogeneic tumor cell)를 주사하여 그 효과를 분석하였다.⁶⁾ 이 보고에서 자신의 종양을 이용한 면역요법보다는 낮은 효과를 나타내었지만 12명의 환아 중 1명에서는 백신만으로 90% 이상의 종양 감소를 보여 동종 백신 요법의 가능성을 보여 주었다. 또한 Haight 등은 이러한

IL-2 유전자를 발현시킨 동종 종양백신을 조혈모세포 이식 후 고위험군의 NBL 환아에게 투여하여 이들 환자의 혈액 내 항체가 자신의 종양과 교차반응하는 것을 확인함으로써 서로 다른 환자의 종양이 공통된 항원을 가지고 있다는 것을 시사하였다.²¹⁾ NBL 뿐만 아니라 호르몬 치료에 내성을 보이는 전립선암 환자에게 3종의 동종 종양세포주를 혼합한 3종 세포 백신 요법이 행하여졌으며, 이 연구에서는 여러 세포주를 동시에 사용하여 공유되는 항원에 대한 교차 면역(cross-protective immunity)을 얻을 수 있었고 전 과정을 안전하게 부작용 없이 끝낼 수 있다고 하였다. 따라서 동종 종양세포주를 이용한다면 여러 세포주를 동시에 DC에 탐재하여 종양에 대한 보다 강력한 면역반응을 얻을 수 있다는 가능성을 보여주었다.²²⁾

최근 들어 DC의 역할이 밝혀지면서 동종 종양세포주를 직접 주입하지 않고 DC에 동종 종양세포주의 용해물을 탐재 후 DC를 주사하여 종양에 대한 효과를 평가하고자하는 시도가 있었다. 쥐의 흑색종 모델에서 방사선을 조사한 동종 K1735 흑색종 세포를 동형(syngeneic) DC와 혼합 후 동형 흑색종 세포인 B16을 주입하였다. 동종 백신만을 투여한 군은 동형 흑색종 세포인 B16만을 투여한 군과 종양의 발생 억제에는 차이가 없었으나, 동종 K1735와 DC를 같이 주사한 경우 70%에서 종양을 방지할 수 있었다.²³⁾ 이 실험을 통하여 DC가 동종 백신과 동형 종양 사이에 공유된 항원의 면역성을 증폭시킬 수 있음이 명백하게 밝혀졌으며, DC와 동종 종양세포 백신의 병합 요법은 개개인의 종양 조직을 조작할 필요 없이 특정 종양항원이 필요하지 않으면서 매우 효과적인 면역요법이라는 것을 알 수 있다. 또한 DC와 동종 종양세포 백신의 병합요법은 DC에 의한 교차 자극(cross-priming)에 의해 가능하다는 증거들이 제시되고 있다.⁷⁾

4기 NBL의 치료로서 많은 환아에서 조혈모세포이식 후 면역요법의 하나로서 IL-2를 단독으로 투여하고 있다. DC를 이용한 면역요법은 고용량의 항암제를 투여받은 환아에서도 효과를 나타내나, IL-2의 주입과 같이 시행된다면 고용량의 항암제에 의한 면역억제 상태를 극복하게 되므로 세포 살해 T 림프구의 생성이 활발히되고 이 시기에는 조혈모세포이식 후이므로 종양이 존재한다고 하더라도 미세잔존암의 상태로 존재하므로 면역요법의 적기라고 할 수 있다. DC 백신과 IL-2의 병합요법은 쥐 모델에서는 매우 효과적인 것으로 밝혀졌으며,²⁴⁾ Stift 등에 의해 20명의 성인 고형암 환아에서 DC 백신과 저용량의 IL-2를 함께 투여한 결

과 7명의 환아에서 종양의 크기가 줄어들거나 종양 표지자 수치가 하강하였고 부작용은 없었다고 하였다.²⁵⁾ 따라서 조혈모세포이식 후 동종 종양항원을 탐재한 DC 백신과 IL-2의 병합요법은 4기 NBL 환아에서 시도할 가치가 있다고 하겠다.

본 연구에서는 종양별로 분명한 종양항원이 규명되어 있지 않고 항원으로 이용하기 위하여 환자로부터 충분한 종양세포 및 조직을 확보하기 힘든 여건을 극복하고자, 동종 신경모세포종 종양세포주를 항원 제공원으로 이용하고 인체 말초혈-유래 수지상세포를 항원제공세포로 활용하여 종양세포에 대한 세포살해 T 림프구의 분화를 유도할 수 있는지를 체외실험을 통해 분석하였다.

결론적으로 자멸사-유도 종양세포는 효과적으로 수지상세포를 분화시킬 수 있는 종양항원의 제공원으로 활용될 수 있었고, 자멸사-유도 종양세포를 이용하여 종양항원을 탐재시킨 수지상세포는 종양항원의 제공원으로 이용된 종양세포주 뿐 아니라 세포기원이 같은 동종 종양세포주에 대해서도 효과적인 세포살해 T 림프구 반응을 유도할 수 있었다.

따라서 이와 같은 결과는 신경모세포종에서 수지상세포를 활용한 면역요법이 종양의 치료에 활용될 수 있으며 동종 종양세포를 종양항원의 제공원으로 이용할 수 있음을 시사하였다.

요 약

배경: 4기 신경모세포종(neuroblastoma, NBL)은 적극적인 치료에도 불구하고 장기 생존율이 30%밖에 되지 않는다. 최근 수지상세포(dendritic cells, DC)를 이용한 항종양 면역반응 유도는 종양에 대한 면역요법으로서 새로운 암 치료의 전략으로 주목 받고 있다. 대개 DC 종양백신에서는 자가 종양세포를 항원 제공원으로 사용해 왔으나, 충분한 자가 종양세포를 확보하기 어려운 점 등 여러 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 NBL에서 동종 종양세포주를 항원 제공원으로 이용하여 이를 탐재한 인체 DC가 항종양 면역반응을 유도하는지를 평가함으로써 소아 NBL 치료에 활용할 수 있는 가능성을 검토하고 임상적용을 위한 기초자료를 확보하고자 하였다.

방법: 실험에 사용한 DC는 말초혈에서 분리한 단핵구를 GM-CSF와 IL-4를 첨가한 배지에서 7일간 배양하여 제조하였다. 제조된 DC를 자외선(ultraviolet, UV) 조사로 자멸사를 유도한 한 종류의 NBL 세포주와 배양

하였으며, 종양항원-탐재 DC와 말초혈 단핵구를 7일간 함께 배양하여 종양항원-특이 세포살해 T 림프구의 분화를 유도하였다. T 림프구를 수확하여 NBL 세포주에 대한 세포살해능을 측정하였다.

결과: 자멸사 유도 종양세포주를 미성숙 DC와 배양하여 종양항원을 효과적으로 탐재하였으며, 성숙 DC로의 분화를 유도하였다. 종양항원-탐재 DC에 의하여 활성화되고 분화된 T 림프구의 종양에 대한 세포살해능을 분석한 결과, 종양-특이 세포살해 T 림프구가 효과적으로 분화 유도되었으며, 항원을 제시하는 DC에 탐재한 NBL 세포주뿐 아니라 다른 NBL 세포주에 대해서도 종양 세포 살해능이 획득되었다.

결론: 동종 자멸사유도 신경모세포종 세포주는 성숙 DC로의 분화를 유도하며, DC에 동종 자멸사유도 신경모세포종 세포주를 종양 항원 제공원으로 탐재한 경우 종양-특이 세포살해 T 림프구의 활성화 및 분화 유도가 가능하였다.

참 고 문 헌

- Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia M, et al. N7: a novel multi-modality therapy of high risk neuroblastoma (NB) in children diagnosed over 1 year of age. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:227-30.
- Toren A, Nagler A, Rozenfeld-Granot G, et al. Amplification of immunological functions by subcutaneous injection of intermediate-high dose interleukin-2 for 2 years after autologous stem cell transplantation in children with stage IV neuroblastoma. *Transplantation* 2000;70:1100-4.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunity to tumors. In: *Cellular and molecular immunology*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1997:382-405.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
- Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 2001;29:1247-55.
- Bowman LC, Grossmann M, Rill D, et al. Interleukin-2 gene-modified allogeneic tumor cells for treatment of relapsed neuroblastoma. *Hum Gene Ther* 1998;9:1303-11.
- Berard F, Blanco P, Davoust J, et al. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 2002;192:1535-44.
- Märten A, Greten T, Ziske C, et al. Generation of activated and antigen-specific T cells with cytotoxic activity after co-culture with dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:25-32.
- Lee GK. Characterization of new monoclonal antibodies recognizing subsets of human dendritic cells. The 43rd Biannual Meeting of the Korean Association of Immunologists, Abstract (SIII-2), pp47-48, 2001.
- Kim JI, Lee HR, Kim EY, Kim SW, Lee GK, Song HG. Characterization of a new monoclonal antibody, CH6, against a human cell membrane molecule. The 42nd Biannual Meeting of the Korean Association of Immunologists, Abstract (P-06), p68, 2001.
- Turner B, Haendle I, Röder C, et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999;190:1669-78.
- Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 2000;96:3102-8.
- Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM, et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res* 2001;61:842-7.
- Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11307-11.
- Nanda NK, Sercarz EE. Induction of anti-self-immunity to cure cancer. *Cell* 1995;82:13-7.
- Pardoll D, Nabel GJ. Cancer immunotherapy. In: Friedmann T, ed. *The development of human gene therapy*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999:427-57.
- Zhao XJ, Cheung NK. GD2 oligosaccharide: target for cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;182:67-74.
- Henderson RA, Finn OJ. Human tumor antigens are ready to fly. *Adv Immunol* 1996;62:217-56.
- Foreman NK, Rill DR, Coustan-smith E, Douglass EC, Brenner MK. Mechanisms of selective killing of neuroblastoma cells by natural killer cells and lymphokine activated killer cells. Potential for residual disease eradication. *Br J Cancer* 1993;67:933-8.
- Cheung NK, Medof ME, Munn D. Immunotherapy

- with GD2 specific monoclonal antibodies. *Prog Clin Biol Res* 1988;271:619-32.
- 21) Haight AE, Bowman LC, Ng CY, Vanin EF, Davidoff AM. Humoral response to vaccination with interleukin-2-expressing allogeneic neuroblastoma cells after primary therapy. *Med Pediatr Oncol* 2000;35:712-5.
- 22) Eaton JD, Perry MJ, Nicholson S, et al. Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int* 2002;89:19-26.
- 23) Melcher A, Todryk S, Bateman A, Chong H, Lemoine NR, Vile RG. Adoptive transfer of immature dendritic cells with autologous or allogeneic tumor cells generates systemic antitumor immunity. *Cancer Res* 1999;59:2802-5.
- 24) Shimizu K, Fields RC, Giedlin M, Mulé JJ. Systemic administration of interleukin 2 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2268-73.
- 25) Stift A, Friedl J, Dubsky P, et al. Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:135-42.
-