

수지상세포를 이용한 항암 면역 치료: 생쥐 신장암 모델을 이용한 연구

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 암센터, ¹혈액종양내과

이현아 · 최광민 · 백소영 · 이흥기¹ · 정철원¹

Dendritic Cell Based Cancer Immunotherapy: in vivo Study with Mouse Renal Cell Carcinoma Model

Hyunah Lee, Kwang-Min Choi, Soyoung Baek, Hong-Ghi Lee¹ and Chul-Won Jung¹

The Cancer Center, ¹Division of Hematology and Oncology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: As a potent antigen presenting cell and a powerful inducer of antigen specific immunity, dendritic cells (DCs) are being considered as a promising anti-tumor therapeutic module. The expected therapeutic effect of DCs in renal cell carcinoma was tested in the mouse model. Established late-stage tumor therapeutic (E-T) and minimal residual disease (MRD) model was considered in the *in vivo* experiments. **Methods:** Syngeneic renal cell carcinoma cells (RENCA) were inoculated either subcutaneously (E-T) or intravenously (MRD) into the Balb/c mouse. Tumor cell lysate pulsed-DCs were injected twice in two weeks. Intraperitoneal DC injection was started 3 week (E-T model) or one day (MRD model) after tumor cell inoculation. Two weeks after the final DC injection, the tumor growth and the systemic immunity were observed. Therapeutic DCs were cultured from the bone marrow myeloid lineage cells with GM-CSF and IL-4 for 7 days and pulsed with RENCA cell lysate for 18 hrs. **Results:** Compared to the saline treated group, tumor growth (E-T model) or formation (MRD model) was suppressed in pulsed-DC treated group. RENCA specific lymphocyte proliferation was observed in the RENCA tumor-bearing mice treated with pulsed-DCs. Primary cytotoxic T cell activity against RENCA cells was increased in pulsed-DC treated group. **Conclusion:** The data suggest the possible anti-tumor effect of cultured DCs in established or minimal residual disease/metastasis state of renal cell carcinoma. Systemic tumor specific immunity including cytotoxic T cell activity was modulated also in pulsed-DC treated group. (**Immune Network 2004;4(1):44-52**)

Key Words: Dendritic cells, anti-cancer immunotherapy, renal cell carcinoma

서 론

현재의 암 치료 노력이 직면한 가장 큰 문제 중의 하나는 정상 세포에 대한 독성을 해결하지 못하고 있는 것이다. 정상 세포에 영향을 주지 않고 종양만을 선택적으로

파괴하도록 하는 종양 특이 면역의 유도 및 기능 향상은 따라서 항암 치료의 새로운 가능성으로 대두되고 있다. 생체 내 정상적으로 존재하는 면역감시기구 중 종양세포를 인지하고 소멸시키는 것은 T 세포나 NK 세포 등 세포성 면역기능의 활성화가 주요 역할을 담당하게 된다. 종양세포에 특이적으로 작용하는 T 세포의 활성화 과정은 이를 조절하는 항원소개세포의 역할이 선행되어야만 하는데, 수지상세포는 체내에서 알려진 가장 전문적이고도 강력한 항원소개세포이다. 1973년 Steinman과 Cohn (1)이 보고한 수지상세포는 'nature's adjuvant'라는 명성을 얻으며 고도로 전문화된 항원소개세포로 resting/

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

본 연구는 삼성생명과학연구소(#SBRI C-99-027) 및 식품의약품안전청(03092 세치안 070) 연구비 지원으로 수행되었음.

naive T cell의 강력한 activator로 발견되었다(2-6). 'Nature's adjuvant'라는 명성을 얻으며 수지상세포가 강력한 면역 기능 활성화의 중심 역할을 할 수 있는 것은 APC (Antigen-Presenting Cell)로서 세포 표면에 MHC molecules (I/II)뿐 아니라 co-stimulatory molecules (CD80, CD86)와 adhesion molecule (예, ICAM-1)들을 고농도로 발현하고 있고, 더하여 여러 가지 cytokine (IFN-alpha, IL-12, IL-18 등)을 분비하기 때문인 것으로 알려져 있다. 수지상 세포에 의한 항원 특이 살해 T 세포(cytotoxic T lymphocyte/CTL)의 생성, CD4⁺ helper T cell (Th1 type)의 증식 및 활성화 등의 연구 결과가 발표되고 있으며 *in vivo* 실험을 통해, 생체 내로 주입된 수지상 세포도 CTL의 생성을 촉진시킴이 밝혀지고 있다(7-13). 수지상 세포에 의한 자연 살해 세포(NK cell) 활성화 유도에 대한 증거도 보고되고 있다(14). 따라서 DC를 치료하고자 하는 tumor의 항원/표지인자로 교육시켜 항 종양 특이 면역세포의 기능을 회복시키거나 또는 활성화시키도록 유도하여 종양을 치료하는 면역 세포 치료제로서 사용할 수 있는 것으로 예상된다.

신장암은 전이가 되고 나면 치료가 불가능한 것으로 알려진 악성 종양이다(15).

우리나라 보건복지부는 연례 암 등록 보고서 1999년 통계에서 신장암이 한국 남성에게 10번째로 흔한 악성 종양임을 나타내고 있다(16). 흥미롭게도 전이된 신장암은 면역성이 강하여, cytokine (IL-2, IFN- α)에 반응을 나타내나 전체적인 반응률은 높지 않은 것으로 보고되고 있다(15~27%) (17). 신장암의 일차 치료법 중 한 가지로 IL-2, IFN- α 등의 면역 생물학적 제제가 사용되지만 적정 용량, 용법 등이 확립되어 있지 못하다. IFN- α 단독 투여를 이용한 제3상 임상 시험은 13%의 반응률과 일년 생존율 43% 증가를 보고하고 있다(18). 또한 Rosenberg 등은 lymphokine-activated killer cells (LAK)과 IL-2 최대 적정 용량을 병용하였을 때 전이성 신장암의 완전 관해 및 10년 이상의 생존율을 보고하였다(19).

RENCA는 Balb/c mice에서 생성된 신장암(renal cell adenocarcinoma)으로, 사람의 신장암과 유사한 성질을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 성장 속도가 빠르고 신장으로부터 림프절, 폐, 간, 뼈 등으로 자연 전이되는 악성 종양이다. RENCA가 자라고 있는 쥐에서 면역 기능이 억제됨이 보고되었다(16,20). 즉, lymphokine activated killer cell (LAK cell) 활성화, 자연살해세포(NK cell) 활성화, cytotoxic T cell 생성 및 지연성 과민성 반응(Delayed-Type Hypersensitivity, DTH)의 억제 등이 알려져 왔다. 사람의 RCC연구 결과와 함께 RENCA를 이용한 동물 실험 결과들은 이를 이용한 신장암 동물 모델을 만들어 수지상 세포를 이용한 면역 세포 치료법의 유효성 연구의 가능성을 제시하고 있다.

대부분의 종양에서처럼 신장암도 확실한 종양 특이 항원이 확인되지 않은 상태이다. 가장 많이 연구된 신장암 항원은 G250 단백질로 75% 이상의 신장암 세포가 G250 항원을 발현하여 치료법 개발의 대상으로 연구되고 있다(21). 그러나 최근 클론된 G250 유전자의 경우 항-G250 면역 반응 유도효과가 강하지 않은 것으로 알려지고 있다(22). 이 같은 연구 결과들이 신장암의 수지상 세포 치료를 위한 종양 특이 항원으로 tumor lysate를 가장 많이 선택하는 근거가 되고 있다.

본 연구는 RENCA cell로 생쥐에 말기 신장암 치료 모델과 전이 잔류암 모델을 만들어 tumor lysate로 교육시킨 치료용 수지상세포의 항암 효과 및 종양 특이 면역 반응 유도를 확인하였다. 치료용 수지상세포를 주사한 군에서 피하에 만들어진 종양 성장이 억제되거나 폐 종양 생성이 억제되는 것을 관찰하였다 이들 군에서 RENCA 특이 살해세포 활성(CTL activity)과 임파구 증식이 현저히 증가함을 관찰하였다. 이 결과들은 치료가 거의 불가능한 것으로 알려진 전이성 신장암에 대해 수지상세포를 이용한 항암 면역 세포 치료법이 새로운 치료법으로서 가능성을 가짐을 보여주었다. 이 결과들을 토대로 보다 나은 항암 면역 세포 치료법 개발을 위한 문제점들을 고찰하였다.

재료 및 방법

동물. 암컷 순계인 Balb/c 및 C57BL/6 mice (5~6주령)를 대한 Bio-Link (충청북도 음성)에서 구입하였다. Mice는 특정 병원균이 없는(specific pathogen-free, SPF) 동물로 삼성생명과학연구소 실험동물 연구실에서 ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources) guideline에 따라 사육되었다. 실험 기간 중 사료와 물은 자유롭게 섭취시켰고, 12시간 명: 암 조건을 유지하였다. 모든 동물은 실험을 시작하기 전 일주일 동안 적응 기간을 거쳤다 **시약.** RPMI-1640 medium, fetal bovine serum 및 penicillin-streptomycin은 미국 GIBCO laboratories (Grand Island, NY)에서 구입하였다. 아래의 시약들은 미국 SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다; lipopolysaccharide (LPS, from E.Coli 055:B5), concanavalin A (ConA), mitomycin-C. [methyl-³H]thymidine (6.7 Ci/ mmol) and [⁵¹Cr]-sodium chromate (400~1200 Ci/g)는 미국 NEN (Wilmington, DE) 제품을 사용하였다. Flow cytometric phenotyping을 위하여 BD-PharMingen (San Diego, CA, USA)에서 다음과 같은 항체들을 구입하였다.: fluorescein isothiocyanate (FITC)- or phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal Abs for MHC class I (H-2K^d), MHC class II (IA^d), CD3, CD11c, CD80 and CD86. IgG, Mac3. Dendritic cell marker인 NLDC145 항체는 Serotec (Oxford, England)에서 구입하였다. Lympholyte[®]-M은

CEDARLANE[®] (Ontario, Canada)에서 구입하였다.

세포주. Balb/c에서 얻어진 신장 선암 세포주(renal cell adenocarcinoma line)인 RENCA는 미국 텍사스 대학 M.D. Anderson 암 센터의 Dr. I. J. Fidler에게서 제공받았다. 세포주의 배양은 RPMI-1640 medium (10% heat inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 그리고 100µg/ml streptomycin을 첨가한 complete medium)으로 유지되었다. 생쥐 골수 세포에서 myeloid계 세포를 분리하기 위하여 사용한 항체는 hybridoma cell lines에서 얻었다 (GK1.5 for anti-L3T4, 3.168 for anti-Lyt-2, RA3 for anti-B220, J11d for anti-B cells/neutrophils). 각 세포주는 한국 생명공학연구원 임종석 박사팀에서 제공받았거나 또는 미국 세포주 은행(ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였다.

생쥐 골수 세포 분리. 경추 탈골 후 얻은 대퇴골을 주사기에 담긴 RPMI-1640으로 씻어 골수를 분리한 후 배양액 중에서 screen mesh를 통해 단일 세포로 만들었다. 적혈구는 Tris-buffered 0.15 M ammonium chloride solution (pH 7.2)으로 씻어 용해시키고 남아있는 유핵 세포는 hemocytometer에서 계수하였다. 세포 생존율은 Trypan Blue exclusion (routinely >90%)으로 확인하였다.

골수성 수지상 세포(myeloid-DC)의 Ex vivo 배양. 생쥐의 골수 단세포로부터 시작하는 골수성 수지상 세포의 배양은 본 실험실에서 변형시킨 Inaba et al.(23) 법으로 시행하였다. 분리된 골수 단세포를 L3T4, Lyt-2, B220 및 B 세포 항체와 보체로 panning하여 골수성 세포(myeloid-lineage cells)만 분리하고 1×10^6 /ml의 세포에 GM-CSF와 IL-4 (1×10^3 units/ml)를 넣고 6일간 배양하였다. 배양 6일째 RENCA cell lysate 50µg/ml을 넣고 18시간 더 배양하였다. Tumor cell lysate는 RENCA cell을 liquid nitrogen (-180°C)과 incubator (37°C)에서 freezing-thawing과정을 거친 후 1,500 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻어진 상등액의 단백질을 Bradford 법으로 확인하여 정량하였다. 수지상 세포의 성숙을 유도하기 위해 tumor cell lysate와 함께 배양 후 LPS (100 ng/ml)를 넣어 18시간 더 배양하였다. 배양 8일째 수지상 세포를 거두어 표현형(Table I) 및 allogeneic splenocyte를 responder로 하는 mixed lymphocyte response (MLR) assay로 기능을 검색하였다. 치료용으로 주사하기 위한 수지상 세포는 tumor cell lysate와 함께 배양한 후 수확하여 주사용 생리 식염수에 부유시킨 후(5×10^5 /200µl/mouse) 2시간 이내에 생쥐 복강으로 투여하였다.

종양 세포 이식 및 치료용 수지상 세포 주입. 배양된 RENCA cells을 거두어 피하(말기암 치료 모델: 1×10^5 cells/mouse) 또는 정맥 내(폐 전이 미세 잔류암 모델: 5×10^5 cells/mouse)로 이식하였다. 치료용 수지상 세포의 투여는(5×10^5 DCs/mouse), 말기암 치료 모델에서는 종양

Table I. List of surface marker antibodies for DC characterization

Antibodies	Fluorescence	Specificity
IgG	FITC	B cells
CD3	FITC	Primed or unprimed T cells
Mac3	PE	Activated macrophages, some dendritic cells
CD11c	FITC	Dendritic cells, CD4CD8 ⁺ intraepithelial lymphocytes
NLDC145	FITC	Dendritic, interdigitating cells
CD80	FITC	B7-1 co-stimulatory molecule
CD86	FITC	B7-2 co-stimulatory molecule
H2k ^d	PE	MHC class I molecule
IA ^d	PE	MHC class II molecule

세포 이식 후 3주째부터 그리고 미세 잔류암 모델에서는 종양 세포 주입 24 시간 후부터 시작하였다. 일주일 간격으로 2회 치료용 수지상 세포를 복강 내로 투입하였다. 대조군은 saline을 투여하고, 피하에 자라는 종양의 크기는 2주간 주기적으로 caliper를 이용하여 측정하였다. 종양 크기(tumor volume) 측정은 Ray 등(24)이 발표한 방법을 사용하였다. 미세 잔류암 모델에서 종양 형성은 마지막 치료 2주 후 생쥐를 희생시켜 확인하였다. 종양이 생긴 폐와 심장을 분리하여, Bouin Solution으로 고정 염색한 후 종양 결절의 수를 세어 정량화하였다. 두 모델 모두 전신성 면역 기능 변화는 비장 세포에서 측정하였다.

세포 표현형 검색(Flow cytometric analysis). 수지상 세포 또는 비장 세포의 표현형 검색은 기 발표된 Yoon 등의(25) 방법을 따랐다. 비장 단핵세포는(1×10^5 cells/100 µl) 형광 물질로 표식된 아래의 항체들을 함유한 PBS (0.1% sodium azide와 1% FBS가 혼합된 PBS-CS)에 부유시킨 후 4°C에서 40분간 배양하였다. total T cell을 위한 hamster anti-mouse CD3ε-FITC, 각각 CD4 및 CD8 T cell subset을 위한 rat anti-mouse L3T4-PE, rat anti-mouse Ly-2-PE, 활성화 대식세포 확인을 위한 rat anti-mouse Mac3-PE. Negative control was set using rat IgG_{2b}-PE (PharMingen, San Diego, CA) and hamster IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). 수지상 세포의 확인은 같은 방법으로 Table I에 표시된 항체를 사용하였다. 배양이 끝난 후 세포를 세척하고, 500µl의 PBS-CS에 풀어 Flow cytometer (FACSVantage, Becton-Dickson, Mountain View, CA)로 분석하였다. 분석은 세포 염색 1시간 이내에 시행하였다.

비장 림프구 증식 반응. 배양 수지상 세포의 기능을 확인하기 위하여 또는 치료 후 종양 특이 면역 기능을 증가를 확인하기 위하여 비장 단핵세포의 증식을 확인하는 실험이다. 배양 세포의 기능 확인을 위한 MLR assay는

96 well flat-bottomed microtiter plate에 비장 림프구(R, responder: 2×10^5 cells/well)와 mitomycin-C로 처리된 수지상 세포(S, stimulator)를 R : S ratio 1 : 1 ~ 1 : 10의 비율로 96시간 같이 배양한 후 responder cell의 증식 정도를 측정하였다. 즉, 세포를 37°C, humidified, 5%-CO₂ conditioned air조건의 incubator에서 배양하고, 세포 수확 18시간 전에 1μCi의 [³H]-thymidine을 넣은 후 96시간 배양 시점에서 glass fiber filter로 세포를 수확하기 위하여 PhD[®] cell harvester (Cambridge Technology, Inc., Cambridge, MA, USA)를 이용하였다. 세포가 수확된 filter를 scintillation cocktail에 넣어, 방사능의 정도를 liquid scintillation counter (Beckman LS 6500, Fullerton, CA)로 측정하였다. 치료 후 종양 특이 면역 증가를 확인하기 위해서는 비장 임파구(2×10^5 cells/100μl/well)에 tumor cell lysate 20μg/ml을 넣고 MLR assay에서와 같은 방법으로 비장 세포 증식을 측정하였다.

살해 면역세포 기능 측정. 수지상세포 치료 후 유도된 종양 특이 살해세포(cytotoxic T cell, CTL) 활성은 Yoon 등(25)이 기 발표한 방법을 사용하였다. Effector cell (E)인 비장 림프구가 CTL반응의 종양 특이 표적인 RENCA 세포 또는 비특이 비교군으로 대장암 세포인CT26를 죽이는 정도를 측정한다. Na₂⁵¹CrO₄로 label된 표적 세포(1×10^4 cells/100μl)와 100μl의 effector 세포를 여러 농도로 섞어 96 well round bottom microtiter plate에서 4시간 반응시킨 후 1,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취한다. 사멸된 target 세포에서 새어 나온 상등액 중의 방사능을 Wallac 1470 Wizard[™] gamma counter (Finland)로 측정한다. Label된 표적 세포로부터의 자연적인 ⁵¹Cr 방사능 유리(spontaneous release, SR)와 total release (TR)는 배양액 또는 1 N HCl로 처리한 후 각각 관찰하였다. 세포 살해 능은 아래 식을 이용하여 나타내었다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{\text{experimental cpm} - \text{SR cpm}}{\text{TR cpm} - \text{SR cpm}} \times 100$$

통계 처리. In vivo 실험은 그룹당 4~7마리씩으로, 3번씩 반복하였다. 통계적 유의성의 검색은 analyses of variance (ANOVA) using the Fisher protected least significant difference test를 이용하였다. P value가 0.05 이하일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

치료용 수지상 세포의 배양. 본 실험에서 사용된 수지상세포는 생쥐의 골수에서 유래한 골수성 수지상세포(myeloid-DC)로 배양한 것이다. 항원 소개 및 효능성 T

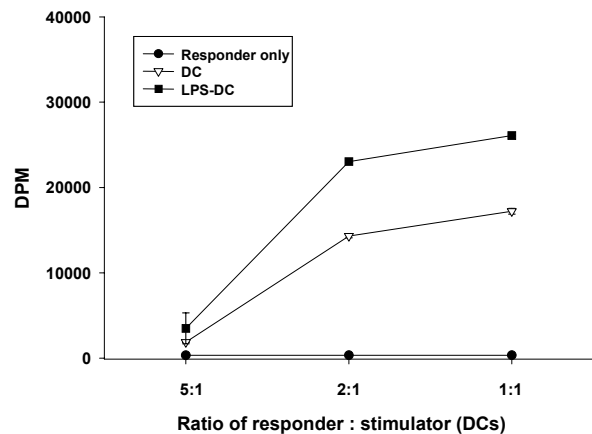


Figure 1. *In vitro* induction of allogeneic-lymphocyte proliferation by *ex vivo* cultured myeloid-DCs from the bone marrow of Balb/c mice. As a responder, splenocytes (2×10^5 cells/well) from C57BL/6 mice were co-cultured with mitomycin-C treated DCs (stimulator) from Balb/c mice. The concentrations of DCs were 2×10^5 , 1×10^5 and 4×10^4 for the ratio of responder: stimulator 1 : 1, 2 : 1 and 5 : 1 respectively. The proliferative response was proportional to the DC concentrations. The response of splenocyte proliferation stimulated with LPS-modulated DCs was stronger than the proliferation with DCs. Data represent the mean \pm SE of 3 different experiments.

세포 증식을 유도하는 수지상세포의 기능을 C57BL/6 생쥐의 비장에서 분리한 동종 림프구를 responder로 한 MLR assay로 확인하였다. 수지상세포에 의해 정상 T 세포를 포함한 림프구의 증식이 유도됨을 관찰하였고 LPS로 수지상세포의 성숙을 유도한 경우 비장 림프구 증식을 유도하는 활성이 더욱 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 배양된 수지상세포가 항원소개세포로 효능성 T 세포 증식을 유도할 수 있는 정상적 기능을 가짐을 확인하였다(Fig. 1). Flow cytometer로 측정된 세포 표현형은 배양된 세포가 항원 소개 기능을 담당할 가능성을 지닌 MHC class I+++; class II++; CD80 & 86++; CD11c++ 세포임을 확인하였다. 또한 mouse의 interdigitating D의 marker로 알려진 NLDC14의 발현도 확인하였다. Tumor cell lysate pulsing에 의해 CD11c의 발현이 증가하였다(Fig. 2).

피하에 생성된 말기 신장암에 대한, 신장암 세포주 용해액(RENCA cell lysate)으로 pulsing한 치료용 수지상 세포의 치료 효과(말기암 치료 모델). RENCA cell로 피하에 형성되어 성장한 종양을 치료하는 tumor cell lysate-pulsed 수지상 세포의 효과를 관찰하였다. 수지상 세포 치료가 시작되는 시점은, 특별한 치료가 진행되지 않으면 생성된 종양으로 인해 1~2주내 사망하는 상황이므로, 사람의 말기 암을 대변하는 모델로 설정하였다. 종양이 생성되어 3주 후부터 5×10^5 의 수지상세포를 일주에 한 번씩 2회 투여한 후 saline만 투여한 그룹에 비해

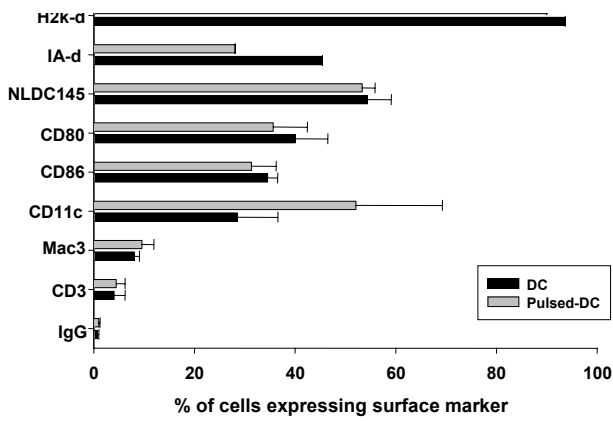


Figure 2. Flow cytometric phenotyping of cultured-DC. DCs were cultured from the bone marrow of Balb/c mice with GM-CSF and IL-4 for 7 days and pulsed with RENCA cell lysate. Cells were stained with fluorescent labeled surface marker antibodies (Table I) and analyzed with FACS Vantage™ (Becton-Dickson, Mountain View, CA, USA). Expression of MHC class I (H2k^d) was over 95%. Other antigen presentation related markers like MHC class II (IA^{-d}), co-stimulatory molecules B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86), as well as CD11c were also expressed in high level. Data supported that the cultured cells were DCs.

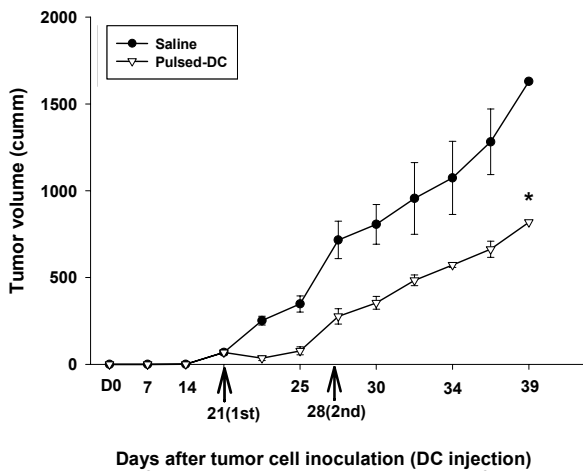


Figure 3. Growth retardation of sub-cutis inoculated tumors in established therapeutic model. Mean tumor volume±SE of 7 mice were observed. Three weeks after the RENCA cell s.c. inoculation, two injections of 2~3×10⁵ DCs were resulted in the statistically significant (asterisk: P<0.05) regression of tumor growth. Data represent the one out of three different experiments with similar trend.

현저한 종양 성장 억제 효과를 관찰하였다(Fig. 3). 그러나 수지상세포 치료만으로는 3주간 성장한 종양이 완전히 제거되지 않았다. 비치료군에서 관찰되는 사망 및 극도의 체중 감소와 운동성 둔화 등의 종양으로 인한 일반 증상은 수지상세포 치료군에서 육안 비교가 가능하도록

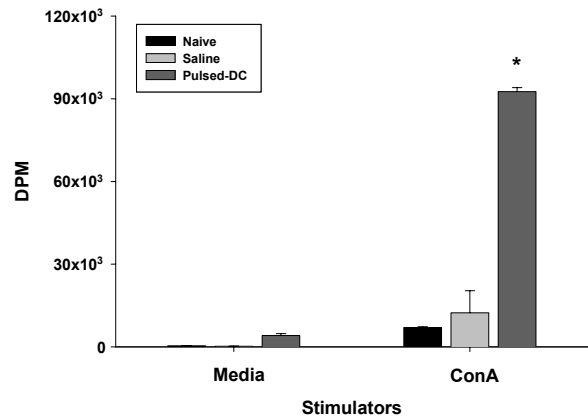


Figure 4. DC induced systemic immune modulation in established therapeutic model: induction of splenic T cell proliferations. Splenocytes from the tumor bearers treated with DCs were stimulated with T cell mitogen, ConA. T cell proliferations were significantly (asterisk means P<0.05) increased in DC treated group (750% increase of saline group). Data represent the mean±SE of 7 mice for each group, which is the result of one out of three different experiments with similar trend.

호전되었다. 또한 수지상세포 투여로 인한 현상으로 판단되는 육안 관찰 가능한 독성은 없었다.

말기암 치료 모델에서 수지상세포 치료 후 면역 기능 관찰. 마지막 수지상세포 투여 2주 후 생쥐로부터 얻어진 비장 세포에서 전신성 면역 기능의 변화를 측정하였다. Tumor cell lysate pulsed-수지상세포로 인해 유도될 것으로 예상되는 종양 특이 림프구의 반응을 관찰하였다. 수지상세포 치료 후에 비장 T 세포의 증식능이 현저히 증가하였다(Fig. 4). 즉, T 세포 mitogen인 ConA에 반응한 세포 증식이 수지 세포 치료 그룹에서 saline만 투여한 대조군에 비해 7.5배의 증가를 보였고, 정상 쥐에 비해 12배의 증가가 유도되는 것을 관찰하였다 또한 RENCA tumor cell 특이 CTL의 활성의 증가가 수지상세포 치료군에서 확인되었다(Fig. 5). In vitro CTL 유도 없이, 비장에서 분리된 초기 배양 세포의 활성을 측정하였음에도, 수지상세포 치료군의 유의한 CTL 활성 증가가 관찰되었다.

정맥 내로 주입된 신장암 세포주 발암에 미치는 치료용 수지상세포의 효과(미세 잔류암 모델). RENCA cell 을 정맥 내로 투여한 후 24시간 이내에 치료용 수지상세포를 복강 내로 주사하고, 일주일 후 두 번째 치료를 시행하였다. 조직에 정착되어 성장하는 종양은 없으나 혈액 및 체내에 종양 세포가 존재하는 미세 잔류암 및 신장암의 폐전이 모델로 수지상 세포의 치료 효과를 관찰하였다(Fig. 6, Table II). RENCA cell lysate로 pulse한 치료용 수지상세포 치료군에서 폐종양의 생성과 성장이 억제되는 것으로 확인되었다. 이 결과는 치료용 수지상

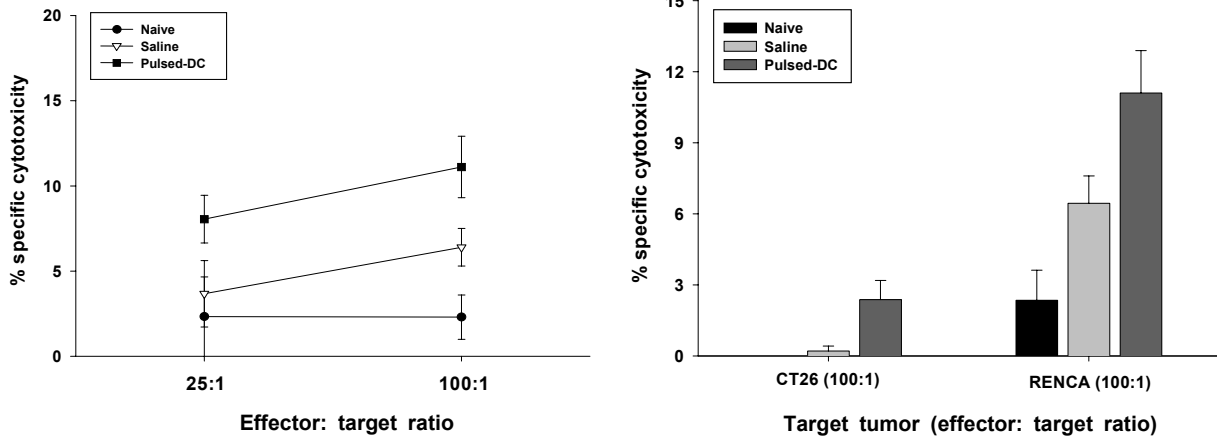


Figure 5. Cytotoxic T cell activity specific for RENCA cells in the established therapeutic model. Splenocytes from the DC treated mice (effector cells) were co-cultured for 4 hr with ⁵¹Cr-labeled target tumor cells, RENCA or CT26 in different effector: target tumor ratio. The number of target tumor cells was 1×10⁴/well. The primary CTL response was obtained without *in vitro* induction procedure. RENCA specific cytotoxic splenocyte activity was induced in RENCA cell lysate pulsed-DC treated group. Cytotoxicity against CT26 was negligible. Data represent the mean±SE of 7 mice for each group which is the result of one out of three different experiments with similar trend. A) RENCA specific cytotoxicity in different effector : target (E : T) ratio. B) Response observed against specific tumor target RENCA and non-specific tumor target CT26 at the E : T ratio 100 : 1.

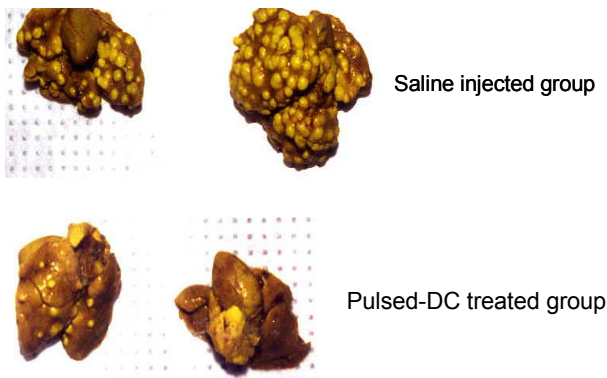


Figure 6. Pulmonary tumor nodules in minimal residual disease (MRD) model. Picture represents the pulmonary tumor formation in RENCA MRD model treated with DCs. After the elimination, lung and heart were fixed and stained with Bouin's solution to clarify the nodules. Tumor burden was quantified by counting the tumor nodules. Overall data were represented in Table II.

Table II. Pulmonary tumor burden in minimal residual disease (MRD) model.

Tumor Burden	Treatment	
	Saline	Pulsed-DC
+++	4/10 (40%)	1/14 (7%)
++	4/10 (40%)	1/14 (7%)
+	1/10 (10%)	4/14 (29%)
	9/10 (90%)	6/14 (43%)
-	1/10 (10%)	8/14 (57%)

After 24 hr of intravenous inoculation of RENCA cells Balb/c mice were treated with DCs for twice by one-week interval. Therapeutic DCs were myeloid-DC pulsed with RENCA cell lysate. Experiments were repeated three times. In each experiment 4~5 mice were enrolled in each group. Before the end of the experiments, two mice were dead in saline group and one mouse was dead in DC treated group. The quantification of tumor burden was standardized by counting the tumor nodules found in the lung. +++: Number of pulmonary tumor nodule >30, ++: = 10~30, +: < 10, - : No tumor nodules observed by eyes.

세포가 항암 보조 면역 요법제로 수술 등으로 종양을 제거한 후 남아 있는 미세 잔류암을 해결하기 위해 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

미세 잔류 전이암 모델에서 수지상세포 치료 후 면역 기능 관찰. 마지막 수지상세포 투여 2주 후 생쥐로부터 얻어진 비장 세포에서 전신성 면역 기능의 변화를 측정하였다. 수지상세포 치료 후에 RENCA cell lysate에 반응하는 종양 특이 비장 림프구의 증식이 현저히 증가하여 치료용 수지상세포에 의한 종양 특이 면역 세포 활성화를 확인하였다(Fig. 7). 즉, tumor cell lysate pulsed 수지상

세포 치료 그룹에서 saline만 투여한 대조군에 비해 lysate에 반응한 림프구 증식률이 3.6배 증가하였다. RENCA cell 특이 CTL의 활성의 증가도 수지상세포 치료 군의 비장 초기 배양 세포에서 확인되었다(Fig. 8).

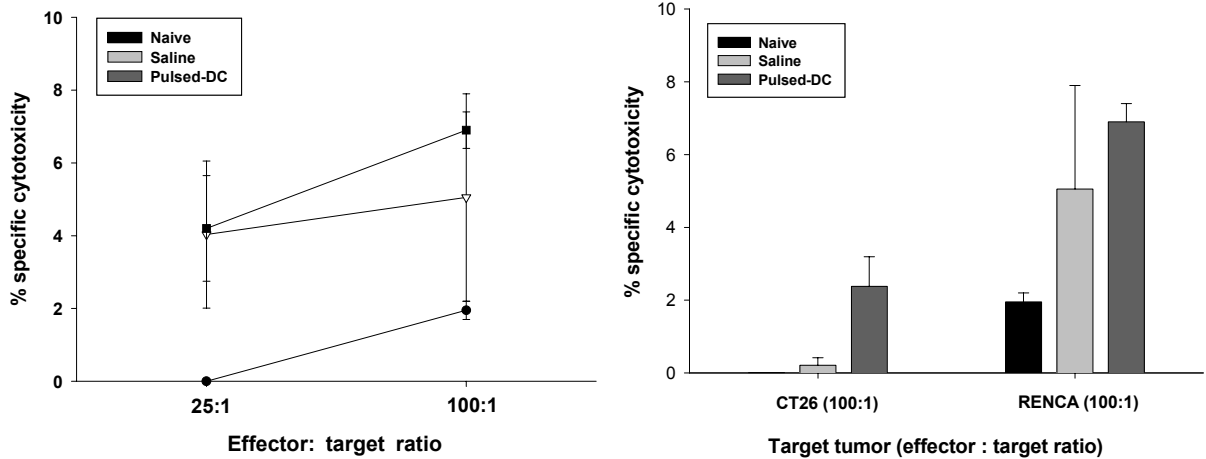


Figure 8. Cytotoxic T cell activity specific for RENCA cells in the MRD model. Splenocytes from DC treated mice (effector cells) were co-cultured for 4 hr with ⁵¹Cr-labeled target tumor cells, RENCA or CT26 in different effector: target tumor ratios. The number of target tumor cells was 1×10⁴/well. RENCA specific cytotoxic splenocyte activity was induced in RENCA cell lysate pulsed-DC treated group. Data represent the mean±SE of 4~5 mice for each group which is the result of one out of three different experiments with similar trend. A) RENCA specific cytotoxicity in different effector: target (E : T) ratios. B) Response observed against specific tumor target RENCA and non-specific tumor target CT26 at the E : T ratio 100 : 1.

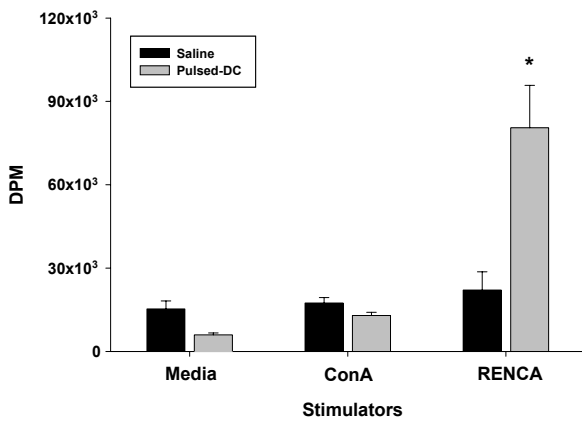


Figure 7. DC induced systemic immune modulation in MRD model: induction of RENCA-specific splenic lymphocyte proliferations. Splenocytes from the tumor bearers treated with DCs were stimulated with T cell mitogen, ConA or RENCA cell lysate (20 ug/ml). RENCA specific lymphocyte proliferations were significantly (asterisk, P<0.05) increased in DC treated group (360% increase of saline group). Data represent the mean ±SE of 4~5 mice for each group which is the result of one out of three different experiments with similar trend.

고찰

본 실험은 대표적 난치성 종양인 신장암 모델에서 종양 항원으로 체외 교육된 수지상 세포의 항암 면역 치료 효과를 확인한 것이다. 기존의 항암 치료법인 화학 요법, 외과적 적제술, 방사선 요법 등의 정상 세포에 대한 부작용 및 치료적 한계는 새로운 대안을 요구하고 있다 저하

되어 있는 암 환자의 면역 기능을 도와 암세포 특이 면역 반응을 일으켜 효과적인 항암 작용이 활성화되기를 기대하는 면역 세포 치료법의 유용성이 대두되고 있다 수지상세포는 종양 관련 항원을 효과적으로 면역 세포에 전달하여 항암 효능 세포가 활성화되도록 하는 데 가장 중심 역할을 하는 것으로 알려져 있다(26).

최근의 연구 결과들은 수지상세포의 종류가 생체 내에서뿐만 아니라, 체외 배양된 세포에서도 매우 다양함을 밝히고 있다. 체외 배양된 수지상세포의 origin(즉, lymphoid or myeloid-DC, dermal-DC)뿐만 아니라 표현형의 heterogeneity 및 기능(항원 소개 능력 또는 면역 관용 조절)에도 종류별 차이가 있는 것이 보고되고 있다(27-30). 특히 DC의 성숙도(maturation) 및 활성화도(priming/polarization)는 실질적으로 DC를 질병 치료에 이용하려 할 때 가장 효과적인 치료 결과를 얻기 위해 반드시 고려하여야 할 사항으로 인정되고 있다(31-33). 본 실험을 위해 배양된 골수성 수지상세포(myeloid-DC)는 항원 소개 기능을 담당할 수 있는 MHC class I molecule을 거의 대부분의 세포에서 발현하였고(95% 이상) MHC class II 및 co-stimulatory factor molecule들의 발현은 40~50%의 세포에서 관찰되었다. 생쥐의 생체 내 수지상세포 분리에 사용되는 CD11c 또는 interdigitating DC의 표현형으로 알려진 NLDC 145는 50~60%의 세포에서 발현되고, CD3와 CD4, CD8의 발현은 5~10%에 그쳐(data not shown) 배양된 수지상세포가 골수성이며 항원 소개 기능을 담당할 수 있음을 예측할 수 있었다. 별도의 순수 분리 과정 없이 배양 세포 100%가 수지상 세포일 수 없을 것으로 생각되나, 활성 대식세포 및 일부 수지상세포에서

도 발현되는 것으로 알려지는 Mac3의 발현과 100%에 가까운 MHC class I molecule의 발현은 혼합된 세포 역시 항원 소개 기능을 담당할 것으로 추측하게 하여, 항암 면역 세포 치료의 목적을 달성하는 것은 별 무리가 없으리라 생각된다. 이중 림프구 증식 유도 작용을 확인하여 수지상세포의 기능을 확인하는 mixed lymphocyte reaction (MLR)을 통해 배양된 세포의 성상을 확인하였다 그러나 이 같은 *in vitro* 확인법으로 *in vivo* 항암 효과를 예측하는 것은 어려운 것으로 예상된다.

말기암 모델은 RENCA cell을 생쥐의 피하에 주입한 후 3주가 지나면, 종양이 직경 5~10 mm 이상으로 자라고 항암 치료 없이는 1~2주 내에 사망하는 상황이다. RENCA cell lysate로 pulse한 수지상세포로 치료한 군에서 유의한 종양 성장 억제 효과와 함께 체중 감소 운동성 둔화 등 종양으로 인한 일반 증상의 호전을 확인하였다. 생존을 확인 전에 면역 반응 검사를 위해 마지막 수지상세포 주사 2주 후 일괄 희생시킨 시점에서 saline을 투여한 군에서만 미리 사망한 경우가 관찰되었다. 비록 이미 일정 크기 이상 성장한 종양이 완전히 제거되지는 않았지만 치료 효과를 볼 수 있었다. 치료 후 확인한 RENCA 특이 전신성 면역기능의 검색은 수지상세포 투여에 의한 항암 효과와 면역 기능 변화의 연관성을 증명하고 있다. RENCA cell lysate pulsed-수지상세포로 치료한 군에서 RENCA cell에 대한 특이 살해세포 활성 (cytotoxic T cell, CTL activity)이 증가하였고, T 세포의 증식 반응 또한 현저히 증가한 것을 관찰하였다. CTL activity의 측정은 비장 세포의 일차 반응으로, *in vitro*에서 증폭 과정을 거치지 않았으므로, 절대치는 낮았으나 수지상세포 치료군과 비치료군 간의 현저한 차이를 확인할 수 있었다. 그러나 수지상세포 치료에 의해 종양항원 특이 면역기능이 현저히 증가함에도 불구하고, *in vivo* 말기암 모델에서 완전한 종양 제거가 일어나지 않는 것은 유도된 면역기능이 거의 최대로 성장한 종양을 제거하기에는 부족하기 때문일 것으로 추측할 수 있다. 미세 잔류암 모델은 주 종양이 수술, 화학 요법, 방사선 요법 등으로 제거된 후 조직 중에 정착되어 형성된 종양은 없으나 생체 내에 암 세포가 잔류하는 상황을 모방하였다 말기암 모델에서와 다르게 종양 생성이 완전히 억제된 경우가 있었고 비치료군에 비해 종양 생성의 정도가 현저히 차이가 나는 것을 관찰할 수 있어 좀 더 나은 치료 효과를 기대할 수 있음을 시사하였다. 종양 특이 면역기능의 변화를 확인하기 위하여 RENCA cell lysate pulsed 수지상세포의 마지막 주사 2주 후 비장 세포를 얻어 림프구 증식 기능을 관찰하였을 때, 말기암 모델에서와 다르게, ConA에 대한 비특이적 T 세포 증식은 큰 변화를 보이지 않았으나 RENCA cell lysate에 대한 특이 증식 반응은 현저히 증가하는 것을 관찰하였다. RENCA 세포에

대한 CTL activity가 증가하는 것과 함께 수지상세포 치료에 의한 전신성 면역 반응 변화와 항암 효과와의 연관 관계를 확인할 수 있었다.

말기암 치료 모델에서 수지상세포에 의한 치료 효과가 제한적인 것은 이미 생성된 종양의 크기가 면역 반응을 넘어서는 상태인 것이 원인일 수도 있으나, 또한 수지상 세포 치료 방법의 변화가 필요한 것일 수도 있다. 즉 수지상세포 치료 횟수, 주입 경로, 치료 시기 등에 따른 효과를 면밀히 연구하여야 실제 임상 응용에 가장 큰 효과를 얻을 수 있으리라고 생각된다. 또한 치료용 수지상 세포 제조에 있어, tumor cell lysate 외에 항원 소개 원의 종류, 소개 방법(34), 수지상세포의 분화/성숙 상태 등의 (32,35,36) 가장 적절한 조건을 찾는 것도 치료 효과를 증대시키는 중요한 요인으로 생각된다. 이와 같은 문제점들이 해결되어야 함에도 불구하고, 본 실험의 결과는 수지상 세포가 효과적인 항암 면역세포 치료제로서 충분한 가능성을 가지고 있음을 시사하고 있다.

*In vitro*에서 제조된 치료용 수지상세포의 항암 효과를 예측하거나, 주사 후 환자의 면역 기능 검사에 의해 치료 효과를 단시간 내에 확인할 수 있게 하기 위해 면역 기능 검색의 여러 방법들이 시도되고 있다. Holtl 등(37)의 연구 결과는 수지상세포에 대한 임상 반응과 보조 항원으로 사용된 KLH에 대한 지연성 과민 반응의 결과가 비례함을 나타내고 있다. 최근 연구 관심사 중의 하나는 *in vivo* 항암 효과와 보다 가깝게 연결되는 면역 기능 인자들(예, CD8⁺ 세포에서 분비되는 IFN- γ)을 찾고 그 변화를 측정하여, *in vivo* 효과를 예측하는 것이다. 본 실험에서는 치료 후 나타나는 종양 특이 전신성 면역 기능의 변화가 *in vivo* 항암 효과와 연관성을 나타내는 것을 관찰하였다. 그러나, 배양된 수지상세포의 *in vitro* 기능 확인 실험의 결과는 *in vivo* 항암 효과를 대변하지 못했다.

신장암 대상 수지상세포 치료가 항암 특이 면역 기능을 증가시키며 종양 생성 및 성장 억제에 충분한 가능성을 보인 본 연구 결과를 바탕으로 종양 항원으로 교육된 수지상 세포를 이용한 항암 면역 치료법을 보다 강력하고 효과적으로 개선하기 위한 실험이 진행되고 있다.

참 고 문 헌

1. Steinman RM, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137;1142-1162, 1973
2. Steinman RM: Prospects for immunotherapy directed to the T cell receptor in human autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* 636;147-153, 1991
3. Shurin MR: Dendritic cells presenting tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother* 43;158, 1996
4. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392;245-252, 1998
5. Palucka K, Banchereau J: Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol* 19;12-25, 1999

6. Palucka K, Banchereau J: Linking innate and adaptive immunity. *Nat Med* 5;868-870, 1999
7. Inaba K, Young JW, Steinman RM : Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med* 166; 182-194, 1987
8. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM: Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 172;631-640, 1990.
9. Flamand V, Sornasse T, Thielenabs K, Demanet C, Bakkus M, Bazin H, Thielemans C, Leo O, Urbain J, Moser M: Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *Eur J Immunol* 24;605-610, 1994
10. Celluzzi C, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD: Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 183;283-288, 1996
11. Hart DNJ: Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90(9);3245-3287, 1997.
12. Kurokawa T, Oelke M, Mackensen A: Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells. *Int J Cancer* 91;749, 2001
13. Muller L, Provenzani C, Faul C, Pawelec G: Recognition of chronic myelogenous leukemia cells by autologous T lymphocytes primed in vitro against the patient's dendritic cells. *Br J Haematol* 112(3);740-748, 2001
14. Fernandez N et.al.: Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature Medicine* 5(4);405-410, 1999
15. Young Robert C: Metastatic renal-cell carcinoma: what causes occasional dramatic regressions? *The New England Journal of Medicine* 338(18);1305-1306, 1998
16. Annual Report of the Central Cancer Registry in Korea, Central Cancer Registry Center, Ministry of Health and Welfare p42, 2001
17. Gregorian SK, Battisto JR: Immunosuppression in murine renal cell carcinoma.I. Characterization of extent, severity and sources. *Cancer Immunol Immunother* 31(6);325-334, 1990
18. Medial Research Council Renal Cancer Collaborators: Interferon- α and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomized controlled trial. *Lancet* 353;14, 1999
19. Rosenberg SA, Lotze MT, Mull LM: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316;889, 1987
20. Gregorian SK., Battisto JR. : Immunosuppression in murine renal cell carcinoma II. Identification of responsible lymphoid cell phenotypes and examination of eliminatin of suppression. *Cancer Immunol Immunother* 31(6);335-341, 1990
21. Divgi CR, Bander NH, Scott AM: Phase I/II radioimmunotherapy trial with iodine-131-labeled monoclonal antibody G250 in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 4;2729, 1998
22. Grabmaier K, Vissier JLM, De Wueert MCA: Molecular cloning and immunogenicity of renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Int J Cancer* 85;865, 2000
23. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Dequchi M, Ikehara S, Steinman RM: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176(6);1693-1702, 1992
24. Ray PK, Raychaudhuri S, Allen P: Mechanism of regression of mammary adenocarcinomas in rats following plasma adsorption over protein A-containing staphylococcus aureus. *Cancer Res* 42; 4970-4974, 1982
25. Yoon HL, Singh KP, Ratner S, Reiners JrJJ: Phorbol ester effects on splenic lymphocyte composition and cytotoxic T cell activities of SSIN mice: a strain deficient in CD8+ T cells. *Carcinogenesis* 17(12);2617-2624, 1996
26. Lotze, M., Shurin, M., Davis, I., Amoscato, A., and Storkus, W.: Dendritic cell based therapy of cancer. *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology*. Ricciardi-Castagnoli ed., Plenum Press, New York, USA, 1997.
27. Inaba K, Inaba M, Deguchi M, Hagi K, Yasumizu R, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM: Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex calss II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 90;3038-3042, 1993
28. Olweus J, BitMansour A, Warnke R: Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94;12551-12556, 1997
29. Steinman RM, Inaba K: Myeloid dendritic cells. *J Leuk Biol* 66(2); 205-208, 1999
30. Wu L: Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98; 3376-3382, 2001
31. 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 downregulated by tumor necrosis factor-. *J Exp Med* 179;1109, 1994.
32. Kalinski P, Schuitemarker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML: Final maturation of dendritic cells id associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol* 162(6);3231-3236, 1999
33. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G: Pro-inflammatory cytokines and prostaglandines induce maturaton of potent immunostimulatory dendritic cells under feta-calf-serum free conditions. *Eur J Immunol* 27(12); 3135-3142, 1999
34. Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J: Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 63;2127-2133, 2003
35. Oosterwijk-Wakka J, Tiemessen D, Bleumer I, de Varies I, Jongmans W, Adema G, Debruyne F, de Mulder PH, Oosterwijk E, Mulders PF: Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigen in combination with interleukin-2: A phase I study. *J Immunother* 25(6);500-508, 2002
36. Gitlitz B, Beldegrun A, Zisman A, Chao D, Pantuck A, Hinkel A, Mulders P, Moldawer N, Tso C, Figlin R: A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J Immunother* 26(5);412-419, 2003
37. Holtl L, Rieser C, Papesh C: Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *J Urol* 161;777, 1999