동종 종양 세포 용해액을 이용한 수지상 세포 항암 백신의 흑색종 폐암 전이 모델에서의 효과 연구

[1](주) 메디포스트 중앙연구소, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 암센터

이영준[1] · 김명주 · 인소희 · 최옥미[1] · 백소영 · 권영도[1] · 이현아

Effect of Dendritic Cell Based Cancer Vaccine Using Allogeneic Tumor Cell Lysate in Melanoma Pulmonary Metastasis Model

Young-Joon Lee[1], Myung Joo Kim, So Hee In, Ok-Mi Choi[1], Soyoung Baek, Young-Do Kwon[1] and Hyunah Lee

[1]Medipost Biomedical Research Institute, The Cancer Center, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: To perform the successful dendritic cell-based cancer immunotherapy one of the main issues to be solved is the source of antigen for DC pulsing. Limitations occur by using auto-tumor lysate due to the difficulties obtaining enough tumor tissue(s) quantitatively as well as qualitatively. In this study the possibility of allogeneic tumor cell lysate as a DC pulsing antigen has been tested in mouse melanoma pulmonary metastasis model. **Methods:** B16F10 melanoma cells (1×10^5/mouse) were inoculated intravenously into the C57BL/6 mouse. Therapeutic DCs were cultured from the bone marrow myeloid lineage cells with GM-CSF and IL-4 (1,000 U/ml each) for 7 days and pulsed with lysate of either autologous B16F10 (B-DC), allogeneic K1735 (C3H/He origin; K-DC) or CloneM3 (DBA2 origin; C-DC) melanoma cells for 18 hrs. Pulsed-DCs (1×10^6/mouse)[CGP1] were injected i.p. twice with one week interval starting from the day 1 after tumor cell inoculation. **Results:** Without observable toxicity, allogeneic tumor cell lysate pulsed-DC induced the significantly better anti-tumor response (tumor scale: 2.7 ± 0.3, 0.7 ± 0.3 and 0.3 ± 0.2 for saline, B-DC and C-DC treated group, respectively). Along with increased tumor specific lymphocyte proliferations, induction of IFN-γ secretion against both auto- and allo-tumor cell lysates was observed from the DC treated mice. (w/B16F10-lysate: 44.97 ± 10.31, 1787.94 ± 131.18, 1257.15 ± 48.27, w/CloneM3 lysate: 0, 1591.13 ± 1.83, 1460.47 ± 86.05 pg/ml for saline, B-DC and C-DC treated group, respectively) Natural killer cell activity was also increased in the mice treated with tumor cell lysate pulsed-DC ($8.9\pm$[CGP2]0.1, 11.6 ± 0.8 and 12.6 ± 0.7% specific NK activity for saline, B-DC and C-DC treated group, respectively). **Conclusion:** Conclusively, promising data were obtained that allogeneic-tumor cell lysate can be used as a tumor antigen for DC-based cancer immunotherapy. **(Immune Network 2005;5(3):163-171)**

Key Words: Dendritic cells, anti-cancer immunotherapy, allogeneic tumor cell lysate

서 론

악성 종양의 치료 방법은 크게 외과적 수술, 약물치료 및 방사선치료 등으로 구분할 수 있으며 이러한 방법들이 필요에 따라 상호보완적으로 사용되고 있으나 심각한 부작용 등의 문제로 인해 더욱 효과적이고 안전한 종양 치료법의 개발이 절실히 요구되고 있다. 최근 새로운 개념의 면역학적 치료 방법들이 개발되고 있는데, 환자의 면역체계를 활성화하여 잔류 종양세포를 제거하거나 성장을 상당 기간 동안 억제하는 방법들로써 치료 효과

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

개선과 함께 부작용이 많이 감소하였다는 것이 큰 장점이다. 특히 수지상세포(dendritic cell, DC)를 이용한 항암면역치료법이 1990년대 중반부터 연구되기 시작하여 현재까지 많은 연구 성과를 올리고 있다.

수지상 세포는 골수 조혈 줄기세포로부터 유래하며 가장 강력한 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)로 항원자극이 있을 때는 일차성 면역반응을 유발하고 지속시키는 능력을 가지고 있다(1-8). 수지상 세포는 MHC 분자는 물론이고 B7.1 (CD80) 및 B7.2 (CD86) 등의 co-stimulatory molecule과 adhesion molecule들을 가장 풍부하게 발현하는 APC이므로 휴지기(resting) 또는 미감작(naive) T세포를 강력하게 자극하여 항원특이 T세포반응을 유발시킨다. 종양에 대한 면역반응에서 결정적인 역할을 수행하는 세포독성 T림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL) 반응을 유도하기 위해서는 첫째 수지상 세포와 같은 강력한 APC에 항원 펩타이드를 표출시켜야 하고, 둘째로 $CD4^+$ T세포의 도움을 받아야 한다. 수지상 세포는 외인성 단백질 항원들로부터 유래된 펩타이드도 MHC class I 분자와 함께 교차제시(cross-presentation)하여 CTL을 교차자극(cross-priming)할 수 있다(9-13). 따라서, 수지상 세포를 항암면역 치료에 이용할 수 있는 것은 외인성 항원을 CTL에 교차 자극시킬 수 있는 능력과 강력한 면역반응을 유발하는 능력 때문이라고 할 수 있다.

1990중반[CGP3]에 사람 수지상 세포의 생체외 배양법이 정립되고(14-16) Hsu 등(17)이 1996년에 최초로 수지상 세포를 이용한 항암면역 치료 결과를 보고한 이후 종양특이적인 면역반응을 유도하기 위해서 수지상 세포에 다양한 방법으로 Tumor Associated Antigen (TAA)[CGP4]를 전달하여 임상 연구가 진행되고 있다. 현재까지 임상연구에서 가장 많이 이용된 방법들로는 TAA의 합성 펩타이드를 사용하는 방법과(18-23) 자가 종양세포 용해액이나 고사체 등과 같은 종양세포의 항원복합체를 TAA의 재료로 사용하는 방법이(18,24-28) 있다. 자가 종양세포 용해액을 TAA의 재료로 사용하면 펩타이드 항원이 가진 제한점들; 즉, 1) 합성 펩타이드의 친화도가 사람백혈구항원(human leukocyte antigen, HLA) 분자의 특정 아형에만 국한됨. 2) 항원표출이 충분한 기간 동안 안정적으로 유지되지 않음(29). 3) 추가적인 $CD4^+$ T세포의 활성화가 유발되지 않아 면역반응이 상대적으로 약함. 4) 유도된 CTL 반응이 특정 TAA에만 됨[CGP5]. 5) 그리고 TAA 펩타이드가 밝혀진 종양이 제한적인 것 같은 문제점들을 많이 극복할 수는 있지만 역시 해결해야 할 문제점을 안고 있다. 즉, 1) 환자의 원발성 종양을 이미 수술로 제거하여 자가 종양조직을 얻을 수 없거나 작은 전이병소가 산발적으로 존재하여 자가 종양조직을 충분히 얻을 수 없는 환자들에게는 적용할 수 없음[CGP6]. 2) 육안적으로 확인 선별된 종양조직에 정상세포들도 포함되어 있고 완전한 선별이 어려움. 3) 종양세포만을 선별하여 사용하더라도 종양세포에 있는 여러 종류의 자가 항원들이 수지상 세포에 함께 탑재되어 면역기능을 자극하기 때문에 자가면역질환을 유발할 가능성이 있음[CGP7]. 따라서, 공통의 TAA를 발현하는 확립된 동종 종양세포 주를 항원의 재료로 사용한다면 종양세포의 항원복합체를 사용하는 장점을 살리면서 자가 종양조직을 사용할 때의 여러 가지 문제점도 극복할 수 있는 가능성이 있다.

동종 종양세포 백신에 의한 세포성 면역반응 유도 결과가 여러 연구팀에 의해 보고되고 있다. Souberbielle 등(30)은 B16F10 흑색종 동물모델에서 동종 흑색종 세포주인 K1735-M2를 방사선 조사하여 제조한 백신을 정맥 내 및 복강 내 주사한 후 B16F10을 피하 주사하였을 때 자가(syngeneic) 종양세포 백신을 주사한 대상군보다 생존율이 향상되었다고 보고하였으며, Melcher 등(31)은 B16F1 흑색종 동물모델에서 동종 흑색종 세포주인 K1735를 방사선 조사하여 자가 미성숙 수지상 세포와 혼합한 백신을 피하 주사한 경우에 방사선 조사한 K1735 세포만을 백신으로 사용했을 때보다 생존율이 증가되었다고 보고하였다. 또한, 사람 DC와 종양 세포주를 사용한 *in vitro* 실험에서는 동종 흑색종 세포주로 제조된 항원을 말초혈액 단구로부터 배양한 수지상 세포에 탑재시켜 CTL을 유도한 후 다른 흑색종 세포주에 반응시켰을 때 HLA 표현형에 제한적인 흑색종-특이 면역반응이 일어난다는 것이 확인되었다(32,33). 그리고, Holtl과 Thurnher 등(34)이 시행한 자가 암세포 또는 확립된 동종 신세포암 세포주(A498)의 용해물을 말초혈액 단구-유래 수지상 세포에 탑재하여 전이성 신세포암 환자의 면역치료에 적용한 임상연구는 동종 신세포암 세포주 항원을 탑재한 수지상 세포로 치료한 일부의 환자에서 임상적 반응을 보였다고 보고하였으며, Salcedo 등(35)은 전이성 흑색종 환자를 대상으로 동종 흑색종 세포주인 M17의 용해물을 탑재한 자가 수지상 세포 백신으로 치료한 8명의 환자 중 3명에서 임상적 반응이 관찰되었다고 보고하였다.

이상의 보고들로 동종 종양 세포주를 항원의 재료로 사용한 수지상 세포 백신의 항암면역치료 적용 가능성을 확인할 수 있으나, 실제 임상에 유용하게 사용할 충분한 전임상 연구 결과들이 부족한 상황이다. 본 연구는 기존 수지상 세포 백신의 단점들을 극복할 수 있는 새로운 대안으로 동종 종양세포 용해액을 이용한 수지상 세포 백신의 활용 가능성을 마우스 흑색종의 폐암 전이 모델을 이용하여 검증하였다. 종양 생성 억제 및 종양 특이 면역 반응 유도 관찰을 통해 동종 종양세포 용해액의 수지상 세포 백신 항원 재료로서의 가능성을 고찰하였다.

재료 및 방법

동물. 암컷 순계인 C57BL/6 mice (5~6 주령)를 대한

Bio-Link (충청북도 음성)로부터 구입하였다. Mice는 특정 병원균이 없는(specific pathogen-free, SPF) 동물로 삼성서울병원 실험동물연구실에서 ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources) guideline에 따라 사육되었다. 실험 기간 중 사료와 물은 자유롭게 섭취 시켰고, 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)로부터 구입하였다. 아래의 시약들은 미국 SIGMA Chemical Co. (St.Louis, MO)로부터 구입하였다; lipopolysaccharide (LPS, from *E.Coli* 055:B5), concanavalin A (ConA), mitomycin-C. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)는 Molecular Probes Inc., Eugene, OR)로부터 구입하였다. Flow cytometric phenotyping을 위하여 BD-Pharmingen (Sandiego, CA, USA)으로부터 다음과 같은 항체들을 구입하였다; fluorescein isothiocyanate (FITC)-or phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal Abs for MHC class I (H-2Kb), MHC class II (IAb), CD4, CD8, CD11c, CD80 and CD86. Low-Tox-M 보체 및 Lympholyte-M은 CEDARLANE (Ontario, Canada)으로부터 구입하였다.

세포주. C57BL/6 syngeneic 흑색종 세포주인 B16F10 cell line (H2b)을 미국 세포주 은행(ATCC, Rockville, MD)으로부터 구입하였다. 세포주의 배양은 RPMI-1640 medium (10% heat inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 그리고 100 g/ml streptomycin을 첨가한 complete medium)으로 유지되었다. 동종 흑색종 세포주로서 C3H/He 마우스에서 유래한 K1735 (H2k) 및 DBA/2 마우스에서 유래한 Clone-M3 (H2d)들을 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하여 B16F10과 같은 방법으로 유지되었다. 생쥐 골수 세포로부터 myeloid계 세포를 분리하기 위하여 사용한 항체는 hybridoma cell lines에서 얻었다(GK1.5 for anti-L3T4, 53.672 for anti-Lyt-2, RA3 for anti-B220, J11d for anti-B cells/neutrophills). 각 세포주는 미국세포주은행(ATCC, Rockville, MD)으로부터 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. (14) 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 tumor cell lysate 50 μg/ml을 넣고 18시간 더 배양하였다. Tumor cell lysate는 B16F10 (자가 종양 세포주) 및 clone-M3, K1735 (동종 종양 세포주)을 liquid nitrogen (−180°C)과 incubator (37°C)에서 5회의 freezing-thawing 과정을 거친 후 1,500 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻어진 상등액의 단백질 함유를 Bradford법으로 확인하여 정량하였다. 배양 7일째 수지상 세포를 거두어 표현형 및 B16F10 mouse의 비장 림프구를 responder로 하는 자가 mixed lymphocyte response (MLR) assay[CGP8]로 기능을 검색하였다. 또한 배양액 중의 IL-10 및 IL-12의 양을 측정하여 수지상 세포를 정성하였다. 치료용으로 주사하기 위한 수지상 세포는 종양 세포 용해액과 함께 배양한 후 수확하여 주사용 생리 식염수에 부유시킨 후(1×10^6/200 μl/mouse) 2시간 이내에 생쥐 복강으로 투여하였다.

종양 세포 이식 및 치료용 수지상 세포 주입. 배양된 흑색종 세포들을 거두어 정맥 내(1×10^5 cells/100 μl/ mouse)로 주입하였다. 치료용 수지상 세포의 투여는(1×10^6 DCs/mouse), 종양 세포 주입 1일 후부터 시작하였다 (폐전이 미세 잔류암 모델). 일주일 간격으로 2회 치료용 수지상 세포를 복강 내로 투입하였다(B16F10-DC, B-DC). 대조군은 saline을 투여한 군과, 종양세포 용해액으로 pulsing하지 않은 수지상 세포 투여군(UDC) 및 동종 흑색종 세포 용해액으로 pulsing한 수지상 세포 투여군(clone M3-DC, C-DC & K1735-DC, K-DC)을 설정하였다. 종양 형성은 마지막 치료 2주 후 생쥐를 희생시켜 확인하였다. 즉 B16F10 흑색종의 정맥 내 주사 후 21일째까지 생존여부와 독성반응을 관찰하였으며, 21일째에 살아있는 모든 실험동물들을 희생시켜 폐암 형성 및 전신전이 양상을 육안으로 관찰하였다(Fig. 1). 폐에 형성된 전이 흑색종은 수지상 세포 치료에 반응을 보인 마우스를 제외하고 폐에 생성된 종양의 결절들이 상당히 크고 서로 뭉쳐 있어서 각개 결절의 수를 세는 것이 불가능하여 종양의 형성 정도를 평가하기 위해 몇 개의 등급으로 구분하여 반 정량적으로 평가하는 방법(36)을 활용하였다(Table II).

세포 표현형 검색(Flow cytometric analysis). 수지상 세포 또는 비장 세포의 표현형 검색은 기 발표된 Yoon 등(37)의 방법을 따랐다. 비장 단핵세포는(1×10^5 cells/100 μl) 형광 물질로 표식된 항체들을 함유한 PBS-CS (PBS +0.1% sodium azide+1% FBS)[CGP9]에 부유시킨 후 4°C에서 40 분간 배양하였다. 사용된 항체들은 다음과 같다; Total T cell[CGP10]을 위한 hamster anti-mouse CD3- FITC, 각각 CD4및 CD8 T cell subset을 위한 rat anti-mouse L3T4-PE, rat anti-mouse Lyt-2-PE, 활성 대식세포 확인을 위한 rat anti-mouse Mac3-PE. Negative control은 rat

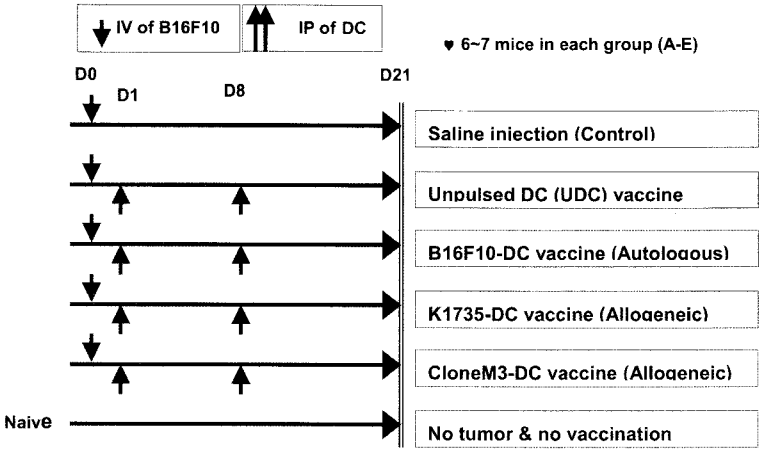

Figure 1. Experimental protocol.

IgG2b-PE (Pharmingen, San Diego, CA)와 hamster IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). 수지상 세포의 확인은 같은 방법으로 CD4/CD8 (Primed or unprimed T cells), CD11c (Dendritic cells, CD4-$CD8^+$intraepithelial lymphocytes), CD80 (B7-1 co- stimulatory molecule) CD86 (B7-2 co-stimulatory molecule) $H2k^b$ (MHC class I molecule) IA^b (MHC class II molecule) 및 Dextran-FITC (phagocytic ability of DCs (maturation))를 항체로 사용하였다. 배양이 끝난 후 세포를 세척하고, 500 μl의 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 확인(auto-MLR)하기 위하여 또는 치료 후 종양 특이 면역 기능 증가를 확인(immune monitoring)하기 위하여 비장 단핵세포의 증식을 확인하였다[CGP11]. 형광 물질인 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)를 세포에 결합시킨 후 수지상 세포와 같이 배양하거나(auto-MLR), 수지상 세포 pulsing에 사용한 종양 세포 용해액 첨가로 세포증식을 유도하여(immune monitoring), 분열한 세포 내의 형광 발현도가 증식유도 이전에 비해 감소하는 정도를 flow cytometer로 측정하는 방법을 사용하였다. 분석할 비장세포들을 HBSS (Gibco BRL, Life Technologies, NY, USA)에 5×10^6 cells/ml의 농도로 맞추어 CFSE 0.5 μM을 첨가하여 37°C 암소에서 10분간 반응시킨 후, 5% FBS가 첨가된 차가운 HBSS로 2회 세척한 후 2×10^6 cells/ml의 농도로 24 well plate의 각 well에 넣고 37°C, 5% CO_2 및 가습 조건에서 96시간 배양한다. 배양 후 수확한 비장세포의 형광 발생 정도를 flow cytometer로 측정한다.

종양 항원 특이 effector cytokine (IFN-γ)의 분비 측정. 수지상 세포 치료 후 생체 내에 종양 특이 항암 면역 반응에서 주 역할을 담당하는 것으로 알려진 IFN-γ (38)가 비장 면역 세포에서 분비되는지 확인하였다. 비장 림프구 1×10^7을 종양세포 용해액 20 μg/ml과 함께 24 well plate에서 37°C, 5% CO_2 및 가습 조건으로 24시간 배양한 상등액 중에서 분비된 IFN-γ를 ELISA assay kit (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

자연 살해 세포 기능 측정. 수지상 세포 치료 후 유도된 자연 살해세포(natural killer cell, NK) 활성은 Yoon 등 (37)에 의해 기 발표된 방법을 사용하였다. Effector cell (E)인 비장 림프구가 NK cytotoxicity의 표적 세포(target cell, T)인 YAC-1 mouse lymphoma cell을 죽이는 정도를 측정한다. $Na_2{}^{51}CrO_4$로 label된 표적 세포(1×10^4 cells/100 μl)와 100 μl의 effector 세포를 여러 농도로 섞어 96 well round bottom microtiter plate에서 4시간 반응시킨 후 1,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취한다. 사멸된 표적 세포에서 새어 나온 상등액 중의 방사능을 Wallac 1470 Wizard™ gamma counter (Finland)로 측정한다. 방사능 label된 표적 세포로부터의 자연적인 ^{51}Cr 방사능 유리(spontaneous release, SR)와 total release (TR)는 배양액 또는 1 NHCl로 처리한 후 각각 관찰하였다. 세포 살해능은 아래 식을 이용하여 나타내었다.

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

통계 처리. *In vivo* 실험은 그룹당 6~7마리씩으로, 2번 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.

수지상 세포 면역 표현형 발현: 마우스의 골수성 세포로부터 배양한 수지상 세포의 표현형 발현을 flow cytometry로 측정하여 확인하였다. 항원 소개 기전을 담당하

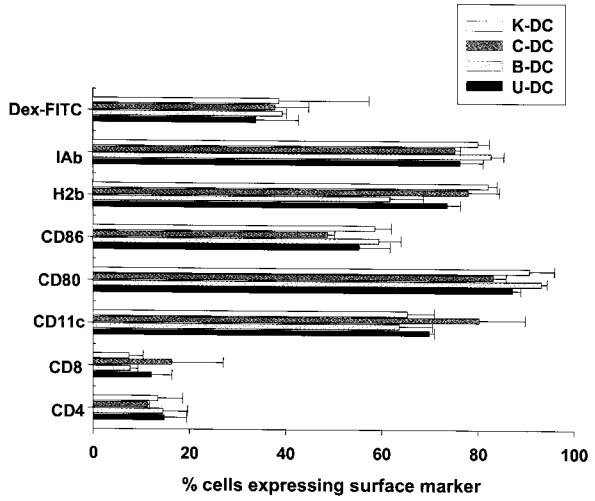

Figure 2. Flow cytometric phenotyping of cultured-DCs. DCs were cultured from the bone marrow of C57BL/6 mice with GM-CSF and IL-4 for 7 days (U-DC) and pulsed with either B16F10 (autologous B-DC), allogeneic Clone M3 (C-DC) or K1735 (K-DC) cell lysate. Cells were stained with fluorescent labeled surface marker antibodies (Table I) and analyzed with FACSVantage^{TM} (Becton- Dickson, Mountain View, CA, USA). Antigen presentation related markers like MHC class I/II ($H2k^b$/IA^b), co-stimulatory molecules $B_{7.1}$ (CD80) and $B_{7.2}$ (CD86), as well as CD11c were expressed in high level. Data supported that the cultured cells were DCs.

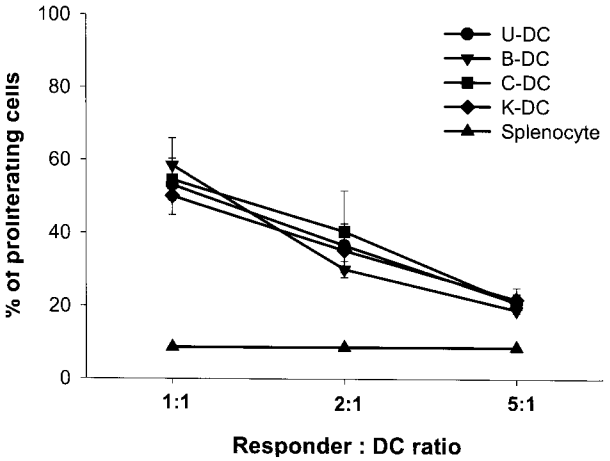

Figure 3. *In vitro* induction of autologous-mixed lymphocyte proliferation (Auto-MLR) by cultured myeloid-DCs. As a responder, CFSE labeled splenocytes (2×10^5 cells/well) from the syngeneic C57BL/6 mice were co-cultured with mitomycin-C treated DCs (stimulator) pulsed with B16F10 (B-DC), Clone M3 (C-DC) or K1735 (K-DC) cell lysates for 96 hrs. Decreased fluorescence intensity of proliferating splenocytes were detected by flow cytometer. 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.

는 MHC class I/II, CD80 & 86이 고농도로 발현되고, DC의 marker로 알려진 CD11c도 잘 발현되는 전형적인 골수성 수지상 세포로 항원 특이 세포 면역 기능 증가에

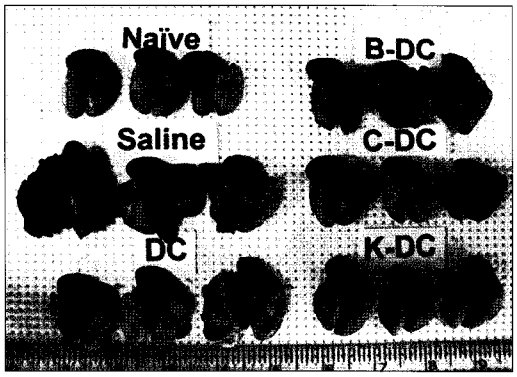

Figure 4. Gross findings of B16F10 melanoma formed in the C57BL/6 mouse lung: effect of DC vaccination. Representative lung tissues were obtained from naive mice (naive), control mice treated with saline (saline), and mice treated with unpulsed-DC (U-DC), autologous B16F10 lysate pulsed-DC (B-DC), and allogeneic Clone M3 (C-DC) or K1735 (K- DC) lysate pulsed-DC, respectively.

관여할 수 있음을 확인하였다. 종양 세포 용해액 pulsing에 의한 유의한 영향은 관찰되지 않았다(Fig. 2).

수지상 세포 자극에 의한 비장 림프구의 증식 반응 (Auto-MLR): C57BL/6 마우스에서 채취한 비장 림프구를 같은 C57BL/6 마우스의 골수로부터 분화시킨 수지상 세포와 같이 배양하여 유도되는 비장 세포의 증식 반응을 CFSE assay로 관찰하였다. 배양된 수지상 세포는 비장 세포의 증식을 유도하였고 자가(B16F10) 및 동종(Clone M3 and K1735) 세포(WDC) 용해액 탑재에 의해 통계적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다(Fig. 3).

흑색종 폐 전이 미세 잔류암 모델에서 수지상 세포의 항암 효과. C57BL/6 mouse syngeneic B16F10 흑색종 세포주를 주사한 24시간 후부터 일주일 간격으로 2회 자가 B16F10 또는 동종 Clone M3 및 K1735 세포 용해액으로 탑재한 수지상 세포로 치료한 후 2주 후에 모든 실험 동물을 안락사시켜 종양의 생성, 전이양상을 육안으로 관찰하였다(Fig. 4) 육안 및 현미경으로 관찰한 종양의 생성 정도를 De Matos (42)를 참고하여 마련한 기준에 따라 정량화 하였다(Table I). 생리식염수만 투여한 대조군(saline)의 tumor burden이 2.7±0.3인 것에 비해 수지상 세포 치료군에서는 0.7±0.3 (B-DC), 0.3±0.2 (C-DC)로 통계적으로 유의하게 종양 생성이 억제되는 것을 확인하였다(Table II)[CGP12]. 종양 세포 용해액을 탑재하지 않은 unpulsed-DC (U-DC) 투여 군과 동종 K1735 세포 용해액 탑재 수지상 세포의 종양 생성 억제 효과는 확인 되었으나 통계적 유의성은 없었다. 반면, 자가 B16F10 및 동종 clone M3 세포 용해액 탑재 수지상 세포의 우수한 항암 효과는 통계적으로도 유의하였다. 특히 동종 종양 세포주인 clone M3 용해액 탑재 수지상 세포의 효과가 가장 우수하여, 폐와 심장의 무게도 종양을 이식하지 않은 정상 쥐와 유사하였다(lung+heart weight: 0.3±0.003 g

Table I. Seimiquantitiative rating system of pulmonary metastatic melanoma in C57BL/6 mice

Grade	Score	Description of pulmonary tumor burden
I	0	No tumor mass or colonies are observed grossly or microscopically. No enlargement of lung was observed.
II	1	Tumor mass or colonies account for less than 10% of the pulmonary mass.
III	2	Tumor mass or colonies account for approximately 10~50% of the pulmonary mass.
IV	3	Tumor mass or colonies covered over 50% of pulmonary mass.
V	4	Death by heavy tumor burden.

Table II. Quantitation of anti-tumor effect of DCs for B16F10 melanoma formed in lung

Types of Vaccination	# of mice	Mean Tumor Burden[a]	P-value
Saline	3	2.7±0.3	–
DC	7	1.4±0.4	0.118
B16F10-DC	7	0.7±0.3	0.004*
Clone M3-DC	6	0.3±0.2	0.0005*
K1735-DC	6	1.0±0.5	0.072

[a]Pulmonary metastatic tumor burden is classified according to the subjective grading system (Table I). *P values of <0.05 are considered significant in comparison to control (saline-treated) mice group.

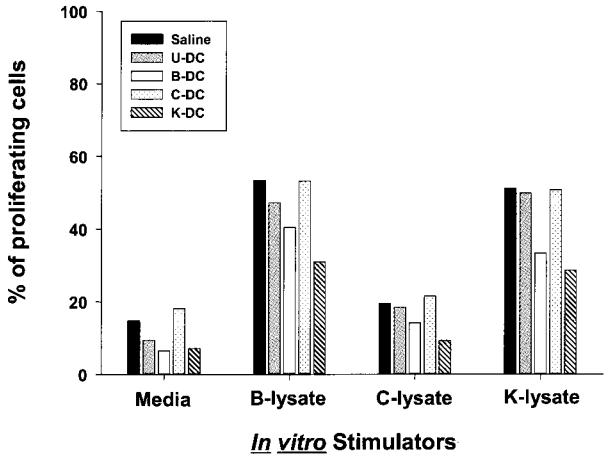

Figure 5. Splenocyte proliferations induced by tumor cell lysates. CFSE labeled splenic lymphocytes from the B16F10 melanoma bearing and tumor cell lysate pulsed-DC treated mice were cultured with B16F10, Clone M3 or K1735 cell lysates for 96 hrs to observe the proliferations. Splenic lymphocytes were prepared from the naive mice (naive), control mice treated with saline (saline), and mice treated with unpulsed-DC (U-DC), B16F10 (B-DC), and Clone M3 (C-DC) or K1735 (K-DC) cell lysate pulsed-DCs, respectively.

vs. 0.31±0.02 g for naive vs. C-DC, treated mice, respectively). 생성된 종양 세포와 같은 세포의 용해액을 탑재한 수지상 세포의 항암 효과는 종양 특이 면역 반응이 작용 기전으로 중요함을 시사한다.

종양 항원 특이 면역 반응 검색.

종양 항원 특이 림프구 증식 반응: 종양을 발생시키고 수지상 세포로 치료한 마우스의 비장세포에서 종양 세포 용해액 자극에 반응하여 증식하는 종양 항원 특이 면역 기능을 검색하였다. 전반적으로 자가 및 동종 K1735 세포 용해액으로 자극한 비장 세포의 증식은 media만 넣은 대조군에 비해 증가하는 것이 관찰되었다. 동종 clone M3세포 용해액에 대한 비장 세포 증식 반응은 media 자극에 의한 비특이 반응을 나타내는 대조군과 유사한 정도로 관찰되었다. 그러나 수지상 세포로 치료하지 않은 종양 생성군(saline 투여군)의 비장 세포도, 종양 세포 lysate에 반응하여 증식하는 것을 관찰하였고 이는 증식하는 비장 세포가 항암 효과와 관계된 것만은 아닌 것으로 생각한다. 결과는 종양세포 용해액에 반응하는 종양 항원 특이 비장세포 증식 반응은 실제 수지상 세포의 치료 효과를 대변할 수 없을 것을 시사한다(Fig. 5).

종양 항원 특이 IFN-γ 분비 반응: 림프구에서 분비하는 IFN-γ는 수지상 세포의 항암 작용 기전에서 중심 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(38). 종양을 발생시키고 수지상 세포로 치료한 마우스의 비장세포를 종양 세포 용해액으로 자극하여 배양액 중으로 분비된 IFN-γ를 ELISA로 측정하였다. 종양 항원 특이 비장 세포 증식 반응에서와는 다르게 자가 및 동종 종양 항원 자극에 대한 IFN-γ의 분비는 통계적으로 유의하게 월등히 증가하였다. 반면, saline 투여군에서는 IFN-γ의 분비가 관찰되지 않았고 종양 세포 용해액을 탑재하지 않은 수지상 세포 투여군에서의 분비는 종양 세포 탑재 수지상 세포 치료군에 비해 미미하였다. 특히 항암 효과가 우수하였던 B16F10 및 Clone M3 세포 용해액 대한 IFN-γ의 분비가 K1735 세포 용해액 자극에 대한 반응보다 우수 한 것은 종양 항원 특이 IFN-γ 분비가 수지상 세포 치료 효과와 비례함을 증명한다(Fig. 6).

수지상 세포 치료군에서 자연 살해 세포 활성 변화: 치료군의 비장 림프구 내 자연 살해 세포 활성을 조사하였다(Fig. 7). naive control의 활성과 비교하여, saline 투여 대조군 및 종양 세포 용해액을 탑재하지 않은 수지상 세

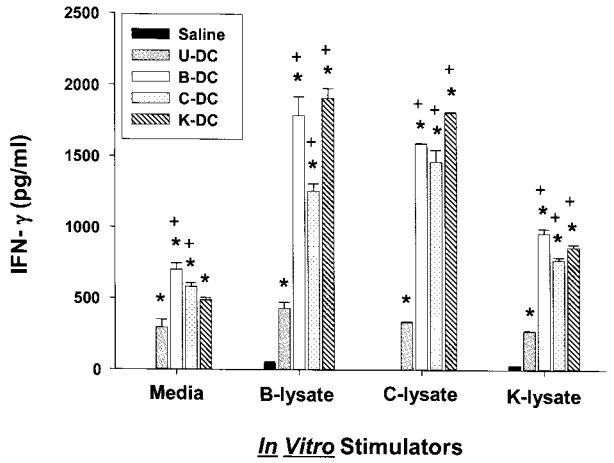

Figure 6. IFN-γ secretions induced by tumor cell lysates from the splenocytes. Splenic lymphocytes from the B16F10 melanoma bearing and tumor cell lysate pulsed-DC treated mice were stimulated with B16F10, Clone M3 or K1735 cell lysates for 24 hrs to observe the IFN-γ secretion into the culture media which is quantitated by ELISA. *Asterisks* (*) indicate that the concentrations of IFN-γ secreted from each tumor cell lysate pulsed-DC treated group were higher than that of saline treated group with statistical significance ($P<0.05$). *Plus signs* (+) indicate the statistical significance compared to U-DC treated group ($P<0.05$).

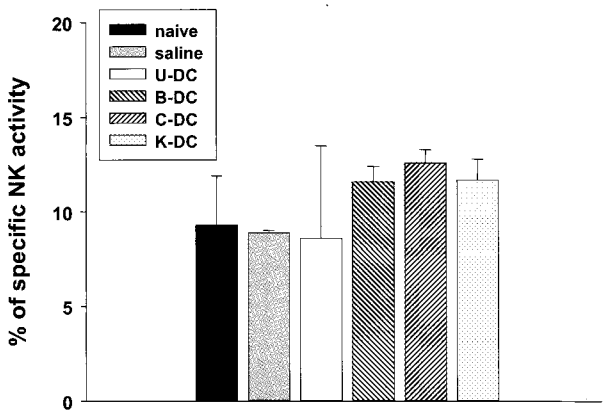

Figure 7. Splenic NK activity in DC treated tumor bearing mice. Splenic lymphocytes were obtained from the naive mice (naive), and B16F10 melanoma bearing mice treated with saline (saline) or B16F10 (B-DC), Clone M3 (C-DC) or K1735 (K-DC) tumor cell lysate pulsed-DC. Splenic lymphocytes were co-cultured for 4 hrs with $Na_2{}^{51}CrO_4$-labeled YAC-1 mouse lymphoma cells which is a target for the NK activity. Radioactivity released into the culture media was counted by Wallac 1470 Wizard™ gamma counter (Finland). % specific NK activity was calculated by the equation expressed in "materials & methods" section.

포 치료군(U-DC)에서는 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 반면에 통계적 유의성은 없었으나 종양 세포 용해액을 탑재한 수지상 세포 치료군에서의 자연 살해 세포 활성은 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 항암 효과가 가장 우수하였던 동종 clone M3 세포 용해액 탑재 수지상 세포 치료군의 자연 살해 세포 활성이 가장 많이 증가하는 경향이 관찰되었다. 이것은 수지상 세포 백신 치료에 따른 자연 살해 세포 활성 변화가 종양 항원 특이 면역반응의 변화와 함께 항암 효과의 한 기전이 될 수 있음을 시사한다.

고 찰

B16 흑색종 세포주는 C57BL/6 마우스에서 자연적으로 발생한 종양으로부터 유래한 것이다(39). K1735 흑색종 세포주는 C3H 마우스로부터 자외선 조사와 croton oil에 의해 유도되었으며(40), Clone M3 세포주는 'Cloudman S91 clone M3' 또는 'Cloudman S91' 또는 'S91-M3' 등으로 표기하기도 하는데 DBA/2 마우스에서 자연적으로 발생한 흑색종이다(41). Peter 등(42)이 B16F1, K1735-M2 및 S91-M3 흑색종 세포주들에서 MHC class I 및 II 분자와 흑색종-관련 항원(melanoma-associated antigen, MAA)인 tyrosinase, tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) 및 gp100 등의 발현 정도를 포함하여 면역학적으로 중요한 여러 종류의 표지자들을 비교 분석하였는데, 이들 흑색종 세포주들의 면역원성은 MHC 분자나 몇몇 알려진 MAA의 발현 이외에도 아직 밝혀지지 않은 MAA를 비롯한 다른 요인에 의해서도 유발되는 것으로 생각한다. 연구 결과에서와 같이, 전신 전이된 흑색종을 동종 종양세포 항원이 탑재된 DC백신으로 치료하여 종양의 성장을 효과적으로 억제할 수 있었던 것은 K1735와 Clone M3 세포주들이 B16F10과 공통의 MAA를 충분히 많이 공유하고 있고 상이한 MHC 항원형이 종양을 보유한 개체의 면역반응을 자극하는 효과가 더해졌기 때문이라고 생각한다.

DC백신의 효과를 입증하기 위해서 시행했던 기존의 동물실험들은 주로 피하 부위에 종양을 만들어 특정 백신을 투여한 군과 대조군에서의 피하 종양 크기의 변화나 생존율을 비교하는 방법을 사용하였다. 그러나 실제 임상적으로 흑색종의 경우를 제외하고는 피부 전이가 발생하는 경우는 흔하지 않은 편이며 흑색종을 포함한 대부분의 종양은 혈행성 경로로 폐나 간을 비롯하여 피부 이외의 장기로 전이되는 경우가 훨씬 흔하다. 그러므로 이 연구에서는 실제 임상 상황과 유사하도록 마우스의 흑색종 세포주를 사용하여 혈행성 전신전이모델을 만들어서 DC백신으로 치료한 후 폐에 전이되어 생긴 종양의 상태를 평가하는 방법을 이용하였다. 또한 본 실험은 암 조직의 외과적 적출 후에 잔류할 것으로 생각되는 미세 잔류 전이 암세포를 제거하기 위한 adjuvant therapy로 수지상 세포를 이용한 면역 세포 치료법의 가능성을 확인하고자 하였다. B16 흑색종 동물모델을 대상으로 자가 종양세포항원을 탑재한 수지상 세포 백신의 효능을 입증한 기존의 연구결과들과(31,36) 유사하게 본

실험에서도 B16F10 (H2b) 세포 용해액 탑재 수지상 세포의 항암 효과가 관찰되었으나 가장 강력한 효과는 clone M3 (H2d) 동종 종양 항원을 탑재한 수지상 세포 치료군에서 관찰되었다. 그러나 동종 K1735 (H2k) 항원의 효과는 자가 항원에 비해 떨어졌고 이것은 아마도 항암 면역 기능을 유도할 수 있는 B16F10과의 공통 MAA의 공유 정도 및 동종의 상이한 MHC 항원형이 종양을 보유한 개체의 면역반응을 자극하는 효과가 차이를 보이기 때문일 것으로 생각한다.

B16F10 주사 후 종양세포 용해액 탑재 수지상 세포 백신으로 치료한 실험군의 비장 림프구에서 항원 특이 세포성 면역반응을 평가하였다. 항원 특이 비장 림프구 증식 반응은 saline 투여 대조군에 비해 유사하거나 오히려 감소되는 경향을 보였고, 동종 clone M3세포 용해액에 대한 비장 세포 증식 반응은 media로 자극한 비 특이 증식 반응과 유사한 정도로 낮게 관찰되었다. 그러나 수지상 세포로 치료하지 않은 종양 생성군(saline 투여군)의 비장 세포도, 종양 세포 lysate에 반응하여 증식하는 것을 관찰하였고 따라서 증식하는 비장 세포가 항암 작용과 관계된 것만은 아닌 것으로 생각한다. 결과는 종양 세포 용해액에 반응하는 종양 항원 특이 비장세포 증식 반응은 실제 수지상 세포의 치료 효과를 대변할 수 없다는 것을 시사한다

동종 종양세포 항원 자극에 대한 비장 림프구로 부터의 IFN-γ 분비는 치료받지 않은 saline 투여 대조군에서는 관찰되지 않았고, 종양 세포 용해액 탑재 수지상 세포 치료군에서 종양 항원 특이 반응으로 유의있게 증가 하는 것을 확인하였다. 특히 항암 효과가 우수하였던 자가 B16F10 세포 및 동종 clone M3 세포 용해액 탑재 수지상 세포 투여군에서 가장 큰 증가를 보인 것은 수지상 세포에 의한 항암 효과 기전으로 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있는 종양 항원 특이 effector cytokine (IFN-γ)의 역할 확인과 항암 효과를 대변하는 면역 기능 검색 parameter로의 사용 가능성을 시사하는 것이다.

실제 수지상 세포의 항암 면역 기전은 종양 항원 특이 살해세포의 활성화 유도에 그치지 않고, 자연 살해 세포 등 innate와 adaptive 면역계 전반에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(1,5,43-45). 특히 동종 종양 항원을 이용한 항암 효과 유도의 경우 종양 항원 특이 면역 반응 유도와 자연 살해 세포 활성화가 많이 연관 되어 있을 것으로 생각한다. 본 실험의 결과 종양 항원을 탑재한 수지상 세포 치료군의 비장 림프구에서 자연 살해 세포 활성이 증가된 것을 관찰하였다. 그러나, 통계적 유의성을 가지고 종양 항원 자극에 따른 IFN-γ 분비로 관찰된 종양 항원 특이 면역 기능에 비해 증가 정도가 약하게 나타났다. 동종 종양 항원을 이용한 수지상 세포 백신의 항암 효과도 항원 특이 면역 반응 증강이 주 기전임을 시사한다.

본 실험을 통해 폐 전이성 흑색종에 대한 수지상 세포 백신의 면역치료에 있어서 동종 종양세포를 항원으로 사용하였을 때 나타나는 *in vivo* 항암 작용이 효과적으로 동물 모델에서 확인되었으며, 동종 항원 사용으로 인한 것으로 생각하는 부작용은 관찰되지 않았다. 그러나, 탑재 항원으로 사용하는 동종 종양 세포 주에 따라 항암 효과(종양 특이 면역능) 유도에 차이가 있음을 확인하였다. 이 같은 차이점이 발생하는 기전을 밝히기 위해 본 연구팀에서 연구가 진행되고 있다. 결론적으로 동종 종양 세포를 수지상 세포 백신의 탑재 항원으로 사용할 수 있으며, 부작용 없이 종양 항원 특이 면역 반응과 항암 작용을 유도할 수 있음을 확인하였다. 이러한 치료 방법은 종양 항원을 쉽게 구할 수 있다는 장점과 함께임상적으로도 전이성 암환자들을 치료하는 데 유용하게 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Steinman RM: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9;271-296, 1991
2. Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP: Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. J Exp Med 183;317-322, 1996
3. Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ: Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendtiric cells as a means to induce CTL. J Immunol 158;3270-3276, 1997
4. Brossart P, Bevan MJ: Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. Blood 90;1594-1599, 1997
5. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392;245-252, 1998
6. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A: Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. Curr Opin Immunol 9;10-16, 1997
7. Porgador A, Gilboa E: Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. J Exp Med 182;255-260, 1995
8. Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT: Therapy of murine tumors with tumor-peptide pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. J Exp Med 183;87-97, 1996
9. Bevan MJ: Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigen with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. J Exp Med 143;1283-1288, 1976
10. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H: Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. Science 264; 961-965, 1994
11. Reis e Sousa C, Germain RN: Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. J Exp Med 182;841-851, 1995
12. Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C: Constitutive macropinocytosis allows TAP-depen-

dent presentation of exogenous antigen on class I MHC molecules by bone marrow derived dendritic cells. Eur J Immunol 27;280-288, 1997
13. Carbone FR, Kurts C, Bennett SR, Miller JF, Heath WR: Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. Immunol Today 19;368-373, 1998
14. 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;1693-1702, 1992
15. 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-α. J Exp Med 179;1109-1118, 1994
16. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. J Exp Med 180;83-93, 1994
17. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. Nat Med 2;52-58, 1996
18. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. Nat Med 4;328-332, 1998
19. Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A: Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201 specific peptides from prostate-specific membrane antigen. Prostate 29;371-380, 1996
20. Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ, Jarisch J, Bowes VA, Ragde H: Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A2-specific prostate-specific membrane antigen peptides: a phase II prostate vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. Prostate 38;73-78, 1999
21. Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S: A phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. Clin Cancer Res 5;1331-1338, 1999
22. Thurner B, Haendle I, Roger C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H: 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 190;1669-1678, 1999
23. 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 96;3102-3108, 2000
24. Höltl L, Reiser C, Papesh C, Ramoner R, Herold M, Klocker H: Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. J Urol 161;777-782, 1999
25. Schott M, Feldkamp J, Schattenberg D, Krueger T, Dotzenrath C, Seissler J: Induction of cellular immunity in a parathyroid carcinoma treated with tumor lysate pulsed dendritic cells. Eur J Endocrinol 142;300-306, 2000
26. Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JE: Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. Cancer Res 61;8513-8519, 2001
27. Hernando JJ, Park TW, Kubler K, Offergeld R, Schlebusch H, Bauknecht T: Vaccination with autologous tumor antigen pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies: clinical and immunological evaluation of a phase I trial. Cancer Immunol Immunother 51;45-52, 2002
28. Azuma T, Horie S, Tomita K, Takahashi T, Tanaka Y, Kashiwase K: Dendritic cell immunotherapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: University of Tokyo experience. Int J Urology 9;340-346, 2002
29. Amoscato AA, Prenovits DA, Lotz MT: Rapid extracellular degradation of synthetic class I peptides by human dendritic cells. J Immunol 161;4023-4032, 1998
30. Souberbielle BE, Westby M, Ganz S, Kayaga J, Mendes R, Morrow WJW, Dalgleish AG: Comparison of four strategies for tumour vaccination in the B16-F10 melanoma model. Gene Ther 5;1447-1454, 1998
31. 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 59;2802-2805, 1999
32. Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, Taquet N: Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. J Exp Med 192;1535-1543, 2000
33. Jenne L, Arrighi JF, Jonuleit H, Saurat JH, Hauser C: Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human $CD8^+$ T cells for efficient tumor cell lysis. Cancer Res 60; 4446-4452, 2000
34. Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G: Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with autologous tumor lysate-pulsed dendritic cells. Scientific Program and Abstract of 7th International Symposium on Dendritic Cells, p145, 2002
35. Bercovici N, Massicard S, Baron V, Pauillac F, Hamon I, Agrawal S: Immune responses in patients with metastatic melanoma immunized with autologous DC loaded with an allogeneic melanoma cell lysate. Scientific Program and Abstract of 7th International Symposium on Dendritic Cells, p180, 2002
36. Dematos P, Abdel-Wahab Z, Vervaert C, Hester D, Seigler H: Pulsing of dendritic cells with cell lysates from either B16 melanoma or MCA-106 fibrosarcoma yields equally dffective vaccines against B16 tumors in mice. J Surg Oncol 68;79-91, 1998
37. Yoon HL, Singh K, Ratner S, Reiners JJ: Phorbol ester effects on splenic lymphocyte composition and cytotoxic T cell activities of SSIN mice: a strain deficient in $CD8^+$ T cells. Carcinogenesis 17;2617-2624, 1996
38. Kemp R, Ronchese F: Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity. J Immunol 167;6497-6502, 2001
39. Green EL: Handbook on Genetically Standardized JAX Mice. New York, McGraw-Hill, pp521-562, 1977
40. Kripke ML: Speculations on the role of ultraviolet radiation in the development of malignant melanoma. J Natl Cancer Inst 63;541-548, 1979
41. Cloudman AM: The effect of an extra-chromosomal influence upon transplanted spontaneous tumors in mice. Science 93;380-381, 1941
42. Peter I, Mezzacasa A, LeDonne P, Dummer R, Hemmi S: Comparative analysis of immunocritical melanoma markers in the mouse melanoma cell lines B16, K1735 and S91-M3. Melanoma Res 11;21-30, 2001
43. Palucka K, Banchereau J: Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. J Clin Immunol 19;12-25, 1999
44. Palucka K, Banchereau J: Linking innate and adaptive immunity. Nat Med 5;868-870, 1999
45. 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;405-410, 1999