

항종양 면역반응 유도를 위한 수지상세포의 최적 활성화 조건

남병혁 · 조월순 · 이기원 · 오수정 · 강은영 · 최유진 · 도은주 · 홍숙희 · 임영진 · 김기욱¹ · 정민호*

동아대학교 의과학연구원, 임상시험연구센터, ¹동아대학교 의과대학 신경외과학교실

Received June 13, 2006 / Accepted July 21, 2006

The Optimal Activation State of Dendritic Cells for the Induction of Antitumor Immunity. Byung-Hyoun Nam, Wool-Soon Jo, Ki-Won Lee, Su-Jung Oh, Eun-Young Kang, Yu-Jin Choi, Eunju Do, Sook-Hee Hong, Young-Jin Lim, Ki-Uk Kim¹ and Min-Ho Jeong*. *Dong-A University Medical Science Research Center, Clinical Research Center, Busan 602-714, Korea, ¹Department of Neurosurgery, College of Medicine, Dong-A University, Busan 602-714, Korea* – Dendritic cells (DCs) are the only antigen presenting cells (APCs) capable of initiating immune responses, which is crucial for priming the specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response and tumor immunity. Upon activation by DCs, CD4+ helper T cells can cross-prime CD8+ CTLs via IL-12. However, recently activated DCs were described to prime *in vitro* strong T helper cell type 1 (Th₁) responses, whereas at later time points, they preferentially prime Th₂ cells. Therefore, we examined in this study the optimum kinetic state of DCs activation impacted on *in vivo* priming of tumor-specific CTLs by using ovalbumin (OVA) tumor antigen model. Bone-marrow-derived DCs showed an appropriate expression of surface MHC and costimulatory molecules after 6 or 7-day differentiation. The 6-day differentiated DCs pulsed with OVA antigen for 8 h (8-h DC) and followed by restimulation with LPS for 24 h maintained high interleukin (IL)-12 production potential, accompanying the decreased level in their secretion by delayed re-exposure time to LPS. Furthermore, immunization with 8-h DC induced higher intracellular interferon(IFN)- γ /CD8+ T cells and elicited more powerful cytotoxicity of splenocytes to EG7 cells, a clone of EL4 cells transfected with an OVA cDNA, than immunization with 24-h DC. In the animal study for the evaluation of therapeutic or protective antitumor immunity, immunization with 8-h DC induced an effective antitumor immunity against tumor of EG7 cells and completely protected mice from tumor formation and prolonged survival, respectively. The most commonly used and clinically applied DC-based vaccine is based on *in vitro* antigen loading for 24 h. However, our data indicated that antigen stimulation over 8 h decreased antitumor immunity with functional exhaustion of DCs, and that the 8-h DC would be an optimum activation state impacted on *in vivo* priming of tumor-specific CTLs and subsequently lead to induction of strong antitumor immunity.

Key words – Dendritic cell, cytotoxic T lymphocyte, ovalbumin, tumor immunity

서 론

수지상세포(dendritic cells; DCs)는 특이 면역반응의 시작과 유지에 있어서 아주 중요한 역할을 담당하는 전문 항원제시세포(antigen presenting cells; APCs)이며, 휴지상태의 T세포에 직접 작용하여 세포성 면역반응과 체액성 면역반응을 동시에 유도할 수 있는 유일한 세포로 알려져 있다[5,9]. 일반적으로 내인성 항원은 APCs의 주조직적합항원I (Major histocompatibility complex class I; MHC class I) 분자로 표출되어 CD8+ T세포 활성화를 유도하고[19], 외인성 항원은 APCs에 endocytosis 또는 phagocytosis 과정을 통해 MHC class II 분자로 표출되어 CD4+ T세포 활성화를 유도한다[32]. 그러나 활성화된 수지상세포는 interleukin (IL)-2 등의 사이토카인 작용으로 유도된 제1형 조력 T세포(type 1 T

helper cell; Th₁) 반응에 의한 cross-presentation 과정을 통하여 외인성 항원에 의한 CD8+ 세포독성 T세포(cytotoxic T lymphocyte; CTL) 반응도 효과적으로 유도할 수 있다[1]. 따라서 외인성 종양항원을 탑재한 수지상세포는 항원 특이적 CLT를 활성화할 수 있으며, 이는 종양세포에 특이적으로 세포독성을 나타내게 된다[4,12,20,30]. 수지상세포의 이러한 특성들은 세포치료제로 개발되어 인위적인 항종양 면역반응을 유도하기 위한 백신으로 활용되고 있다.

수지상세포는 생체 내에서 미성숙 상태로 분포하며, 병원체 유래(pathogen-derived or pathogen-associated molecular pattern; PAMP) 또는 염증발생전 신호(pro-inflammatory signal)의 생성물과 다양한 사이토카인 자극에 의하여 활성화 및 성숙과정을 거치게 된다. DCs는 성숙과정 동안 항원 포획을 위한 수용체와 endocytosis 능력이 감소되지만[22], MHC 분자와 costimulatory molecules의 발현 증가와 2차 림프기관으로 이동하기 위한 chemokine 수용체의 변화[23,24] 등을 통하여 효과적인 항원제시능력을 가지게 된다[1,3,15,28].

*Corresponding author

Tel : +82-51-240-2865, Fax : +82-51-242-7265

E-mail : mhjeong@dau.ac.kr

수지상세포를 효과적인 항종양백신으로 적용하기 위하여 다양한 항원탐재 방법들이 제시되고 있지만, 생체 내에서 최적의 CTL 반응을 유도하기 위한 수지상세포의 활성화 및 성숙단계에 대한 기준도 매우 중요하게 대두되고 있다. *In vitro* 에서 성숙 전단계의 수지상세포에 장기간의 지나친 자극의 경우, 수지상세포의 기능적 또는 형태적 변화로 인하여 면역 반응의 변화를 초래할 수 있으며[10,14], 생체 내에 투입된 수지상세포가 오히려 기능적 마비(paralysis) 또는 탈진상태(exhaustion)에 이르게 되는 경우도 있다[11,13,21]. 따라서 본 연구에서는 수지상세포의 종양항원 탐재와 활성화 조건을 *in vitro*, *ex vivo* 및 *in vivo* 실험을 통하여 조사하고, 생체 내에서 실질적인 항종양 면역반응을 유도하기 위한 수지상세포의 최적 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

마우스 및 종양세포주

실험동물은 6-8주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 샘타코(주)에서 구입하였으며, specific-pathogen free (SPF) 시설에서 good laboratory practice (GLP) 규정을 준수하여 사육하였다. T-cell lymphoma 유래의 EL4 세포주와 EL4 세포에 ovalbumin (OVA) cDNA를 transfection한 EG7 세포주는 부산대학교 의과대학 생화학교실로부터 입수하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Gibco BRL) 그리고 2 mM L-glutamate (Sigma)가 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL) 배양 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 배양하였다.

마우스 골수세포로부터 수지상세포의 분화와 성숙

C57BL/6 마우스 뒷다리의 대퇴골과 경골에서 골수세포를 적출하고 ACK lysis buffer (0.15 M NH₄Cl, 1.0 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂-EDTA)를 이용하여 적혈구를 제거하였다. 수지상세포는 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 50 μM 2-mercaptoethanol이 포함된 Opti-MEM (Gibco BRL) 배지에 20 ng/ml granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, PeProtech) 와 10 ng/ml IL-4 (PeProtech)를 첨가한 배양액에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 분화를 유도하였다. 수지상세포의 분화정도는 CD11c, CD86, CD40, MHC class II의 표면발현을 flow cytometer 분석으로 확인하였다. 수지상세포의 성숙을 위한 자극인자로 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lipopolysaccharide (LPS, Sigma)를 사용하였으며, 종양항원으로는 1 mg/ml OVA (Sigma)를 사용하였다.

수지상세포의 표면분자 발현 분석

수지상세포를 회수하여 2% FBS가 첨가된 phosphate buf-

fered solution (PBS)에 부유하고 fluorescein isothiocyanate (FITC) 또는 Phycoerythrin (PE)으로 표지된 anti-mouse CD11c, CD86 (B7-2), CD40 및 MHC class II (I-A/I-E) 항체 (BD PharMingen)로 4°C, 암실에서 30분간 염색하였다. 세포의 생존율을 동시에 측정하기 위하여 염색한 시료에 propidium iodide (PI) 용액 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI, 0.1% v/v sodium citrate)을 첨가한 다음, Epics XL flow cytometer (Beckman Coulter)를 이용하여 분석하였다.

사이토카인 측정

수지상세포의 분화와 성숙단계에 따른 활성정도를 확인하기 위하여 IL-12 분비량을 sandwich ELISA 방법으로 측정하였다. Coating 항체 (PharMingen)를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 희석하여, 96-well ELISA plate (Nunc)에 50 μl 씩 넣고 실온에서 하룻밤 정치시켰다. PBST (0.05%로 tween 20이 첨가된 PBS)로 세척하고, 3% bovine serum albumin (BSA Fraction V, Sigma)을 함유한 PBS를 200 μl 씩 첨가하여 실온에 2 시간 정치하여 blocking하였다. PBST로 세척한 다음 표준용액과 세포처리 후 일정시간 배양한 상등액 시료를 각각 100 μl 씩 첨가하여 실온에 3시간동안 정치하였다. PBST로 세척하고 biotinylated 항체 (PharMingen)를 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 100 μl 씩 첨가하고 실온에서 1 시간 반응시켰다. PBST로 세척한 다음 HRP-conjugated streptavidin (0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Endogen) 100 μl 를 첨가하여 실온에서 30 분간 정치하고 PBST로 세척하였다. 발색반응은 tetramethylbenzidine (TMB) 기질용액 (InnoGenex) 50 μl 를 이용하였으며, Bio-Tek EL312e microplate ELISA reader에서 630 nm에서의 O.D 값을 측정하였다. 반응정지를 위하여 0.18 M H₂SO₄ 용액을 50 μl 씩 첨가하고 450 nm에서의 O.D 값을 재측정하였다.

수지상세포의 *ex vivo* 활성 측정

수지상세포 1 \times 10⁶ cells/50 μl 를 7일 간격으로 3회 피하주사하여 면역한 C57BL/6 마우스의 비장세포를 배양배지에서 4 mg/ml OVA항원으로 5일 동안 재자극한 다음, 세포내 IFN- γ 을 생성하는 CD8+ T세포와 항원특이적인 세포독성 활성을 조사하였다. 세포내 IFN- γ 을 생성하는 CD8+ T세포 측정을 위하여 비장세포를 고정액으로 4°C에서 1시간 처리하고 permeabilization 용액을 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 다음, FITC-conjugated anti-mouse IFN- γ 항체(BD PharMingen)과 PE-conjugated anti-mouse CD8 (BD PharMingen) 항체로 염색하여 Epics XL flow cytometer로 분석하였다. CD8+ T 세포의 세포독성 활성은 비장세포(effector cell)과 100 μCi 의 Na⁵¹CrO₄를 표지한 EL4 세포와 EG7 세포(target cell)을 적절한 비율로 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 4시간 동안 공조배양한 후 배양 상등액으로 방출된 ⁵¹Cr의 radioactivity를 gamma-counter (Beckman, Milan,

Italy)로 측정하였다. 세포독성 활성은 다음 식에 따라 환산하여 표시하였다.

$$\text{Cytotoxic activity (\%)} = \frac{[(\text{sample release} - \text{spontaneous release}) / (\text{total release} - \text{spontaneous release})] \times 100}$$

(sample release: 시료 처리 후 방출량; spontaneous release: 자연적인 target cell의 방출량; total release: 1% triton X-100에 의한 target cell의 방출량)

수지상세포의 *in vivo* 활성 측정

수지상세포에 의한 종양의 치료 및 예방효과를 OVA 종양 모델을 이용하여 조사하였다. 종양은 C57BL/6 마우스에 1 X 10⁶개의 EG7 세포를 왼쪽 대퇴부에 피하주사하여 형성하였다. 치료효과를 측정하기 위하여 EG7 세포 투여 3일 후부터 수지상세포를 오른쪽 대퇴부에 7일 간격으로 3회 투여하면서 종양형성 억제와 마우스 생존기간을 관찰하였다. 예방효과를 측정하기 위하여 수지상세포를 7일 간격으로 3회 투여하고, 3차 투여 7일 후 EG7 종양세포를 주사하여 종양형성 억제와 마우스 생존기간을 관찰하였다. 종양의 형성은 마지막 투여 후 6주간 동안 관찰하였다. 종양크기는 calipers를 사

용하여 측정하였고, 다음과 같은 공식으로 계산하였다.[1]

$$\text{Tumor cell volume (mm}^3\text{)} = (\text{Width, mm})^2 \times \text{Length (mm)} \times 0.52$$

결과 및 토의

수지상세포의 분화와 성숙

마우스 골수로부터 분리한 전구체 세포로부터 GM-CSF와 IL-4에 의한 수지상세포 분화정도를 수지상세포에서 특이적인 CD11c 표면분자 발현정도로 조사하였다. CD11c+ 세포는 60% 이상의 분포를 보이는 배양 6일 이후로 배양시간이 경과함에 따라 점차 증가하였으며, 마지막 24시간 동안 OVA와 같은 특정항원 또는 LPS와 같은 성숙자극인자에 노출되어도 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 1A). 한편 CD11c+ 세포에서 항원제시세포의 기능적 활성을 나타내는 MHC class II 분자와 CD86 (B7.2) 분자의 발현도 시간 의존적으로 증가하였으나, CD40은 배양 7일 이후로는 오히려 감소하는 양상을 보였다. Costimulatory molecule들은 OVA와 같은 특정 항원 또는 LPS와 같은 성숙유도인자의 자극에 의하여 발현이 더욱 증가

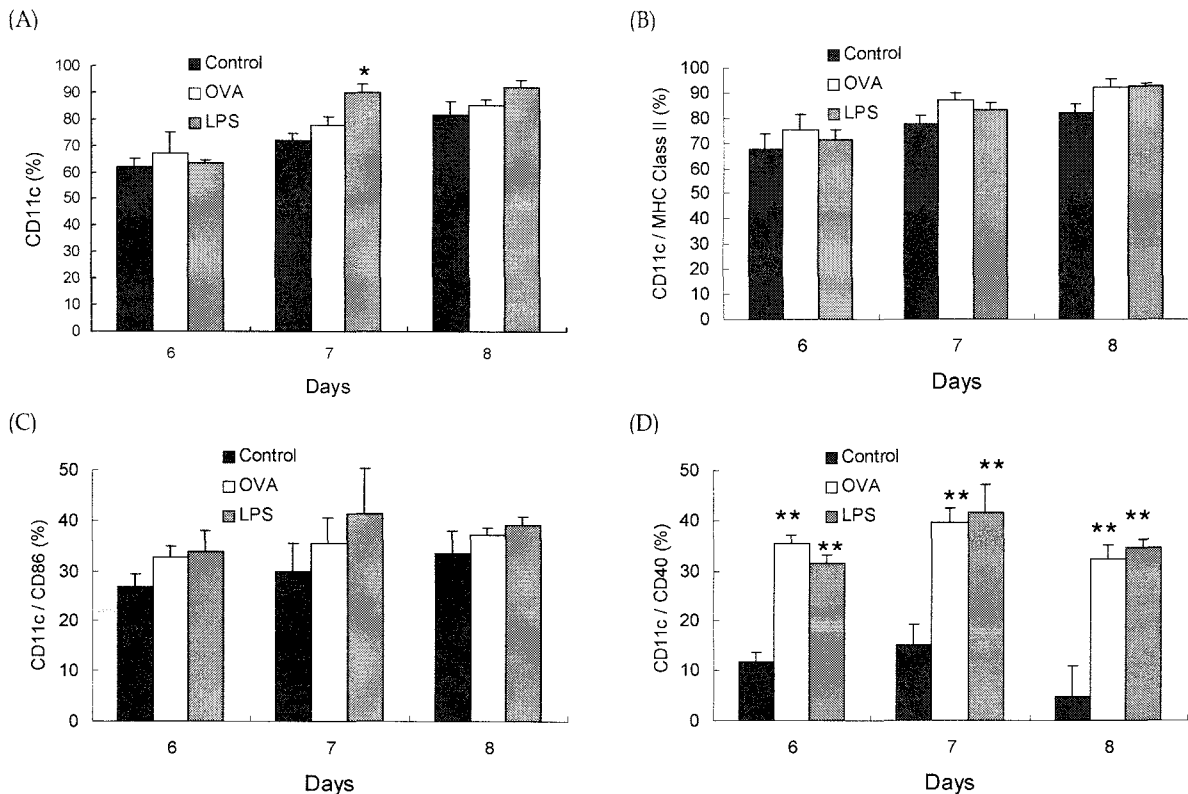


Fig. 1. The expressions of surface markers on DCs. Bone marrow cells from C57BL/6 mouse were differentiated into DCs by GM-CSF and IL-4 for the indicated time. The cells were pulsed with OVA (1 mg/ml) or stimulated with LPS (1 µg/ml) for 24 h. Fluorescence was analyzed with a Coulter Epics XL cytometer, and percent gated cells were calculated. (A) CD11c single positive cells, (B) CD11c and MHC class II double positive cells, (C) CD11c and CD86 double positive cells, and (D) CD11c and CD40 double positive cells. Data were reported as the mean ± SE of three independent experiments. *P<0.05 and **P<0.01, when compared with control.

하는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B-D). 이러한 실험결과는 미성숙한 수지상세포에서 항원탐제와 활성화 자극을 위한 MHC 분자 및 costimulatory molecule의 발현에 있어서 배양 6-7일 정도의 세포가 적합한 분화단계임을 제시한다.

수지상세포의 *in vitro* 활성화평가

수지상세포는 *in vitro*에서 항원에 노출(pulsing)시켜 활성화를 유도할 수 있고, 이를 생체 내에 투입하여 고준위의 항원특이적인 면역반응을 유도할 수 있다[13]. 본 실험에서는 OVA 항원 pulsing에 의한 수지상세포의 최적 활성화 단계를 결정하기 위하여 배양 6일과 7일 수지상세포에 항원을 8, 16 및 24시간 동안 각각 노출시킨 다음, 수지상세포의 활성화 정도를 확인하기 위하여 IL-12 분비량을 측정하였다(Fig. 2). OVA항원 노출 시간에 비례적으로 IL-12 생성량이 증가하였으며, 배양 6일 수지상세포가 7일에 비해 높은 IL-12 생성을 나타내었다. 한편 *in vitro*에서 항원에 노출된 수지상세포는 생체 내에서 다양한 성숙자극인자로 추가적인 자극을 받게 된다. 이에 본 실험에서는 항원 pulsing 이후에 LPS로 24시간 동안 추가로 자극한 수지상세포의 활성화 변화 추이를 조사하였다. 이 경우에도 배양 6일 수지상세포가 7일에 비해 전반적으로 사이토카인 분비능이 높았으나, 항원 노출 시간이 길어지면 오히려 IL-12 분비능이 감소하였다. 이러한 실험결과는 미성숙 단계의 수지상세포에 항원이 pulsing되어야 효과적인 활성화를 유도할 수 있으며, *in vitro*에서 총 배양기간이 7일 이내가 적합함을 보여준다. 또한 *in vitro*에서 조작된 수지상세포가 생체 내에서의 재자극 받는 것을 고려할 때, 8시간 이상의 항원 노출은 수지상세포를 고갈상태(exhaustion)에 빠지게 하여 항원제시능이 저하될 수 있다는 사실을 제시한다. 실질적으로 생체 내에 투입된 수지상세포는 림프조직

에 도달할 즈음에 IL-12 분비가 최고조에 달해야 효과적으로 Th₁ 반응을 일으키며[6,7,16,17,25-27], 보다 강력한 CTL 반응을 유도한다[8,29,31]. 따라서 본 실험에서 나타난 바와 같이 *in vitro*에서 수지상세포에 항원노출 시간이 길어질수록 *in vivo*에서 재자극 인자에 대한 IL-12 분비능이 저하하여 효과적인 항종양 면역반응을 나타낼 수 없을 것으로 추정된다.

수지상세포의 *ex vivo* 활성화평가

배양 6일 세포에 OVA 항원을 8시간 또는 24시간 노출시킨 수지상세포를 생체 내 투입한 마우스에서 면역반응 유도를 확인하기 위하여 일차적으로 비장세포 중의 세포독성에 관여하는 T세포 분획을 분석하였다. 항원에 노출된 수지상세포를 투입한 마우스의 CD8+ T세포 분획이 다소 증가한 것을 볼 수 있었으며, 특히 8시간 항원 노출한 경우의 수지상세포에서 가장 높은 분포를 나타내었다. 또한 CD8+ T세포 중 IFN- γ 를 분비하는 세포도 동일한 결과를 보였다(Fig. 3). 다음으로 이들 세포의 세포독성을 EL4 세포 또는 OVA를 발현하는 EG7 세포를 대상으로 조사하였다. OVA 항원을 pulsing한 수지상세포를 투여한 마우스 그룹에서는 EL4 세포와 대조적으로 EG7 세포에 대하여 3:1, 10:1, 30:1 및 100:1의 E:T ratio에 증가에 따라 세포독성도 증가하였다. 이 경우에도 OVA 항원을 8시간 노출한 수지상세포에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4). 이러한 실험결과는 IL-12 생성능 결과와 일치하는 것으로서 *in vitro*에서의 실험결과를 재확인할 수 있었다. 이는 24시간 중앙항원을 처리한 수지상세포 치료제 임상시험에서 효과적인 항종양 면역반응을 유도하지 못하는 이유 중의 하나로 설명될 수 있을 것이다. 실제로 탈진 상태의 수지상세포는 Th2 를 개시하거나 비분극 T 세포를 유도한다고 보고되고 있다[13].

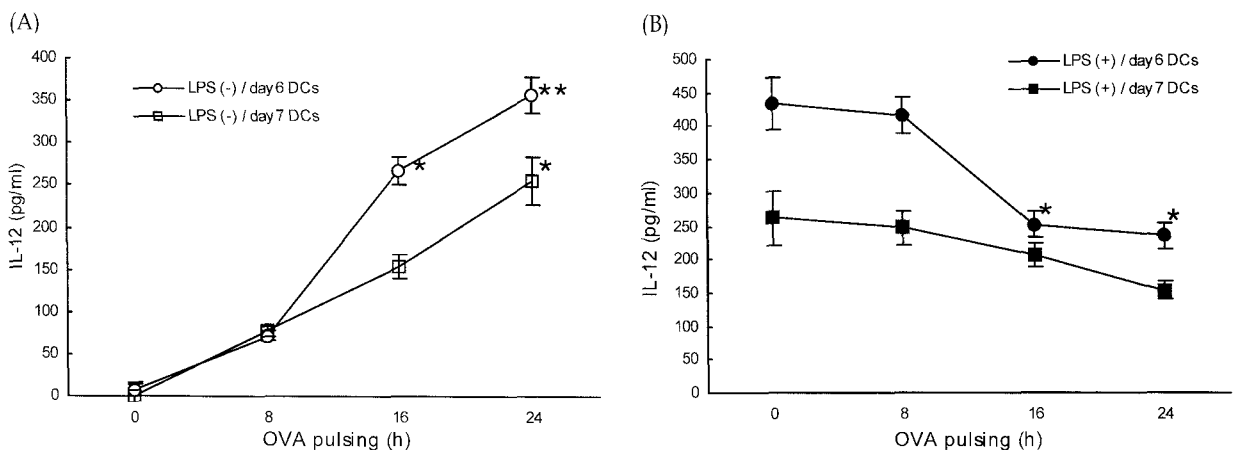


Fig. 2. The measurement of IL-12 secretion of DCs. Figure 2 was predicted DCs condition after injection into animal or human body. Bone marrow cells from C57BL/6 mouse were differentiated into DCs by GM-CSF and IL-4 for 6 or 7 days. The cells were pulsed with OVA (1 mg/ml) for the indicated time (A), and then stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 24 h (B). The amounts of IL-12 in the culture supernatants were determined with sandwich ELISA method. Data were reported as the mean \pm SE of three independent experiments. * P <0.05 and ** P <0.01, when compared with unpulsed control.

수지상세포의 *in vivo* 활성 측정 (종양 모델에서 항종양 치료 및 예방효과)

EG7 세포에 의해 형성된 종양모델에 대한 실질적인 항종양 치료 및 예방효과를 측정하여, *in vitro* 및 *ex vivo* 실험을 통하여 검증한 최적 활성단계의 항원탑재(antigen-pulsed) 수지상세포를 확인하였다. OVA 항원탑재 수지상세포를 투여한 치료효과 실험에서는 saline 혹은 항원을 처리하지 않은 수지상세포를 주사한 그룹과 비교할 때 뚜렷한 종양형성

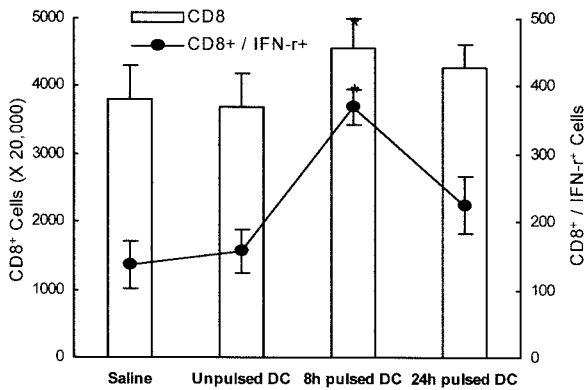


Fig. 3. Flow cytometric analysis of CD8+/IFN- γ + T cells from splenocytes of mice immunized with DCs. Splenocytes from immunized mice with saline or DCs, which were differentiated for 6 days and pulsed with OVA for the indicated time, were stained for surface CD8 molecule and intracellular IFN- γ . Fluorescence was analyzed with a Coulter Epics XL cytometer (Beckman Coulter, FL), and the positively stained cells (CD8 single positive or CD8 and IFN-r double positive) were counted. Data were reported as the mean \pm SE of six mice per group. * P <0.05, when compared with saline treated DC.

억제효과를 나타내었다. 특히 OVA 항원을 8시간 pulsing한 그룹이 24시간 그룹보다 더 강력한 종양형성 억제 효과를 나타내었다. 또한 생존 시기에서도 8시간 그룹이 4주 이상의 지연 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 예방효과 실험에서도 유사한 결과를 보였다. 즉 OVA 항원을 8시간 pulsing한 그룹에서 강력한 종양형성 저지효과를 나타내었으며, 사망한 마우스 없이 지속적으로 생존함을 보였다(Fig. 5B). 현재 사용되고 있는 대부분의 수지상세포 치료제는 24시간 항원을 노출시켜 *in vitro*에서 최고조의 활성화 단계에 이른 세포를 생체 내로 투여한다. 그러나 본 연구의 결과로 24시간 항원 노출은 생체 내에서 수지상세포의 재자극에 의한 탈진상태를 유발하여 치료효과가 떨어질 수 있으므로, 실질적인 항종양 면역반응을 유도하는데 있어서 8시간 항원 노출이 보다 효과적임을 제안한다.

요 약

수지상세포는 종양면역에서 필수적인 강력한 CTL 반응을 개시할 수 있는 유일한 세포이다. 특히 외인성 종양항원에 대한 CTL 반응 유도는 활성화된 수지상세포의 IL-12 분비를 통한 CD4+ helper T세포의 cross-priming을 필요로 한다. 그러나 최근에 활성화된 수지상세포는 Th₁ 면역반응을 유도하지만, 활성화 시간이 경과함에 따라 오히려 Th₂ 반응을 유도할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 OVA를 종양항원 모델로 설정하여 종양특이적인 CTL 반응을 형성하기 위한 최적의 수지상세포 활성화 조건을 조사하였다. 마우스 골수세포에서 수지상세포로의 분화는 항원제시 기능을 위한 표면분자의 발현 측면에서 볼 때 배양 6일-7일 정도가 적합하였다. 수지상세포의 IL-12 생성능은 배양 6일 이상, OVA 항원 탑재

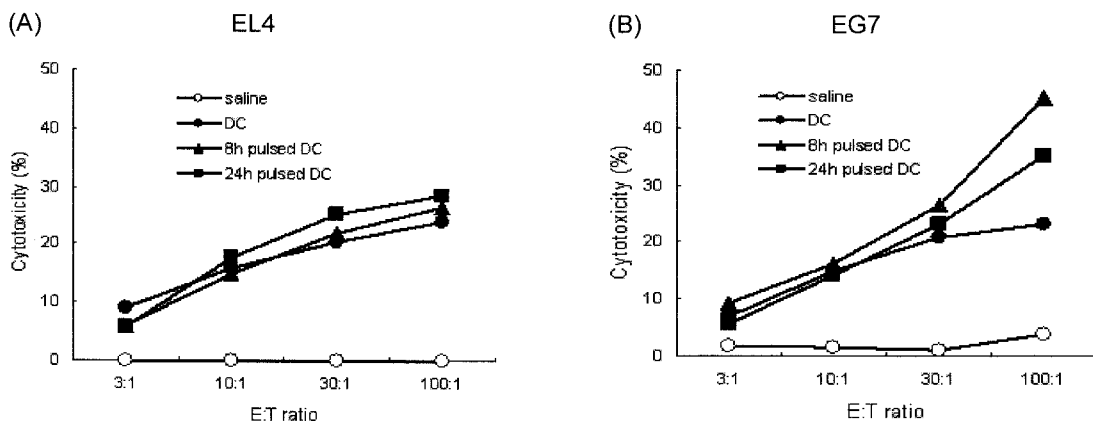
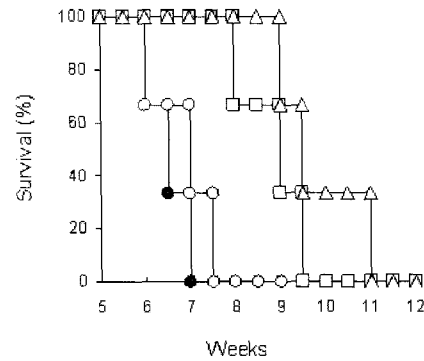
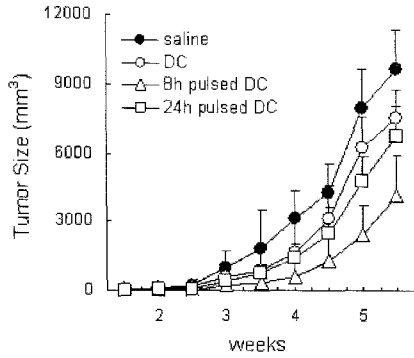


Fig. 4. OVA-specific cytotoxicity of splenocytes by immunization with DCs. Splenocytes from immunized mice with saline or DCs, which were differentiated for 6 days and pulsed with OVA for the indicated time, were restimulated with OVA for 5 days and cocultured with radioisotope-labelled target cells including EL4 and EG7 cells at various ratios for 4 h. Supernatants from triplicate cultures were collected, and radioactivities of ⁵¹Cr were measured with gamma-counter (Beckman, Milan). Data were reported as the mean of six mice per group.

(A) Therapeutic Group



(B) Preventive Group

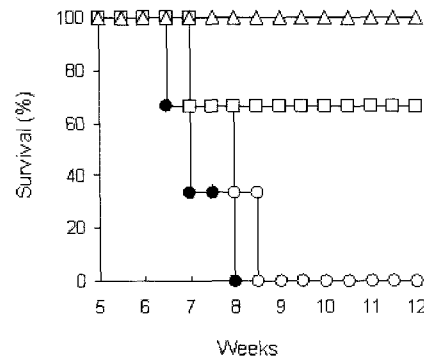
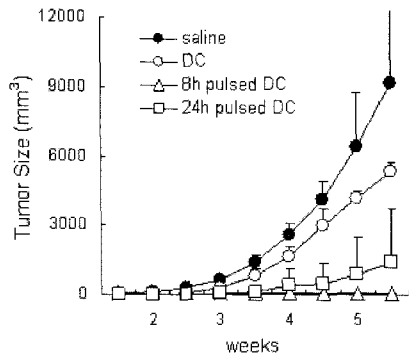


Fig. 5. OVA-specific antitumor immunity induced by immunization with DCs. C57BL/6 mice were immunized subcutaneously with saline or DCs in the right flank three times at 1-week intervals. EG7 tumor cells were inoculated subcutaneously on the left flank of immunized mice 1 week after last immunization (A) or mice 3 days before first immunization (B). Tumor size was assessed twice a week. Data were reported as the mean tumor size \pm SE of eight mice per group. Survival was recorded as the percentage of surviving mice.

8시간 이상의 경우에 연이은 LPS 성숙자극으로 오히려 감소하는 경향을 보였다. 즉 배양 6일의 수지상세포에 OVA 항원 탑재를 8시간 수행한 경우(8-h DC)가 *in vitro*에서의 IL-12 생성능, *ex vivo*에서의 세포내 IFN- γ 를 발현하는 CD8⁺ T세포의 증가 및 OVA 특이적인 세포독성효과 등에서 가장 좋은 결과를 보였다. 또한 *in vivo*에서 종양 치료 및 예방효과에서도 8-h DC로 면역한 경우에 가장 우수한 종양형성 억제 효과와 생존기간 연장효과를 보였다. 현재 대부분의 수지상세포를 이용한 항종양 백신에서 항원 탑재반응을 24시간 동안 수행하고 있으나, 본 실험의 결과로 볼 때, 8시간의 *in vitro* 항원 탑재가 보다 효과적인 종양특이적 CTL 반응과 항종양 면역반응을 유도함을 알 수 있다. 결론적으로 본 연구를 통하여 8시간 이상의 항원접촉은 수지상세포의 기능적 활성능력을 오히려 고갈시킬 수 있음을 제시한다.

감사의 글

본 논문은 2002년도 한국과학재단 및 동아대학교의료원

학술연구비 지원에 의해 작성되었음.

참고 문헌

1. Banchereau, J., C. Briere, J. Caux, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. . Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767-811.
2. Banchereau, J., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. M. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Ineiro, R. M. Steinman and J. Fay. 2001. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* **61**, 6451-6458.
3. Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
4. Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* **184**, 747-752.
5. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and

- S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621-667.
6. Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra and K. M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**, 547-549.
 7. Iezzi, G., E. Scotet, D. Sheidegger and A. Lanzavecchia. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur. J. Immunol.* **29**, 4092-4101.
 8. Kaech, S. M. and R. Ahmed. 2001. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat. Immunol.* **2**, 415-422.
 9. Kaiser, A., N. Bercovici, J. P. Abastado and A. Nardin. 2003. Naive CD8+ T cell recruitment and proliferation are dependent on stage of dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **33**, 162-171.
 10. Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* **20**, 561-567.
 11. Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg. 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- γ 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**, 3231-3236.
 12. Kelsall, B. L., E. Stuber, M. Neurath and W. Strober. 1996. Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T cell responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **795**, 116-126.
 13. Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* **1**, 311-316.
 14. Liu, Y. J. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262.
 15. Lutz, M. B. and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?. *Trends Immunol.* **23**, 445-449.
 16. Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wsocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* **154**, 5071-5079.
 17. Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinini, E. Maggi, G. Trinchieri and S. Romagnani. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* **177**, 1199-1204.
 18. O'Reilly, M.S., L. Holmgren, C. Chen and J. Folkman. 1996. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med.* **2**, 689-692.
 19. Pamer, E. and P. Cresswell. 1998. Mechanisms of MHC class I restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 323-358.
 20. Pardoll, D. M. and S. L. Topalian. 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 588-594.
 21. Reis e S. C., G. Yap, O. Schulz, N. Rogers, M. Schito, J. liberti, S. Hieny and A. Sher. 1999. Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity* **111**, 637-647.
 22. Sallusto, F., M. Cella. C. Danieli and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: down-regulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400.
 23. Sallusto, F., C. R. Mackay and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 593-620.
 24. Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp and A. Lanzavecchia. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1617-1625.
 25. Schmitt, E., P. Hoehn, T. Germann and E. Rude. 1994. Differential effects of interleukin-12 on the development of naive mouse CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **24**, 343-347.
 26. Scott, P. 1993. Selective differentiation of CD4+ T helper cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 391-397.
 27. Stoll, S., J. Delon, T. M. Brotz and R. N. German. 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296**, 1873-1876.
 28. Thery, C. and S. Amigorena. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 45-51.
 29. Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. eikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen and G. Schuler. 1999. 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.
 30. Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 251-276.
 31. Van Stipdonk, M. J., E. E. Lemmens and S. P. Schoenberger. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat. Immunol.* **2**, 423-429.
 32. Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 821-850.