

Lewis 폐암 마우스 모델에서 Interleukin-12가 E-selectin 발현에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

이상학, 신 윤, 윤형규, 이숙영, 김석찬, 권순석,
김영균, 김관형, 문화식, 송정섭, 박성학

= Abstract =

Effect of Interleukin-12 on the Expression of E-selectin in Mouse Model of Lewis Lung Carcinoma

Sang Haak Lee, M.D., Yoon Shin, M.D., Hyoung Kyu Yoon, M.D.,
Sook Young Lee, M.D., Seok Chan Kim, M.D., Soon Seog Kwon, M.D.,
Young Kyoon Kim, M.D., Kwan Hyoung Kim, M.D., Hwa Sik Moon, M.D.,
Jeong Sup Song, M.D., Sung Hak Park, M.D.

Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Interleukin-12 (IL-12) can induce antitumor effects in vivo. This antitumor effect is associated with T cell infiltration but the effect of IL-12 on the steps of T cell migration into the tumor tissue has not been fully elucidated. This study focused on the effect of IL-12 on the tumor growth and the metastasis and on the expression of E-selectin, an adhesion molecule which is activated endothelial specific in its expression. In addition, we studied whether the expression of E-selectin is associated with the TNF- α , a cytokine that its production is increased by IL-12 and has functions inducing a variety of adhesion molecules.

Methods : Mice of C57BL/6 strain were injected with Lewis lung cancer cells followed by either IL-12, TNF- α or normal saline by intraperitoneal route. Twenty eight days after tumor cell inoculation, metastatic nodules of lung were enumerated and immunohistochemical staining of the subcutaneous tumors were performed with monoclonal antibodies to CD4, CD8, CD16, and E-selectin.

Address for correspondence :

Sang Haak Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, St. Paul's Hospital, The Catholic University of Korea,
620-56, Jeonnonng Dong, Dongdaemoon-Gu, Seoul, Republic of Korea

Phone : 02-958-2114 Fax : 02-968-7250 E-mail : shlee@sph.cuk.ac.kr

Results : In IL-12 treated mice, the subcutaneously implanted Lewis lung tumors were decreased in size and the metastases were also decreased in number compared to control mice. On tumor tissues, increased infiltration of CD4+, CD8+, and CD16+ cells were observed in IL-12 treated mice compared to control mice. In control mice, E-selectin was absent on tumor vessels, but the expression of E-selectin was increased on tumor vessels of IL-12 treated mice. Administration of TNF- α increased not only the expression of E-selectin but also infiltrations of CD4+, CD8+, and CD16+ cells on tumor tissues.

Conclusions : These results demonstrate that IL-12 inhibits tumor growth and metastases through infiltrations of inflammatory cells in mouse model of Lewis lung carcinoma and E-selectin may play a role in inflammatory cell recruitment on tumor tissue following IL-12 administration. Also, TNF- α may have a role as a mediator responsible for the IL-12 induced expression of E-selectin. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 161-171)

Key words : Interleukin-12, Tumor necrosis factor- α , E-selectin, Lewis lung carcinoma.

서 론

Interleukin-12 (IL-12)는 75 kDa의 disulfide-linked heterodimer로서 'natural killer cell stimulatory factor (NKSF)'로 처음 밝혀지고¹ 1991년에 IL-12로 명명된 사이토카인으로², 항원 특이적 T 림프구 분화 그리고 interferon- γ (IFN- γ)와 granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 생성을 유도하는 작용을 가지고 있다³⁻⁷. 또한 악성종양 환자의 말초혈액을 IL-12와 함께 배양시 자연살해세포에 의한 세포독성의 결여를 교정해 준다는 보고가 있으며⁸ 종양조직에 존재하는 T 림프구를 IL-12와 함께 배양시 그 종양의 세포사를 증가시킨다는 보고⁹도 있어 종양의 치료적 효과에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

그러나 최근까지 IL-12에 대한 연구는 주로 작동세포에 대해서만 이루어졌고 실제로 종양에 대한 작용을 나타내기 위한 필수적인 단계인 종양 내로 작동세포의 이동과정에 IL-12가 미치는 영향에 대해서는 잘 알려진 바가 없다. IL-12에 의해 림프구와 단핵구 등의 작동세포가 활성화된다면 그 작용을 나타내기 위해서는 종양내 혈관을 통과하여 종양조직으

로의 이동이 먼저 이루어져야 하며 이를 위해서는 종양내 혈관의 유착분자 발현이 중요하다. Wu 등¹⁰에 의하면 백혈구의 이동이 정상혈관에 비해 종양미세혈관에서 감소되어 있고 또한 종양미세혈관에서 백혈구들의 유착이 감소된 이유는 종양미세혈관내에 혈관유착분자의 발현이 감소 또는 결여되어 있기 때문이라고 하였다. 이런 관점에서 볼 때 IL-12에 의한 항암작용은 단순히 작동세포의 활성화 뿐 아니라 종양미세혈관의 유착분자 발현의 증가와도 관련이 있을 것으로 추정된다.

IL-12는 TNF- α 의 생성을 증가시키는데 TNF- α 는 정상혈관 및 종양미세혈관에서의 백혈구 유착을 증가시킨다고 보고되었다¹¹. 그러나 IL-12 투여시 예상되는 종양미세혈관 유착분자 발현의 변화가 TNF- α 와 관련되어 있는지는 명확하지 않다. 본 연구에서는 Lewis 폐암 마우스 모델을 만들어 IL-12가 암의 성장과 전이의 억제에 미치는 영향을 관찰하고 또한 활성화된 내피세포에 선택적으로 분포하는 특성을 가지고 있는 E-selectin¹²의 발현에 IL-12가 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 또한 TNF- α 투여 후 E-selectin의 발현에 어떤 변화가 생기는지를 관찰하여 IL-12의 작용과 비교해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 재 료

1) 실험동물

실험동물로는 6주내지 8주된 C57BL/6 마우스를 사용하였고 IL-12 투여군 10마리, TNF- α 투여군 5마리, 대조군에 11마리로 배정하였다. 실험동물이 고행사료 및 물을 자유롭게 섭취하도록 하였으며 동물사육 조건은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5\%$, 환기횟수 15회/시간, 명암교대는 12시간 (조명/7:00-19:00)으로 하였다.

2) 암세포주

암세포주로는 LL/2 세포주를 ATCC사 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.)에서 구입하였다. LL/2 세포주는 폐로 전이되는 특징을 가지고 있는 Lewis 폐암 세포주로, 실험에 사용할 때까지 37°C , 5% CO_2 배양기에서 Dulbecco's modified Eagle's medium (4.5 g/l glucose, 90% ; fetal bovine serum, 10%) (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A.)으로 계대배양하였다.

3) 사이토카인 및 항체

마우스 IL-12와 TNF- α 는 R&D사 (Minneapolis, MN, U.S.A.)제로 순도는 SDS-PAGE상 97% 이상이었으며 내독소 농도는 사이토카인 1 μg 당 0.1 ng 미만이었다. 마우스 E-selectin (CD62E) 및 CD4, CD8, CD16에 대한 단일클론성 항체 (IgG_{2b}, rat)는 각각 Pharmingen사 (San Diego, CA, U.S.A.)제를 사용하였다.

2. 방 법

1) 암세포의 이식

실험 마우스의 좌측 옆구리부위에 LL/2 Lewis 폐암 세포를 인산 완충식염수 (phosphate buffered saline,

PBS)에 희석하여 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 의 농도로 만든 후 0.1 ml씩을 피하주사하였다.

2) IL-12 및 TNF- α 의 투여

IL-12 투여군은 IL-12를 인산 완충식염수로 희석, 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 의 농도로 만들어 암세포 이식 14일째부터 매일 IL-12 1 μg 을 5일간 복강내 주사하였고 대조군에게는 동일한 시기에 인산 완충식염수 100 μl 를 복강내 주사하였다. 한편 TNF- α 투여군은 TNF- α 를 인산 완충식염수로 희석, 2.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 의 농도로 만들어 암세포 이식 24일째부터 5일간 매일 2.5 μg 씩을 복강내 주사하였다.

3) 피하 종양의 크기 및 폐전이 결절의 수 측정

일주일째 2차레씩 종양의 장축 및 단축의 길이를 측정하였고 종양의 용적은 다음의 공식을 이용하였다¹³. 용적 = (장축) \times (단축)². 폐전이 결절의 수는 마우스 도살시 Gorelik 들¹⁴의 방법을 이용하여 세었다.

4) 조직표본 및 면역조직화학법

암세포주 이식 28일째 IL-12 처치군과 TNF- α 처치군 및 대조군을 희생시켰다. 마우스의 복강내로 16.5% 우레탄 (1 ml/100 g 체중)을 주사하여 마취하고 흉곽을 노출시킨 뒤 심장에 도관을 삽입하여 인산 완충식염수 150 ml를 관류시키고 바로 이어서 4% paraformaldehyde (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 용액 200 ml를 관류시켰다. 동시에 4% paraformaldehyde를 폐가 팽창될 때까지 기관을 통하여 주사하였다. 양측 폐와 피하 종양을 절제한 후 동일한 고정액에 2시간 재고정 시킨 후 인산 완충식염수로 30분간 세척하였다. 30% 자당액에 16시간 담근 후 OCT 화합물 (Sakura Fine Technical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 포매 후 -70°C 에 즉시 보관하였다. 냉동절편기 (Cryocut microtome, 2800 FRI-GOCUT N, Reichert-Jung, Germany)를 사용하여 6 μm 두께의 동결절편을 작성한 뒤 젤라틴으로 처리된 슬라이드에 붙이고 실온에서 건조시켰다. 면역조직

화학염색은 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)법¹⁵을 응용하여 시행하였다. 내인성 페록시다아제 (endogenous peroxidase)를 억제시키기 위해 3% 과산화수소로 10분간 처리하였고 비특이적 결합부위의 차단을 위해 정상 염소혈청으로 40분간 처리한 다음 1차 항체들을 도포하여 4°C에서 하룻밤동안 반응시켰다. 사용한 1차 항체들의 희석배수는 CD62E (IgG_{2b}, rat) 1 : 100, CD4 (IgG_{2b}, rat) 1 : 200, CD8 (IgG_{2b}, rat) 1 : 200, CD16 (IgG_{2b}, rat) 1 : 200 이었다. 다음날 실온에서 1시간동안 방치시키고 인산 완충식염수로 10분간 3차례 세척한 후, 2차 항체로 바이오틴이 표지된 goat anti-rat IgG (희석비율 1 : 50; Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.)를 60분간 실온에서 반응시켰다. 인산 완충식염수로 5분씩 4회 세척한 뒤 3차 시약으로 2차 항체와 특이적으로 결합하는 avidin-biotin-peroxidase complex (희석비율 1 : 100, Vector Laboratories)를 사용하여 30분간 반응시켰다. Tris 완충액 (0.05 M, pH 7.4)으로 5분씩 4회 세척한 뒤 항체 처리가 끝난 절편들은 0.05% 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB)-0.01% H₂O₂ 혼합액으로 발색하였다. 발색이 끝난 절편은 hematoxylin으로 대조염색하여 에탄올로 탈수, xy-lene으로 투명과정을 거친 후 balsam으로 봉입하였다.

면역조직화학염색의 표지도는 Briscoe 들¹⁶의 방법을 응용하여 판정하였다. 간략히 설명하면 염색된 슬라이드를 광학현미경하에서 관찰하여 염색정도 및 염색분포에 따라 0에서 3+까지 구분하였다. E-selectin에 대해서는 0 (염색된 혈관이 없거나 일부 혈관에만 미약하게 염색된 경우), 1+ (여러 혈관에 약하게 염색된 경우), 2+ (대부분의 혈관에 중등도로 염색된 경우), 3+ (대부분의 혈관에 강하게 염색된 경우)로 구분하였고, CD4+ 및 CD8+, CD16+ 세포에 대해서는 0 (드물게 양성세포가 관찰되는 경우), 1+ (드문드문 양성세포의 침윤이 관찰되는 경우), 2+ (중등도로 양성세포의 침윤이 관찰되는 경우), 3+ (양성세포의 침윤이 강하게 관찰되는 경우)

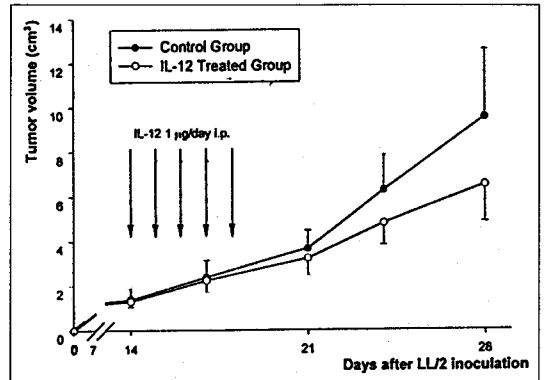


Fig. 1. Effect of IL-12 administration on subcutaneous growth of LL/2 tumors. C57BL/6 mice were inoculated subcutaneously with LL/2 (1×10^6) tumor cells. IL-12 was intraperitoneally administered into LL/2 bearing mice in a dose of 1 μ g/mouse five times every day. Tumor growth is expressed as the volume (in cm³).

로 분류하였다.

3. 통계처리

모든 변수는 평균 표준오차로 나타냈다. IL-12 투여군과 대조군의 종양 용적 변화의 비교는 repeated measure ANOVA, 폐전이 결절의 비교는 Student's *t*-test, 각 군간의 면역염색정도의 비교는 Sheffe 검정법을 이용하여 SAS 컴퓨터 프로그램으로 검정하였다. P 값이 0.05 이하인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

1. IL-12 투여에 의한 종양 성장과 폐전이 억제

IL-12 투여 시작일인 암세포 이식 14일째 피하종양의 용적은 대조군과 IL-12 투여군에서 각각 1.4 ± 0.5 cm³, 1.3 ± 0.2 cm³로 양군간에 유의한 차이가 없었으나, 암세포 이식 28일째 피하종양의 용적은 대조군

Table 1. Inhibition of lung metastases of LL/2 by IL-12 administration.

Group (No.)	Control group (n=11)	IL-12 treated group (n=10)
No. of lung metastases	22.7 ± 2.6	8.6 ± 1.2*

Mice were injected subcutaneously with 1×10^6 LL/2 cells on day 0 and treatment with $1 \mu\text{g}$ per injection of IL-12 five times every day was initiated on day 14. All of mice were sacrificed on day 28 and number of metastases enumerated.

Values are expressed as mean ± standard deviation.

* : $P < 0.001$ compared with the control group.

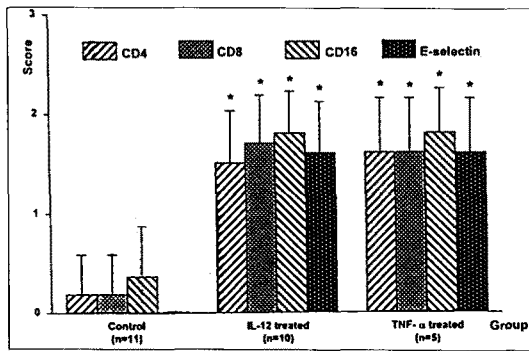


Fig. 2. Effect of IL-12 and TNF- α on the induction of CD4+, CD8+, CD16+ cell infiltrates, and E-selectin. Specimens were scored using set scales between 0 and 3+, designed to assess the intensity and distribution of staining. Scores for CD4+, CD8+, and CD16+ cells were based on the degree of infiltration of positive cells : 0, occasional positive cells only ; 1+, sparse infiltration of positive cells ; 2+, moderate cellular infiltration of positive cells ; and 3+, intense positively staining infiltrates. The scoring system for E-selectin expression was : 0, absent staining or faint staining of an occasional vessel only ; 1+, faint staining of several vessels ; 2+, moderate intensity staining of most vessels ; and 3+, intense staining of most vessels. * $P < 0.05$ compared with the control group.

$9.5 \pm 3.05 \text{ cm}^3$, IL-12 투여군에서 $6.5 \pm 1.6 \text{ cm}^3$ 으로 IL-12 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 피하종양의 성장 억제가 관찰되었다 ($P < 0.05$, Fig. 1). 또한 IL-12가 폐전이에 미치는 영향을 평가하기 위해 암세포 이식 28일째에 마우스를 도살하여 관찰한 폐전이 결절의 수는 IL-12 투여군에서 마리당 8.6 ± 1.2 개, 대조군에서 22.7 ± 2.6 개로 (table 1) IL-12 투여군에서 통계적으로 유의한 감소를 나타내었다 ($P < 0.001$).

2. IL-12 및 TNF- α 에 의한 종양내 CD4+, CD8+, CD16+ 세포의 침윤

대조군의 종양에서 CD4와 CD8 및 CD16에 대한 면역염색의 평균 점수는 각각 0.2 ± 0.40 , 0.2 ± 0.40 , 0.4 ± 0.50 으로 양성인 세포가 거의 관찰되지 않았던 반면, IL-12를 투여한 마우스의 종양에서는 CD4와 CD8 및 CD16에 대한 평균 점수가 각각 1.5 ± 0.53 , 1.7 ± 0.48 , 1.8 ± 0.42 로 양성인 세포의 증가가 관찰되었다(Fig. 2, Fig. 3). TNF- α 를 투여한 마우스의 종양내에도 CD4와 CD8 및 CD16에 양성인 세포의 증가 (각각 1.6 ± 0.55 , 1.6 ± 0.55 , 1.8 ± 0.45)가 관찰되었다(Fig. 2, Fig. 3). IL-12 투여군과 TNF- α 투여군 사이에는 유의한 차이가 없었으며 IL-12 및 TNF- α 투여군과 대조군사이에는 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되었다 ($P < 0.05$).

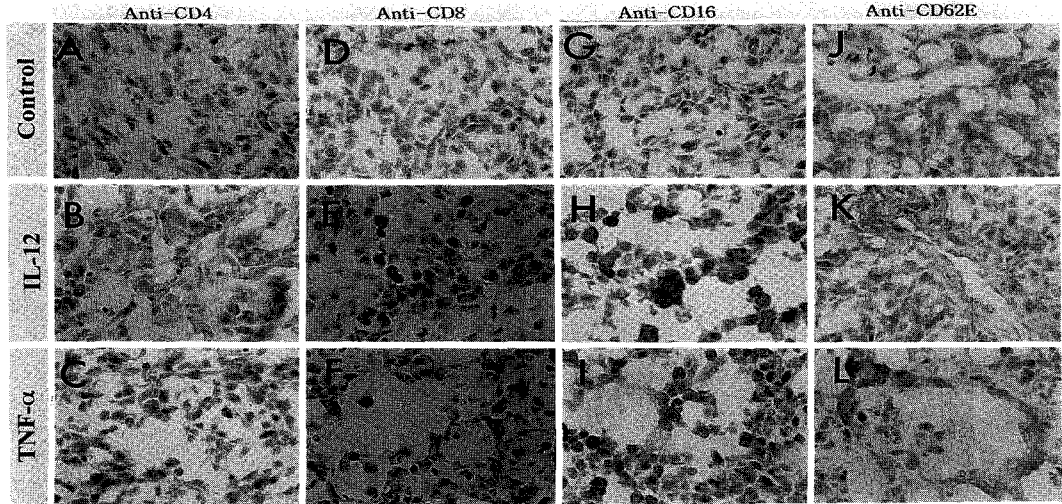


Fig. 3. Staining of tumors with various monoclonal antibodies. Frozen sections of subcutaneous tumors removed from mice 28 days after LL/2 cell inoculation were stained with either rat anti-mouse CD4 (A, B, C), CD8 (D, E, F), CD16 (G, H, I), or CD62E (J, K, L). A, D, G, and J represent normal control group ; B, E, H, and K, IL-12 treated group ; and C, F, I, and L, TNF- α treated group. Expression of E-selectin and infiltrations of CD4+, CD8+, and CD16+ cells were increased in IL-12 and TNF- α treated group compared to control group (All pictures $\times 400$).

3. IL-12 및 TNF- α 에 의한 종양내 혈관의 E-selectin 발현

대조군의 종양은 E-selectin에 대한 염색에서 모두 음성이었던 반면 IL-12를 투여한 마우스의 종양내 혈관은 E-selectin에 대한 발현이 증가 (평균 점수 1.6 ± 0.52)되어 있었다. TNF- α 를 투여한 마우스의 종양미세혈관에서도 E-selectin에 대한 발현이 증가 (평균 점수 1.6 ± 0.55)되어 있었다 (Fig. 2, Fig. 3). IL-12 투여군과 TNF- α 투여군 사이에는 유의한 차이가 없었으며 IL-12 및 TNF- α 투여군과 대조군 사이에는 유의한 차이가 관찰되었다 ($P < 0.05$).

고 찰

본 연구에서는 IL-12가 Lewis 폐암 마우스 모델에서 암종의 성장 및 전이를 억제함을 확인할 수 있었다.

Lewis 폐암은 C57BL 마우스의 폐에서 자발적으로 발생된 암종으로 피하조직에 이식시 빠르게 폐로 전이되는 특징을 가지고 있어¹⁷ 종양연구에 많이 사용되고 있는 모델이다. 최근까지 악성종양을 치료하기 위한 면역치료의 한 방법으로 사이토카인을 이용한 시도가 다수 있었으나 그 성공은 일부 제한된 암종에만 있었고, 그 효과 또한 일정하지 않았다¹⁸⁻²¹. 반면 비교적 최근에 밝혀진 사이토카인인 IL-12는 활성화된 대식세포와 B 림프구로부터 생산되는 물질로 여러 종류의 동물 종양모델에서 상당한 항암 효과가 있다고 보고되고 있다^{13, 22-25}. IL-12가 항암작용을 나타내는 기전은 아직 모두 밝혀지지는 않았지만 현재까지 알려진 중요한 기전으로는 자연살해세포와 림프구의 활성화와 증식, 그리고 이들 세포로부터 IFN- γ 분비증강 등을 들 수 있다^{22, 26-30}.

본 실험에서는 이러한 IL-12의 작용이 림프구와 자연살해세포의 종양내 침윤에 어떠한 영향을 미치는지

를 관찰하고자 CD4 및 CD8, CD16에 대한 항체를 이용하여 면역화학조직염색을 시행하였는 바 IL-12를 투여한 마우스의 종양내에는 대조군에 비해 증가된 수의 침윤이 관찰되었다. IL-12가 항암작용을 나타내기 위해서는 앞에서 언급한 바와 같이 T 림프구와 자연살해세포의 IFN- γ 생성이 중요하다고 알려져 있는데 이에 대한 근거로는 T 림프구가 결여된 누드마우스를 이용한 모델이나¹³ CD4와 CD8에 대한 항체를 투여하여 시행한 차단실험에서 IL-12의 작용이 미미했던 결과들^{24, 31}을 들 수 있다. 그러나 이러한 각 염증세포 각각이 IL-12의 작용을 매개하는가에 대해서는 연구자간에 다른 결과를 나타내고 있다. Nastala 등²⁴의 모델에서는 CD4+ 또는 CD8+ T 림프구 단독으로도 종양성장을 억제하는 효과가 있다고 하였으며, Brunda 등¹³의 모델에서는 CD8+ T 림프구가 종양성장 억제에 필요하다고 하였다. 이런 결과를 종합해 볼 때 IL-12가 항암작용을 나타내기 위해서는 T 림프구와 자연살해세포와 같은 세포의 동원이 필수적이나 각각의 연구 종양모델에 따라 T 림프구 유형의 작용은 다를 수 있다고 생각된다.

한편 이런 면역염증세포들이 종양내로 침윤하여 그 작용을 나타내기 위해서는 종양내 혈관과 면역염증세포간의 유착과정이 선행되어야 한다. 이 과정을 담당하는 유착분자들은 분자생물학적 특징과 기능적 특징에 의해 크게 세 종류로 나뉘어 진다. 첫째 종류는 면역글로부린 초유전자 가족으로 면역글로부린 domain이 사슬내의 disulfide 결합으로 연결되면서 환상으로 배열되는 구조를 공통으로 갖고 있으며 세포와 세포의 유착에 관여한다³². 둘째 종류는 integrin 가족으로 α 와 β polypeptide 아단위로 구성된 non-covalent heterodimer이며 세포와 기질의 유착에 관여한다³³. 마지막으로 selectin 가족은 N-terminal 부위에 lectin과 유사한 영역을 가진 세포단백으로 세포와 세포의 유착에 중요한 작용을 담당하고 있다³⁴. E-selectin은 selectin 가족에 속하는 유착물질로 사이토카인 등에 의해 자극된 내피세포에만 표현됨으로써 염증세포의 병변내 침윤에 작용하는 유착분자이다¹².

본 실험에서는 IL-12가 항암작용을 나타내는 기전의 하나로 E-selectin의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다. 종양이 면역회피를 나타내는 기전의 하나로 종양미세혈관에서 면역세포와 내피세포간의 유착이 감소되어 있다는 보고¹⁶가 있으며, Kuzu 등³⁵의 혈관종양을 이용한 논문에서는 유착분자의 발현이 전반적으로 감소되어 있다고 하였다. 본 실험에서도 대조군의 종양내 혈관에서 E-selectin의 발현은 거의 관찰되지 않았으나 IL-12 투여에 의해 그 발현이 증가됨을 관찰할 수 있어 IL-12에 의해 유도되는 E-selectin의 발현이 면역염증세포의 종양내 침윤에 관여하는 것을 밝힐 수 있었다.

TNF- α 는 IL-12에 의해 생산이 유도되는 대표적인 사이토카인의 한가지로^{22, 27}, 국소적으로 투여시 종양의 억제작용이 있으며³⁶ 또한 유착분자의 발현을 증가시켜 혈관과 염증세포의 결합을 촉진시키는 작용이 있다고 알려져 있다^{37, 38}. E-selectin에 대해서는 투여 3-4시간에 발현을 최고로 증가시키며 16-24시간 후에는 그 작용이 없어지는 역동학적 특성을 가지고 있는 바³⁹ 본 실험에서는 IL-12에 의해 유도된 E-selectin의 발현이 TNF- α 에 의해 매개되었을 가능성을 알아보기 위해 TNF- α 를 투여한 직후 E-selectin의 발현을 관찰하였다. Fukumura 등¹¹은 종양내에서의 염증세포의 유착이 TNF- α 에 매개하여 증가됨을 관찰하였는데 이는 본 실험에서 TNF- α 투여에 의해 E-selectin의 발현이 증가된 것과 일치하는 내용이다. 또한 TNF- α 투여에 의한 종양내 CD4+ 및 CD8+, CD16+ 세포들의 침윤 역시 IL-12 투여시와 유사하게 증가되는 소견을 보였는데, 이는 IL-12에 의한 E-selectin의 발현과 종양내 면역염증세포의 침윤이 TNF- α 에 의해 매개됨을 보다 더 시사해주는 단서라고 할 수 있겠다.

본 실험에서 IL-12 투여군의 경우는 IL-12 투여 10일 후 E-selectin에 대한 면역화학염색을 하여 그 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이렇게 장시간 후에도 E-selectin의 발현이 증가되어 있는 것은 E-selectin에 대한 자극이 지속적으로 이루어지고 있음

을 의미한다고 할 수 있다. 즉, IL-12 투여 후 종양 내 침윤한 림프구와 대식세포 등의 염증세포에서 TNF- α 가 지속적으로 분비되어 E-selectin의 발현 증가가 계속적으로 이루어짐을 추측할 수 있으며, IL-12의 항암기전에는 종양내 침윤세포에서 지속적으로 분비되는 사이토카인이 중요한 역할을 한다는 Yu 들⁴⁰의 실험 결과가 이러한 추정의 일부 뒷받침이 될 수 있겠다. 향후 TNF- α 에 대한 항체를 이용한 차단실험과 면역화학염색 등의 실험이 추가로 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 IL-12는 Lewis 폐암 마우스 모델에서 암세포 이식부위의 종양성장과 폐전이를 억제하는 작용을 나타냈으며 또한 면역염증세포의 종양내 침윤 증가를 유도하였다. 또한 IL-12에 의해 E-selectin의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었고 이 유착분자의 발현은 IL-12에 의해 증가되는 cytokine인 TNF- α 에 의해서 마찬가지로 유도됨을 알 수 있었으며 향후 항 TNF- α 항체를 이용한 차단실험을 통해 IL-12에 의해 유도되는 유착분자의 발현이 TNF- α 에 의해 매개되는지를 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

Interleukin-12 (IL-12)는 자연살해세포와 T 림프구 활성을 증가시킬 뿐 아니라 증식을 촉진시키고 interferon- γ 와 granulocyte-macrophage colony stimulating factor 그리고 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 생성을 유도한다고 알려져 있으며 여러 동물실험에서 악성종양의 치료에 상당한 효과가 있음이 알려져 있다. 이런 결과는 종양내 염증세포의 침윤이 증가함과 밀접한 관련이 있다고 밝혀져 있지만 이들 염증세포가 종양내로 이동하는 단계에 IL-12가 미치는 영향에 대해서는 잘 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 IL-12가 종양의 성장 및 전이에 미치는 영향과 활성화된 내피세포에 발현되는 것으로 알려진 E-selectin의 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 하였고

또한 E-selectin의 발현이 IL-12에 의해 생산이 증가되고 여러 유착분자의 발현을 유도하는 작용이 있는 것으로 알려진 TNF- α 와 연관이 있는지 알아보고자 하였다.

방 법 :

C57BL/6 마우스를 대상으로 Lewis 폐암세포주를 피하주사하여 암세포를 이식한 후 각 군마다 각각 IL-12 또는 TNF- α , 생리식염수를 복강내 투여하였다. 암세포이식 28일째 마우스를 도살하여 폐전이 결절의 수를 측정하였으며 피하종양에 대해 CD4, CD8, CD16, E-selectin에 대한 면역화학조직염색을 시행하였다.

결 과 :

IL-12를 투여한 군에서 대조군에 비해 암세포 이식부위의 종양 크기가 감소하였으며 폐전이 결절의 수도 감소하였다. IL-12를 투여한 군에서 대조군에 비해 CD4+ 및 CD8+ 그리고 CD16+ 세포의 종양내 침윤이 증가하였다. IL-12를 투여하지 않은 대조군에서 E-selectin은 발현되지 않았으나 IL-12 투여군에서 종양내 혈관내피세포에서의 E-selectin 발현이 증가되었다. TNF- α 투여시 종양내 혈관내피세포에서의 E-selectin 발현 증가가 관찰되었으며 또한 종양내 CD4+ 및 CD8+ 그리고 CD16+ 세포의 침윤이 증가되었다.

결 론 :

이상의 결과로 보아 IL-12는 Lewis 폐암모델에서 종양내 염증세포의 침윤을 일으켜 종양의 성장과 전이를 억제하는 작용을 나타내며 염증세포의 침윤에는 E-selectin이 관여할 것으로 생각된다. 또한 E-selectin의 발현증가에는 IL-12에 의해 생성이 유도되는 TNF- α 가 작용할 가능성을 추정할 수 있겠다.

참 고 문 헌

1. Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC, Gately MK.

- Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;88:4143-7.
2. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste-Amezaga M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E, Chizzonite R, Wolf SF, Trinchieri G. Production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1991;176:1387-98.
 3. Bertagnoli MM, Lin B, Young D, Herrmann SH. IL-12 augments antigen-dependent proliferation of activated T lymphocytes. *J Immunol* 1992; 149:3778-83.
 4. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol* 1992 : 143:127-42.
 5. Aste-Amezaga M, D'Andrea A, Kubin M, Trinchieri G. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cell Immunol* 1994;156:480-92.
 6. McKnight AJ, Zimmer GJ, Fogelman I, Wolf SF, Abbas AK. Effect of IL-12 on helper cell-dependent immune responses in vivo. *J Immunol* 1994; 152:2172-9.
 7. Alzona M, Jack H, Fisher RI, Ellis TM. IL-12 activates IFN-gamma production through the preferential activation of CD30 T cells. *J Immunol* 1995;154:9-16.
 8. Soiffer RJ, Robertson MJ, Murray C, Cochran K, Ritz J. Interleukin-12 augments cytolytic activity of peripheral blood lymphocytes from patients with hematologic and solid malignancies. *Blood* 1993;82:2790-6.
 9. Andrew JV, Schoof DD, Bertagnoli MM, Peoples GE, Goedegebuure PS, Eberlein TJ. Immunomodulatory effects of interleukin-12 on human infiltrating lymphocytes. *J Immunother* 1993;14:1-10.
 10. Wu NZ, Klitzman B, Dodge R, Dewhirst MW. Diminished leukocyte endothelium interaction in tumor microvessels. *Cancer Res* 1992;52:4265-8.
 11. Fukumura D, Salehi HA, Witwer B, Tuma RF, Melder RJ, Jain RK. Tumor necrosis factor- α induced leukocyte adhesion in normal and tumor vessels: effect of tumor type, transplantation site and host strain. *Cancer Res* 1995;55:4824-9.
 12. Borgstrom P, Hughes GK, Hansell P, Wolitzky BA, Sriramarao P. Leukocyte adhesion in angiogenic blood vessels. *J Clin Invest* 1997;99: 2246-53.
 13. Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993;178:1223-30.
 14. Gorelik E, Wiltrot RH, Brunda MJ, Holden HT, Herrerman RB. Augmentation of metastasis formation by thioglycollate-elicited macrophages. *Int J Cancer* 1982;29:575-81.
 15. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC in immunoperoxidase technique; A comparison between ABC and unlabelled antibody(PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.
 16. Briscoe DM, Cotran RS, Pober JS. Effect of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. *J Immunol* 1992;149:2954-60.

17. Mayo JG. Biologic characterization of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. *Cancer Chemother Rep* 1972;(Part 2)3;325-30.
18. Brunda MJ, Sulich V, Bellatori D. The anti-tumor effect of recombinant interferon alpha or gamma is influenced by tumor location. *Int J Cancer* 1987;40:807-10.
19. Mule JJ, Yang JC, Lafreniere R, Shu S, Rosenberg SA. Identification of cellular mechanisms operational in vivo during the regression of established pulmonary metastases by systemic administration of high-dose recombinant interleukin-2. *J Immunol* 1987;139:285-94.
20. Sayers TJ, Wiltrot TA, McCormick K, Husted C, Wiltrot RH. Antitumor effects of α -interferon and γ -interferon on a murine renal cancer (Renca) in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1990;50:5414-20.
21. Kedar E, Klein E. Cancer immunotherapy; are the results discouraging? Can they be improved? *Adv Cancer Res* 1992;59:245-322.
22. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon F, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:827-845.
23. Brunda MJ, Luistro L, Hendrzak JA, Fountoulakis M, Garotta G, Gately MK. Role of interferon- γ in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. *J Immunol* 1995;17:71-7.
24. Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, Gately MK, Wolf SF, Schreiber RD, Storkus WJ, Lotze MT. Recombinant interleukin-12(IL-12) administration induces tumor regression in association with interferon-gamma production. *J Immunol* 1994;153:1697-706.
25. Tahara H, Zeh HJ, Storkus III WJ. Fibroblasts genetically engineered to secrete IL-12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma in vivo. *Cancer Res* 1994;54:182-9.
26. Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YCE, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R, Gately MK. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6808-12.
27. Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G. Induction of interferon- γ production by natural killer cell stimulatory factor : Characterization of the responding cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 1991;173:869-79.
28. Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FJ, Familletti PC, Sinigaglia F, Chizzonite R, Gubler U, Stern AS. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12(cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J Immunol* 1991;147:874-82.
29. Perussia B, Chan SH, D'Andrea A, Tsuji K, Santoli D, Pospisil M, Young D, Wolf SF, Trinchieri G. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR- $\alpha\beta$ +, TCR $\gamma\delta$ + T lymphocytes and NK cells. *J Immunol* 1992;149:3495-502.
30. Robertson MJ, Soiffer RJ, Wolf SF, Manley TJ, Donahue C, Young D, Herrmann SH, Ritz J. Responses of human natural killer (NK) cells to

- NK cell stimulatory factor (NKSF) : Cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J Exp Med* 1992;175: 779-88.
31. Zou JP, Yamamoto N, Fujii T, Takenaka H, Kobayashi M, Herrmann SH, Wolf SF, Fujiwara H, Hamaoka T. Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity : Response is correlated with a striking reversal of suppressed interferon- γ production by anti-tumor T cells. *Int Immunol* 1994; 7:1135-45.
32. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 1988;6:381-405.
33. Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991;87:1-5.
34. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Gellatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R. Selectins : a family of adhesion receptors. *Cell* 1991;67:233-41.
35. Kuzu I, Bicknell R, Fletcher CDM, Gatter KC. Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. *Lab Invest* 1993;69:322-8.
36. Fraker DL, Alexander HR, Pass HI. Biologic therapy with TNF: systemic and regional administration. In : DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Biologic Therapy of Cancer*, 2nd ed. Philadelphia : J. B. Lippincott Co.; 1994, p. 62-9.
37. Melder RJ, Munn LL, Yamada S, Ohkubo C, Jain RK. Selectin and integrin mediated T lymphocyte rolling and arrest on TNF α -activated endothelium is augmented by erythrocytes. *Biophys J* 1995;69:2131-8.
38. Sluiter W, Pietersma A, Lamers JM, Koster JF. Leukocyte adhesion molecules on vascular endothelium : their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22(Suppl) : 37S-44S.
39. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9238-42.
40. Yu WG, Ogawa M, Mu J, Umehara K, Tsujimura T, Fujiwara H, Hamaoka T. IL-12-induced tumor regression correlates with in situ activity of IFN-gamma produced by tumor-infiltrating cells and its secondary induction of anti-tumor pathways. *J Leukoc Biol* 1997;62:450-7.