

항암 면역요법제 인터루킨-2의 면역과민반응 평가연구

조영주 · 엄준호 · 길정현 · 박재현 · 이종권 · 오혜영 · 박귀례 · 김형수*

독성연구부 면역독성과, 국립독성연구원

(Received October 25, 2004; Revised November 12, 2004)

Potential Hypersensitivity of Recombinant Mouse IL-2 as a Immunotherapeutic Agent of Cancer in Tumor-bearing BALB/c Mice

Young Joo Cho, Juno H. Eom, Jung Hyun Gil, Jae Hyun Park, Jong Kwon Lee, Hye Young Oh, Kui Lea Park and Hyung Soo Kim*

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food Drug Administration, #5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul 122-704, Korea

Abstract — Interleukin-2 (IL-2), a glycoprotein mainly secreted by CD4+ T helper lymphocytes, has been developed to use recombinant cytokine to augment the immune response against cancer since IL-2 not only stimulates T lymphocytes but also enhances natural killer (NK) cell activity. In order to evaluate the immunological safety of recombinant mouse IL-2 (*mIL-2*) in cancer therapy, renal cell carcinoma was established in the flank by s.c. injection of renca cell line. Tumor-bearing BALB/c mice were treated with i.p. injections with 2×10^5 IU *mIL-2*. Even though the tumor size was diminished, there were not significant recovery of body and relative lymphoid organ weights including thymic atrophy in *mIL-2* immunotherapy. Distribution ratios of T cell subsets in thymus were analysed using flow cytometry. Without regard to dosage of *mIL-2*, the ratio of CD3+CD4-CD8- T cells was increased in accordance with survival of solid tumor but that of CD4+CD8+ T cells was decreased dramatically. Emergence of autoantibodies (ANA, anti-dsDNA, and anti-histone) in blood was measured after *mIL-2* treatment. The results showed that the levels of ANA and anti-dsDNA did not significantly changed, but the level of anti-histone was increased significantly owing to *mIL-2* therapy. These results indicate *mIL-2* immunotherapy is to induce the autoimmune potential, and the anti-histone measurement as a biomarker of autoimmunity is useful in cancer immunotherapy.

Keywords □ IL-2, cancer immunotherapy, autoantibody, flow cytometry

생물공학 기술의 발전과 함께 최근에 이루어진 인간유전체정보(human genome project)의 완료는 질병의 예방과 치료를 통한 인류의 건강한 삶과 수명연장에 대한 기대를 증대시키고 있음은 물론 실제로 이와 같은 목적을 위해 생물공학기술이 적용되어 개발된 의약품(바이오제품 또는 바이오의약품)들이 일부 생산되어 소비시장에 나오고 있다. 한편 진행성 암을 가진 대다수의 환자는 수술이나 화학요법 등으로 완치를 기대하기 어려워서 새로운 치료방법으로서 항암 사이토카인(cytokine)을 이용한 연구가 가장 활발히 진행되고 있다. 이처럼 중앙 면역학의 발달로 항암 면역요법의 연구에 커다란 진전이 이루어지고 있어,¹⁾ 담암

(tumor bearing) 개체의 자체 면역체계에 의한 항암효과 증강을 목표로 한 생물학적 반응 조절자(biological response modifier; BRM) 이용이 동물 및 인체에서 시도되고 있으며 BRM의 하나로써 여러 종류의 림포카인(lymphokine)이 항암 면역요법에 이용되고 있다.¹⁻⁴⁾ 또한 이미 개발된 바이오의약품들보다 훨씬 많은 제품들이 개발 중에 있으며 이에는 DNA 백신, 유전자치료제, 세포치료제와 같은 신개념의 의약품도 포함되어 있다. 의료목적의 바이오제품 즉 바이오의약품 중 상당수는 현재 인류를 괴롭히고 있는 질병 중 암의 예방 및 치료와 관련된 것이며, 암의 치료에 활용되는 대부분의 바이오의약품 작용은 면역기능을 증진시켜 암을 극복하고자 하고 있다. 면역기능을 증진시키기 위해서 사용하고 있는 바이오의약품의 작용양식은 1) 기능을 *in vitro* 에서 활성화시킨 면역세포(수지상세포/dendritic cell, T 세포, NK 세포 등)의 주입하는 방법,⁵⁾ 2) 면역기능조절물질로서 면역세포

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-380-1797 (팩스) 02-380-1799
(E-mail) kim_hs@kfda.go.kr

상호간의 역할 조절을 담당하는 사이토카인 자체나 이를 체내에서 발현할 수 있는 유전물질의 주입하는 방법,⁶⁻⁸⁾ 3) 암세포-특이 항원을 발현할 수 있는 유전물질의 주입하는 방법⁹⁾ 등이 있다. 사이토카인은 면역반응의 각 단계에서 림프구의 활성을 조절하는 폴리펩타이드로서 암 환자의 면역능을 증강시킬 수 있다. 임상 연구에서 가장 많이 사용된 사이토카인은 인터루킨-2 (Interleukin-2; IL-2), 인터루킨-12(IL-12), 알파인터페론(IFN- α), 감마인터페론(IFN- γ), 종양괴사인자 (TNF- α) 및 과립구-단핵구 군체자극인자(GM-CSF) 등이다.¹⁰⁾ IL-2는 IL-12와 더불어 림프카인의 일종으로서 1976년 Morgan 등이 T 세포 증식에 긴요한 인자로 기술한 이래¹¹⁾ 다양한 생물학적 활성을 가진 것이 알려졌으며 T 세포에 의한 면역조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데, 그 중에서도 체내 및 체외에서 T_H1을 유도하여 항암효과를 가진 세포독성 T 세포의 수와 활성도를 증가시키고 알려져 있다.^{12,13)} 다른 한편 사이토카인의 강력한 면역조절 능력은 암 치료에 탁월한 효과를 발휘할 수 있다. 그러나 작용이 지나치게 강하여 체내의 면역조절기능의 균형을 상실시키거나 면역능을 과도하게 증진시킴으로써 오히려 인체에 유해한 부작용을 초래할 가능성도 있다. 이와 같이 사이토카인은 광범위하게 사용될 수 있지만, 본래의 기능상 인체에 위대한 부작용을 일으킬 가능성도 내재하고 있는 것이 사실임에도 불구하고 면역요법의 개발자가 유효성인 치료 작용에 중점을 두고, 안전성을 간과하거나, 생물공학제품에 대한 적절한 안전성 평가방법의 부재 등으로 인하여 그 위해성이 합리적으로 평가되지 못하는 측면이 있다.

따라서 본 연구에서는 주요 면역세포들의 활성화에 관여하는 사이토카인으로서 유전자 재조합 인터루킨-2를 암환자에게 투여하여 암치료 목적으로 사용되는 경우에 항종양효과와 더불어 동반되는 알레르기반응, 염증반응 및 자가면역반응 등 바람직하지 않은 면역반응 유발할 가능성에 대해 평가하고자 하였다. 실험동물로서 BALB/c 마우스를 사용하여 마우스 신장암 세포주인 Renca cells을 이용한 피하종양모델에서 항암 면역치료제로서 유전자 재조합 마우스 인터루킨-2를 임상요법에 준하여 투여한 후, 알레르기 반응, 염증 및 자가면역반응 관련 지표들의 변화에 대해 평가함으로써 바이오의약품의 면역학적 부작용 평가 및 평가 지표의 개발에도 기여하고자 하였다.

실험 방법

암 세포주 배양

고형암 유발을 위해 사용된 암 세포주는 마우스 신장암 세포주인 Renca를 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. Renca 세포를 10%의 FBS가 함유된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂ incubator, 37°C에서 배양하여 실험에 사용하였다.

실험동물 및 고형암유발

4주령의 수컷 BALB/c 마우스를 (주)샘타코사로부터 구입하여 1주간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간동안 마우스는 온도 23±2°C, 습도 55±10%, 12시간 명암주기 하에서 사육하였고, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 고형암은 마우스 오른쪽 옆구리에 Renca cell(1×10⁶ cells)을 피하에 주입하여 피하종양을 유발시켰다.

유전자재조합 마우스 인터루킨-2 용액의 조제 및 투여

유전자재조합 마우스 인터루킨-2(*rmIL-2*)는 Pharmingen Inc. (San Diego, CA, USA)에서 구입하여, 0.1% bovine serum albumin이 함유된 PBS에 용해하여 최소 10 µg/ml의 농도로 분주한 후 -70°C의 냉동고에 보관하였다가 치료 당일 용해하여 사용하였다. BALB/c 마우스에 고형암을 유발시킨 후 15일째 항암치료제로 활용되는 *rmIL-2*를 복강에 주사하였다. 실험동물군은 음성대조군, 용매대조군(*rmIL-2* 비투여군) 및 *rmIL-2* 투여군으로 구성하였으며, 각 군당 8마리의 마우스가 사용되었다. 음성대조군의 마우스에는 PBS만을 피하주사하여 종양이 없는 군이다. *rmIL-2* 투여군은 먼저 고형암을 유발시킨 후 *rmIL-2*를 2×10⁵ IU 용량으로 복강에 주사하였으며¹⁴⁾ 주사 일정은 임상용법을 고려하여 3일간 매일 복강내 투여한 후, 3일 휴약하고 다시 3일간 복강에 주사하는 순으로 진행되었다. 용매투여군에는 0.1% BSA가 함유된 PBS 100 µl를 *rmIL-2* 투여와 동일한 방법과 일정으로 투여하였다(Scheme 1).

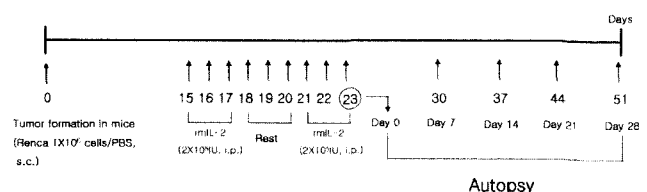
체중 및 면역 관련 장기 무게 측정

rmIL-2 투여 전과 투여 종료 후 0, 7, 14, 21, 28일째 마우스의 체중을 측정하였으며, 체중변화율은 투여 개시체중에 대한 종료체중 백분율로 구하였고, 마우스는 CO₂를 이용하여 희생시키고 면역 관련 장기인 비장과 흉선을 적출하여 그 무게를 측정하고 체중에 대한 상대적 장기 무게로 나타내었다.

고형암의 체적 측정

마우스를 CO₂를 이용하여 치사시킨 후 고형암 조직을 적출하여 측정기를 이용하여 길이와 폭을 측정한 후 다음과 같은 공식¹⁵⁾에 의해 고형암의 체적을 산출하였다.

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = (\text{square root of width} \times \text{length})^3$$



Scheme 1 – Schedule for measurement of various parameters.

면역세포의 분리 및 세포수 측정

rmIL-2 투여 종료 후 0, 7, 14, 21, 28일째 마우스를 CO₂를 이용하여 치사시킨 후 비장과 흉선을 무균적으로 적출하여 stainless steel mesh(#100)에서 압착하여 세포를 분리시키고 적혈구 용해 완충액(0.15 M NH₄Cl, 1.0 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 7.2)로 적혈구를 제거하고 complete RPMI 1640 media(100 µg/kg streptomycin, 100 IU/ml penicillin, 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum)로 2회 세척하여 complete RPMI 1640 media에 림프구(lymphocyte)를 부유시킨 후 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포수를 계수하여 실험에 사용하였다.

흉선세포아군들에 대한 유세포분석

흉선세포종의 T 세포와 B 세포의 비율을 분석하기 위해 마우스의 흉선세포(1×10⁶ cells)를 staining buffer(NaN₂-PBS)로 2회 원심세척(1,500 rpm, 10분)한 후 표면항원에 대한 항체를 가하고 4°C 차광하에서 30분간 염색하였다. T 세포, helper T 세포, cytotoxic T 세포의 표면항원표지로 각각 fluorescein isothiocyanate(FITC)-purified hamster anti-mouse CD3e monoclonal antibody, CY-chrome-conjugates rat anti-mouse CD4 monoclonal antibody, Phycoerythrin(PE)-conjugated rat anti mouse CD8a monoclonal antibody를 사용하였다. 염색된 세포를 staining buffer로 2회 세척한 후 2% paraformaldehyde로 고정하여 flow cytometer(Dual laser FACSCalibur™, Becton Dickinson, USA)를 이용하여 분석하였다.

ELISA를 이용한 혈중 histamine 측정

rmIL-2 투여 종료 후 0, 7, 14, 21, 28일째 마우스에서 심장 채혈하여 EDTA(K₃) 튜브에 혈액을 담아 균일하게 혼합한 후 원심분리(3000 rpm 10 min, 4°C)하여 혈장을 얻은 후 실험 전까지 -70°C에서 보관하였다. Histamine분석을 위해 histamine 분석용 ELISA kit(Alpha Diagnostic International Inc. San Antonio Texas USA)를 사용하였으며 분석은 제조사의 추천방법을 따랐다. 간략히 서술하면, 먼저 혈장 및 plasma standards를 indicator buffer와 진탕혼합하고 아실화제를 가해 상온에서 30분간 반응시켜 N-acylhistamine화 시켰다. 아실화된 시료는 goat anti-rabbit antiserum이 부착된 96-well immuoplate에 넣고, histamin antiserum과 enzyme conjugate를 가해서 plate를 acetate plate sealer로 봉하여 500 rpm의 orbital shaker로 상온에서 3시간 동안 반응시켜 histamin을 peroxidase와 포합시킨다. 기질로서 TMB(tetramethylbensidine)를 가해 상온에서 반응시키고 1 M 황산으로 반응을 정지시켰다. ELISA reader(Molecular Devices Co, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조 파장으로는 600~650 nm를 사용하였다.

ELISA를 이용한 혈중 IgE 측정

rmIL-2 투여 종료 후 0, 7, 14, 21, 28일째 마우스에서 심장 채혈하여 상온에서 방치한 후 원심 분리하여 혈청을 얻은 후 실험 전까지 -70°C에서 보관하였다. 혈청중의 IgE를 측정하기 위해서 mouse IgE 분석용 ELISA kit(ABL, Hamburg Germany)를 사용하였으며 분석은 제조사의 추천방법을 따랐다. Anti-mouse IgE monoclonal antibody를 96 well flat bottomed plate에 고정하고, 혈청 시료나 계대회색 표준시료(recombinant mouse IgE)를 가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 다시 biotinylated anti-mouse IgE monoclonal antibody와 avidin-horseradish peroxidase(HRP)를 넣어 상온에서 1시간 배양하였다. 기질인 TMB와 과산화수소수를 가하고, 차광하에 30분간 반응 후 반응정지액인 1 M 황산으로 반응을 정지시켜 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조파장 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

ELISA를 이용한 혈중 자가항체가 측정

ELISA를 이용한 혈중 IgE 측정과 동일한 방법으로 혈청을 얻은 후 실험 전까지 -70°C에서 보관하였다. 자가항체분석을 위해 autoantibody로서 anti-Histome antibodies, anti-dsDNA antibodies, 및 ANA(anti-Nuclear antibodies) 분석용 ELISA kit (Alpha Diagnostic International Inc. San Antonio Texas USA)를 사용하여 제조사의 추천방법을 따라 분석하였다. 간단히 기술하면, 항원(Histome, dsDNA, Nuclear)이 부착되어 있는 96-well immuoplate에 시료 혈청이나 음성혈청 및 양성혈청을 가하고 plate를 플라스틱 랩으로 밀봉하여 상온에서 30분간 결합시켰다. Goat anti-mouse IgG HRP-conjugate를 가한 후 상온에서 30분간 방치하였다. TMB 기질을 가하여 상온에서 15분간 반응시키고, 반응정지액인 1 M 황산으로 반응을 정지시켜 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Naive 마우스의 혈청을 음성대조군으로 하여 음성대조군의 흡광도 값에 0.2를 더한 흡광도 값을 측정하여 기준흡광도로 잡고 각 시료의 흡광도 값이 기준흡광도 보다 높게 나타나면 양성으로 판정하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 Sigma Stat(version 2.03)을 사용하였으며, Student's t-test와 one way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 분석하였으며 p<0.05 수준 이하에서 유의성을 검정하였다.

실험 결과

유전자 재조합 마우스 인터루킨-2(*rmIL-2*)의 고형암 증식억제효과
 피하에 Renca cells로 고형암 형성 후, *rmIL-2*의 항암면역치료제로서의 유효성을 평가하기 위해서 *rmIL-2*를 3일간 복강 내

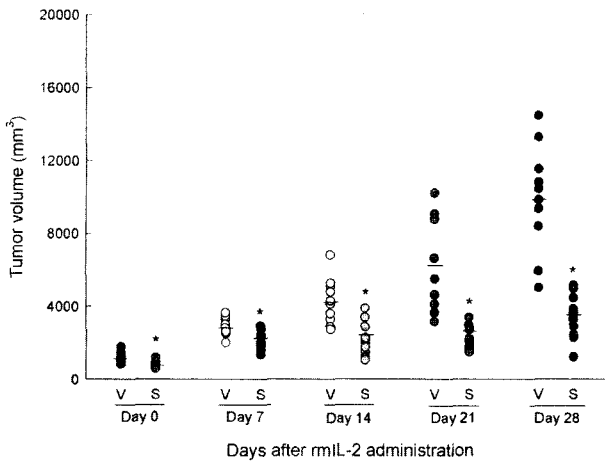


Fig. 1 – Diminution of tumor progression by immunotherapy with *rmlL-2 in vivo*. BALB/c mice were challenged with Renca tumor cells (1×10^6 cells/PBS) subcutaneously in the right flank. After 15 days, Sample (S) tumor bearing mice were injected with *rmlL-2* (2×10^5 IU/mouse) via intra-peritoneal on day 15, 16, 17, 21, 22, 23. Vehicle control (V) mice were injected i.p. with $100 \mu\text{l}$ of 0.1% BSA in PBS. The mice were sacrificed on day 0, 7, 14, 21, 28 after the final administration of *rmlL-2*. The tumors were measured with caliper and the volumes were calculated by the formula: Tumor volume (mm^3) = (square root of width \times length)³. *($P < 0.05$): Significantly different by Student's *t*-test compared to the vehicle control. Results express mean \pm S.E. of 8 mice/group.

투여하고 3일 휴약하고, 다시 3일간 복강내 투여한 후 일주일 간격으로 고형암 부피를 caliper를 이용하여 측정하였다. 그 결과 용매대조군(*rmlL-2* 비투여군)에 비해 *rmlL-2* 투여군에서 암 크기 증가가 억제되는 것이 확인되었으며, *rmlL-2* 투여 종료한 후

28일에는 약 70%의 억제효과를 나타내었다(Fig. 1, 2).

마우스의 체중 및 면역관련 장기 중량에 미치는 영향

Renca cells을 이용한 BALB/c 마우스 피하종양모델에서 항암 면역치료제로서 *rmlL-2*를 복강내 투여 종료 후, 일주일 간격으로 마우스를 부검하여 체중 및 면역 관련 장기의 상대적 중량 변화를 측정된 결과, 정상적인 음성대조군에 비해 고형암을 지닌 용매대조군(*rmlL-2* 비투여군)이나 *rmlL-2* 투여군 모두에서 체중이 유의하게 감소하였으나, 비장의 상대적 중량 및 세포수에는 유의한 영향이 나타나지 않았으며, *rmlL-2* 투여와 상관없이 고형암을 지닌 경우 흉선의 위축이 일어나 흉선의 상대적 중량이 *rmlL-2* 투여 종료 후 0일째부터 28일째까지 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

마우스 흉선 T 세포 아군의 상대적 분포비에 미치는 영향

암의 발생에 따라 흉선의 위축이 일어나지만 항암면역요법으로서 *rmlL-2*를 투여하여 암의 성장이 전지 및 둔화되었을 때 흉선에서 발생·분화되는 T 세포 아군에 미치는 영향을 평가하여 면역기능의 변화를 측정하기 위하여 마우스의 흉선을 적출하여 흉선을 구성하는 T 세포아군들의 상대적 분포비를 flow cytometry로 분석한 결과, 흉선구성 세포비는 *rmlL-2* 투여와 상관없이 암의 발생으로 CD3-군은 감소되는 비율이며, CD3+군의 비율은 크게 증가하였다. CD3-군에서 *rmlL-2* 최종투여 후 7일까지는 다소 유의성 있게 증가되었다. 암발생으로 CD3+ 세포군 구성비율은 CD3+CD4+CD8+ 세포군을 제외하고는 증가되었으며, *rmlL-2* 투여에 의한 결과는 더욱 유의성 있게 증가되었으며, CD3+CD4+CD8- 세포가 CD3+CD4-CD8+ 세포보다 많은 영

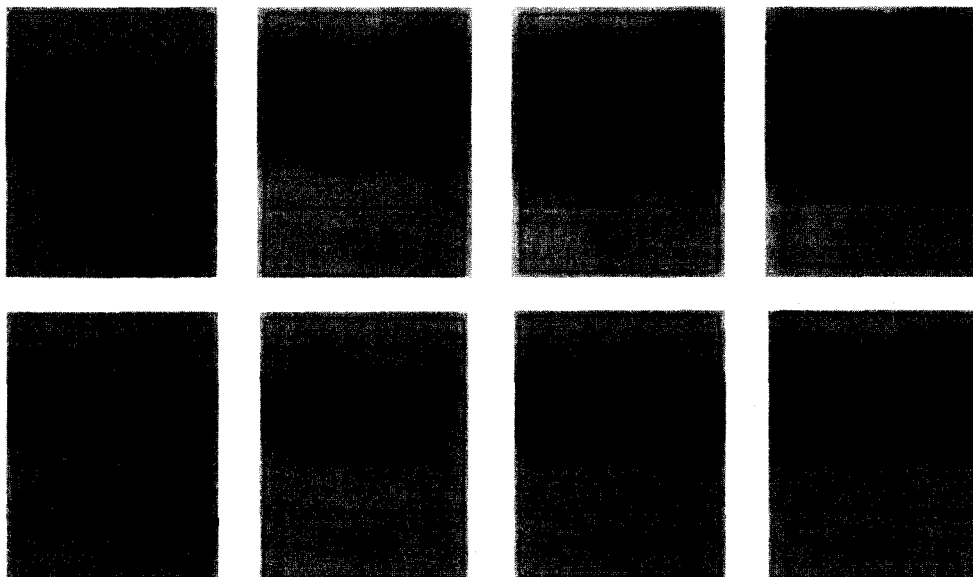


Fig. 2 – Examples of tumor nodules of both Vehicle control (V) group and Sample (S) group treated with *rmlL-2*.

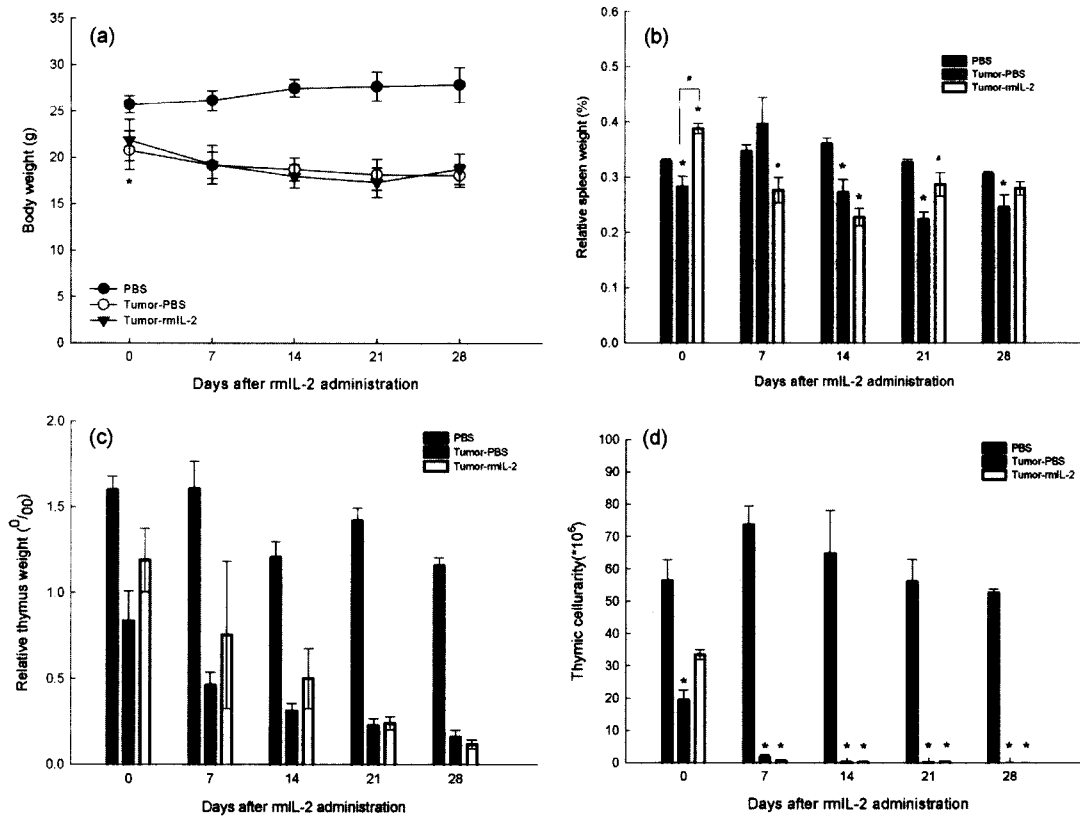


Fig. 3 – Changes in body weights (a), relative spleen weights (b), relative thymus weights (c), and thymic cellularities (d) in male BALB/c mice after immunotherapy with *mIL-2* *in vivo*. PBS group was injected s.c. with 100 μ l of PBS. BALB/c mice were challenged with Renca tumor cells (1×10^6 cells/PBS) subcutaneously in the right flank. After 15 days, Sample (S) tumor bearing mice were injected with *mIL-2* (2×10^5 IU/mouse) via intra-peritoneal on day 15, 16, 17, 21, 22, 23. Vehicle control (V) mice were injected i.p. with 100 μ l of 0.1% BSA in PBS. The mice were sacrificed on day 0, 7, 14, 21, 28 after the final administration of *mIL-2*. Relative spleen weight (%) = spleen weight/body weight $\times 100$. Relative thymus weight (%) = thymus weight/body weight $\times 1000$. * ($P < 0.05$): Significantly different from PBS. # ($P < 0.05$): Significantly different from tumor-PBS. Results represent mean \pm S.E. of 8 mice/group.

Table I – Effect of *mIL-2* on the composition rate of CD3- thymocyte subsets

Group	Sacrificed days	CD3-				Total (%)
		CD4-CD8- (%)	CD4+CD8+ (%)	CD4+CD8- (%)	CD4-CD8+ (%)	
N	0	1.10 \pm 0.06	93.04 \pm 0.31	0.07 \pm 0.02	5.78 \pm 0.30	80.93 \pm 0.80
	7	2.11 \pm 0.52	90.85 \pm 1.33	0.12 \pm 0.02	7.68 \pm 0.52	85.35 \pm 0.75
	14	1.18 \pm 0.21	94.06 \pm 0.58	0.09 \pm 0.03	4.67 \pm 0.34	86.42 \pm 0.24
	21	1.55 \pm 0.27	94.54 \pm 0.42	0.31 \pm 0.12	1.43 \pm 0.06	83.67 \pm 1.37
V	0	2.88 \pm 0.06*	88.62 \pm 0.19*	0.10 \pm 0.01	8.40 \pm 0.17*	64.30 \pm 0.99*
	7	10.31 \pm 0.45*	79.96 \pm 0.71*	3.20 \pm 0.12*	6.52 \pm 0.35	65.35 \pm 0.59*
	14	22.67 \pm 0.11*	57.07 \pm 1.53*	8.90 \pm 0.65*	11.20 \pm 1.17*	65.15 \pm 2.11*
	21	86.05 \pm 3.80*	3.36 \pm 0.12*	8.83 \pm 0.03*	4.66 \pm 1.51	46.92 \pm 4.70*
S	0	2.09 \pm 0.15*#	90.82 \pm 0.34*#	0.16 \pm 0.03*#	6.77 \pm 0.23*#	68.72 \pm 0.57*#
	7	17.63*#	71.39*#	3.65*	7.34	60.08*#
	14	35.95 \pm 1.96*#	50.00 \pm 1.05*#	5.58 \pm 0.11*#	7.48 \pm 0.45#	20.54 \pm 0.23*#
	21	35.95 \pm 1.96*#	50.00 \pm 1.05*#	5.58 \pm 0.11*#	7.48 \pm 0.45#	20.54 \pm 0.23*#

Negative control (N) group was injected s.c. with 100 μ l of PBS. BALB/c mice were challenged with Renca tumor cells (1×10^6 cells/PBS) subcutaneously in the right flank. After 15 days, Sample (S) tumor bearing mice were injected with *mIL-2* (2×10^5 IU/mouse) via intra-peritoneal on day 15, 16, 17, 21, 22, 23. Vehicle control (V) mice were injected i.p. with 100 μ l of 0.1% BSA in PBS. The mice were sacrificed on day 0, 7, 14, 21, 28 after the final administration of *mIL-2*. Thymic cells were stained with CD3 (FITC-conjugated), CD4 (Cy-Chrome-conjugated) and CD8 (PE-conjugated) mAbs. And the distribution of thymocyte subsets was examined by flow cytometry. * ($P < 0.05$): Significantly different from negative control (N). # ($P < 0.05$): Significantly different from vehicle control (V). Results express mean \pm S.E. for 8 mice/group.

Table II – Effect of *rmIL-2* on the composition rate of CD3+ thymocyte subsets

Group	Sacrificed days	CD3+				Total (%)
		CD4-CD8- (%)	CD4+CD8+ (%)	CD4+CD8- (%)	CD4-CD8+ (%)	
N	0	1.35±0.08	36.69±0.55	36.43±0.80	25.53±0.74	19.12±0.80
	7	2.43±0.33	34.84±0.97	37.97±1.29	24.76±0.78	13.47±0.52
	14	1.99±0.16	35.94±2.29	39.48±1.64	22.59±0.98	13.65±0.25
	21	4.40±0.47	31.27±1.38	41.77±2.83	21.60±1.39	16.44±1.38
V	0	1.63±0.08	31.44±0.52	35.19±0.76*	31.91±0.37*	35.74±1.03*
	7	6.90±0.35*	6.95±0.37*	53.77±0.42*	32.38±0.44*	34.81±0.59*
	14	16.52±0.05*	5.45±0.62*	60.35±1.99*	17.70±1.34	35.05±2.11*
	21	9.35±0.13*	0.50±0.04*	53.72±1.01	36.43±0.84*	57.59±3.17*
S	0	1.30±0.52 [#]	27.81±0.75* [#]	37.78±0.95*	33.11±0.47*	30.78±0.86* [#]
	7	15.18* [#]	5.57*	38.14 [#]	41.1* [#]	40.19* [#]
	14	8.02±0.13* [#]	5.60±0.11*	59.97±0.04*	26.42±0.01 [#]	79.57±0.23* [#]
	21	23.04* [#]	2.42*	44.47	30.07	90.02* [#]

Negative control (N) group was injected s.c. with 100 μ l of PBS. BALB/c mice were challenged with Renca tumor cells (1×10^6 cells/PBS) subcutaneously in the right flank. After 15 days, Sample (S) tumor bearing mice were injected with *rmIL-2* (2×10^5 IU/mouse) via intra-peritoneal on day 15, 16, 17, 21, 22, 23. Vehicle control (V) mice were injected i.p. with 100 μ l of 0.1% BSA in PBS. The mice were sacrificed on day 0, 7, 14, 21, 28 after the final administration of *rmIL-2*. Thymic cells were stained with CD3 (FITC-conjugated), CD4 (Cy-Chrome-conjugated) and CD8 (PE-conjugated) mAbs. And the distribution of thymocyte subsets was examined by flow cytometry. *($P < 0.05$): Significantly different from negative control (N). [#]($P < 0.05$): Significantly different from vehicle control (V). Results express mean \pm S.E. for 8 mice/group.

향을 받았다(Table I, II).

혈중 histamin 및 IgE 분석 평가

고형암을 지닌 마우스에 *rmIL-2* 투여 종료 후 염증 및 알레르기 관련 생리활성인자에 대한 영향을 평가하기 위하여 histamine 및 IgE의 혈중 농도를 ELISA 방법으로 분석하였다. 혈중 histamine 농도는 유의한 변화를 관찰할 수 없었으나(Fig. 4), IgE의 혈중 농도는 *rmIL-2* 투여 종료 후 0일째부터 21일째까지 고

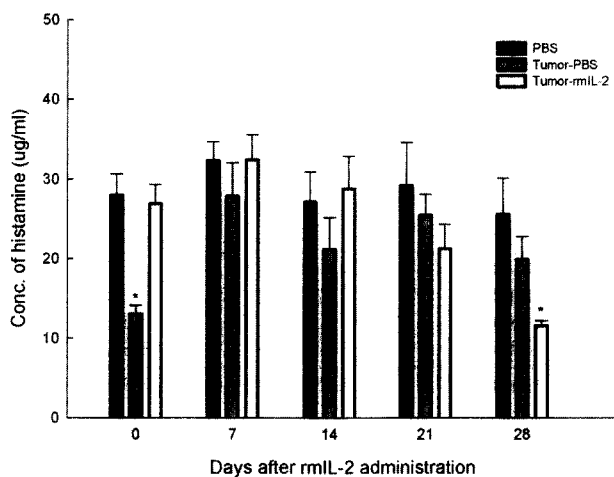


Fig. 4 – Determination of histamine levels in plasma of mice after immunotherapy with *rmIL-2*. Plasma were taken on day 0, 7, 14, 21, 28 after the final administration of *rmIL-2*. And the histamine levels were quantified by ELISA method in the plasma. *($P < 0.05$): Significantly different from PBS group. Results represent mean \pm S.E. of 8 mice/group.

형암이 없는 음성대조군에 비해 용매대조군(*rmIL-2* 비투여군)이 유의하게 증가함을 보였으며 *rmIL-2* 투여군에서는 유의함을 살펴볼 수 없었다(Fig. 5).

자가 면역 반응 유발성 평가

면역치료용 바이오제제인 *rmIL-2* 투여로 인한 면역능 과증진 유발에 따른 자가 면역 반응의 지표로 혈중 자가 항체(ANA(anti-

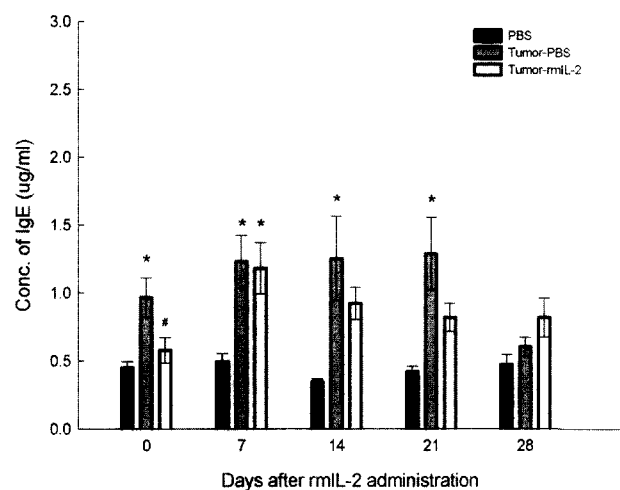


Fig. 5 – Determination of IgE levels in serum of mice after immunotherapy with *rmIL-2*. Sera were taken on day 0, 7, 14, 21, 28 after the final administration of *rmIL-2*. And the histamine levels were quantified by ELISA method in the serum. *($P < 0.05$): Significantly different from PBS. [#]($P < 0.05$): Significantly different from tumor-PBS. Results represent mean \times S.E. of 8 mice/group.

nuclear antibody), anti-dsDNA, anti-histone) 양 변화를 측정하였다. 자가 항체의 측정은 *rmIL-2* 투여 종료 후 1주 간격으로 4주간 이루어졌다. 혈중 자가 항체 측정 결과, ANA 및 anti-

dsDNA 양은 *rmIL-2* 투여 후에도 항체가 기준선이하로서 음성으로 판정되었으나, anti-histone은 *rmIL-2* 투여로 자가 면역 관련 양성반응을 보였다(Fig. 6).

고찰

바이오효약품으로서 IL-2는 T_H 임파구에 의해 생산되는 15 KDa 단백질로서 T 세포 증식을 자극시키고 여러가지 다른 사이토카인들의 생산을 유도한다고 알려져 있다.¹⁶⁾ 또한 전이성 신장암, melanoma, lymphoma 및 leukemia에 효능을 나타내는 것으로 미 FDA에서 허가를 받고 항암 면역요법에 이용되고 있다. 특히, IL-2는 항암치료는 전이성 신장암에 특히 효능을 나타내고, 이와 관련하여 Talmadge 등이 IL-2 투여에 의해 폐와 복강내 전이에 효과가 있다고 보고하였으며,¹⁷⁾ Lotze 등은 IL-2의 고농도 투여에 의해 신장세포암과 흑색종에서 효과가 나타난다고 보고한 바 있다.¹⁸⁾ 본 연구에서도 바이오효약품으로서 *rmIL-2*를 사용하였는데 이는 마우스를 평가용 실험동물로 사용하기 위한 것이며, 고형암 유발 세포주로는 신장암 유래 암세포주인 Renca 세포를 선정하였다. 우선 *rmIL-2*의 항암치료제로서의 유효한 투여 농도로서 체표면적을 기준으로 임상용량으로부터 환산하여 치료하여 고형암 증식억제효과를 고형암의 부피로 환산 비교한 결과 *rmIL-2* 투여군의 암 크기 증가도가 최대 약 70% 억제효과를 나타내어 항암면역요법제로서 IL-2를 단독 사용해서 암을 완전히 제거할 수는 없었지만 암의 성장을 충분히 억제할 수 있을 것으로 사료되었다.

면역증가제로서 암치료에 활용되는 IL-2에 대한 면역학적인 안전성을 평가하기 위한 기본 병리지표로서 체중, 면역관련 장기의 상대적 중량 및 구성 세포수 등을 *rmIL-2* 투여 종료 후부터 일주일 간격으로 측정하였다. 체중에 있어 고형암으로 체중은 유의하게 감소하였으며, *rmIL-2* 투여에 의해서 체중이 회복되지 않았다. 체중감소의 원인은 *rmIL-2*의 투여에 의한 T_H 세포의 사이토카인을 통한 대식세포의 활성화에 의해 cachetin인 TNF- α 의 작용에 의한 식욕감퇴의 결과라고 사료되었다.

또한, 마우스 비장의 상대적 중량 및 세포수는 *rmIL-2* 투여종료시 증가되어 고형암에 의한 영향을 극복한 면역증강효과를 나타낸 것으로 보였으나, 투여 종료후 14일째부터는 통계적으로 유의성 있게 면역증가효과가 없었다. 흉선에 있어서는 고형암은 흉선의 위축을 강하게 유도하고 있으며, *rmIL-2* 투여로 극복되지 않으며, 흉선의 구성 세포수에 있어서는 투여 종료후 7일째부터 현격하게 감소되었다. 이것은 Fu 등이 T 세포 숙성기관인 흉선이 암 형성과 함께 심각하게 영향을 받아 암이 형성된 후 4주 뒤에는 중량으로 평가했을 때, 정상 5% 이하밖에 남아있지 않다는 보고¹⁹⁾와 일치되는 결과로 사료되며, 암의 형성이 일차면역기관인 흉선에 강하게 영향을 미치며 *rmIL-2* 투여로 극복되지

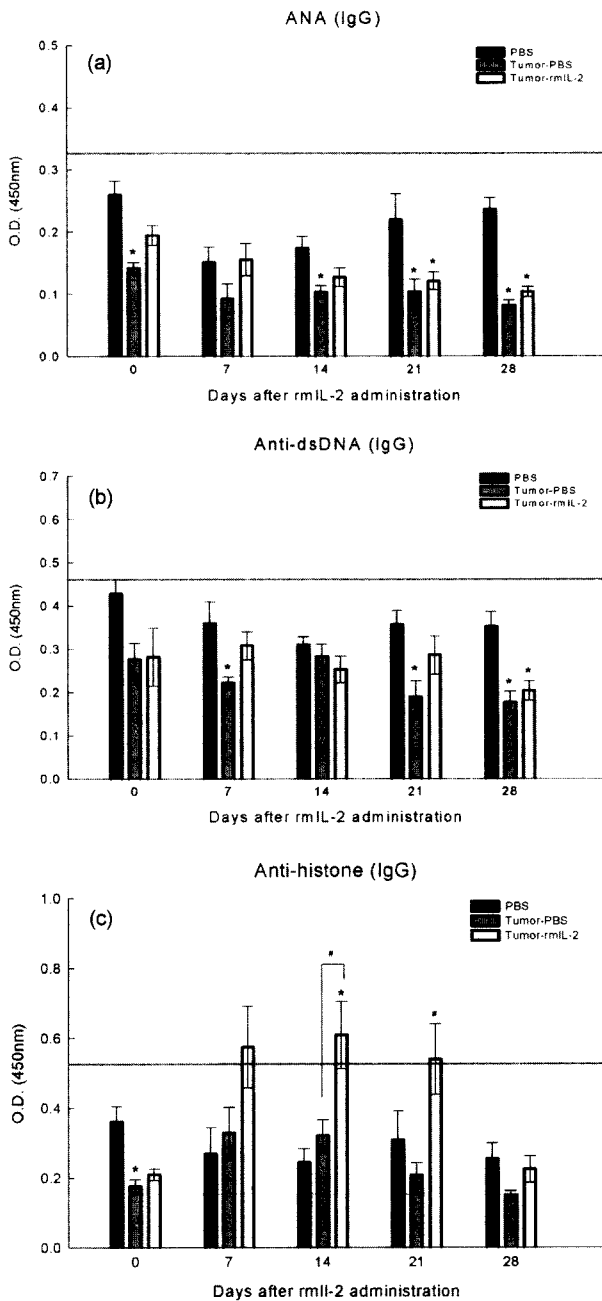


Fig. 6 – Relative levels of autoantibodies (ANA, anti-dsDNA and anti-histone) after immunotherapy with *rmIL-2*. Sera were taken on day 0, 7, 14, 21, 28 after the final administration of *rmIL-2*. And the levels of autoantibodies were quantified by ELISA method in the serum. Any sample with OD₄₅₀ values of >0.334 for ANA (a), >0.461 for anti-dsDNA (b), and >0.525 for anti-histone (c) was considered definitely positive. * (P<0.05): Significantly different from PBS. # (P<0.05): Significantly different from tumor-PBS. Results represent mean±S.E. of 8 mice/group.

않는 것으로 사료된다.

고형암으로 인해 위축된 흉선에 IL-2 투여가 T 세포 아군의 상대적 분포비에 미치는 영향을 flow cytometry를 활용하여 분석한 결과 흉선 구성 세포 중 CD3-CD4+CD8- 세포 및 CD3-CD4-CD8+ 세포는 macrophage나 monocyte 및 NK 세포 등으로 암의 발생으로 비례적으로 증가되는 결과를 보였으나, CD3-CD4+CD8+의 유의적으로 감소하며 CD3-CD4-CD8- 강한 증가추세는 흉선의 위축과 기능상실을 반영한 결과라고 사료되며, *rmIL-2* 투여 직후에는 다소 양호적인 비율을 나타내었다. 또한 CD3+ 세포군은 T 세포의 분화를 반영하는 것으로 암의 발생에 따라 CD3+CD4-CD8- 증가와 CD3+CD4+CD8+ 감소는 분화의 저해단계인 것으로 사료되며, 이는 Becky 등이 암으로 인해 CD4+CD8+ 세포가 급격히 감소한다는 보고와²⁰⁾ 일치하는 결과를 나타냈다. *rmIL-2* 투여로 T_H 세포인 CD3+CD4+CD8- 세포와 대부분 cytotoxic T 세포군인 CD3+CD4-CD8+ 세포가 유의적인 증가를 보였으나, 흉선 세포수의 급격한 감소를 감안하여 보면 *rmIL-2* 투여는 유의성 있는 영향을 주지 못한 것으로 사료된다. IL-2는 T 세포 증식에 긴요한 생물학적 활성을 가진 것이 알려져 있으며, 그 중에서도 체내 및 체외에서 암세포 살해 효과를 가진 cytotoxic T 세포의 수와 활성도도 증가시킨다고 알려져 있다.^{12,13)} 본 연구에서도 CD4-CD8+ 세포수가 *rmIL-2* 투여 종료 후 14일째까지 음성대조군에 비해 유의성 있게 증가함을 나타내었으며, 흉선이 위축되면서 기능결핍으로 말미암아 T 세포 분화성장이 크게 손상되고, 이를 극복하기 위한 면역증강요법은 T 세포 분화성장에 영향을 미쳐 자가면역반응을 일으킬 수 있음을 보여줄 수 있다. 나아가 CD25 세포와 CD152(CTLA-4) 세포가 자가면역과 상관관계가 있다는 보고에²¹⁻²⁴⁾ 따라 자가면역반응 유발을 보다 명확한 결과를 얻기 위해서는 CD3/CD4/CD25와 CD3/CD4/CD152 T 세포아군들의 변화를 분석이 요구된다고 사료된다.

RmIL-2 투여에 의한 안전성 평가지표로서 염증 및 알레르기 관련 생리활성인자의 생성에 대한 영향을 IgE 및 histamine의 혈중 농도로 분석 평가하였다. 고형암이 있는 경우 IgE의 혈중 농도는 유의성 있게 증가되었다. 이는 신장암 유발과 함께 IL-6 생산이 증가한다는 보고²⁵⁾가 있어 IL-6에 의한 B 세포의 활성화로 IgE의 생성증가가 반영된 것으로 사료된다. *RmIL-2* 치료로 IgE의 생성이 투여 종료시에는 유의성 있게 저하되며 시간의 경과함에 따라 저하된 경향을 유지하였으며, 혈중 histamine 농도는 유의한 변화를 관찰할 수 없어 IgE의 증감이 혈중 histamine의 증감에 영향을 미치지 않았다. 따라서 암 유발과 *rmIL-2* 투여에 의한 염증인자와의 상관성은 추가적인 요소가 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

면역증진 바이오의약품의 자가면역반응 유발성을 평가하기 위한 지표로서 전신성 공포증, 쇼그렌 증후군, 다발성동맥염 등의

자가면역질환과 관련하는 ENA(extractable nuclear antigen)와 주로 전신성홍반성낭창과 직접적으로 관계되는 ds-DNA 및 histones에 대한 자가항체를 평가지표로 하여 ANA(anti-nuclear antibody), anti-dsDNA, anti-histone 등의 혈중농도 변화를 *rmIL-2* 투여 종료 후 1주 간격으로 4주간 측정된 결과, 암의 형성에 의해 ANA 및 anti-dsDNA 혈중농도는 일률적으로 저하되어 면역능 전반이 저해된 것을 반영하고 있으며, *rmIL-2* 투여에 의해 약간 상승된 경향이지만 자가면역반응으로서는 음성으로 판정되었다. Anti-histone 혈중농도는 고형암의 발생으로 대부분 낮아지지만 *rmIL-2* 투여군에서는 유의성 있게 증가되어 *rmIL-2* 투여 후 1~3주간 지속적인 자가항체 양성반응을 나타내어, 신장암 환자에게 고용량의 IL-2로 치료한 결과 근무력증, 근염, 인슐린의존성당뇨병과 같은 자가면역질환을 유발한다는 Paula 등의 보고²⁶⁾와 연계되는 해석이 가능할 것으로 사료된다. 결국, 면역증강 바이오 의약품의 안전성 평가에 있어 자가면역유발성을 평가하여야 하며, 자가면역유발성 평가에 있어서 Bondanza 등이 제시한²⁷⁾ 신장 등의 면역복합체 침착과 사구체 염의 현미화학적 검사와 아울러 혈중의 anti-histone 과 같은 자가항체도 자가면역반응 평가 지표로서 유용할 것으로 사료된다.

결 론

Interleukin-2는 lymphokine의 일종으로서 자연살상세포 및 T 세포를 강력하게 자극할 수 있는 활성을 지닌 것으로 알려져 있으며 항암면역치료제로 이용되고 있다. 그러나 IL-2를 면역능 향진용으로 사용할 경우 항상성 유지의 면역 특성상 동반되는 면역학적 부작용을 평가하고자 하였다. Renca 신장암 세포주를 사용하여 고형암을 유발시킨 BALB/c 마우스를 실험동물모델로 하여 바이오의약품인 *rmIL-2* 투여로 고형암이 축소되는 유효성을 나타내는 조건하에서 면역학적 부작용인 자가면역유발성을 평가함은 물론 효율적인 안전성 평가지표 개발에도 기여하고자 하였다. 그 결과 *rmIL-2* 투여 직후에는 면역장기인 비장 및 흉선의 상대증량과 구성 세포수가 회복되었으나, 투여 종료 후 7일째부터 암발생에 따른 급격한 감소를 극복할 수 없었다. 흉선 구성세포에서 *rmIL-2* 투여가 흉선 T 세포아군들의 상대적 분포비와 세포수를 반영하여 미치는 영향을 분석해보면 암의 발생으로 흉선 T 세포 아군의 증산을 하고자 하였으나 CD3+ CD4- CD8- 세포에서 CD3+ CD4+ CD8+ 세포군으로 발달하는 과정이 차단되었으며, *rmIL-2* 투여 후 급격한 흉선의 기능상실과 구성 세포수가 급감되었다. 혈청 중 IgE 농도는 암의 발생으로 증가되고 *rmIL-2* 투여로 다소 감소하나 혈중 histamine 농도에는 영향을 미치지 못하였으며, 자가항체(ANA, anti-dsDNA 및 anti-histone)의 혈중농도는 anti-histone의 경우 *rmIL-2* 투여 후 21일까지 유의성 있게 증가되는 양성의 결과를 나타냈다. 결과적으로 면역

능 증강 바이오의약품은 자가항체를 유발할 수 있으며, 이에 대한 평가 지표로서 혈중 anti-histone과 같은 자가항체가 측정이 병리조직검사와 함께 유용한 지표로서 활용되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 2003년도 바이오제품의 독성·약리·임상 평가기술개발사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Rosenberg, S. A. and Longo, D. L. : *Principles and application of biologic therapy*. In : DeVita, V. T., Hellman, S. and Rosenberg, S. A., Cancer 3rd ed., Philadelphia Lippincott, p. 301 (1989).
- 2) Roitt, I. M., Brostoff, J. and Male, D. : *Immunology*. 1st ed., London, Mosby, p. 18 (1985).
- 3) Herberman, R. B. : Design of clinical trials with biological response modifiers. *Cancer Treat. Rep.* **24**, 1161 (1985).
- 4) Jang, J. S., Jun, J. B., Hahm, J. S., Lee, M. H., Choi, I. Y. and Chung, A. J. : Clinical trial of human recombinant interleukin-2 (IL-2) in advanced cancer patients. *J. of Korean Cancer Association* **22**, 96 (1990).
- 5) Yomohide, T., Tetsuo, T., Tatsuya, K., Takuya, M., Noriyoshi, K., Yoshiko, S., Masahisa, J., Akinori, K., Yutaka, S., Masatsugu, H. and Norio, H. : Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* **61**, 7563 (2001).
- 6) Bing, C., Tatyana, M. T., Daila, S. G., Melba, L. A., Radha, D. R. and Istvan, F. : Evaluation of cytokine toxicity induced by vaccinia virus-mediated IL-2 and IL-12 antitumor immunotherapy. *Cytokine* **15**, 305 (2001).
- 7) Shinichiro, I., Setsu, M., Chie, K., Yoichiro, M., Takeshi, Y. and Motoo, S. : Combination chemo-immunotherapy of murine solid tumor with OK-432, G-CSF, IL-2, and chemotherapeutics. *Int. J. Immunopharmac.* **17**, 973 (1995).
- 8) Stephane Palu, Etienne Regulier, Yves Poitevin, Horst Hormann, and R. Brice Acres : The combination of a chemokine, cytokine and TCR-based T cell stimulus for effective gene therapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 645 (2002).
- 9) Lee, J. K., Thomas, J. S., Alan, D. B., Timothy, C. B., Howard, A. Y., Kristin, L. K., Jon, M. W. and Robert, H. W. : IFN- γ dependent delay of *in vivo* tumor progression by FAS over expression on murine renal cancer cells. *The Journal of Immunology* **164**, 231 (2000).
- 10) Kang, C. D. : 종양 면역 치료법의 최신 연구 동향, 보건산업기술동향, p. 50 (2001).
- 11) Morgan, D. A., Ryscetti, F. W. and Gallo, R. C. : Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal bone marrows. *Science* **193**, 1007 (1976).
- 12) Papa, M. Z., Yang, J. C., Vetto, J. T., Shiloni, E., Eisenthal, A. and Rosebberg, S. A. : Combined effects of chemotherapy and IL-2 in the therapy of mice with advanced pulmonary tumors. *Cancer Research* **48**, 122 (1988).
- 13) NIH conference : Immunomodulator in clinical medicine. *Annal. Int. Med.* **106**, 421 (1987).
- 14) Anton, H. C. Baselmans, J.-W., Korten, J. J., Battermann, J. E., Van, D. and Willem, D. O. : The mechanism of regression of solid SL2 lymphosarcoma after local IL-2 therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 492 (2002).
- 15) Kim, K. Y., Cho, Y. J., Jeon, G. A., Ryu, P. D. and Nam, M. J. : Membrane-bound alkaline phosphatase gene induces anti-tumor effect by G2/M arrest in etoposide phosphate-treated cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **252**, 213 (2003).
- 16) Samir, S. T., William, P., Robert, F. and Arie, B. : Immunotherapy for renal cell carcinoma : The era of interleukin-2-based treatment. *Urology* **45**, 911 (1995).
- 17) Talmadge, J. E., Philips, H., Schindler, J., Tribble, H. and Pennington, R. : Systemic preclinical study on the therapeutic properties of recombinant human interleukin-2 for the treatment of metastatic disease. *Cancer Research* **47**, 5725 (1987).
- 18) Lotze, M. T., Chang, A. E., Seipp, C. A., Vetto, J. T. and Rosenberg, S. A. : High dose recombinant IL-2 in the treatment of patients with disseminated cancer. *JAMA* **256**, 3117 (1986).
- 19) Fu, Y., Paul, R. D., Wang, Y. and Lopez, D. M. : Thymic atrophy induced by murine mammary adenocarcinoma *in vivo*. *In Vivo* **3**, 4300 (1989).
- 20) Becky Adkins, Vijaya Charyulu, Qi-Ling Sun, David Lobo, and Diana M. Lopez : Early block in maturation is associated with thymic involution in mammary tumor-bearing mice. *The Journal of Immunology* **164**, 5635 (2000).
- 21) Nitin, J. K., Carol, L. V., Jeffrey, A. B. and Stephen, D. M. : Targeting the B7/CD28 : CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *J. of Neuroimmunology* **89**, 10 (1998).
- 22) Maria A Curotto de Lafaille and Juan J Lafaille : CD4+ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Current Opinion in Immunology* **14**, 771 (2002).
- 23) Ethan M. Shevach : Suppressor T cells : Rebirth, function and homeostasis. *Current Biology* **10**, R572 (2000).

- 24) John J. O'Shea, Averil Ma and Peter Lipsky : Cytokines and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* **2**, 37 (2002).
- 25) Mayer Fishman and John Seigne : Immunotherapy of metastatic renal cell cancer. *Cancer Control* **9**, 293 (2002).
- 26) Paula, G. F., Seward, B. R., Jean, K. M., Mary, F., Marie, E. C., Mary, E. P., Michael, B. A. and Jared, A. G. : Induction of myasthenia gravis, myositis and insulin-dependent diabetes mellitus by high-dose interleukin-2 in a patient with renal cell cancer. *J. of Immunotherapy* **25**, 373 (2002).
- 27) Bondanza, A., Zimmermann, V. S., Dell'Antonio, G., Cin, E. D., Capobianco, A., Sabbadini, M. G., Manfredi, A. A. and Querini, P. R. : Cutting Edge: Dissociation between autoimmune response and clinical disease after vaccination with dendritic cells. *J. of Immunology* **170**, 24 (2003).