

# Tat-LLO 융합 단백질에 의한 CEA 특이 항종양 면역 반응의 증가

<sup>1</sup>가톨릭대학교 의과대학 미생물학교실, <sup>2</sup>외과학교실

이순애<sup>1</sup> · 손현정<sup>1</sup> · 김창현<sup>1</sup> · 박미영<sup>1</sup> · 오승택<sup>2</sup> · 김태규<sup>1</sup>

## Enhanced CEA-specific Immune Responses by Tat-LLO Fusion Protein

Soon-Aei Yi<sup>1</sup>, HyunJung Sohn<sup>1</sup>, Chang-Hyun Kim<sup>1</sup>, Mi-Young Park<sup>1</sup>, Seong-Taek Oh<sup>2</sup> and Tai-Gyu Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Microbiology and Immunology, <sup>2</sup>Surgery, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

### ABSTRACT

**Background:** Carcinoembryonic antigen (CEA) is well-known soluble tumor marker frequently detectable in peripheral blood of carcinoma patients and considered as good target for antigen-specific immunotherapy. However, it is known that the induction of immune response to CEA is very difficult because CEA is a self-antigen expressed in fetal cells and weakly expressed in normal colorectal epithelial cells. To enhance anti-tumor immunity specific for CEA, recombinant CEA protein was modified using listeriolysin O (LLO) for endosomal lysis and transactivator of transcription (Tat) domain for transducing extracellular proteins into cytoplasm. **Methods:** After immunization using dendritic cells pulsed with Tat-CEA, both Tat-CEA and LLO, and both Tat-CEA and Tat-LLO, antibody titer to CEA and LLO, cytotoxic T lymphocyte activity and the frequency of IFN- $\gamma$  producing T lymphocytes were measured. **Results:** Immunization using DC pulsed with both Tat-CEA and Tat-LLO protein showed the increasement of production of CEA-specific antibody in serum, cytotoxic T lymphocyte activity, the frequency of IFN- $\gamma$  secreting T cells, compared with DC pulsed with both Tat-CEA and LLO. Furthermore the ratio of CD8<sup>+</sup> T cell to CD4<sup>+</sup> T cell among CEA-specific T cells was increased in group pulsed with both Tat-CEA and Tat-LLO. **Conclusion:** These results suggested that DC vaccine using Tat-LLO could be used for the development of effective immunotherapy for the treatment of tumor. (**Immune Network 2005;5(3):172-178**)

**Key Words:** Carcinoembryonic antigen (CEA), listeriolysin O (LLO), transactivator of transcription (Tat), dendritic cell (DC), cytotoxic T lymphocyte (CTL)

### 서 론

CEA (Carcinoembryonic antigen)는 180 kDa의 암태아 당 단백질로 대장 직장암, 위암, 췌장암에서 95% 이상 발현

책임저자 : 김태규, 가톨릭대학교 의과대학 미생물학교실  
☎ 137-701, 서울시 서초구 반포동 505번지  
Tel: 02-590-1216, Fax: 02-3476-7355  
E-mail: kimtg@catholic.ac.kr

본 연구는 한국산업기술평가원/2004 산업기반기술개발사업(과제 번호: 200410701)의 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

하고, 유방암에서 약 50%, 비소세포성 폐암에서 70%가 발현하며 태아 결장에서는 높게, 정상 성인 상피 결장에서는 낮은 수준으로 발견되는 것으로 보고되고 있다(1). CEA는 항암 면역반응을 위한 항원의 표적으로 제공되고 있으며, CEA를 이용한 항종양 효과 초기 연구에서 CEA를 발현하는 재조합 백신 바이러스를 이용하여 CEA에 특이적인 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 유도함으로써 CEA를 발현하는 종양세포에 대하여 방어진 면역반응을 확인하였다(2). 항종양 면역 반응에 중요한 역할을 하는 CD8<sup>+</sup> 세포독성 T 세포(CD8<sup>+</sup> cyto-

toxic T lymphocytes; CTL)를 유도하기 위해서는 MHC class I 분자에 항원이 제시되는 과정이 필수적이다. 이러한 과정은 세포 내의 단백질이 Large multifunctional proteasome (LMP)에 의해 처리되어 Transporter associated with antigen processing (TAP) 단백질에 의해 소포체(Endoplasmic reticulum; ER)로 이동하여 MHC class I 분자와 결합되고, 골지체(Golgi apparatus)를 경유하여 세포표면에 제시되는 과정으로 이루어진다(3).

외래 단백질을 직접 MHC class I 분자에 제시하기 위해 HIV (Human immunodeficiency virus)의 발현과 증식을 조절하는 단백질의 일종인 Tat 단백질의 세포질 내 전달에 작용하는 49에서 57번째 잔기(YGRKKRRQRRR)가 이용되고 있다. 세포 내로 전달된 Tat 단백질은 아직 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 세포 내에서 단백질 분해 과정을 거쳐 소포체 내에서 MHC class I 분자와 결합하여 세포 표면으로 제시되는 것으로 알려져 있으며(4,5), 이러한 특징은 MHC class I 분자에 제한된 CTL 면역반응을 유도하기 위해 이용될 수 있을 것으로 생각한다. 그러나 최근 이러한 Tat 단백질이 소낭을 탈출하지 못한다는 연구결과가 보고되고 있다. 그람양성 박테리아인 *Listeria monocytogenes*은 음식물에서 유래되는 세균으로 *hly* 유전자를 포함하며 *hly* 유전자가 형성하는 Listeriolysin O (LLO)는 산성인 환경에서 최적 활성을 나타내고(6-8), 막에 구멍을 만들어 파괴함으로써 항원 단백질을 세포질 내로 이동시켜 효과적으로 MHC class I 분자에 의한 항원 제시가 가능한 것으로 알려져 있다(9).

본 연구에서는 종양 특이 T-세포를 시험관 내에서뿐만 아니라 생체 내에서도 활성화 시켜 항종양 면역능을 효율적으로 유도하는 것으로 보고되고 있는 수지상세포에 단백질 항원의 세포 내 전달을 높이고 MHC class I 경로로의 유도를 증가시키기 위해 Tat-CEA 단백질과 Tat-LLO 단백질을 동시에 감작하여 CEA에 특이적인 면역능을 증가시키고자 하였다.

## 재료 및 방법

**Tat-CEA 융합 유전자의 크로닝.** HIV 유전자를 포함하는 pNL4-3 HIV plasmid에서 Tat 유전자를 증폭하기 위하여 다음의 primer를 이용하였다. Sense primer 5'-GCA TAGATCTGATGTGTTTCATGACAAAAGCCT-3', antisense primer 5'-CGTAGGATCCGATTGCT TTGATA GAGAAGCTTG-3'으로 증폭된 유전자 산물은 1% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였고, Gel extraction kit (Qiagen)를 이용하여 HIV-1 transactivator of transcription (Tat) 유전자를 얻었다. CEA 유전자는 primer (sense 5'-GACTTTTTTAACACAGAATTGGG-3', antisense primer 5'-CCTTGTGCCCATGGAACACAGAC-3')를 이용하여 사람 대장암 종양 세포주인 LOVO 세포주(ATCC# CCL-229)로

부터 분리된 cDNA에서 PCR법으로 증폭하였고(10), CEA (103-405 bp)의 도메인 N부분을 primer (sense 5'-GTCCT CGAGATGAAGCTCACTATTGAATCC-3', antisense 5'-G ACCTCGAGAGTTGCTTCTT CATTAC-3')를 이용하여 증폭하였다. PCR로 증폭한 Tat 유전자를 Nde I과 Xho I으로 자른 후 동일한 제한효소로 처리한 pET15b plasmid (Novagen)에 삽입한 후, 증폭된 CEA를 Xho I 처리하여 크로닝 하였다. 크로닝 된 재조합 plasmid를 pET15b-Tat-CEA라 명명하였다.

**LLO 유전자와 Tat-LLO 융합 유전자의 크로닝.** HIV 유전자를 포함하는 pNL4-3 HIV plasmid에서 위와 같은 primer를 사용하여 PCR법으로 증폭하여 HIV-1 transactivator of transcription (Tat) 유전자를 얻었다. LLO 유전자는 *Listeria monocytogenes* (KCTC #3710) 균주로부터 chromosomal DNA (Bioneer)를 얻은 후, *Hly* 유전자의 signal peptide 부분을 제외하고 PEST 부분을 primer (sense primer 5'-CGGGACTCGAGATGGATGCATCCTGCATTC AATAA-3', antisense primer 5'-TATGGATCCTTATTCG ATTGGATTATCTAC-3')를 이용하여 PCR법으로 증폭하였다(11,12). 증폭된 Tat 유전자를 Nde I과 Xho I으로 처리한 후 동일한 제한효소로 처리한 pET15b plasmid vector (Novagen)에 크로닝하여 pET15b-Tat이라 명명하였다. 재조합 pET15b-Tat을 다시 Xho I과 Bam HI으로 처리하고 LLO 유전자를 삽입하여 Tat-LLO가 삽입된 재조합 pET15b plasmid vector와 LLO 유전자만 삽입된 pET15b plasmid vector를 크로닝하여 pET15b-Tat-LLO 그리고 pET15b-LLO라 명명하였다.

**대장균을 이용한 Tat-CEA, LLO, Tat-LLO 융합 단백질의 발현 및 정제.** 크로닝된 유전자를 도입한 대장균을 LB배지에 접종하여 37°C 배양조에서 600 nm 흡광도가 0.5~0.7이 될 때까지 배양한 후(10,12), 최종 농도가 1.5 mM이 되도록 isopropyl- $\beta$ -thiogalactoside (IPTG, Biorad)을 첨가한다. 초음파 충격으로 세포를 분해하고 His-Tag와 Ni-NTA (Qiagen) 결합을 이용하여 정제한 뒤(13), Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Pierce)를 이용해 투석하여 Bradford method법으로 정량하였다(14).

**Western blotting.** 전기를 이용해 12.5% polyacrylamide SDS-gel상에서 단백질을 분리하고 coomassie blue로 염색하며 분리된 단백질을 4°C에서 1시간 동안 90 V의 전압으로 nitrocellulose 막으로 옮겨준다(Biorad). 막은 Tris-buffered saline (TBS)가 포함된 5% 탈지분유로 실온에서 2시간 반 비특이적인 반응을 막아준다. 막은 TBS가 포함된 5% 탈지분유로 항-His 항체 (IG therapy)를 1 : 1,000으로 희석하여 상온에서 2시간 반 반응시킨다. TBS (Tris-buffered saline) plus 5% tween 20 (TBS-T)로 3번 세척 후 2차 항체인 HRP-linked sheep anti-mouse IgG (Amersham biosciences)를 TBS가 포함된 5% 탈지분유에 1 : 2,000으로

희석하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨다. TBS-T로 5번 세척 후 ECL (Amersham biosciences) 용액을 이용하여 발색하였다.

**LLO와 Tat-LLO 단백질의 적혈구 용해성(hemolytic activity) 측정.** 정제된 LLO, Tat-LLO 단백질의 용혈성은 LLO, Tat-LLO 단백질을 0.1% (w/v) 우혈청단백질(Sigma)이 포함된 인산완충용액(pH 5.5)에 1 ml이 되도록 희석한 후, 0.5 ml 사람 적혈구(2.5% hematocrit)를 넣어준 후, 45분 동안 37°C 배양기에서 반응시킨다. 1,700 g에서 5분간 원심분리 후 상청액으로 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(12).

**골수성 수지상세포의 배양과 수지상세포 백신.** 6~8주령 암컷 C57BL/6 마우스(H-2b, 오리엔트, 경기도 가평, 한국)의 대퇴골과 경골에서 1 ml 주사기를 이용하여 골수 세포를 얻었다. 배양액 중에서 nylon mesh를 통해 단일 세포로 만든 후, 적혈구는 Tris-buffer 0.15 M ammonium chloride (pH 7.2)로 용해시키고 남아있는 세포는 hemocytometer에서 계산하였다. 10 ng/ml 재조합 마우스 GM-CSF (Pierce Endogen, Rockford, IL, USA)와 10 ng/ml의 재조합 마우스 IL-4 (Pierce Endogen)가 포함된 RPMI 1,640 (GibcoBRL) 배지에서 이틀 간격으로 7일간 배양하여 획득하였다. 그 후, 수지상세포의 성숙을 유도하기 위하여 7일째에 1 µg/ml 농도의 lipopolysaccharide (L-4516, Sigma)를 첨가하여 24시간 더 배양하였다. C57BL/6 마우스에서 유래된 수지상세포 1×10<sup>6</sup>개에 Tat-CEA, Tat-CEA와 LLO, Tat-CEA와 Tat-LLO 단백질을 0.1 µM 농도로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 잠작시킨 후, 48시간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후, 인산완충용액(pH 7.4)으로 2회 수세한 다음 각 그룹(5마리) 마우스의 피하층에 주사하였다. 대조군은 마우스에서 유래된 수지상세포만을 피하층에 주입하였다. 일주일 간격으로 3회 면역시키고 7일 후 마우스의 비장세포를 분리하였다.

**ELISA.** CEA 단백질 항체를 측정하기 위해 96-well EIA plates (costar 3590)에 정제된 CEA 단백질 10 µg을 4°C에서 24시간 반응시켰다. 인산완충용액/0.05% (v/v) Tween 20으로 3번 세척 후, 3% 우혈청단백질이 포함된 인산완충용액으로 상온에서 2시간 동안 비 특이적인 결합을 방지하고 1% (v/v) 우혈청단백질/0.05% (v/v) Tween 20용액에 1 : 400으로 혈청을 희석하여 상온에서 2시간 반응시키고 인산완충용액/0.05% (v/v) Tween 20으로 3번 세척 후, HRP-linked sheep anti-mouse IgG를 1% (v/v) 우혈청단백질/0.05% (v/v) Tween 20에 1 : 4,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 인산완충용액/0.05% (v/v) Tween 20으로 3번 세척 후, TMB substrate (Endogen)로 발색하여 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**CEA-특이 T 세포주의 세포 살해능 측정.** CEA를 발현하는 마우스 대장암 종양 세포주인 MC38/CEA2 (The murine colon cancer MC38/CEA2 was kindly provided by Dr. Schlom J, Division of tumor immunology and biology, National Cancer Institute, USA)는 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA)과 2 mM L-glutamine (GibcoBRL), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (GibcoBRL)이 포함된 DMEM (Gibco BRL)배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

면역시킨 마우스에서 분리한 비장세포를 4% paraformaldehyde가 포함된 인산완충용액으로 고정시킨 MC38/CEA2 세포주에 시험관 내에서 20 U/ml의 IL-2 (Interleukin-2; Genzyme)를 첨가하여 5일간 배양 후 MC38/CEA2와 MC38를 표적세포로 이용하여 CEA 특이 세포독성 T 세포 면역능을 측정하였다. 표적세포를 100 Ci <sup>51</sup>Cr/5×10<sup>5</sup> 세포로 90분간 표지한 다음 4회 수세 후 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 부유하여 V-형의 96-well 배양조에 1×10<sup>4</sup>/well 농도로 접종하고 시험관 내에서 배양된 T 세포주를 비율별로 첨가하였다. 배양조를 1,500 rpm에서 10분 원심 침전시킨 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양한 후, 100 µl의 상청액을 수거하여 γ-counter (Packard, Meriden, CT, USA)를 이용하여 방사량을 측정하고 다음의 계산식을 이용하여 세포 살해 정도를 측정하였다(23,24).

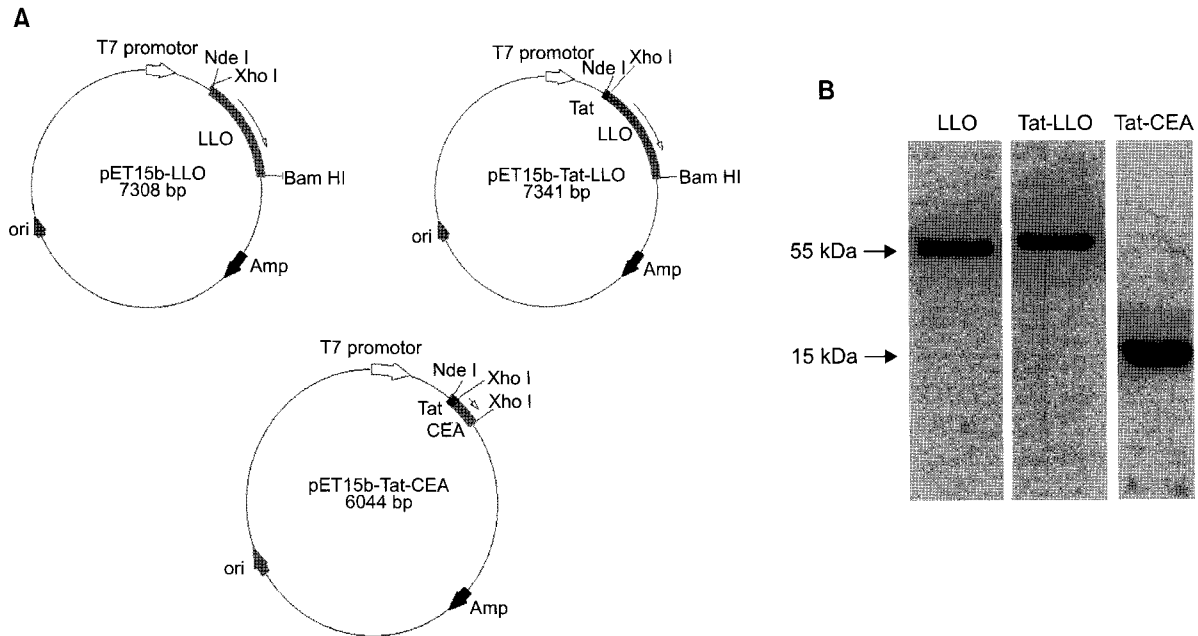
$$\% \text{ specific release (SR)} = \frac{\text{Experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{Maximal release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

Experimental release: 표적세포와 세포독성 T 세포를 함께 배양하여 얻은 값

spontaneous release: 배지만으로 배양된 표적세포에서 얻은 값

Maximal release: 1% Triton X-100을 첨가하여 배양한 표적세포에서 얻은 값

**ELISPOT와 ELISA 검사.** IFN-γ 생성 T 림프구 수를 측정하기 위한 ELISPOT은 수지상세포에 CEA-RNA (Promega RiboMAX™ Large scale RNA production system-T7) 20 µg 을 250 V 전기충격으로 삽입하여 항원 제시세포로서 사용하였고, CD4<sup>+</sup> T세포와 CD8<sup>+</sup> T세포의 반응을 구분하여 측정하기 위해 면역 주입한 마우스의 비장세포를 분리하여 적혈구를 제거하고 Mini and MidiMACs™ starting kits를 이용하여 CD4<sup>+</sup> T세포와 CD8<sup>+</sup> T세포를 분리하였다(MACs). CEA-RNA로 잠작된 수지상세포와 비장세포를 혼합하여 1×10<sup>5</sup>/well 농도로 배양조에 접종한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 반응시켰다. 인산완충용액/0.05% (v/v) Tween 20으로 3

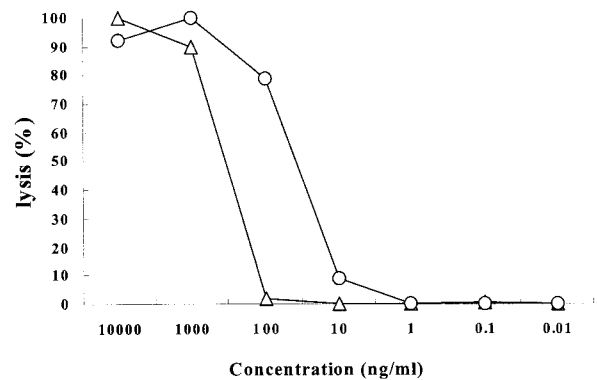


**Figure 1.** Schematic map of recombinant plasmid and expression of LLO, Tat-LLO, Tat-CEA in *E. coli*. (A) Map of recombinant plasmid for expression LLO, Tat-LLO, Tat-CEA in *E. coli*. (B) Immunoblot of purified LLO, Tat-LLO and Tat-CEA protein were detected with an anti-His antibody.

회 세척 후 2  $\mu\text{g/ml}$  biotinylate가 부착된 항 IFN- $\gamma$  항체를 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 4회 수세한 다음 avidin/alkaline phosphatase를 첨가하여 실온에서 30분 반응시킨 후 발색하여 각 well의 spot수를 ELISPOT reader (AID, Strassberg, Germany)를 이용하여 측정하였다. 배양 상청액내의 IFN- $\gamma$ 를 측정하기 위해 각 그룹의  $1 \times 10^5$ 의 비장세포를 MC38/CEA2에 5일간 자극시킨 후 그 상청액으로 ELISA (Biosource)를 시행하였다(15).

**결 과**

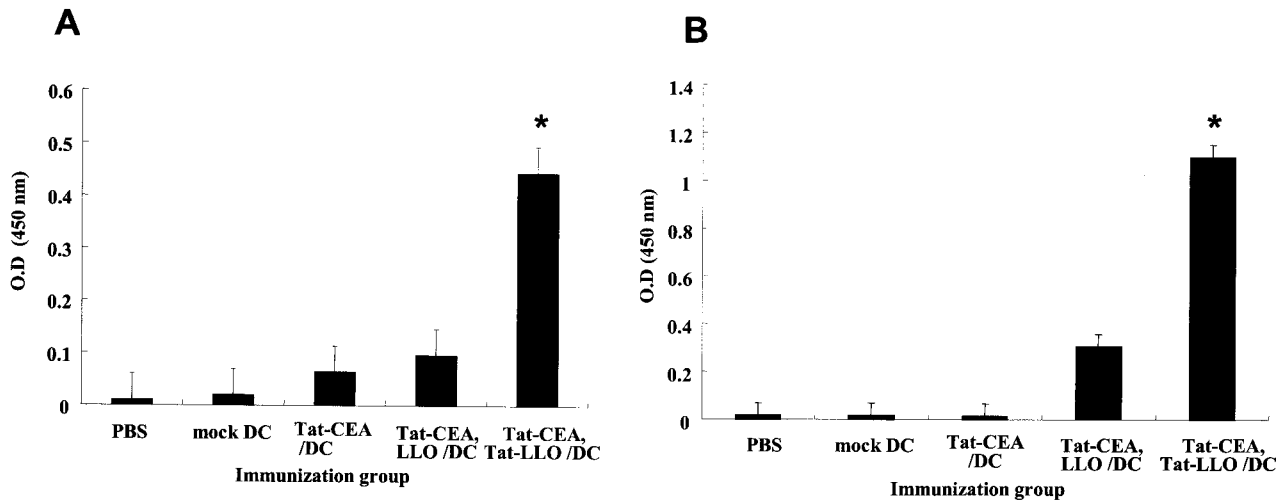
**재조합 단백질 발현 및 Tat-LLO와 LLO의 용혈능 측정.** LLO 단백질과 Tat-LLO 융합 단백질을 생산하기 위해 재조합 pET15b-LLO, pET15b-Tat-LLO 그리고 pET15b-Tat-CEA를 박테리아 균주인 BL21에 형질 도입하여 Ni-NTA column (Qiagen)으로 정제하고 항 HIS 항체를 이용하여 western blotting으로 LLO와 Tat-LLO는 각각 55 kDa와 56 kDa 그리고 Tat-CEA는 15 kDa으로 발현을 확인하였고, 1 L당 Tat-CEA 단백질은 2 mg, LLO 단백질은 2.3 mg, Tat-LLO 단백질은 1.7 mg이 생산되었다(Fig. 1). 생산된 LLO와 Tat-LLO 단백질의 용혈소 활성을 확인하기 위해 2.5% hematocrite 사람 적혈구에 농도별로 단백질을 반응시켰다. LLO는 100 ng/ml에서 Tat-LLO는 10 ng/ml에서 1 HU (HU: hemolytic units)를 보였고 이 결과 생산된 LLO 단백질의 용혈소 활성은 확인되었으며 Tat이 융합된 LLO 단백질이 Tat이 융합되지 않은 단백질보다 용혈능이 높았다(Fig. 2).



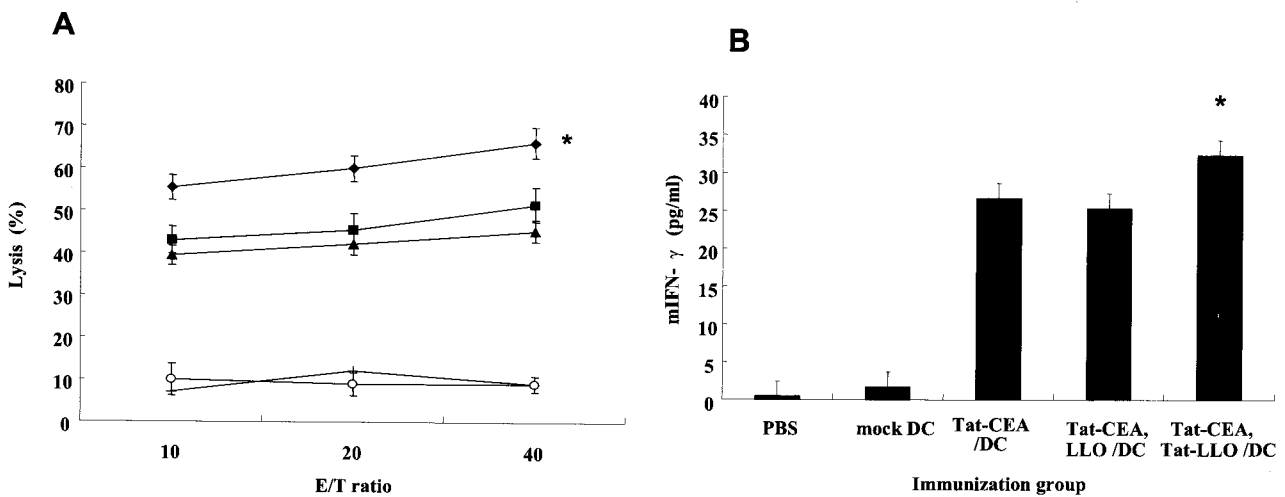
**Figure 2.** The hemolytic activity of the recombinant LLO and Tat-LLO protein. Serial ten fold dilutions of each LLO proteins were tested on human red blood cells (hRBCs) at pH 5.5. The optical absorbance of the released hemoglobin read 541 nm was related to 100% hRBCs.  $\Delta$ : LLO protein,  $\circ$ : Tat-LLO protein.

**수지상세포 백신에 의한 CEA 및 LLO 특이 항체 유도.** Tat-CEA, LLO, Tat-LLO로 감염시킨 수지상세포에 의한 면역 여부와 LLO와 Tat-LLO 융합 단백질에 의해 CEA 특이 면역반응이 어떻게 변화되었는지 확인하고자 면역시킨 마우스의 혈청으로 ELISA를 하였다. LLO와 Tat-CEA 감염 수지상세포 면역 실험군에 비해 Tat-LLO와 Tat-CEA 감염 수지상세포 면역 실험군에 대한 흡광도가 증가되었다( $p < 0.05$ )(Fig. 3).

**CEA 특이 세포성 면역능 측정.** 면역시킨 마우스에서 분리한 비장세포를 실험군 별로 MC38/CEA2 세포주에



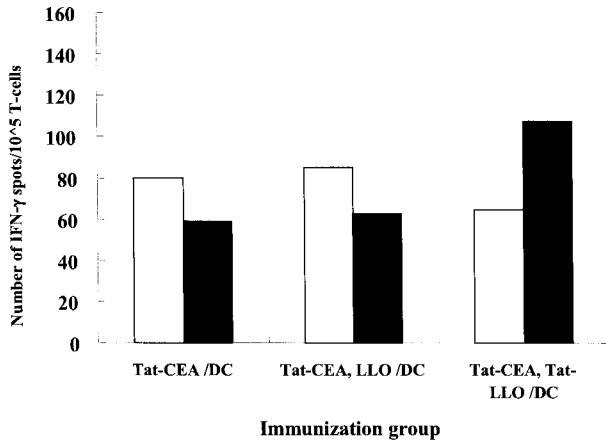
**Figure 3.** Detection of antibodies specific for CEA and LLO by ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Mice were immunized with  $1 \times 10^6$  DCs pulsed with Tat-CEA, both Tat-CEA and LLO, and both Tat-CEA and Tat-LLO. Mice immunized with PBS and mock DC used as controls. Two weeks after the final immunization mice were bled and serum was tested. Data shown as mean O.D (+SD) of immunization group (n=5 per group). (A) Tat-CEA specific antibody. (B) LLO specific antibody. \*Statistically significant at  $p < 0.05$  using a paired student's t-test compared with all other groups.



**Figure 4.** Detection of CEA specific cellular immunity. Mice were immunized with  $1 \times 10^6$  DCs pulsed with Tat-CEA, both Tat-CEA and LLO, and both Tat-CEA and Tat-LLO. Mice immunized with PBS and mock DC used as controls. (A) CEA-specific cytolytic activity was measured by  $^{51}\text{Cr}$  release assay.  $^{51}\text{Cr}$ -labeled target cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  with effector cells at different ratio. (B) Fixed MC38/CEA2 were co-cultured with mouse spleen cells for 5 days. Culture supernatant were collected and assayed for IFN- $\gamma$  by ELISA. Data shown as mean O.D ( $\pm$ SD) of immunization group (n=5 per group). +: PBS, O: mock DC; ■: Tat-CEA/DC, ▲: Tat-CEA and LLO/DC, ◆: Tat-CEA and Tat-LLO/DC. \*Statistically significant at  $p < 0.05$  using a paired student's t-test compared with all other groups.

시험관내에서 자극하여 5일간 배양 후, MC38/CEA2와 MC38을 표적세포로 이용하여 CEA 특이 세포독성 T세포 면역능을 측정하였다. MC38/CEA2를 표적세포로 이용한 실험군에서는 음성대조군인 DC와 인산완충용액에서 세포독성이 보이지 않았으나, LLO와 Tat-CEA 감작 수지상세포를 면역 주입시켰을 때의 세포독성은 42% (E : T=40 : 1)이고, Tat-LLO와 Tat-CEA 감작 수지상세포

를 면역 주입시켰을 때의 세포독성은 65% (E : T=40 : 1)로 Tat-LLO와 Tat-CEA 감작 수지상세포를 면역 주입시켰을 때의 CEA 특이 세포 독성 T 세포 면역능이 증가되었다(Fig. 4A). 또한 시험관 내에서 5일간 자극한 상청액의 농도를 측정한 결과 LLO와 Tat-CEA 감작 수지상세포 면역 실험군보다 Tat-LLO와 Tat-CEA 감작 수지상세포 면역 실험군에서의 IFN- $\gamma$  생성이 증가됨을 확인하였



**Figure 5.** Frequencies of IFN- $\gamma$  secreting CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells specific for CEA. The spleen cells of mice immunized with DCs pulsed with Tat-CEA, both Tat-CEA and LLO, and both Tat-CEA and Tat-LLO. DCs pulsed with CEA-RNA was used as target cells. These spots were counted as described in the material and method. □: CD4<sup>+</sup> T cell with CEA-RNA/DC, ■: CD8<sup>+</sup> T cell with CEA-RNA/DC.

다( $p < 0.05$ )(Fig. 4B).

**CEA 특이 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포 면역능 비교.** Tat-CEA와 Tat-LLO 융합 단백질로 감각시킨 수지상세포에 의한 세포성 면역 반응의 유도가 CD8<sup>+</sup> T 세포로의 면역 반응인지 확인하기 위해 면역시킨 마우스에서 분리한 비장세포를 CEA-RNA로 감각시킨 수지상세포로 시험관 내에서 자극하여 IFN- $\gamma$  발현 림프구의 빈도를 측정하였다. Tat-CEA 감각 수지상세포 면역 실험군과 LLO와 Tat-CEA 감각 수지상세포 면역 실험군에서는 모두 CEA 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포수가 CD8<sup>+</sup> T 세포수보다 높았으나 Tat-LLO와 Tat-CEA 감각 수지상세포 면역 실험군에서는 CEA 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포수보다 CD8<sup>+</sup> T 세포수가 높음을 확인하였다(Fig. 5).

## 고 찰

CEA는 다양한 종양에서 발현되는 자가 항원의 일원이며 면역치료 분야에서 강력한 표지 인자로 정의되고 있다(16). 기존의 CEA에 대한 종양 면역 치료에서는 유전자 백신이나 바이러스 벡터에 관한 연구가 활발히 행해졌으나, CEA 단백질 백신에 관한 연구는 활발하지 않았다. 유전자 백신에 비해서 단백질 백신은 이미 일반적으로 많이 이용되고 안전성 면에서 장점이 되므로 본 연구에서는 다양한 종양에서 발현되는 CEA 단백질과 소낭에 구멍을 형성하여 항원을 방출시키는 Listeriolysin O 단백질 독소(6) 각각에 단백질을 세포 내로 전달시키는 특징을 가진 Transactivator of transcription (Tat) 단백질을 결합시켜 함께 항원으로 사용하여 고효율의 세포독성 T 림프구를 유도하고자 하였다.

대장균에서의 단백질 발현은 종양 항원 유전자의 크기가 크거나 소수성 아미노산 부분이 다수 존재하면 단백질 발현율이 현저히 떨어지므로 CEA 단백질을 도메인 N, 1, 2, 3으로 나누었고 그 중 소수성 부분이 적은 N 도메인을 단백질로 발현하여 정제하였으며 기존의 다른 연구에서는 도메인 N과 A3를 융합하여 대장균이 아닌 *Pichia Pastoris*에서 단백질로 생산하였다(17,18). Tat 단백질은 HIV의 조절 단백질의 일종으로 세포외 환경에서 HIV에 감염된 세포에 전이되어 종양 유전자의 발현을 활성화시킴으로써 잠복기의 HIV를 활성화시키며(19), 이중 단백질과 융합하여 수지상세포에 접종한 뒤, 실험쥐에 주입하여 생체 내에서 CTL의 유도를 확인하였고, 종양항원과 같이 면역 유도능이 낮은 항원에 대한 CTL 유도 연구에 응용되어 왔으며(20), Tat 단백질의 전이 특성은 Tat 단백질의 37~72 부위의 아미노기를 효소에 접합시켜 배지에 공급해 준 후 배양된 세포 내 효소의 활성도를 측정하여 확인하였다(21). Nakamura 등은 항원에 Tat 단백질을 화학적으로 결합시키거나 Tat 융합 단백질을 *E. coli*와 같은 대장균에서 정제한 후 동물에 주입하여 Tat의 체내화(incorporation) 기능을 보임으로써 Tat 단백질의 면역 유도 기능을 보고하였다(22). 본 실험에서는 Tat의 체내화 기능을 확인하기 위해 LLO 단백질과 융합시켜 포유동물의 적혈구에서 용혈능을 측정하였다. Fig. 2의 결과에 의하면, Tat-LLO 단백질이 LLO 단백질의 용혈능보다 약 10배 정도 높았다. 그러므로 포유동물 세포나 종양세포에서뿐만 아니라, 적혈구에서도 Tat의 체내화 기능이 유지됨을 확인하였다. 최근 LLO 단백질의 막을 파괴시키는 기능이 C말단 아미노산 부분에 집중되어 있는 것으로 밝혀졌다(25).

종양 백신에 사용되는 수지상세포는 Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)와 Interleukin (IL-4)을 이용하여 말초 혈액 단핵구로부터 유도할 수 있고 항원제시 기능이 강력하며(26), 종양 항원을 T-세포에 제시함과 동시에 쉽게 T-세포를 활성화시킬 수 있다. 따라서 종양 특이 T-세포를 시험관 내에서뿐만 아니라, 생체 내에서도 활성화시켜 종양의 확산을 막을 수 있으므로 본 연구에서는 CEA에 대한 CTL을 유도하기 위해 대장균에서 정제한 단백질을 수지상세포에 감각시켰다. 일반적으로 수지상세포에 단백질을 감각시키면 세포성 면역반응보다는 항원처리가 MHC class II 경로를 통해 CD4<sup>+</sup> T 세포를 주로 활성화시킴으로써 체액성 면역 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 종양치료에 효과적인 CD8<sup>+</sup> T 세포로의 유도를 위해 종양 항원단 단백질을 수지상세포에 감각할 때 소낭에서 항원을 방출(endosomal escaping)하도록 Tat-CEA와 Tat-LLO 단백질을 동시에 감각시켜 쥐에 주입하였다. Tat-CEA와 Tat-LLO 단백질을 수지상세포에 동시 감각한 경우 CEA와

LLO에 대한 각각의 항체생성의 증가를 Fig. 3 결과에서 확인하였고, Tat-CEA와 LLO 단백질을 주입하였을 때 보다 Tat-CEA와 Tat-LLO 단백질을 주입하였을 때 CEA 특이 세포 살해능의 활성도 역시 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 항원 단백질은 세포 내에서 단백질 분해 과정을 거쳐 소포체 내에서 MHC class I 분자와 결합하고 MHC class I 분자에 제한된 T세포 반응은 LLO 단백질만을 사용한 것보다 Tat-LLO 단백질을 사용했을 때 CD4<sup>+</sup> T 세포보다는 CD8<sup>+</sup> T 세포의 비율을 증가시켰다(Fig. 5).

본 연구의 결과는 Tat-CEA 융합단백질과 Tat-LLO 융합단백질을 동시에 수지상세포에 감작시킨 종양백신이 종양항원 특이 세포성 면역능을 증가시킨다는 것을 확인한 것으로, 앞으로 면역능을 증가시키는 LLO 단백질의 특정 부위를 규명하고 동물모델에서의 예방 및 항종양 치료효과를 증명하여야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W: Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab* 5;344-366, 1991
- Kass E, Schlom J, Thompson J, Guadagni F, Graziano P, Greiner JW: Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. *Cancer Res* 1;59:676-683, 1999
- Germain RN: The biochemistry and biology of antigen presentation by MHC class I and class II molecules: implications for development of combination vaccines. *Ann N Y Acad Sci* 754;114-125, 1995
- Rubartelli A, Poggi A, Sitia R, Zocchi MR: HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol Today* 19;543-545, 1998
- Wang W, El-Deiry WS: Targeting p53 by PTD-mediated transduction. *Trends Biotechnol* 22;431-434, 2004
- Lety MA, Frehel C, Dubail I, Beretti JL, Kayal S, Berche P, Charbit A: Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 39;1124-1139, 2001
- Giammarini C, Andreoni F, Amagliani G, Casiere A, Barocci S, Magnani M: Purification and characterization of a recombinant listeriolysin O expressed in *Escherichia coli* and possible diagnostic applications. *J Biotechnol* 109;13-20, 2004
- Beauregard KE, Lee KD, Collier RJ, Swanson JA: pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* 186;1159-1163, 1997
- Portnoy DA, Jones S: The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection (escape from a vacuole). *Ann N Y Acad Sci* 730; 15-25, 1994
- Cho HI, Kim HJ, Oh ST, Kim TG: *In vitro* induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with recombinant adenoviruses. *Vaccine* 22;224-236, 2003
- Sewell DA, Shahabi V, Gunn GR 3rd, Pan ZK, Dominiecki ME, Paterson Y: Recombinant *Listeria* vaccines containing PEST sequences are potent immune adjuvants for the tumor-associated antigen human papillomavirus-16 E7. *Cancer Res* 64;8821-8825, 2004
- Giammarini C, Andreoni F, Amagliani G, Casiere A, Barocci S, Magnani M: High-level expression of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O in *Escherichia coli* and preliminary characterization of the purified protein. *Protein Expr Purif* 28; 78-85, 2003
- Mandal M, Lee KD: Listeriolysin O-liposome-mediated cytosolic delivery of macromolecule antigen in vivo: enhancement of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte frequency activity, and tumor protection. *Biochim Biophys Acta* 1563;7-17, 2002
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72;248-254, 1976
- Lima J, Jenkins C, Guerrero A, Triozzi PL, Shaw DR, Strong TV: A DNA vaccine encoding genetic fusions of carcinoembryonic antigen (CEA) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Vaccine* 23;1273-1283, 2005
- Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A: Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12;337-365, 1994
- You YH, Hefta LJ, Yazaki PJ, Wu AM, Shively JE: Expression, purification, and characterization of a two domain carcinoembryonic antigen minigene (N-A3) in *Pichia pastoris*. The essential role of the N-domain. *Anticancer Res* 18;3193-3201, 1998
- Hellwig S, Robin F, Drossard J, Raven NP, Vaquero-Martín C, Shively JE, Fischer R: Production of carcinoembryonic antigen (CEA) N-A3 domain in *Pichia pastoris* by fermentation. *Biotechnol Appl Biochem (Pt 3)* 267-275, 1999
- Frankel AD, Pabo CO: Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55;1189-1193, 1988
- Kim DT, Mitchell DJ, Brockstedt DG, Fong L, Nolan GP, Fathman CG, Engleman EG, Rothbard JB: Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to HIV tat peptide. *J Immunol* 159;1666-1668, 1997
- Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J: Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91;664-668, 1994
- Nakamura T, Tanaka T, Takagi H, Sato M: Cloning and heterologous in vivo expression of Tat binding protein-1 (TBP-1) in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 399;93-100, 1998
- 안창혁, 강원경, 오승택, 조현일, 김태규: CEA와 Tat 융합 단백질을 이용한 CEA 특이 항종양 면역능의 유도 증가. *J Korean Soc Coloproctol* 19;121-128, 2003
- 원은하, 김창현, 박미영, 조현일, 오승택, 홍용길, 김태규: CEA 발현 수지상세포를 이용한 CEA 특이 살해 T세포의 유도. *Immune Network* 3;295-301, 2003
- Ye L, Bu Z, Skeen MJ, Ziegler HK, Compans RW, Yang C: Enhanced immunogenicity of SIV Gag DNA vaccines encoding chimeric proteins containing a C-terminal segment of Listeriolysin O. *Virus Res* 97;7-16, 2003
- Timmerman JM, Levy R: Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 50;507-529, 1999