

종양 세포 용해액에 따른 수지상세포 유도 항원 특이 면역반응 차이의 기전 연구

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 암센터

이강은 · 손혜진 · 김명주 · 백소영 · 이현아

Mechanism of Differential Ag-specific Immune Induction by Different Tumor Cell Lysate Pulsed DC

Kang Eun Lee, Hye-jin Shon, Myung Joo Kim, Soyoun Baek and Hyunah Lee

The Cancer Center, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Tumor cell lysate has been considered as a preferential antigen source for the therapeutic dendritic cell pulsing. Our experiences with in vivo study with animal tumor model indicate the tumor cell lysate dependent differential effect of DC therapy. Our previous data show that MC38 lysate pulsed-DC induced stronger ag-specific immunity than CT26 lysate pulsed-DC in vitro. In this study we tried to reveal the mechanism for differential induction of ag-specific immunity of different colon cancer cell lysate pulsed-DCs. **Methods:** MC38 and CT26 cell lines were prepared as lysate by freezing-thawing procedure. Tumor cell antigenicity was confirmed by detecting the surface expression of MHC I/II & B7.1/2 molecules. IL-10, IL-12 and TGF-beta in the tumor cell lysate were detected by ELISA and the presence of heat shock proteins were analysed by western blotting. **Results:** The secretion of IL-10, a immune-inhibitory cytokine was about 470% higher in CT26 lysate than in MC38. Hsp 70 was detected only in the MC38 lysate but not in the CT26. On the other hand, Hsp 60 and 90 expression were not different in two colon cancer cell lysates. **Conclusion:** In two different colon cancer cell lysate, immune inhibitory IL-10 (higher in CT26) and Hsp70 (MC38 superiority) were differentially expressed. These data indicate that higher ag-specific immunity induction by MC38 lysate pulsed-DC may due to the expression of hsp70 and lower secretion of IL-10, a immune-inhibitory cytokine than CT26 lysate. The significance of other cytokine and the surface marker expression will be discussed. (*Immune Network* 2006;6(3):145-153)

Key Words: dendritic cells, pulsing antigen, tumor cell lysate, heat shock proteins

서 론

최근 새로운 개념의 면역학적 항암 치료 방법들의 개발은 근본 치료가 되지 않는 난치성 암의 치료법으로, 환자의 면역체계를 활성화하여 종양세포를 제거하거나 성장을 상당 기간 동안 억제하는 방법들로써 치료 효과 개선과 함께 부작용이 많이 감소하였다는 것이 큰 장점이다(1-3). 특히 항원 특이 면역 기능 향진에 가장 강력하

고 필수적인 항원 소개세포로 잘 알려진 수지상세포를 이용한 항암면역(세포)치료법이 많은 관심을 얻고 있다. 수지상세포는 골수조혈세포로부터 유래하는 가장 강력한 항원제시세포(APC)로(2,3), 항원 특이 면역 반응을 유발하고 지속시키는 능력을 가지고 있다(4-12). 즉 이 세포는 MHC 분자는 물론이고 B7.1 및 B7.2 등의 보조자극인자(co-stimulatory molecules)와 adhesion molecule들을 풍부하게 발현하므로 휴지기 또는 미감작 T 세포를 강력하게 자극하여 항원 특이 T 세포 반응을 유발시킨다. 종양에 대한 면역반응에서 결정적인 역할을 수행하는 항원특이 세포독성 T 림프구(CTL)반응을 유도하기 위해서는, 첫째 수지상세포와 같은 강력한 APC를 통해 항원

책임저자 : 이현아, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 암센터
☎135-710, 서울시 강남구 일원동 50번지
Tel: 02-3410-3455, Fax: 02-3410-6808
E-mail: hlee@smc.samsung.co.kr

펩타이드를 인식해야 하고, 둘째로 CD4 + T세포의 도움을 받아야 한다. 수지상세포는 외인성 단백질 항원들로부터 유래된 펩타이드를 MHC class I 분자와 함께 교차제시(cross-presentation)하여 CTL (Cytotoxic T Lymphocyte)을 교차자극(cross-priming)할 수 있다. 따라서 수지상세포를 항암면역 치료에 이용할 수 있는 것은 외인성 항원을 CTL에 교차 자극시킬 수 있는 능력과 강력한 면역반응을 유발하는 능력 때문이라고 할 수 있다(13-17). 수지상세포가 항원 특이적인 면역기능을 유도하여 항암작용을 나타나게 하기 위해서는 앞서 말한 바와 같이 직접 펩타이드를 표출시키거나 단백질, DNA 및 RNA를 종양 항원 펩타이드 공급원으로 이용할 수 있다. 그 중에 펩타이드를 사용하는 것은 펩타이드 항원을 발현하는 모든 종양에 적용할 수 있으며, 자가면역에 대한 걱정을 하지 않아도 된다는 장점이 있다. 그러나 실제 임상연구에서는 선호도가 떨어지는데 이는 펩타이드 MHC complex의 짧은 수명과 CD4 + T 세포의 도움을 유도하지 못한다는 단점 때문이다(18-20). 종양 세포 용해액(tumor cell lysate)은 항원 펩타이드가 확실하게 알려지지 않은 종양에서 모든 관련 항원을 포함하고, natural adjuvant로 알려진 heat shock protein (Hsp)의 도움까지 얻어 좋은 항원 소재로 여겨지나, 정제되지 않은 자가 항원으로 인한 자가면역 발생의 위험을 내포하고 있다(21-26).

본 연구팀에서 보고한 *in vivo* mouse tumor model에서의 수지상세포의 항암 효과는(27,28) 종양에 따라 치료의 결과가 다르다는 것을 보여준다. 이 같은 치료결과 차이의 가장 큰 원인은 종양 종류의 면역원성 혹은 항원성의 차이 때문일 가능성이 가장 클 것으로 생각된다. 그러나 또 다른 *in vitro* 실험 결과에서 같은 대장암 세포주입에도 불구하고 CT26과 MC38 cell의 lysate로 pulsing된 수지상세포의 항원 특이 면역 반응 유도능이 서로 다른 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 같은 대장암 세포주입에도 불구하고, 수지상세포를 통한 T cell immunity 유도에 다른 형태로 작용하는 이유를 tumor cell lysate의 특성을 조사하여 찾아보고자 하였다.

MC38 및 CT26 tumor cell lysate에서 각기 다른 cytokine의 분비를 ELISA를 통하여 측정해 보았으며, natural adjuvant로 알려진 Hsp의 발현을 western blotting을 이용하여 조사해 보았다. 이 같은 결과가 이들 lysate로 pulsing된 수지상세포가 일으키는 *in vitro* T cell 면역 반응에 어떠한 연관성을 갖는지 고찰하였다.

재료 및 방법

실험 동물. 암컷 순계인 Balb/c 및 C57 BL/6 mice (5~6 주령)를 Orient Bio (성남, 경기, 대한민국)에서 구입하였다. 마우스는 특정 병원균이 없는(specific pathogen-free, SPF)동물로 삼성생명과학연구소 실험동물 연구실에서

ILAR (Institute of Laboratory Animal Resources) guideline에 따라 사육되었다. 실험 기간 중 사료와 물은 자유롭게 섭취시켰고, 12시간 명, 암 조건을 유지하였다. 모든 동물은 실험을 시작하기 전 일주일 동안 적응 기간을 거쳤다. **시약.** RPMI-1640 medium 및 FBS (fetal bovine serum)은 Gibco laboratories (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Flow cytometric assay를 위하여 BD-PharMingen (San Diego, CA, USA)에서 다음과 같은 형광이 label된 항체들을 구입하였다. Fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) labeled monoclonal Abs for MHC class I (H-2K^d, H-2K^b), MHC class II (I-A^d, I-A^b), CD11c, CD80, CD86. Lympholyte-M은 CEDARLANE (Ontario, Canada)에서 구입하였다.

세포주. Balb/c syngenic colon cancer cell line인 CT26은 미국 세포주 은행(ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였으며, C57BL/6 syngenic colon cancer cell line인 MC38은 삼성서울병원 이식외과 김성주 선생님에게서 제공받았다.

세포는 RPMI-1640 medium (10% heat inactivated FBS, 2 mM glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 첨가한 complete medium)으로 계대 유지되었다. 마우스 골수 세포에서 myeloid계 세포를 분리시키기 위하여 사용한 항체는 hybridoma cell line에서 얻었다 (GK1.5 for anti-L3T4, RA3 for anti-B220, J11d for anti-B cell/neutrophils, 53.672 for anti-Lyt2). 53.672는 연세대학교 이민걸 선생님 팀에서 제공 받았으며, 나머지 cell line은 미국 세포주 은행(ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였다.

마우스 골수 세포의 분리. 경추 탈골 후 얻은 경골과 대퇴골을 주사기에 담긴 RPMI-1640으로 씻어 골수를 분리한 후 배양액 중에서 cell strainer (BD, Bedford, MA, USA)를 통하여 단일 세포로 만들었다. 적혈구는 Tris-buffered 0.15 M ammonium chloride solution (pH 7.2)으로 씻어 용해시키고 남아있는 유핵 세포는 hematocytometer에서 계수하였다. Trypan blue exclusion 방법으로 세포 생존율을 확인하여 90% 이상인 경우에만 실험에 사용하였다.

골수성 수지상세포(myeloid-DC)의 ex vivo 배양. 마우스의 골수 단세포로부터 시작하는 골수성 수지상세포를 만들기 위하여 분리된 골수 단세포를 CD4, CD8, B 세포 및 neutrophil의 항체와 보체로 panning하여 골수성 세포(myeloid lineage cell)만 분리하고 1×10⁶/ml의 세포에 GM-CSF와 IL-4 (1×10³ units/ml)를 넣고 6일간 배양하였다. 배양 6일째 tumor cell lysate 50 µg/ml을 넣고 18시간 더 배양하였다. 이러한 방법으로 생성된 세포를 flow cytometric phenotyping으로 확인하였다. Tumor cell lysate는 CT26 (Balb/c syngenic colon cancer) 및 MC38 (C57BL/6 syngenic colon cancer) cell을 liquid nitrogen (-180°C)과

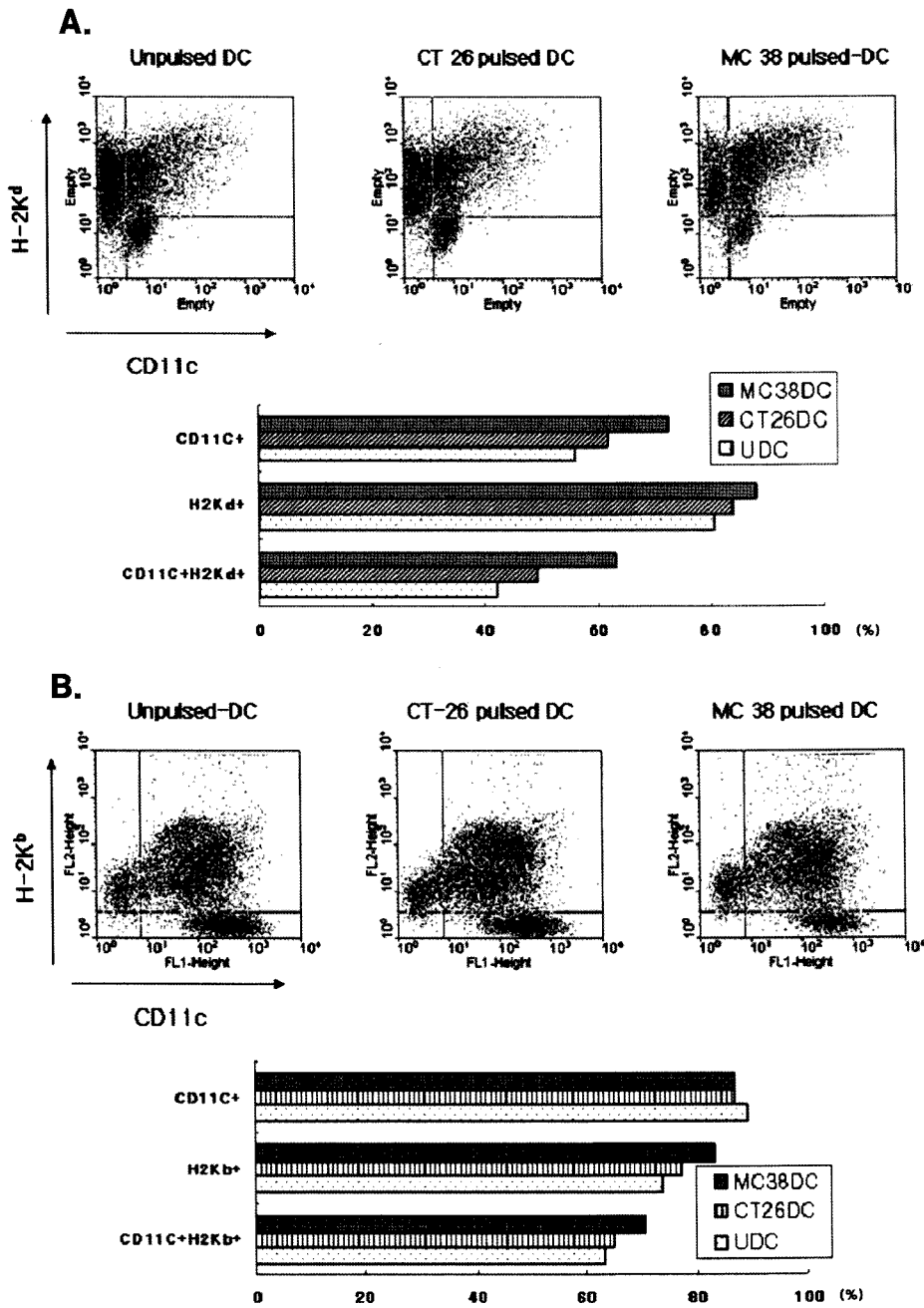


Figure 1. Flow cytometric phenotyping of tumor cell lysate-pulsed myeloid-DCs. DCs were cultured from the bone marrow of mice with GM-CSF and IL-4 for 6 days and pulsed with tumor cell lysate (from CT26 or MC38 colon cancer cell line). Cells were stained with fluorescent labeled surface marker antibodies and analyzed with FACS Vantage. (A) Balb/c mice. (B) C57BL/6 mice.

water bath (37°C)에서 6회의 freezing-thawing 과정을 거친 후 1,800 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻어진 상등액의 단백질을 함유를 Bradford법으로 확인하여 정량하였다. 수지상세포에 의한 *in vitro* T cell activation; cytokine (IFN- γ) 분비 측정. 각각의 종의 마우스로부터 분리·배양한 수지상세포를 각기 다른 tumor cell lysate로 pulsing하여, magnetic bead로 분리한 Thy1.2+ T cell과 함께 96시간 배양한 supernatant에서 항암 면역 반응의 effector인 IFN- γ 를 ELISA kit (R&D, Minneapolis, MN,

USA)로 측정하였다.

Tumor cell line 표현형 확인. Tumor cell line 자체의 항원성의 차이가 영향 인자인지 확인하고자, 표면 표현형의 차이를 관찰하기 위하여 각각의 tumor cell line을 형광 물질로 표식된 항체들 (MHC I/II, CD80/86)을 함유한 PBS에 부유시킨 후 4°C에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 세척하고 300 μ l의 PBS에 풀어 2시간 이내에 flow cytometer (FACS Vantage, Becton-Dickson, Mountain View, CA, USA)로 분석하였다.

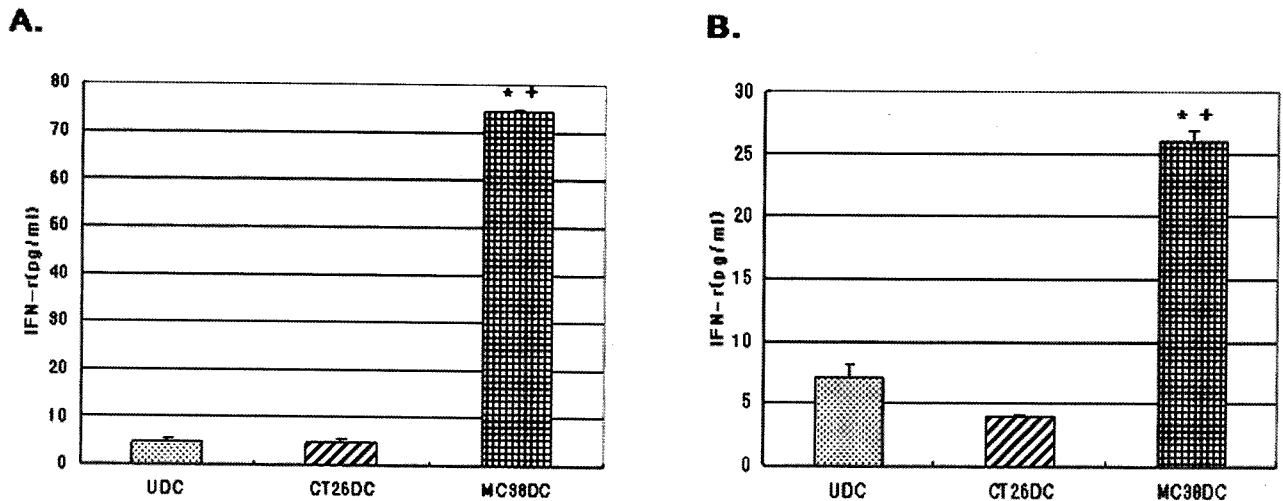


Figure 2. IFN- γ secretion from the T cell stimulated by DCs pulsed with tumor cell lysate. Thy1.2+ T cells from the spleen of each strain of mice (A. C57BL/6, B. Balb/c) were stimulated with CT26 or MC38 cell lysate-pulsed DCs for 96hrs to observe the IFN- γ secretion into the culture supernatant which is quantitated by ELISA. Asterisks (*) indicate the statistical significance of IFN- γ secretion in MC38 pulsed-DC stimulated T cells compared to unpulsed-DC stimulation. Plus signs (+) indicate the statistical significance of MC38-DC compared to CT26 lysate pulsed DC stimulation of IFN- γ secretion.

Tumor cell lysate의 특성 조사.

1) **Cytokine 함유.** 수지상세포 pulsing을 통해 세포에 직접 자극을 주는 tumor cell lysate 내의 요소를 알아보고자 tumor cell lysate 내의 각기 다른 cytokine을 ELISA kit를 이용하여 사용자 manual에 따라 실험하였다(IL-10, IL-12; ebioscience, SanDiego, CA, USA, TGF- β ; R&D, Minneapolis, MN, USA). Freezing-thawing 방법을 반복하여 만든 tumor cell lysate를 정량하여, 각각의 농도(10, 50 μ g) 조건에서 cytokine 함유량을 측정하였다.

2) **Tumor cell lysate의 세포독성.** Tumor cell lysate의 세포독성을 알아보기 위하여, 정상 마우스 비장 단핵구에 tumor cell lysate를 각각의 농도(10, 20, 50 μ g)의 조건으로 처리하여 시간별(24, 48, 72시간)로 배양하였다. 배양이 종료되면 HBSS (Cellgro, Herndon, VA, USA)로 1회 세척하고 flow cytometer로 측정하기 바로 전 propidium iodide (Sigma, St.Louis, MO, USA)를 넣고 tapping해 준 후 측정하여 사멸 세포의 양을 확인하였다.

3) **Tumor cell lysate 내의 Hsp 발현; western blotting.** 종양세포를 lysis buffer에서 micropipette으로 pipetting하여 세포막을 파괴한 뒤 14,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 이를 Bradford assay로 정량한 뒤 12% SDS-PAGE에서 lane당 50 μ g씩 전개시키고 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 이 membrane을 5% skim milk/TBS에 넣고 실온에서 1시간 blocking 한 후 1차 항체(HSP 60, 70, 90, stressgen, AnnArbor, Michigan, USA)와 4°C에서 18 hr (overnight) 반응시켰다. 그 후 이를 0.1% Tween 20을 함유한 TBS로 세척한 뒤 2차 항체에 1시간 반응시키고, 앞서와 마찬가지로 세척

한 뒤 supersignal westpico chemiluminescent substrate (PIERCE, Rockford, IL, USA)를 사용하여 발색한 뒤 Medical X-Ray film General purpose green (Kodak, Rochester, New York, USA)에 노출시켰다. Band가 나타난 X-ray film을 GS-800 calibrated densitometer (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에 넣어 스캔하고 Quantity-one 프로그램을 이용하여 각각의 밴드를 지정해 주고, 지정해준 밴드를 calibration하였다. Calibration한 β -actin의 수치로 각각의 밴드의 수치를 나눈 값을 그래프로 표시하였다.

통계처리. 같은 실험을 3~5회 반복하였고, 동일한 경향을 보이는 결과들 중 대표적인 data를 보고하였다. 통계적 유의성 검색은 student T-test로 하였고 p value 0.05 이하를 유의적 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결 과

수지상세포의 특성 확인. 두가지 대장암 세포주의 기원이 다르기 때문에, allo-reactivity로 인한 현상이 아님을 확인하기 위해 수지상세포를 Balb/c (H-2K^d/CT26 syngenic) 및 C57BL/6 (H-2K^b/MC38 syngenic) 마우스로부터 모두 배양하여 각각의 경우를 모두 실험하였다. 두 종의 마우스의 골수성 세포로부터 분리, 배양한 수지상세포의 표현형 발현을 보고자 flow cytometer로 측정하여 확인하였다. 항원 소개 기전을 담당하는 MHC class I/II, CD80/86이 고농도로 발현되고, 수지상세포의 marker로 알려진 CD11c도 잘 발현되는 골수성 수지상세포로서, 항원 특이 세포 면역 기능 증가에 관여할 수 있음을 확인하였다. 기대하였던 대로 base line 면역기능이 낮은 Balb/c 유래(29) 수지상세포가 C57BL/6 유래 수지상세포

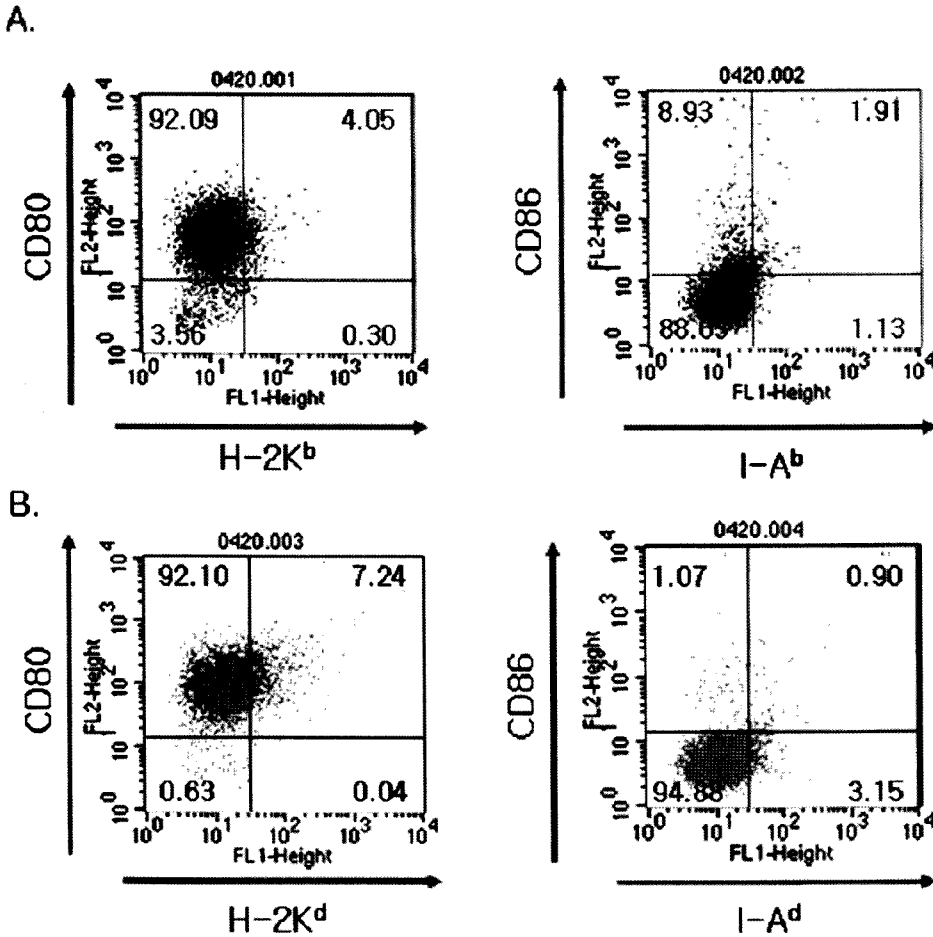


Figure 3. Expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86) and MHC I/II molecules in each tumor cell line was analyzed by flow cytometry (A. C57BL/6, B. Balb/c).

보다 더 미성숙한 상태로 배양되었고 tumor cell lysate pulsing에 민감하게 반응하여 성숙 표현형을 발현하였다 (Fig. 1).

In vitro T cell immunity induction. 각각의 종의 마우스로부터 분리·배양한 수지상세포를 CT26 또는 MC38 lysate로 pulsing하여 in vitro상에서 비장 림프구를 활성화시켜 cytokine을 분비하는 정도를 관찰하였다. 항암 면역 반응의 effector로 알려진 IFN- γ 의 분비는 두 종의 마우스에서 모두 MC38 lysate로 pulsing한 수지상세포의 자극에 의해서만 유도되었다. MC38 tumor cell에 대해 allogenic인 Balb/c mouse에서 뿐 아니라 syngeneic C57BL/6 mouse에서도 MC38 pulsed 수지상세포로만 IFN- γ 의 분비가 유도된 것은, MC38 tumor lysate 자체의 특성 때문임을 짐작케 한다(Fig. 2).

Tumor cell line 표현형의 확인. Tumor cell line 자체의 항원성 차이에 의한 영향 여부를 확인하기 위해 표현형의 차이를 flow cytometer로 측정하였다. 항원 소계를 담당하는 MHC class I/II와 보조자극인자인 CD80/86을 각각의 cell line에서 확인하였다. MC38 cell line에서 MHC class II의 발현량이 CT26 cell line에 비하여 10배정도 많

이 발현이 되어 있음을 확인하였으나(MC38 7.43%, CT26 0.78%: MHC II surface marker expression) 절대치가 미미하여 면역학적 유의성에 관해서는 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 이 밖에 MHC class I과 CD80/86의 expression은 두 cell line 간에 별다른 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

Tumor cell lysate에서의 cytokine. 수지상세포에 pulsing하는 tumor cell lysate 내에서 수지상세포에 영향을 미치는 인자의 여부를 확인해 보고자 freezing-thawing 과정을 거쳐 만든 CT26, MC38 두 cell line의 tumor cell lysate의 IL-10, IL-12, TGF- β 함유 농도를 ELISA를 통하여 측정해 보았다. CT26 cell lysate 안에 IL-10이 MC38 cell lysate에서보다 많은 양이 존재하는 것이 관찰되었다. 이와는 다르게 IL-12는 MC38 cell lysate에 더 많은 양이 존재하는 것이 관찰되었다. TGF- β 의 경우 각 조건의 cell lysate에서 변화는 있었으나, CT26과 MC38 두 cell line 사이의 차이점은 관찰되지 않았다(Fig. 4).

Tumor cell lysate의 세포독성 실험. Tumor cell lysate가 세포에 미치는 독성을 알아보기 위하여 정상 마우스의 비장세포에 tumor cell lysate를 농도별(10, 20, 50 μ g)로

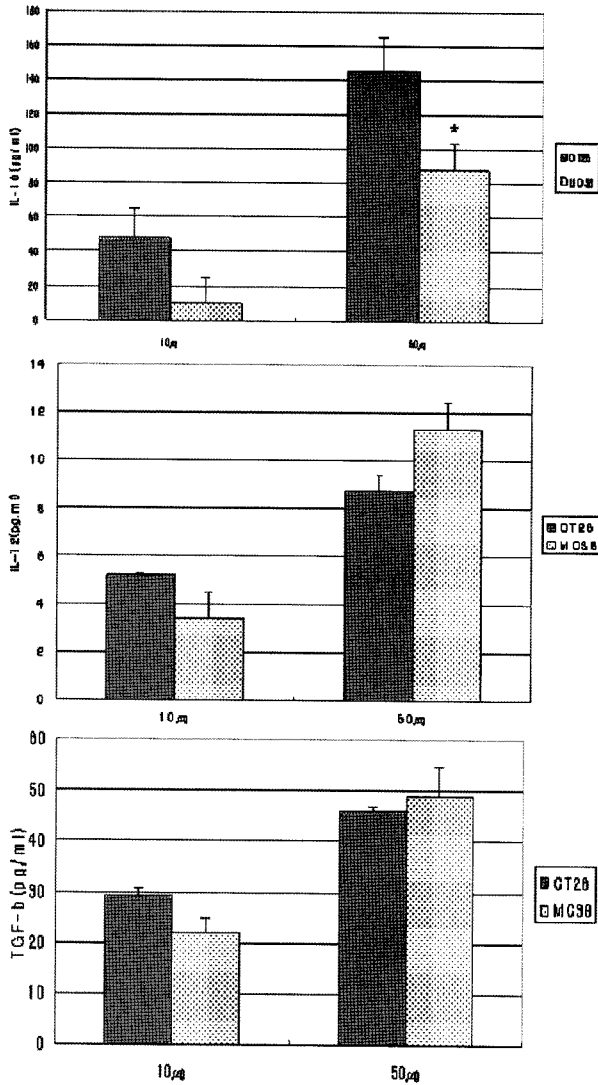


Figure 4. Level of IL-10, IL-12, and TGF-β in tumor cell lysate. Asterisks(*) indicate the statistical significance of cytokine concentration in MC38 lysate compared to CT26 lysate.

처리한 뒤, 24, 48, 72시간 배양하여 시간별, 농도별에 대한 세포 독성을 PI (propidium Iodide) staining한 뒤 flow cytometer로 측정하였다. CT26, MC38 두 tumor cell lysate 모두 농도 의존적이며, 시간 의존적으로 비장림프구에 세포독성을 나타내었다. 그러나 두 cell line사이의 차이는 통계적 유의성이 없었다(Fig. 5).

Heat shock protein의 발현. 수지상세포를 pulsing하는데 사용되는 각각의 tumor cell lysate 내, natural adjuvant인 Hsp의 발현을 확인해 보고자, tumor cell lysate를 Bradford assay를 통하여 정량한 뒤 western blotting을 관찰해 보았다. Hsp60의 경우 각각의 cell line 모두에서 많은 발현을 관찰할 수 있으며, Hsp90은 적은 발현이 나타났으나, 두 종류 cell lysate에서 모두 비슷한 양상으로 발현이 나타남을 확인할 수 있다. 이와는 반대로 Hsp70은 MC38 cell

line에서만 관찰되었다(Fig. 6).

고찰

항암 면역 세포 치료제로서 배양한 수지상세포를 이용할 때 중요한 고려 사항 중의 하나는 어떠한 종양 항원 공급원을 사용하느냐이다. 종양항원 공급원으로는 이미 알려져 있는 펩타이드나 단백질, DNA 및 RNA 등이 이용되고 있는데 이중 특정 펩타이드를 사용하는 것은, 면역 치료 시에 종양세포가 불필요하고 자가 면역에 대한 걱정을 하지 않아도 되는 장점이 있다. 반면, 종양의 이질성 때문에 생기는 이탈성 변종(escape mutant) 등이 발생할 수 있으며, 또한 실제 임상연구에서도 선호도가 떨어지는데 이는 펩타이드 MHC complex의 짧은 수명과 CD4+ T cell의 도움을 유도하지 못한다는 단점 때문이다(18-20). 이에 반해 tumor cell lysate를 쓰는 경우는 모든 종양 관련 항원을 포함하고 Hsp의 도움을 얻을 수 있어 임상연구에서 선호하고 있는 항원 소재이나, 정제되지 않은 자가 항원으로 인한 자가면역 발생의 위험을 내포하고 있다. 또한 자가면역 반응 발생 가능성 이외에도 정제되지 않은 세포 성분으로 인해 예상치 못한 부작용 발생 가능성이 존재한다. 본 실험실에서 시행되었던 예비연구에서 같은 대장암 세포주인 CT26와 MC38의 lysate로 pulsing된 수지상세포의 항원 특이 면역 반응(T cell immunity) 유도에 차이가 있음이 확인되었고 이에 대한 기전을 밝히기 위해 tumor cell lysate 특성을 조사하였다.

CT26 (Balb/c H-2K^d syngenic)와 MC38 (C57BL/6 H-2K^b syngenic) cell line은 마우스 대장암 세포주라는 공통점을 가지고 있으나, 세포 기원이 다르므로 세포주의 면역반응 유도 차이가 allogenic response 때문일 가능성이 있다. 따라서 syngenic 및 상대 마우스 세포 면역능 유도를 모두 확인하였다. Balb/c 및 C57BL/6로부터 myeloid계 수지상세포를 각각 만든 후 두 종류의 cell lysate로 pulsing하였을 때, 같은 배양 조건에서 base line 면역능이 약한 Balb/c의 경우 배양세포의 성숙도가 반대의 C57BL/6에 비해 많이 낮았고, tumor cell lysate에 대해 성숙되는 반응성이 높았다. 특히 Balb/c mice에서 MC38에 의한 수지상세포 표면 표현형의 증가율은 유의성이 있었다. 그러나 두 개의 lysate로 각각 pulse된 수지상세포로 하여금 T cell이 IFN-γ를 분비하도록 자극했을 때 MC38만이 효과를 나타냈고, 그 현상은 두 종의 마우스에서 모두 동일하여, 단순히 allogenic reaction이라기보다 MC38 tumor cell lysate 자체의 특성이 있을 것이라는 가정을 하게 하였다.

수지상세포에 직접적인 자극을 주는 tumor cell lysate 내에서의 요소를 알아보기 위하여 시행한 ELISA에서는 TGF-β의 경우 변화를 보였으나, 두 lysate 간의 차이점은 발견되지 않았다. 그러나 IL-10은 MC38 lysate에 비해

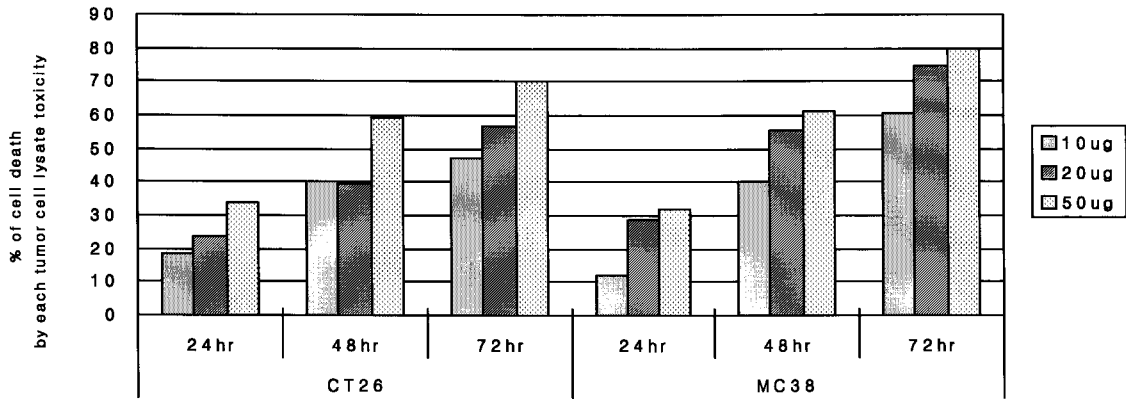


Figure 5. PI single stain shows that the death of splenic lymphocyte by co-culture with tumor cell lysate. Normal mouse splenocytes stimulated with 10, 20, 50 µg each tumor cell lysate for 24, 48 and 72 hr before propidium iodide staining for flow cytometric analysis. Show the graph that percent of cell death by each tumor cell lysate toxicity.

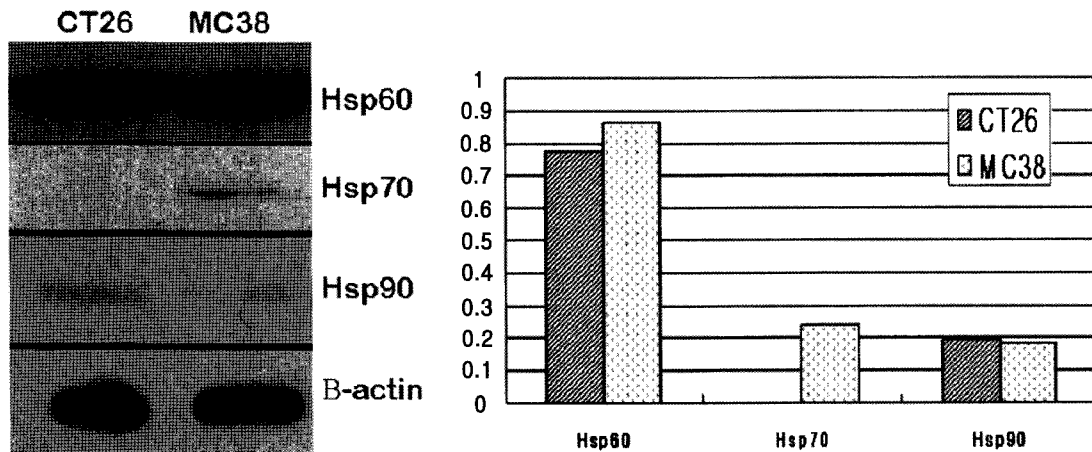


Figure 6. Expression of Hsp60, 70 and Hsp90 protein in mouse tumor cell line. Protein expression of Hsp60, 70 and Hsp90 was analyzed by western blot analysis of mouse tumor cell lysate. Mouse β-actin was used as an internal control.

CT26 lysate에 유의하게 많은 양이 포함되어 있었고, 이는 IL-10이 immune inhibitory factor로 작용하여 CT26 lysate가 pulse된 수지상세포의 작용 및 유도되는 T cell 면역능을 저하시킬 수 있는 가능성을 시사한다. 또한 IL-12는 MC38 lysate에 CT26 lysate에 보다 더 많이 존재하는 것이 확인되었는데, MC38에 의한 IFN-γ 생산 등 T cell immunity 유도에 부분적으로 관련을 가진다고 생각된다.

각각의 tumor cell line의 표면 표현형을 확인한 결과에서는 다른 인자들의 변화는 보이지 않았으나 MC38 cell line에서 MHC class II의 양이 10배 정도 증가해 있음을 확인하였다(MC38 7.43%, CT26 0.78%). 그러나 낮은 절대치로 인해 세포의 activity와 immunity의 증감에 어떠한 관련이 있는지는 확신할 수 없다.

또한 본 연구팀의 과거 동물 실험에서 tumor cell lysate에 따라 immune monitoring 시 비장 림프구가 항원 특이 반응을 나타내기보다는, 사멸되는 양상을 보여 준다는 결과가 있다. 이는 tumor cell lysate 안에 세포에 악영향을 미치는 물질이 들어 있다는 가능성을 시사해 주며, pulsing한 tumor cell lysate 세포 독성으로 인하여 면역 반응 유도에 차이가 있을 가능성을 의심하였다. 그리하여 실행한 tumor cell lysate의 독성을 확인해 본 결과, 지금까지 두 lysate 모두 농도, 시간 의존적인 primary 비장 림프구에 대한 세포 독성을 나타내었으나, cell line간의 차이는 보이지 않았다.

Hsp는 정상세포에서 낮은 농도로 존재하면서 다양한 물리적 및 화학적 자극에 노출된 세포에서 합성이 증가하여 미성숙된 단백질이나 세포손상으로 변성된 단백질

의 복구와 면역체계에 있어서 세포의 보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(21-26). 이러한 natural adjuvant인 Hsp를 tumor cell lysate 안에서 확인해 본 결과 Hsp60과 Hsp90은 양쪽의 tumor cell lysate에서 비슷한 양상을 보이면서 발현이 되는 것을 확인하였다. 그러나 Hsp70은 MC38에서만 발현이 되었다. Hsp70은 여러 보고에서 수지상세포의 작용을 증강시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있고 실제 Hsp를 tumor immuno-therapy의 한 module로 사용한 보고도 있다(30-32). 따라서 MC38을 수지상세포에 pulsing 하였을 때 Hsp70의 chaperon 역할로 T cell의 면역반응이 보다 강하게 일어날 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 내용을 요약하면 같은 대장암 세포주이나 기원이 다른 CT26과 MC38의 lysate로 pulsing된 수지상세포가 항원 특이 T cell immunity 유도에 차이를 보이는 것은 tumor cell lysate 특성의 차이 때문이라고 생각된다. 즉 CT26 tumor cell lysate 내에는 immune inhibitory IL-10이 다량 존재하고, 반면에 MC38 tumor cell lysate에는 immune stimulatory IL-12가 존재하는 것으로 각 tumor lysate로 pulsing한 수지상세포의 면역 반응 유도 차이를 일부 설명할 수 있으리라 생각된다. 또한 natural adjuvant 중 수지상세포의 기능 강화와 관련 있다고 생각되는 Hsp70이 MC38에서만 발견된 것은 MC38 cell 자체의 특성이 수지상세포를 매개로 한 종양항원 면역 반응 유도에 큰 역할을 하는 것을 확인하는 것이라 보여진다. 본 실험의 결과는 수지상세포를 항암 면역 치료제로 사용할 때, pulsing하는 tumor cell lysate의 특성이 주요 고려 대상이 되어야 함을 시사한다.

참 고 문 헌

- 배용수: 수지상세포를 이용한 암치료제 개발현황 및 전망. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2;251-263, 2005
- Nestle F: Dendritic cell vaccination for cancer therapy. *Oncogene* 19;6673-6679, 2000
- Banchereau J, Palucka K: Karolina Palucka. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Immunol* 5;296-306, 2005
- 이영준, 김명주, 인소희, 최옥미, 백소영, 권영도, 이현아: 동종 종양 세포 용해액을 이용한 수지상 세포 항암 백신의 흑색종 폐암 전이 모델에서의 효과 연구. *Immune Network* 5;163-171, 2005
- Steinman RM: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9;271-296, 1991
- Paglia P, Chiodoni C, Rodolfo M, Colombo MP: Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 183;317-322, 1996
- Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ: Virus mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induced CTL. *J Immunol* 158;3270-3276, 1997
- Brossart P, Bevan MJ: Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90;1594-1599, 1997
- Banchereau K, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392;245-252, 1998
- Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A: Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells *Curr Opin Immunol* 9;10-16, 1997
- Porgador A, Gilboa E: Bone marrow generated dendritic cells pulsed with a class I restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 182;255-260, 1995
- Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT: Therapy of murine tumors with tumor peptide pulsed dendritic cells: dependent on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1 associated cytokines. *J Exp Med* 183;87-97, 1996
- Bevan MJ: Cross priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigen with H-2 congenic cells which do not cross react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143;1283-1288, 1976
- Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H: Role of bone marrow derived cells in presenting MHC class I restricted tumor antigens. *Science* 264;961-965, 1994
- Reis e Sousa, Germain R: Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med* 182;841-851, 1995
- Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren Hg, Watts C: Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent presentation of exogenous antigen on class I MHC molecules by bone marrow derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 27;280-288, 1997
- Carbone FR, Kurts C, Bennett SE, Miller JF, Heath WR: Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 19;368-373, 1998
- 박민호, 이창석, 조문형, 한철, 고양석, 김정철, 윤정한, 정갈영, 남종희: 암 태아성 항원 펩타이드로 부가된 수지상세포를 이용한 특이 세포독성 T 세포의 유도. *대한외과학회지* 69;359-366, 2005
- Figdor C, Vries I, Lesterhuis W, Melief C: Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 10;475-480, 2004
- Nair S, Snyder D, Rouse B, Gilboa E, David Snyder, Barry T. Rouse, Eli Gilboa: Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 70;706-715, 1997
- van Eden W, van der Zee R, Prakken B: Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Nat Immunol* 5;318-330, 2005
- Kaufmann SHE: Heat shock proteins immune response. *Immunol. Today* 11;129-136, 1990
- Beackmann RP, Lovett M, Welch WJ: Examining the function and regulation of Hsp70 in cells subjected to metabolic stress. *J Cell Biol* 117;1137-1150, 1992
- Nakamura K, Rokutan K, Marni N: Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *gastroenterology* 101;161-169, 1991
- VanBuskirt AM, DeNagel DC, Guagliardi LE: Cellular and subcellular distribution of PBP 72/74, a peptide binding protein that play a role in antigen processing. *K immunol* 146;500-506, 1991
- Lindquist S, Craig EA: The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 22;631-677, 1988
- 이현아, 최광민, 백소영, 이흥기, 정철원: 수지상세포를 이용한 항암 면역 치료: 생쥐 신장암 모델을 이용한 연구. *Immune Network* 4;44-52, 2004

28. 이석재, 김명주, 인소희, 백소영, 이현아: 폐암의 면역세포 치료: 동물 모델에서 수지상 세포를 이용한 adjuvant therapy 가능성 연구. *Immune Network* 5;36-44, 2005
 29. Yoon(Lee) H, Singh K, Ratner S, Reiners JJ Jr: Phorbol ester effects on splenic lymphocyte composition and cytotoxic T cell activities of SSIN mice: a strain deficient in CD8+ T cells. *Carcinogenesis* 17;2617- 2624, 1996
 30. Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, Gastpar R, Issels RD: Heat shock protein70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia* 18;563-575, 2002
 31. Multhoff G: Activation of natural killer cells by heat shock proteins70. *Int J Hyperthermia* 18;576-585, 2002
 32. Manjili MH, Wang XY, Park J, Macdonald IJ, Li Y, van Schie R, Subjeck JR: Cancer immunotherapy: stress proteins and hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 18;506-520, 2002
-