

## 기존의 치료에 반응하지 않는 다발성 간전이 대장암 환자에서 방사선조사와 병합한 수지상세포 면역치료의 1, 2상 임상시험

동아대학교 의과대학 방사선종양학교실\*, 혈액종양학교실<sup>†</sup>, 소화기내과학교실<sup>‡</sup>, 영상의학교실<sup>§</sup>, 부산대학교 의과대학 혈액종양학교실<sup>||</sup>, 영상의학교실<sup>¶</sup>, 방사선종양학교실<sup>#</sup>, 생화학교실\*\*

최영민\* · 이형식\* · 권혁찬<sup>†</sup> · 한상영<sup>‡</sup> · 최종철<sup>§</sup> · 정주섭<sup>||</sup> · 김창원<sup>¶</sup> · 김동원<sup>#</sup> · 강치덕\*\*

**목적:** 기존치료에 반응하지 않는 다발성 간전이를 동반한 대장암 환자에서 방사선치료와 병합한 수지상세포 면역치료의 독성과 반응도를 조사하였다.

**대상 및 방법:** 2004년 5월부터 2006년 11월까지 다발성 간전이가 동반된 대장암 환자들 중에서 항암화학 요법에 반응하지 않은 환자 중 지원자를 대상으로 연구를 시행하였다. 본 임상 시험에 대하여 동아대학교병원과 부산대학교병원의 임상윤리심의위원회의 허가를 획득하였고, 동의서에 서명한 환자들을 임상 시험의 대상으로 등록하였다. 환자의 말초 혈액으로부터 수지상세포를 추출하여 배양하였다. 임상시험 일자에 맞추어서  $6 \times 10^6$ 개의 수지상세포를 바이알(0.5 ml)에 넣어서 디씨백/아이알 주사를 만들었다. 수지상세포 면역치료는 2주 간격으로 간전이암 조직에 3회 주사하고, 5주에 내약성 평가를 하였다. 내약성 평가를 통과한 환자에게는 8주에 4번째 수지상세포 면역치료를 하였다. 병의 악화가 없거나 임상시험에 대한 환자의 동의 철회가 없는 경우에는 5, 6번째 수지상세포 면역치료를 각각 12, 16주에 시행하였다. 방사선치료는 수지상세포 면역치료를 주사할 간전이암 부위에 주사하기 전일 및 당일 4 Gy씩을 조사하였다. 내약성 평가는  $3 \times 10^6$ 개의 수지상세포로부터 시작하여,  $12 \times 10^6$ 개의 수지상세포까지 시행하였다. 내약성 평가의 최대 내성 용량으로 추가 임상시험을 하였다. 수지상세포 면역치료 주사를 맞은 모든 환자들에서 안전성 평가를 하였다. 4회 이상 주사를 맞은 환자들을 대상으로 10주에 치료 반응을 평가하여 유효성을 조사하였다.

**결과:** 임상시험에 등록된 24명 중 22명에서 수지상세포 면역치료를 시행하였다. 내성약 평가에는 14명이 등록하여 11명에서 평가를 완료하였다. 시험약과의 관련성이 있을 것으로 생각되는 grade 3 이상의 약물반응으로 인한 이상반응은 없었다.  $12 \times 10^6$ 개의 수지상세포를 내성용량으로 확인하였고, 내성용량인  $12 \times 10^6$ 개 수지상세포 면역치료를 이용하여 8명에서 추가로 시험을 하였다. 치료에 대한 환자들의 내성은 양호하였고, grade 3을 초과하는 치명적인 부작용은 발생되지 않았다. 4회 이상의 수지상세포 면역치료 주사를 받은 환자가 17명이었고, 이 중의 15명에서는 종양의 반응도 평가가 이루어졌다. 본 연구의 목적은 안전성 평가이지만, 면역치료의 유효성 평가를 위해, 방사선치료와 수지상세포 면역치료 주사가 시행된 부위 외의 간전이암에서 반응도를 조사 하였다. 면역치료의 반응은 평가가 이루어진 환자들에서 정지성 병변이 4명, 진행성 병변이 11명 이었다.

**결론:** 수지상세포 면역치료와 병합한 방사선치료는 이론적으로 국소 및 전신 제어에 상승효과가 있을 것으로 기대할 수 있다. 하지만 기존 치료에 반응하지 않는 매우 진행된 직장암 환자들을 대상으로 한 본 연구에서는 방사선 치료와 병합한 수지상세포 면역치료로 인한 심각한 부작용의 발생은 없었다는 결과와 4예에서의 정지성 병변의 관찰을 보고한다. 수지상세포의 최대 투여 용량, 적절한 투여 방법, 적절한 방사선의 양, 방사선과 수지상 세포의 적절한 투여 간격 등에 관한 추가 연구를 통하여, 향후 제 2상, 3상 시험으로서의 진행 여부에 긍정적인 결과를 얻을 수 있다고 판단한다.

**핵심어:** 수지상세포 면역치료, 방사선치료, 다발성 간전이 대장암

이 논문은 2008년 3월 11일 접수하여 2008년 6월 2일 채택되었음.

책임저자: 이형식, 동아대학교병원 방사선종양학과

Tel: 051)240-5380/2812, Fax: 051)254-5889

E-mail: hyslee@dau.ac.kr

본 연구는 2007년 동아대학교 학술연구 조성비의 지원에 의하여 연구되었음.

### 서론

수지상세포(dendritic cell, DCs)는 체내 면역 체계에서 항

원을 인식하고, 이들 항원의 처리를 통해 면역 반응을 유발하고, 조절하는 강력한 항원표지세포이다.<sup>1)</sup> 미성숙 수지상세포는 항원을 섭취할 수 있는 수용체를 발현하고 있어, 말초 조직에서 항원을 포획하고 이를 가공하는 역할을 한다. 항원에 감작된 후 수지상세포가 성숙하게 되면, 여러 chemokine 수용체들의 변화로 인하여 말초 조직에서 림프 조직으로 이동한다. 성숙 수지상세포는 식세포 능력을 소실하지만, MHC, CD40, CD83, 보조자극물질(co-stimulatory molecule) 등의 발현을 증가시키고, 다양한 cytokine 유전자들을 활성화시켜서, 림프 조직에서 T 세포의 분화를 유도한다.<sup>2,3)</sup> 또한 인터루킨-12 등의 사이토카인(cytokine)을 생성하여 helper T lymphocyte를 자극하고, 암세포에 특이하게 작용하는 cytotoxic T lymphocyte (CTL)를 유도하여 암 발생 및 암세포 증식을 억제하는 기능이 있다고 알려져 있다. 이때 기억된 T 세포(memory T cell) 뿐만 아니라, 전혀 항원에 노출된 적이 없는 T 세포(naive T cell)까지도 자극하여 적절한 면역 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이에 수지상세포를 이용하여 환자 자신의 면역 체계를 증진시켜 암세포를 공격하게 하는 항암 면역치료법이 활발히 연구되고 있다.

본 연구에서 사용한 디씨백/아이알<sup>®</sup>의 치료기전은 환자의 말초 혈액에서 획득하여 체외에서 분화 유도된 미성숙 수지상세포를 방사선이 조사된 암조직 내부에 주사하여, 수지상세포가 체내에서 탐식 및 성숙 과정을 거쳐서, 암항원에 대한 특이 면역반응을 유도하는 것이다. 암부위에 방사선을 조사하여 암세포 유래의 아포토시스 세포(apoptotic cells)들을 형성시키고, 그 내부에 체외에서 배양한 미성숙 수지상세포를 투여하면, 미성숙 수지상세포가 사멸된 암세포로부터 유래된 암항원에 감작되고 성숙하여서 암 항원에 대한 특이 면역 반응을 유도하기를 기대하는 것이다. 이러한 방법은 수술로 많은 양의 암조직 수집이 가능하지 않거나, 종양조직 내로 주사가 가능한 암환자에게 효과적이며, 체외에서 수지상세포를 감작 및 성숙화시키는 과정 없이 암을 치료할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구의 목적은 대장암환자에게 디씨백/아이알 주사를 투여 시의 용량 결정, 내약성 및 안정성을 평가하는데 있다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구 대상 환자의 선정

18세 이상의 남, 녀로 조직학적으로 대장암(rectal cancer)으로 진단된 환자 중 표준 치료에 실패하거나 표준 치료를 시행할 수 없는 환자, 신체검진 또는 진단영상검사서 간

에 계측이 가능한 병변이 2개 이상 있는 환자, 일상생활 수행능력(ECOG) 분류가 2 이하인 환자, 예측되는 생존기간이 3개월 이상인 환자, 혈액검사에서 다음의 기준을 만족하는 환자(백혈구수  $\geq 2.0 \times 10^9/L$ , 혈소판수  $\geq 50 \times 10^9/L$ , 혈청 총 빌리루빈  $\leq 2 \times$  각 시험기관의 정상 상한치, 혈청 크레아티닌  $\leq 2 \times$  각 시험기관의 정상 상한치, HIV와 HBV surface antigen이 음성), 자가면역항체 검사상 이상 소견이 없는 환자, 투베르쿨린반응 검사에서 세포성 면역반응 능력이 정상임이 확인된 환자, 환자 본인 또는 환자의 대리인이 서면 동의한 자로 선정하였다. 본 시험의 시험약 투여 전 4주 이내에 다른 시험용 의약품을 투여 받은 적이 있는 환자, 본 시험의 시험약 투여 전 4주 이내에 다른 항암화학요법 또는 방사선요법과 같은 항암치료를 받은 환자, 본 시험약의 전 처치 이외의 목적으로 코르티코스테로이드 또는 상응 약물을 병용 투여하는 경우, 임신부나 수유부 또는 적절한 피임법을 사용하지 않는 가임여성 환자, 다른 악성종양이 동반된 환자, 자가 면역질환의 병력이 있는 환자, 심각한 내과적 질환이 동반된 환자 및 기타 연구자가 본 연구에 포함시키기 어렵다고 판단한 환자 등은 제외하였다. 본 시험에 대한 해당 기관의 임상윤리심의위원회(Institutional Review board)의 심의 후에 시험을 시행하였다.

### 2. 임상시험

선정기준/제외기준을 모두 만족하는 피험자에게 치료 계획에 필요한 검사를 실시하고, 환자의 말초 혈액으로부터 수지상세포를 추출하여 6일 이상 배양한다. 임상시험 일자에 맞추어서 무균 처리된 투명 바이알에  $6 \times 10^6$ 개의 자가 유래 수지상세포를 넣고 밀봉하여, 디씨백/아이알 주사를 제조하였다. 디씨백/아이알 주사(1 바이알; 0.5 ml)를 정해진 시험 일정대로 투여하였다. 첫 투약부터 4주까지 2주간격으로 3회 투약하고 5주째 내약성 평가를 실시하였으며, 8주에 추가 투여하고 10주에 반응도를 조사하였다. 명확한 질병의 진행이나 피험자의 동의 철회가 없을 경우, 추가로 12주와 16주에 투약을 실시하여 20주까지 관찰하였다. 피험자 등록기간은 임상시험 시작일로부터 24개월로 하고, 추적 조사 기간은 6개월로 계획하였다. 본 임상시험에서 수지상세포의 투여량은 저용량을  $3 \times 10^6$ , 중간용량을  $6 \times 10^6$ , 고용량을  $12 \times 10^6$ 개로 설정하였다. 3단계의 내약성 평가를 통해 시험약의 최대 내성용량을 조사하였다. 접근하기 쉬운 암종(체표면에 근접해 있거나, 종양의 크기가 가장 큰 곳)을 선택하여, 시험 약 투여 전일 및 당일 4 Gy 썩의 방사선을 조사하였다. 방사선이 조사된 부위에 초음파의 유도 하에서 시험약을 투여하였다(Fig. 1).

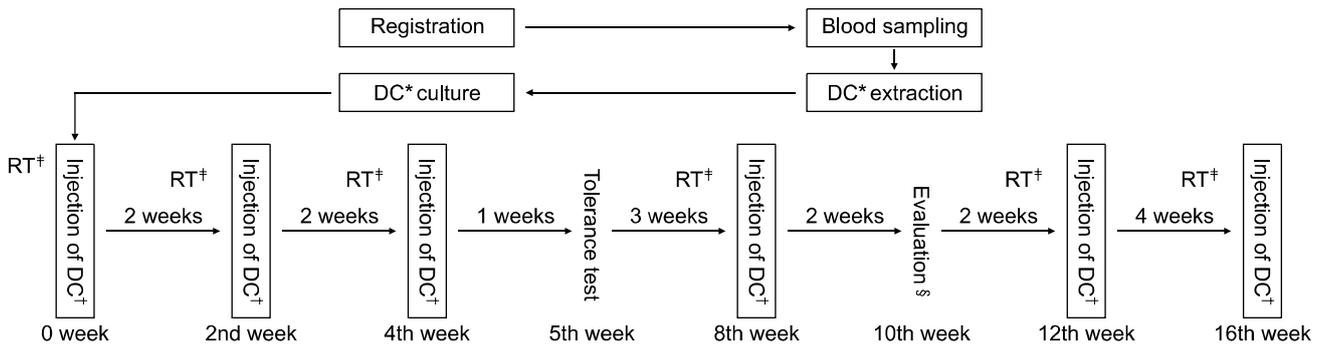


Fig. 1. Treatment scheme of dendritic cell immunotherapy with DCVac/IR<sup>®</sup> following irradiation to the hepatic metastatic lesion of rectal cancer. \*dendritic cell, †dendritic cell immunotherapy with DCVac/IR<sup>®</sup>, ‡radiotherapy: 4 Gy irradiation to the targeted hepatic metastatic lesion on a day before and the day of DCs injection, §response evaluation of neighboring hepatic metastatic lesions outside of the treated hepatic lesion.

### 3. 각 피험자별 용량 및 내약성 평가

처음 3명의 피험자에게  $3 \times 10^6$ 개의 수지상세포를 2주 간격으로 3회 투여하고, 이상약물반응(National Cancer Institute Common Toxicity Criteria; NCI-CTC V.2.0 기준  $\geq$  grade 3)이 나타나지 않을 경우 용량을 배로 증가시키는 형태로 진행하였다. 1명이라도 이상약물반응이 나타날 경우에는 각 3명씩 추가 시험하였다. 최대용량은  $12 \times 10^6$ 개의 수지상세포로 설정하였다.

### 4. 안전성 평가

디씨백/아이알 주사를 적어도 1회 이상 투여한 피험자에 한하여 실시하였다. 피험자 개인별 이상반응 기록표에 기재된 이상반응의 빈도, 정도 등과 일반혈액검사, 혈액생화학검사, 뇨검사, 자가면역반응 등의 임상병리검사, ECG검사 등의 이상소견을 고려하여 안전성을 평가하였다. 이상반응에 대한 평가를 위해 시험약의 복용으로 인한 이상반응 발생여부, 증상, 발현일, 소실일, 정도, 위약 또는 임상시험용 의약품과의 관련성, 관련된 조치, 치료, 결과 등 확인된 사항들을 증례기록서에 기재하였다. 이상반응 정도에 대한 기준은 NCI-CTC V.2.0에 근거하여 grade를 기록하였다. NCI-CTC 기준에 따라 등급을 평가할 수 없는 경우는 0=none, 1=mild, 2=moderate, 3=severe, 4=life threatening 등으로 평가하였다. 연구자는 발생한 이상반응과 시험약과의 관련성을 피험자의 과거력, 건강상태, 투약시간, 복용상태 등 여러 측면에서 검토하여 판단하였다. 이상반응에 대해서는 조치 및 치료를 하였다.

### 5. 유효성 평가

내약성 평가 과정에 등록되었거나 최대 내성용량의 임상 시험에 등록되었던지 간에, 환자들 중에서 4회 이상 시험약을 주사 받은 환자들을 대상으로 10주에 반응을 조사하여 유효성 평가를 하였다. 최소한 12명의 환자를 유효성 평가의 지표로 삼았다. 면역치료에 대한 유효성 평가의 대상병변은 방사선치료와 시험약을 투여한 병소 부위를 제외한 인접 간전이암 부위로 하였다. 치료에 대한 반응 기준은 모든 대상병변의 가장 긴 직경을 측정하여, 치료 전, 후를 비교하였다. 완전반응(complete response)은 모든 대상병변이 소실되는 경우, 부분반응(partial response)은 대상병변의 최장경의 합이 치료 전 최장경의 합과 비교했을 때 적어도 30% 감소하는 경우, 정지성 병변(stable disease)은 부분반응으로 평가될 만큼 작아지지 않았거나, 치료 시작 이후의 최장경 합의 최소치와 비교하여 질병의 진행으로 평가될 만큼 커지지 않은 경우, 진행성 병변(progressive disease)은 대상병변의 최장경의 합이 치료 이후의 최장경 합의 최소치와 비교했을 때 적어도 20% 이상 증가하거나, 1개 이상의 새로운 병변이 나타나는 경우로 판정 기준을 삼았다. 말기암 환자의 면역 치료 1, 2상 검사의 특성상 유효성은 병소 제어율(disease control rate)을 지표로 삼았고, 이는 진행성 병변 반응을 제외한 완전반응, 부분 반응, 정지성 병변 반응을 포함하여 정의하였다.

### 결 과

본 임상시험은 두 기관 각각 12명씩 등록된 환자 중 2명은 투약 시행 전 스크리닝 단계에서 등록을 포기하여 투약

이 시행된 총 22명의 피험자를 대상으로 하였다. 22 명의 피험자 중 유효성 평가는 시험약 4회 이상 주사 받은 환자 중 10주째 17명에서 평가되었다. 17명 중 2명은 유효성 평가 검사를 거부하여 총 15명에서 유효성 평가가 이루어졌다. 내약성 평가 완료 전에 탈락한 피험자가 3명이었고, 내약성 평가 후에 탈락한 피험자가 4명 이었다.

### 1. 용량 결정 및 내약성 평가

본 임상시험은 먼저 최대 내성 용량(maximum tolerable dose) 결정을 위한 단계별 대상자를 선정하여 내약성 평가를 시행한 후, 최대 내성 용량군에서 피험자를 추가로 모집하여 안전성 및 유효성을 확인하였다. 1단계 3×10<sup>6</sup>개 수지상세포를 투여하여 내약성 평가과정에 진입한 피험자는 모두 5명이었는데, 1명이 2회 주사 후, 1명은 3회 주사 후에 동의를 철회하였다. 나머지 3명은 내약성 평가 과정을 완료하였다. 본 용량에서 2건의 grade 3 이상의 이상반응이 발생되었으나, 모두 시험약과는 관련성이 없는 것으로 판단되었다. 2단계 6×10<sup>6</sup>개 수지상세포 용량에서는 1명의 피험자 평가 완료 후, 두 번째 피험자에서 grade 1의 당뇨병이 발생되어서, 본 시험약과의 관련 가능성이 제기되었으나 추적 조사를 통하여 시험약과는 관련성이 없는 것으로 판단되었다. 그 이후 순차적으로 피험자를 등록하여, 2명의 피험자에서 본 임상시험과 관련 가능성이 없는 이상반응이 발생되었으나, 임상시험에 대한 동의를 철회하여 탈락되었다. 이후 3명의 피험자를 추가로 등재시켰고, 이들에게서 grade 3 이상의 이상약물반응이 발생되지 않아서 3단계로 진입하였다. 2단계 6×10<sup>6</sup>개 수지상세포 용량에서는 총 6 명의 피험자 중 3명의 피험자에서 총 5건의 grade 3 이상의 이상반응이 발생되었다. 3단계 12×10<sup>6</sup>개 수지상세포 용량에 참여한 피험자는 3명이었고, 이들 모두는 내약성 평가 과정을 완료하였다. 총 4건의 grade 3 이상의 이상반응이 보고되었으나, 이들 모두는 시험약과의 관련성은 없는 것으로 판단되었다(Table 1). 상기와 같이 3단계의 용량 증가 과정을 거치며 시험약의 내약성을 평가한 결과, 시험약과 관련성 가능성이 있는 grade 3 이상의 이상약물반응이 발생되지 않았다. 이를 통해 본 임상시험에서 정한 최대용량인 12×10<sup>6</sup>개의 수지상세포가 안전용량임을 확인하고 8 명을 추가 등록하여 3단계에서는 총 11명의 피험자가 치료를 받았다.

### 2. 안전성 평가

본 임상시험에 참여하여 1회 이상 시험약을 투여 받은 22명의 피험자 모두에 대해 안전성 평가를 시행하였다. 이

**Table 1. Acute Effects Greater than Grade 3 during Tolerance Test**

Level	Number of patients*	Side effect	Grade	Relation
I <sup>†</sup>	2/5	AST (GOT) elevation	3	No
		Intervertebral disc compression	3	No
II <sup>‡</sup>	3/6	Anemia	3	No
		Thrombocytopenia	3	No
		Weakness	3	No
		Dyspnea	3	No
		Dyspnea	4	No
III <sup>§</sup>	3/11	Constipation	4	No
		Pain on catheter site	3	No
		Hypokalemia	3	No
		Pain due to bone metastasis	4	No

\*number of patients in whom grade 3 or greater acute effects developed out of the allotted patients in each level, <sup>†</sup>3×10<sup>6</sup> dendritic cells, <sup>‡</sup>6×10<sup>6</sup> dendritic cells, <sup>§</sup>12×10<sup>6</sup> dendritic cells

학적검사, 임상병리검사 및 자가면역 반응 등의 결과로 이상반응을 모니터링/평가하였고, 이상반응으로 간주되는 소견에 대해서는 NCI-CTC V.2.0에 따라 등급을 평가하였다. 본 시험약 투여로 인해 예상되는 이상반응들은 피로, 미열, 오한, 식욕부진, 두통, 임파절 종대 등의 감기 유사 증세와 또한 2차이상의 투여시 자가 면역 반응 등을 예상하였고 주사 부위의 발적 및 동통, 당뇨 등을 예상하였다. 22명의 참여 피험자 중 20명에서 83건의 이상반응이 발생되었는데, grade 3 이상의 중대한 이상반응은 총 13명의 피험자에서 19건이 발생되었다. 상기한 시험약과 관련된 치명적인 부작용은 없었다. 8건은 내약성 평가 과정에서 발생되었는데, 이 중에서 시험약과 관련성을 배제할 수 없는 이상반응으로 grade 1의 당뇨가 1명에서 발생되었으나, 그 외의 모든 이상반응들은 시험약과의 관련성이 없는 것으로 판단되었다. 당뇨의 발생 또한 추적 조사를 통하여 시험약과는 관련성이 없는 것으로 판단되었다. 내약성 평가 후와 최대 내성 용량의 임상 시험 과정에서는 grade 3 이상의 이상반응이 11건 발생되었지만, 전신 쇠약, 통증, 호흡곤란, 잔뇨, 눈꺼풀 처짐, 장폐쇄증, 저칼륨혈증 등으로 본 임상 시험과의 직접적인 관련이 없었으며 이러한 이상 반응들은 병소의 폐 및 골전이 등과 같은 진행과정에 생기는 합병증으로 판단하였다.

### 3. 임상시험 탈락

본 임상시험에 등록되어 투약이 시행된 총 22명의 피험자 중에서 시험약 4회 주사 후 10주째의 유효성 평가를 하

기 전에 탈락한 피험자는 모두 7명이었는데, 이들은 모두 내약성 평가 과정에 등록된 환자들이었다. 이 중에서 내약성 평가 완료 전에 탈락한 피험자가 3명이었고, 내약성 평가 후에 탈락한 피험자가 4명이었다. 탈락한 원인들은 주로 전이에 의한 증상 악화로 판단하였다(Table 2).

#### 4. 유효성 평가

8주에 4번째의 시험약을 주사 받은 17명 중에서, 10주에 시행한 종양의 반응도 평가는 총 15명에서 이루어졌다. 이 중에서 4명(26.7%)이 정지성 병변, 11명(73.3%)이 진행성 병변으로 판정되었다.

### 고안 및 결론

1973년 Steinman 등이 쥐의 비장에서 높은 운동성을 보 이면서 형태학적으로는 많은 돌기를 가지고 있는 강력한 항원 전달 세포를 처음으로 발견하고, 이를 “수지상세포” 라고 명명하였다.<sup>17)</sup> 수지상 세포는 전형적인 T 세포, B 세포, 자연살상세포(natural killer cell) 및 단핵세포 등의 표지자를 전혀 발현하지 않는 계열-음성 세포(lineage-negative cell)로서, 형태학적, 면역 표현학적 또는 기능적으로 단핵구(monocyte)나 탐식구(macrophage)와 구분되는 이질적인 백혈구의 일종으로 알려져 있다. 생체 내에서 종양세포를 인지하고 소멸시키는 역할은 T세포나 자연살상세포 등이 담당하는데, 종양세포에 특이적으로 작용할 T세포를 활성화시키기 위해서는 수지상세포에 의한 항원표지(antigen presenting)가 선행되어야만 한다. 수지상세포는 체내 면역 체계에서 항원을 인식하여, 면역 반응을 유발하고 조율하는 강력한 항원표지세포(antigen presenting cell)이다. 수지상세포를 이용한 종양 면역치료는 종양항원(종양 추출물,

단백질, 펩티드, RNA, cDNA)을 수지상세포에 노출시키면, 이에 감작된 수지상세포가 T 세포(CD8+)를 자극시켜서, 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)의 활성이 유도된다는 이론적 배경을 가지고 있다.<sup>4~7,18~21)</sup> 원하는 종양항원에 감작되어 유도된 세포독성 T 림프구는 동일한 종양항원을 내포하는 암세포에 대하여 항종양 효과를 나타내는데, 이를 임상에 이용하는 치료법이 수지상세포를 이용한 종양 면역치료이다.

수지상세포는 혈액 내에서 숫자가 작고 분리하기가 까다로워 백신연구에 큰 장애요인이 되어 왔으나, 최근 시험관에서 면역세포나 줄기세포로부터 수지상세포를 분화, 제조하는 방법이 개발되었다. CD34+ 골수 유래 줄기세포나 재대혈 줄기세포를 분리하여, GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$  등의 싸이토카인을 처리하여 수지상세포로 분화시키는 방법을 사용하기도 한다.<sup>22~24)</sup> 또한 Flt-3 리간드를 환자에 투여하여 체내에서 직접 다량의 수지상세포로 분화를 유도하고, 분화된 수지상세포를 분리하여 백신으로 사용한 연구도 보고되었다.<sup>5,25)</sup>

그러나 현재 가장 널리 사용되는 방법은 환자의 혈액에서 단핵구를 분리하고, 이를 GM-CSF와 IL-4가 첨가된 배지에서 3~7일간 배양하여, 다량의 미성숙 수지상세포를 제조하는 방법이다. 단핵구를 사용하여 수지상세포를 제조하는 방법은 다른 방법에 비해 제조공정이 비교적 간편하고, 균일한 미성숙 수지상세포를 다량 얻을 수 있는 장점이 있어서, 대부분의 수지상세포 백신 연구에 활용되고 있다. 여기에 TNF $\alpha$ , CD40L 등을 첨가하여 배양하면 2~3일 후에 성숙 수지상세포를 제조할 수 있는데, 이러한 방법이 가장 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 말초혈액의 백혈구 분획을 이용한 체외 배양법을 이용하였다.

수지상세포를 이용한 암백신 개발은 수지상세포의 획득 기원, 배양 방법 및 항원 인식 조작의 방법 등에 따라 다양한 차이가 있다. 이 중에서 수지상세포를 암항원에 감작시키는 방법을 보면, 세포고사체(apoptotic bodies), 종양 분쇄물(tumor lysates), 재조합 암항원, RNA (RNA derived using subtraction libraries), DNA (DNA encoding known tumor antigens) 등을 수지상세포에 노출시키는 방법, 종양 펩티드를 수지상세포와 결합시키는 방법(tumor-peptide-pulsed DCs derived exosomes), 종양을 수지상세포와 결합시키는 방법(tumor-DCs heteroconjugates) 등이 이용되고 있다.<sup>26)</sup> 이러한 방법들은 각각의 장, 단점 및 한계를 가지고 있다. 암특이 항원을 사용하는 경우에는 비특이적인 면역유도를 최소화할 수 있다는 장점이 있지만, 암세포가 가지고 있는 다른 항원에 대해서는 면역을 유도할 수 없고, 대부분의 암들에

Table 2. Causes of Dropped-out Patients before Response Evaluation

Period	DC* cell number	Reason	Number of injection
Pre-tolerance test	3x10 <sup>6</sup>	Acceptance withdrawal	2
	6x10 <sup>6</sup>	Dyspnea due to lung metastasis	1
Post-tolerance test	6x10 <sup>6</sup>	Dyspnea due to lung metastasis	1
	3x10 <sup>6</sup>	Intervertebral disc compression	3
	6x10 <sup>6</sup>	Weakness	4
	6x10 <sup>6</sup>	Ileus	4
	12x10 <sup>6</sup>	Bone metastasis	3

\*dendritic cell

서 아직 특이항원이 밝혀지지 않은 상태이므로, 이 방법을 보편화하기는 힘들다는 단점이 소개되고 있다. 암항원이 밝혀지지 않아서 암세포의 파쇄물이나 전체 RNA를 형질 전환하여 항원으로 이용할 경우에는, 수지상세포에 의해 암항원에 대한 면역이 효과적으로 유도될 수 있는 장점은 있으나, 암항원에 비해 자가 유래 항원의 비율이 월등히 높아서 수지상세포에 의한 암항원표지의 효율이 떨어진다는 단점도 있다. 이러한 방법은 국내에서도 신장암환자를 대상으로 크레아백스-RCC®의 유효성 평가를 위한 1상 및 2상 연구를 진행 중에 있으며, 신세포암환자의 암조직 분쇄물을 체외에서 환자의 단핵구 유래 수지상세포에 충분히 감작시키고 성숙시킨 다음, 환자 체내에 다시 주입하는 방법으로 치료를 진행하고 있다.

본 연구에서는 말초혈액의 백혈구 분획을 이용한 체외 배양법을 이용하였고, 미성숙 수지상세포를 방사선 조사 후에 아포토시스가 유도된 세포에 노출하여 항원을 인식 시키는 방법을 사용하였다. 수지상세포를 이용한 암 면역 치료제 개발을 위하여, 동아대학교, 부산대학교의 공동 연구진은 2003년 말부터 비소세포폐암에 대한 적응증으로 디씨백/이피-엘 주의 임상 1, 2상 시험을 수행하고 있으며, 또한 말기 대장암에 대해서도 보다 효과적인 치료방법을 연구하게 되었다. 디씨백/이피-엘 주(적응증: 비소세포폐암)는 분화 유도된 수지상세포를 체외에서 대량으로 제조하고, 추가로 확보된 암 조직을 수지상세포에 탑재하여 성숙시킨 후, 체내에 주사하여 면역 반응을 유도하는 기전의 치료제로 개발되었다. 디씨백/아이알 주(적응증: 대장암)의 치료기전은 분화 유도된 미성숙 수지상세포를 방사선이

조사된 암조직 내부에 주사하여, 수지상세포가 체내에서 탐식과 성숙을 하고 암에 대한 특이 면역반응을 유도하게 되는 이론적 배경을 가지고 진행하였다. 이러한 이론적 배경은 김 등<sup>27)</sup>이 발표한 동물 실험에서 미성숙한 수지상세포는 방사선에 의해 유도된 아포토시스 또는 괴사 세포에 의해서 감작되어 효과적으로 종양 성장의 억제 능력을 보여주었다. 본 연구에서 이 방법을 선택한 또 다른 이유는 체외에서 수지상세포를 감작, 성숙화 시키는 과정 없이 암을 치료할 수 있었고, 대부분의 환자에서 수술에 의한 암 조직의 획득이 용이하지 않았으며, 투여 방법에 있어서도 가장 효과적으로 생각되는 종양 조직 내로의 투입이 가능하였기 때문이다.

수지상세포 백신은 부작용이 없는 안전한 치료용 암 백신으로 알려져 있다. 수지상세포 백신을 이용한 여러 시험들의 결과에서 발생된 부작용은 단기간의 발열과 오한, 투여 부위의 홍반과 경화 등의 경미한 정도에 불과하였다.<sup>28)</sup> 본 연구에서 발생된 약제의 부작용들은 경미하였고, 본 연구에서는 직접 병소에 투여하는 방법을 택하였으므로 투여 부위의 홍반과 경화 등은 관찰할 수 없었다.

1996년에 B세포 림프종 환자에 대한 첫 임상시험 결과가 발표된 이래로,<sup>18)</sup> 현재 수지상세포를 이용한 암환자들의 면역치료는 다발성 골수종,<sup>29)</sup> 악성 림프종,<sup>18,30)</sup> 만성 골수성 백혈병<sup>31)</sup> 등의 혈액종양 질환에 대하여 초기 임상시험 단계에 있으며, 급성백혈병에서도 많은 기초 연구들이 시행되고 있다. 고형암 분야에서도, 특히 악성 흑색종,<sup>10,11)</sup> 전립선암,<sup>32)</sup> 신세포암,<sup>33)</sup> 뇌종양<sup>34)</sup> 등과 같은 암들에서 시도되고 있으며, 그 치료 효과도 안정화 병변 이상의 성적

Table 3. Clinical Trials of DC\*-based Antitumor Immunotherapy

	Cancer type	CR/PR/SD/PD <sup>†</sup>	Disease control rate
Sdanaga <sup>4)</sup>	Gastrointestinal cancer	0/3/0/9	3/12 (25%)
Fong <sup>5)</sup>	Colorectal, lung cancer	2/1/2/7	5/12 (42%)
Morse <sup>6)</sup>	Adult metastatic malignancies	0/1/1/17	2/19 (10.5%)
Geiger <sup>7)</sup>	Pediatric solid tumor	0/1/5/9	6/15 (40%)
Lin <sup>8)</sup>	Nasopharyngeal cancer	0/2/0/14	2/16 (12.5%)
Chang <sup>9)</sup>	Melanoma	0/1/3/13	4/17 (24%)
Nestle <sup>10)</sup>	Melanoma	2/4/0/10	6/16 (38%)
Thurner <sup>11)</sup>	Melanoma	0/6/0/7	6/13 (46%)
Schuler-Thurner <sup>12)</sup>	Melanoma	0/0/1/12	1/12 (8%)
Schuler-Thurner <sup>13)</sup>	Melanoma	1/0/8/15	9/24 (38%)
Lau <sup>14)</sup>	Melanoma	1/2/2/11	5/16 (31%)
Jonuleit <sup>15)</sup>	Melanoma	0/3/2/6	5/11 (45%)
Smithers <sup>16)</sup>	Melanoma	1/2/1/18	4/22 (18%)

\*dendritic cell, <sup>†</sup>number of patients whose responses were complete response, partial response, stable disease, and progressive disease, respectively

을 기대하는 반응율이 20~40% 정도로 고무적으로 보고되고 있다. 세계적으로 많은 기관에서 제 1상 또는 제 2상 임상시험 단계 과정에 있다. 그 외 전신성 홍반성 루푸스와 같은 자가 면역 질환, 난치성 바이러스 질환, 또는 천식 등에 대해서도 수지상세포를 이용한 면역치료법에 대한 기초 연구들이 계속되고 있다. 국내에서도 여러 연구 기관들에서 다양한 방법의 수지상세포를 이용한 면역치료제 개발을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이러한 면역치료제 개발에 있어서, 연구 수행자로서 경험을 빌어 앞으로의 체계적인 방향을 지적하면, 첫째로는 면역치료제의 표준화 검증 방법의 개발, 둘째로는 다양한 사이토카인 처리 연구를 통한 백신의 효능 향상을 위한 연구, 셋째로는 말기암의 임상연구를 통한 효과 입증 보다는 현실적으로 가능성이 기대되는 초기암의 재발 및 전이 방지에 대한 연구의 활성화 등이 수지상세포를 이용한 암환자들의 면역치료에 도움이 될 것으로 기대한다. 본 연구는 체외에서 배양된 미성숙 수지상세포를 방사선이 조사된 암조직 내부에 주사하여, 체내에서 수지상 세포가 방사선에 의해 생성된 아포토시스 세포들을 탐식하는 과정에서 암항원을 탐제하고 성숙하면서, 암에 대한 특이 면역반응을 유도하는 방법을 착안한데 독창성이 있다.

본 24예의 환자를 통한 제 1/2상 임상 시험에서는 환자들이 충분히 관용하는 독성이 관찰되었고, 방사선 치료 효과를 배제하기 위해 방사선 조사를 받은 부위를 제외한 치료 반응 평가에서는 4예의 정지성 병변 소견(26.7%의 병소 제어율)을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 Table 3에 기술한 여러 수지상세포를 이용한 암 면역치료에 관한 임상 시험들의 결과들인 “총 205명의 환자에서 얻은 완전관해 7예 (3.4%), 부분관해 26예(12.7%), 정지성 병변 25예(12.2%), 진행성 병변 147예(71.7%), 28%의 병소 제어율(8~46%)” 치료결과들과 비교하여 대상 환자의 특성상 완전관해, 부분관해는 관찰할 수 없었지만 병소 제어율 관점에서는 유사한 치료결과를 보였다.<sup>4~16)</sup> 연구자들은 방사선 조사로 유도된 아포토시스를 이용한 수지상 세포치료법의 보다 높은 치료 반응률을 기대하기 위해서는 수지상세포의 최대 투여 용량, 적절한 투여 방법, 적절한 방사선의 양, 방사선과 수지상 세포의 적절한 투여 간격 등에 관한 추가 연구를 통하여, 향후 제 2상, 3상 시험으로서의 진행 여부에 긍정적인 결과를 얻을 수 있다고 판단한다.

## 참 고 문 헌

1. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-296
2. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811
3. Zhou LJ, Tedder TF. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood* 1995;86:3295-3301
4. Sadanaga N, Nagashima H, Mashino K, et al. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2277-2284
5. Fong L, Hou Y, Rivas A, et al. Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:8809-8814
6. Morse MA, Deng Y, Coleman D, et al. A phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 1999;5:1331-1338
7. Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, et al. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 2001;61:8513-8519
8. Lin CL, Lo WF, Lee TH, et al. Immunization with Epstein-Barr Virus (EBV) peptide-pulsed dendritic cells induces functional CD8+ T-cell immunity and may lead to tumor regression in patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:6952-6958
9. Chang AE, Redman BG, Whitfield JR, et al. A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1021-1032
10. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-332
11. Thurner B, Haendle I, Röder C, et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999;190:1669-1678
12. Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, et al. Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000; 165:3492-3496
13. Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, et al. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:1279-1288

14. Lau R, Wang F, Jeffery G, et al. Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 2001;24:66-78
15. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tüting T, et al. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001;93:243-251
16. Smithers M, O'Connell K, MacFadyen S, et al. Clinical response after intradermal immature dendritic cell vaccination in metastatic melanoma is associated with immune response to particulate antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:41-52
17. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137:1142-1162
18. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:52-58
19. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lyerly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer* 1999;82:121-124
20. Mayordomo JI, Andres R, Isla MD, et al. Results of a pilot trial of immunotherapy with dendritic cells pulsed with autologous tumor lysates in patients with advanced cancer. *Tumori* 2007;93:26-30
21. Kotera Y, Shimizu K, Mulé JJ. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res* 2001;61:8105-8109
22. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-1118
23. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83-93
24. Iwashita Y, Tahara K, Goto S, et al. A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy for patients with unresectable primary liver cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:155-161
25. Dong J, McPherson CM, Stambrook PJ. Flt-3 ligand: a potent dendritic cell stimulator and novel antitumor agent. *Cancer Biol Ther* 2002;1:486-489
26. Dallal RM, Lotze MT. The dendritic cell and human cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 2000;12:583-588
27. Kim KW, Kim SH, Shin JG, et al. Direct injection of immature dendritic cells into irradiated tumor induces efficient antitumor immunity. *Int J Cancer* 2004;109:685-690
28. Haenssle HA, Krause SW, Emmert S, et al. Hybrid cell vaccination in metastatic melanoma: clinical and immunologic results of a phase I/II study. *J Immunother* 2004;27:147-155
29. Reichardt VL, Milazzo C, Brugger W, Einsele H, Kanz L, Brossart P. Idiotype vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells. *Haematologica* 2003;88:1139-1149
30. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 2002;99:1517-1526
31. Litzow MR, Dietz AB, Bulur PA, et al. Testing the safety of clinical-grade mature autologous myeloid DCs in a phase I clinical immunotherapy trial of CML. *Cytotherapy* 2006;8:290-298
32. Tjoa BA, Murphy GP. Progress in active specific immunotherapy of prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 2000;18:80-87
33. Höftl L, Zelle-Rieser C, Gander H, et al. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3369-3376
34. de Vleeschouwer S, Rapp M, Sorg RV, et al. Dendritic cell vaccination in patients with malignant gliomas: current status and future directions. *Neurosurgery* 2006;59:988-999

---

Abstract

---

## A Phase I/II Trial of DCVac/IR<sup>®</sup> Dendritic Cell Immunotherapy Combined with Irradiation in Cases of Refractory Colorectal Cancer with Multiple Liver Metastases

Youngmin Choi, M.D.\*, Hyung-Sik Lee, M.D.\*, Hyuk-Chan Kwon, M.D.<sup>†</sup>, Sang-Young Han, M.D.<sup>‡</sup>, Jong-Cheol Choi, M.D.<sup>§</sup>, Ju-Seop Chung, M.D.<sup>||</sup>, Chang-Won Kim, M.D.<sup>||</sup>, Dong-Won Kim, M.D.<sup>#</sup> and Chi-Duk Kang, M.D.\*\*

Departments of \*Radiation Oncology, <sup>†</sup>Hemato-oncology, <sup>‡</sup>Gastroenterology, <sup>§</sup>Radiology, Dong-A University School of Medicine, Departments of <sup>||</sup>Hemato-oncology, <sup>||</sup>Radiology, <sup>#</sup>Radiation Oncology, \*\*Biochemistry, Busan National University School of Medicine, Busan, Korea

**Purpose:** To assess the toxicity and tumor response induced by DCVac/IR<sup>®</sup> dendritic cell (DC) immunotherapy combined with irradiation for refractory colorectal cancer patients with multiple liver metastases.

**Materials and Methods:** Between May 2004 and November 2006, applicants from a pool of refractory colorectal cancer patients with multiple liver metastases were enrolled. The patients were registered after having signed the informed consent form, which had been approved by the Institutional Review Board from the Dong-A University and Busan National University Hospital. DCs were obtained from peripheral blood of each patient, and then cultured in vitro. A total of  $6 \times 10^6$  DCs were packed into a vial (DCVac/IR<sup>®</sup>, 0.5 ml) at the convenience of each patient's schedule. On the day before and on the day of each vaccination, each patient received a 4 Gy radiation dose to the target tumor. On the day of vaccination, the indicated dose of autologous DCs was injected into the irradiated tumor using ultrasound-guided needle injection procedures. A total of four vaccinations were scheduled at three 2-week intervals and one 4 week interval at the Dong-A University and Busan National University Hospital. If the tumor status was deemed to be stable or responding to therapy, an additional vaccination dose or two was approved at 4 week intervals beyond the fourth immunization. A tolerance test for DCs was conducted by injecting a range of doses ( $3 \times 10^6$  to  $12 \times 10^6$  DCs) after the 3rd injection. Moreover, the maximal tolerable dose was applied to additional patients. Treatment safety was evaluated in all patients who had at least one injection. Treatment feasibility was evaluated by the 10th week by assessing the response of patients having at least 4 injections. For systemic toxicities, the evaluation was performed using the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, whereas adverse effects were recorded using common WHO toxicity criteria.

**Results:** Of the 24 registered patients, 22 received the DCs injections. Moreover, of the 14 patients that applied for the tolerance test, only 11 patients completed it because 3 patients withdrew their testing agreement. A grade 3 or more side effect, which was possibly related to the DC injection, did not occur in additional patients. The  $12 \times 10^6$  DC injection was identified as the maximum tolerable dose, and was then injected in an additional 8 patients. Patients tolerated the injection fairly well, with no fatal side effects. In order to assess the feasibility of DC immunotherapy, the response was evaluated in other hepatic lesions outside of the targeted hepatic lesion. The response evaluation was performed in 15 of the 17 patients who received at least 4 injections. Stable and progressive disease was found in 4 and 11 patients, respectively.

**Conclusion:** The DC-based immunotherapy and radiotherapy is theoretically synergistic for the local control and systemic control. The DCVac/IR<sup>®</sup> immunotherapy combined with irradiation was tolerable and safe in the evaluated cases of refractory colorectal cancer with multiple liver metastases. Future work should include well designed a phase II clinical trials.

---

**Key Words:** Dendritic cell immunotherapy, Radiotherapy, Colorectal cancer with multiple liver metastases