

인간 말초혈액 단핵구 유래 수지상세포의 면역반응에 미치는 Gefitinib의 영향

부산대학교 의학전문대학원 내과학교실

조진훈, 김미현, 이광하, 김기욱, 전두수, 박혜경, 김윤성, 이민기, 박순규

The Effect of Gefitinib on Immune Response of Human Peripheral Blood Monocyte-Derived Dendritic Cells

Jin Hoon Cho, M.D., Mi Hyun Kim, M.D., Kwang Ha Lee, M.D., Ki Uk Kim, M.D., Doo Soo Jeon, M.D., Hye Kyung Park, M.D., Yun Seong Kim, M.D., Min Ki Lee, M.D., Soon Kew Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Pusan National University School of Medicine, Busan, Korea

Background: Synergistic antitumor effects of the combined chemoimmunotherapy based on dendritic cells have been reported recently. The aim of this study is to search new applicability of gefitinib into the combination treatment through the confirmation of gefitinib effects on the monocyte derived dendritic cells (moDCs); most potent antigen presenting cell (APC).

Methods: Immature and mature monocyte-derived dendritic cell (im, mMoDC)s were generated from peripheral blood monocyte (PBMC) in Opti-MEM culture medium supplemented with IL-4, GM-CSF and cocktail, consisting of TNF- α (10 ng/mL), IL-1 β (10 ng/mL), IL-6 (1,000 U/mL) and PGE₂ (1 μ /mL). Various concentrations of gefitinib also added on day 6 to see the influence on immature and mature MoDCs. Immunophenotyping of DCs under the gefitinib was performed by using monoclonal antibodies (CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, HLA-DR). Supernatant IL-12 production and apoptosis of DCs was evaluated. And MLR assay with [³H]-thymidine uptake assay was done.

Results: Expression of CD83, MHC I were decreased in mMoDCs and MHC I was decreased in imMoDCs under gefitinib. IL-12 production from mMoDCs was decreased under 10 μ M of gefitinib significantly. Differences of T cell proliferation capacity were not observed in each concentration of gefitinib.

Conclusion: In spite of decreased expressions of some dendritic cell surface molecules and IL-12 production under 10 μ M of gefitinib, significant negative influences of gefitinib in antigen presenting capacity and T cell stimulation were not observed.

Key Words: Dendritic cells; gefitinib; Interleukin-12; Apoptosis

서 론

폐암은 전세계적으로 연간 100만 명 이상이 사망하는 주요한 암사망 원인의 하나이다¹. 폐암은 수술, 항암치료,

방사선치료를 포함하는 다학제적 접근을 통해 치료하지만 임상적 결과는 저조하여 수술적 제거가 가능한 국소성 비소세포폐암에서도 재발이 흔하며 수술적 치료가 불가능한 진행성 비소세포폐암에서는 적극적 항암 및 방사선 치료에도 불구하고 5년 생존률은 25%를 넘지 못한다^{2,3}.

전통적 항암 화학약제는 세포의 RNA, DNA의 합성을 억제하거나 microtubules을 안정화하거나 파괴하는 작용 기전을 가지고 있어 조혈간세포에 억제적으로 작용하며 림프구를 고갈시키거나 T세포와 NK세포의 증식과 활성화를 억제하여 인체의 면역기능에 부정적 영향을 미칠 것으로 생각되었다². 그러나, 최근 암 분자면역학의 발전은,

Address for correspondence: Min Ki Lee, M.D.
Department of Internal Medicine, Pusan National University School of Medicine, 1-10, Ami-dong, Suh-gu, Busan 602-739, Korea
Phone: 82-51-240-7216, Fax: 82-51-254-3127
E-mail: leemk@pusan.ac.kr

Received: Oct, 28, 2010

Accepted: Dec, 16, 2010

기존의 항암화학약제가 종양의 면역원성(immunogenicity)을 높여주어 오히려 치료적 상승효과를 보인다는 결과들을 보여 줌으로써 복합 화학 면역치료에 대한 긍정적 시각을 갖게 하였다^{3,6}.

최근에 항암 면역치료와 같은 새로운 치료법에 대한 연구가 적극적으로 이루어짐에 따라 종양을 퇴행시키는 특이적이고 효과적인 면역반응을 이끌어내기 위한 노력들은 종양 세포주 또는 종양 세포 용해질(lysate)을 부가하거나 종양 특이 항원을 발현하도록 유전자를 이입(transfection)한 수지상세포 등을 이용한 연구들과 항암면역반응을 유도하는 사이토카인인 GM-CSF를 발현하는 유전자를 이입한 종양세포를 투여한 연구로 이어져 왔다⁷⁻¹². 하지만 현재까지 폐암 영역에 있어서 면역치료는 종양 특이 항원 반응은 확인하였으나 치료적 효과를 보여 주기에는 미흡하며, 복합 화학 면역치료와 같이 면역치료의 효과를 극대화하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다¹³⁻¹⁶.

복합 화학 면역치료 연구에 적용된 항암제는 대상 암종에 따라 다르지만 paclitaxel¹⁷, cyclophosphamide¹⁸, docetaxel¹⁹, doxorubicine²⁰, gemcitabine^{21,22} 등의 다양한 약제가 있으며, 주로 세포독성 화학치료(cytotoxic chemotherapy)약제와 면역치료의 병용에 대한 연구들이 진행되었고 현재까지 표적치료제와의 병용치료에 대한 연구는 없었다. 근래 진행된 폐암환자의 2, 3차 항암요법으로서 gefitinib이나 erlotinib같은 표적치료약물들은 고무적인 효과를 보였으며 비교적 세포독성이 적은 것으로 알려진 새로운 표적치료약물을 적용한 복합 화학 면역치료를 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Gefitinib은 약제명이 ZD1839이며, [4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-7-methoxy-6(3morpholinopropoxy)quinazolin]의 화학구조식을 가지고 있는 선택적 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR) 티로신 활성효소 억제제(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)로 세포주기 정지와 세포자멸사(apoptosis)를 유도하여 항암효과를 나타내며 EGFR의 돌연변이를 가진 비소세포폐암 환자에게 탁월한 효과를 보이는 약제이다^{23,24}.

본 연구는 진행된 비소세포폐암 환자에 투여되는 EGFR TKIs의 하나인 gefitinib에 주목하여²⁵⁻²⁷, gefitinib이 수지상세포에 줄 수 있는 변화를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. Gefitinib

Gefitinib의 임상적 상용량에서 최대 혈장농도는 0.5~1 μ M이며²⁶, dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해하여 0, 0.1, 1, 10 μ M의 세가지 농도로 실험을 진행하였다. Gefitinib은 아스트라제네카사(Seoul, Korea)를 통해 제공 받았다.

2. 말초혈액 유래 수지상세포

자발적 채혈에 동의한 건강한 지원자 7명의 상완정맥에서 얻은 말초혈액을 헤파린튜브에 채취한 후 이 중 전혈 15 mL를 Hanks' balanced salt solution 15 mL가 담겨진 원심분리튜브에 희석한 후 Ficoll-Paque PLUS (Sigma-Aldrich) 15 mL를 희석된 전혈의 하층에 주입한 후 1,500 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 백혈구층을 다시 Hanks' balanced salt solution으로 세척하여 단핵구를 분리하였다. 얻어진 단핵구를 1×10^7 cells/mL의 농도로 penicillin/streptomycin (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)이 첨가된 Opti-MEM (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배양액이 담겨진 100 mm 플라스틱 페트리 접시에 놓은 후 37°C로 가습된 5% CO₂ 배양기에서 1시간 동안 배양하였다. 비부착 세포들은 phosphated buffered saline (PBS)로 세척한 후 부착된 세포들만 단핵구로 이용하였다. 부착된 단핵구가 담긴 페트리 접시에 동일한 배양액과 100 ng/mL recombinant human GM-CSF, 10 ng/mL recombinant human IL-4 (R&D Systems), 10% fetal calf serum (FCS)을 첨가하였으며 GM-CSF와 IL-4가 첨가된 동일한 배양액을 둘째날과 넷째날에 갈아 주었다. 6일째에 비 부착세포와 느슨히 부착된 세포들을 수확하여 얻어진 미성숙 수지상세포들을 1×10^6 cells/mL 농도로 12 well culture plate에 옮겨 담았다. 이 때 0.1, 1, 10 μ M의 세 가지 농도로 준비된 gefitinib을 첨가하였으며 일부는 수지상세포의 성숙을 유도하고자 TNF- α (10 ng/mL, R&D Systems), IL-1 β (10 ng/mL, R&D Systems), IL-6 (1,000 U/mL, R&D Systems), PGE₂ (1 μ /mL, Sigma)의 혼합물을 첨가한 후 24시간 동안 더 배양하였다. 성숙 수지상세포는 7일째 수확하였다.

3. MTT assay

수지상세포에 대한 gefitinib의 half maximal inhibitory concentration (IC₅₀)을 확인하기 위하여 1×10⁵ cells/well의 미성숙 수지상세포를 이용하여 CellQuanti-MTT Cell Viability Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)로 시행하였으며 각각 독립적인 3회의 실험을 통한 평균값으로 결과를 얻었다.

4. 유세포 분석

Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated monoclonal Abs for CD80, CD86, HLA-ABC (MHC I), HLA-DR (MHC II)와 phycoerythrin (PE) conjugated monoclonal Abs for CD11c, CD14, CD83 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 이용하여 7일째 PBS containing 0.5% bovine serum albumin (PBS/BSA)으로 세척한 수지상세포를 1시간 동안 염색하였다. 염색된 세포는 다시 세척한 후 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA)과 CellQuest software를 이용하여 분석하였다.

5. 상층액 IL-12 측정

7일째 각 well의 배양 상층액을 모아 실험 때까지 영하 70°C 이하에서 동결 보관하였다. Human IL-12 Quantikine HS ELISA kit (R&D Systems; Abingdon, United Kingdom)를 이용하여 제작자의 매뉴얼에 따라 standard sandwich ELISA로 IL-12 heterodimer (p70)을 측정하였다.

6. 수지상세포의 세포자멸사 평가

수지상세포에서 세포자멸사의 평가는 Annexin V-FITC Apoptosis Detection KIT I (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 제작자의 매뉴얼에 따라 진행하여 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson)와 Cell Quest software를 이용하여 분석하였다.

7. 혼합림프구 반응(Mixed lymphocyte reaction, MLR) 검사

96 well round bottom culture plate에 방사선 처리된 수지상세포(S, stimulator)와 10⁵ cells/well의 Nylon wool-passed T세포(R, Responder)를 S : R비가 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1,000이 되도록 넣어 함께 배양하였다. 4일 후 각 well에 1 μCi/mL of [³H]-thymidine을 첨가한 후 16시간 뒤 liquid scintillation counter (Beckman Coulter, Palo Alto, Calif., USA)를 이용하여 [³H]-thymidine uptake를 측정하였다. [³H]-thymidine uptake는 7 well의 평균값으로 나타내었다.

8. 통계처리

T세포 증식 실험(T cell proliferation assay, MLR Assay)은 성숙, 미성숙 수지상 세포로 나눈 후 gefitinib의 농도에 따라 분류하여 분석하였다. 통계적 분석은 한글판 SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 통계 패키지를 이용하였으며, 두 변수의 비교에는 독립표본 t 검정을 하였고 세 변수 이상의 비교에는 일원배치 분산분석을 하였으며 IL-12와 gefitinib의 상관계수를 구하였다. 실험 결과의 통계학적 유의성은 p값이 0.05 미만일 때 의미 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. MTT assay

건강한 자원자 2인으로부터 말초혈액을 채취하여 미성숙 상태의 수지상 세포를 대상으로 시행하였으며 IC₅₀은 25 μM 이상이었다(Table 1). 문헌을 통해 임상적 용량의 gefitinib을 투여할 때 최고 혈장 농도가 0.5~1 μM임을 감안하여 gefitinib의 약물 농도를 0, 0.1, 1, 10 μM 조건에서 시행하였다²³.

Table 1. MTT assay. Cell survival rates are 52% and 53.8% in the 25 μM of gefitinib

DC source	Concentration of gefitinib					
	Control	0.1 μM	1 μM	10 μM	25 μM	50 μM
A	0.5837 (100)	0.5430 (93.0)	0.5227 (89.5)	0.4250 (72.8)	0.3033 (52.0)	0.1233 (21.1)
B	0.5060 (100)	0.5207 (102.9)	0.5170 (102.2)	0.4713 (93.1)	0.2720 (53.8)	0.1665 (32.9)

Values in parenthesis are cell survival rate (%).
DC: dendritic cell.

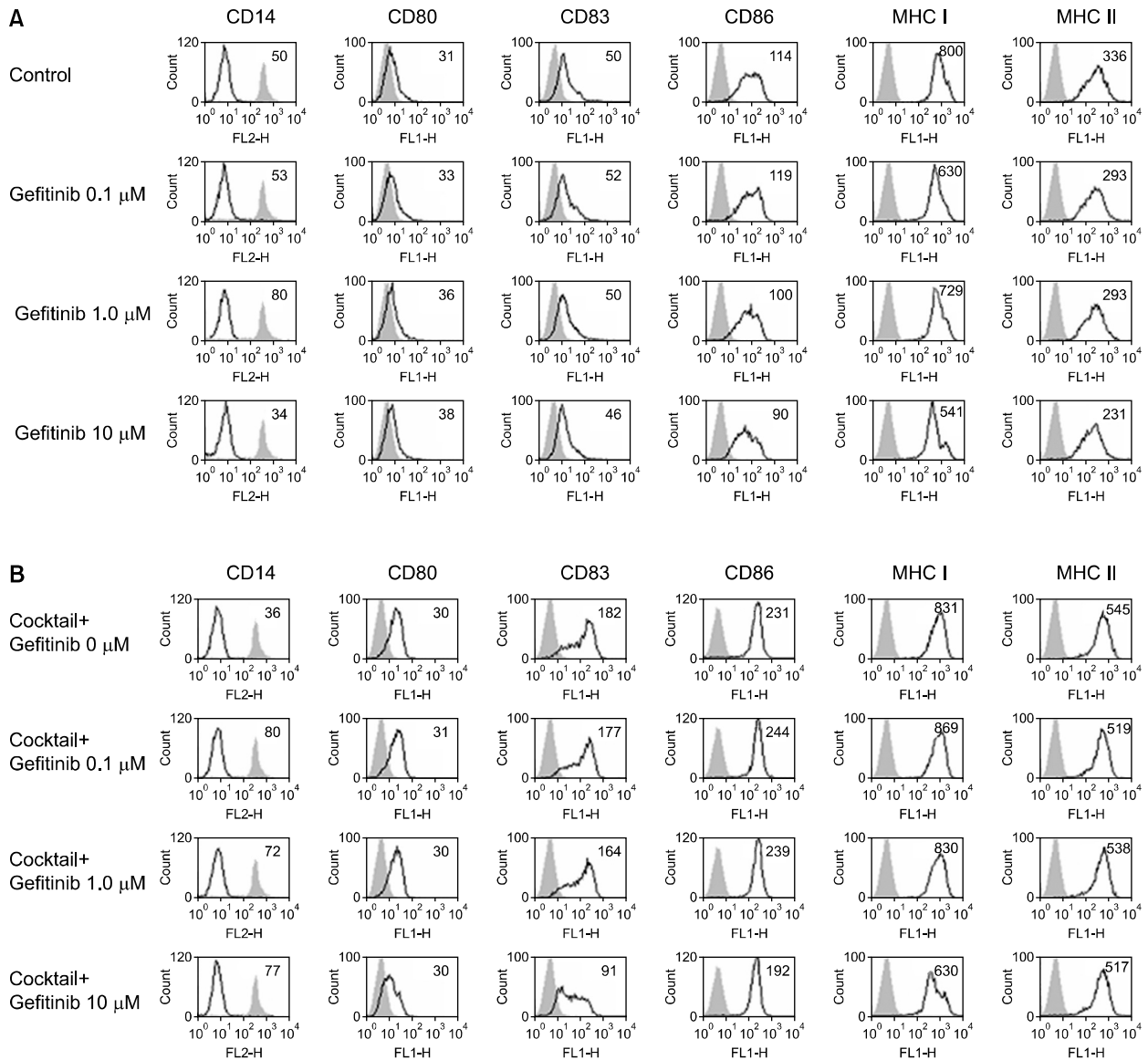


Figure 1. Expression of cell surface markers before and after gefitinib treatment. CD14, CD80, CD83, CD86, MHC I and MHC II of mature monocyte-derived dendritic cells (A) and immature monocyte-derived dendritic cells (B). Grey histogram indicates the negative control staining and the number in each box represents mean fluorescence intensity (MFI).

2. Gefitinib 투여 후 수지상세포의 표면항원 발현

Gefitinib의 투여에 따른 CD80, CD83, CD86, MHC I, MHC II의 표면항원 발현정도는 gefitinib을 투여하지 않은 대조군과 비교할 때, 미성숙 수지상세포의 경우에는 CD80, CD83, CD86, MHC II의 표면항원 발현변화는 없었으며 MHC I의 mean fluorescence intensity (MFI)의 감소가 gefitinib 0.1 μ M 투여군에서 관찰되었으나 이후 농도 증가에 따른 차이는 없었다(Figure 1). 성숙 수지상세포의

경우에는 CD83과 CD86의 MFI가 gefitinib 1 μ M 투여군에서부터 감소되었으나 CD80, CD86, MHC I, MHC II의 표면항원 발현의 변화는 없었다.

3. Gefitinib의 투여에 따른 IL-12 생성

Th1 세포의 분화, 증식을 통한 세포매개성 면역반응에 중요한 생체적 활성 형태의 IL-12p70을 측정하였다. 미성숙 수지상세포의 경우 모든 gefitinib 농도에서 낮은 IL-12 생성능력을 보였으며 성숙 수지상세포의 경우 미성숙 수

지상세포와 비교할 때 뚜렷한 생성증가를 보였다. 성숙 수지상세포에서는 gefitinib의 농도가 증가함에 따라 IL-12가 감소하는 경향이 관찰되었고($R^2=0.273$, $p=0.004$), 10 μM 의 농도에서는 gefitinib 0, 0.1, 1 μM 과 비교할 때 의미 있는 감소를 보였다($p=0.036$) (Figure 2).

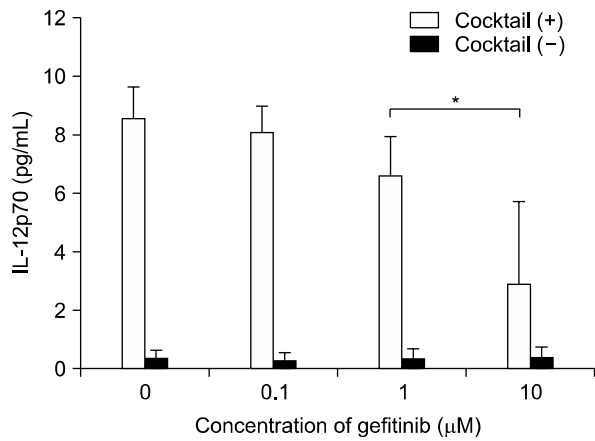


Figure 2. IL-12 in supernatant of dendritic cells under various circumstance. IL-12 secretion of mature monocyte-derived dendritic cells shows decreasing tendency as increasing concentration of gefitinib. * $p=0.036$.

4. 수지상세포의 세포자멸사

Annexin V-FITC 검사에서 gefitinib 10 μM 에서 세포자멸사가 증가하였으나 미성숙 수지상세포의 경우 88.63%, 성숙 수지상세포의 경우 89.39%가 생존하여 많은 세포가

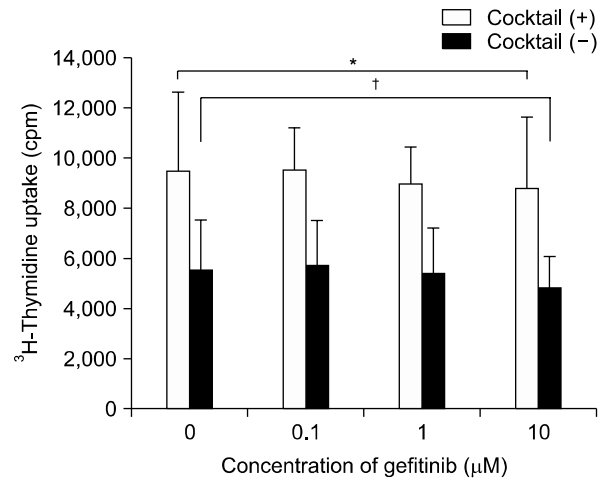


Figure 4. Mixed lymphocyte reaction assay. Irradiated DCs (10^4 cells/well) are cocultured with nylon wool-passed T cell (10^5 cells/well) ie, S : R=1 : 10. [^3H]-thymidine uptake is represented as counts per minute (CPM) with seven wells from each seven donors. * $p=0.924$, $^\dagger p=0.684$.

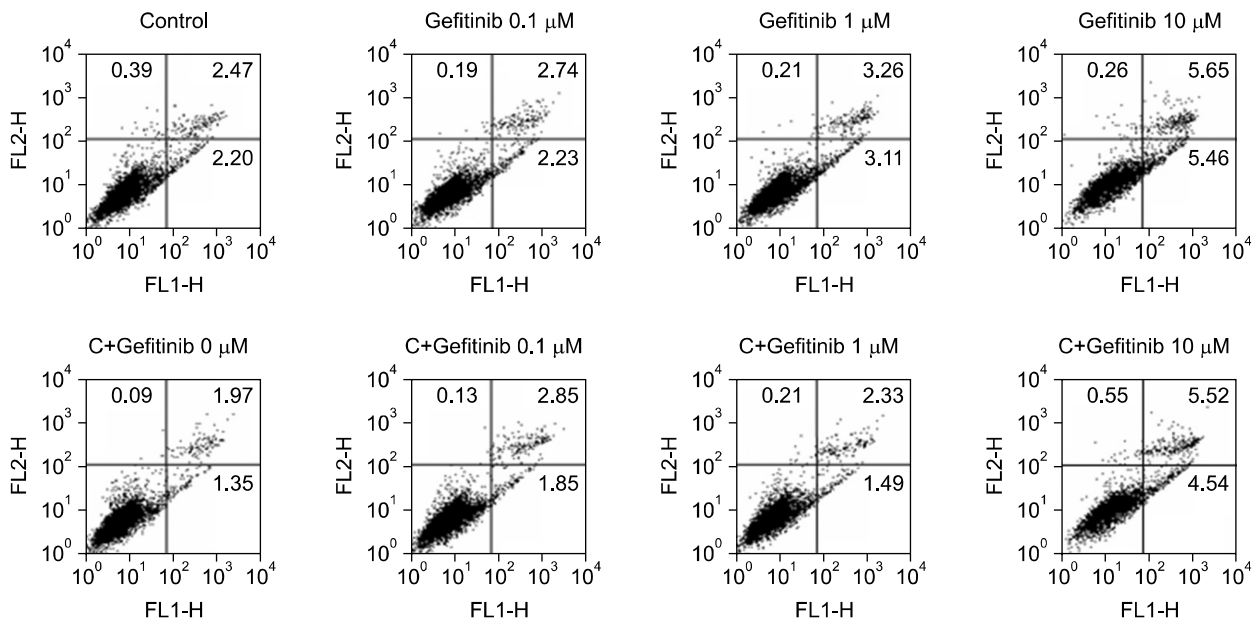


Figure 3. Apoptosis of monocyte-derived dendritic cells under the various concentration of gefitinib. The right two quadrants represent the apoptotic non-viable cells, positive for FITC-Annexin V binding. C: cocktail.

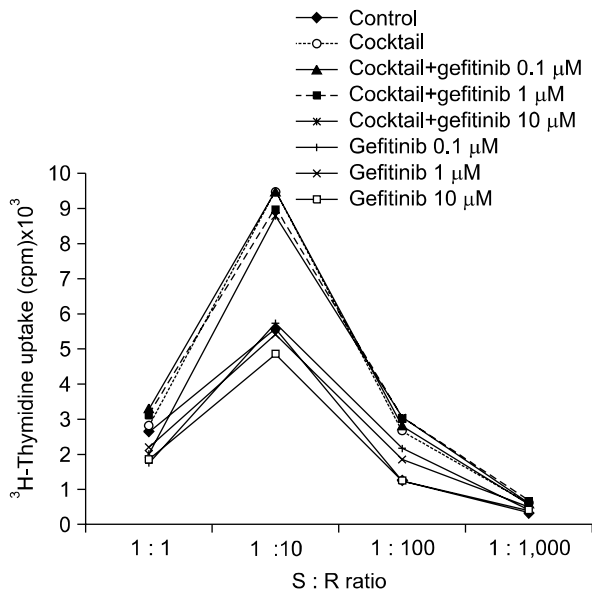


Figure 5. Mixed lymphocyte reaction assay. The most striking increase of [³H]-thymidine uptake is shown in the ratio dendritic cell : T cell=1 : 10, S : R ratio rather than maturation status of dendritic cells exerts more profound influence on [³H]-thymidine uptake.

gefitinib 10 μM의 환경에서도 생존하였다(Figure 3).

5. Gefitinib 투여 후 T세포 증식능의 변화

성숙 수지상세포에서 투여된 gefitinib의 농도에 따른 T세포의 증식능에는 차이가 없었으며 이러한 양상은 미성숙 수지상세포에서도 동일하게 관찰되었다. 성숙, 미성숙 수지상세포 모두 S : R=1 : 10에서 가장 큰 T세포의 증식능을 보였으며 성숙 수지상세포가 미성숙 수지상세포에 비하여 큰 반응을 보여 주었다(Figure 4, 5).

고 찰

수지상세포는 가장 강력한 항원제시세포로 골수에서 생성되어 말초조직으로 이동하여 세포자멸사(apoptosis) 또는 괴사(necrosis)된 종양세포를 흡입하여 MHC class I, II 분자에 다양한 종양항원 결정인자를 발현하게 하고 종양 특이 CD4+, CD8+ T세포반응을 유도한다²⁸. 이러한 수지상세포를 매개로 한 면역치료를 위한 연구들은 특정 펩티드나 종양세포 또는 종양 용해질을 부가(pulsed)하여 종양항원 특이 T세포반응을 유도하고자 하는 연구와 GM-CSF와 같은 사이토카인을 투여하여 면역반응을 높이는 방법, 반대로 CD4+CD25+ 조절 T세포를 억제하거

나 고갈시켜 면역관용을 회피하는 방법으로 연구되었으며 면역억제 사이토카인으로 분류되는 TGF-β, IL-10, IL-13의 차단제를 투여하는 방법, CTLA-4 분자에 대한 단클론 항체를 투여하여 효과를 높이고자 하는 실험도 있었다^{29,30}. Choi 등¹⁷은 생쥐의 섬유육종 모델에서 전신적 paclitaxel 항암요법과 종양 내 수지상세포를 주사하는 방법으로 종양소실을 보인 동물실험 결과를 발표하였는데, 이 실험에서는 확장된 면역반응을 확인하기 위해 종양소실 이후 같은 종양세포를 피하주사하여도 투여된 종양세포까지 완전소실되는 결과를 보였다. 이들은 투여된 항암제에 의해 사멸된 종양세포로부터 유리된 종양항원이 수지상세포로 제시된 효과가 큰 면역반응을 보인 것으로 생각하였다. 이러한 복합치료 방법은 종양 특이 면역반응을 유도하기 위해 특이 종양세포나 펩타이드 또는 이를 발현하는 유전자를 이입하는 방법이 아니라 분화 유도된 수지상세포만으로 복합 화학 면역치료에서 적절한 면역반응을 보일 수 있는 예시가 된다고 하겠다. 이러한 노력에도 불구하고 최근 호르몬치료를 반응하지 않는 전립선암 환자를 대상으로 한 GVAX의 3상 시험이 docetaxel + prednisone 그룹보다 많은 사망자로 인해 중단되는 등 실제적 종양의 퇴행을 유도하기에는 현재 면역치료를 임상적 효과는 아직은 미흡한 결과를 보여주고 있다³⁰.

항암제와 면역치료가 상승효과를 일으키는 기전으로 항암제가 첫째, 다양하고 많은 종양항원을 제시하게 하며 둘째, 교차항원 제시를 증가시키거나 부분적으로 수지상세포를 활성화하여 항원제시능을 높이며 셋째, 억제 림프구(조절 T세포)를 고갈시켜 면역관용을 회피하며 넷째, 종양 내 T세포가 축적되도록 하며 다섯째, T세포의 감작을 유도하고 여섯째, 기억 T세포 생성을 유도하는 것으로 설명되며 연구자들은 복합 화학 면역치료를 발전 가능한 새로운 치료법으로 기대하였다³.

Gefitinib은 주로 단독 경구요법으로 1차 또는 2차 항암요법에 실패한 비소세포폐암 환자에 투여되는 약제로 일 반적인 세포독성을 보이는 항암제와는 다른 표적치료제 로써 복합 화학 면역치료를 우선 고려할 수 있는 항암제라고 하겠다²⁵⁻²⁷.

본 연구는 gefitinib에 노출된 수지상세포에 미치는 면역반응에 대한 영향을 확인하고자 시행되었다. 이를 위해 인간 단핵구로부터 수지상세포의 분화 성숙을 유도하였으며 유도된 수지상세포는 유세포분석기를 이용하여 면역표현형을 확인하였다. 배양 7일째 수확한 세포에서 CD14의 발현이 감소하고 CD80, CD83의 발현이 약간 증

가하며 CD86, MHC I, II의 발현이 증가하였고, 배양 6일째 세포성숙을 유도하기 위해 TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂ 포함된 혼합물을 첨가하여 배양 7일째 수확한 세포에서는 CD14의 발현은 감소하고 CD83, CD86, MHC I, II 발현이 더욱 증가된 성숙 수지상세포의 전형적 면역 표현형을 보였다(Figure 1).

수지상세포는 사멸종양 세포를 함입(gulping)하고 MHC class I, II complex를 형성하여 세포표면으로 직접(direct) 또는 교차(cross) 제시한 후 세포표면 costimulatory molecules과 함께 T세포와 결합하여 활성화, 증식을 일으킨다. 본 연구에서 gefitinib 투여 시 관찰된 MHC I, CD83의 발현저하와 T세포 활성화 및 Th1 면역반응 유도에 있어 필수적인 IL-12의 분비능의 감소는 고농도의 gefitinib 환경에서 수지상세포의 종양 항원 제시능의 감소와 T세포의 활성화 및 증식능의 감소를 초래할 개연성이 있는 것으로 여겨진다. 하지만 T세포의 증식능을 알아본 [³H]-thymidine uptake assay에서는 gefitinib 10 μ M의 농도에서 증식능의 감소가 없었으며 각 S : R비에서 gefitinib의 농도에 따른 증식능의 차이도 관찰되지 않았다. 오히려 S : R비에 따른 T세포 증식능의 차이가 크게 나타나 S : R=1 : 10을 제외한 다른 농도에서는 매우 감소되어 나타났다. 이러한 결과는 비록 gefitinib이 수지상세포 표면분자의 발현에 일부 영향을 주기는 하지만 effector cells로의 항원 제시능과 증식능 유도에 있어 의미있는 감소를 일으키지 않음을 보여준다고 하겠다. 실제 T세포의 증식능에 미치는 영향은 항암제의 농도보다 투여되는 수지상세포의 양이 면역반응의 결정인자가 될 수 있음을 보여주었다. Gefitinib에 노출된 수지상세포를 이용한 비특이적 T세포 반응은 의미있는 억제효과 없이 유도되었다.

본 연구에서 실험농도 결정을 위해 시행한 말초혈액 단핵구 유래 수지상세포에 대한 gefitinib의 IC₅₀은 25 μ M 이상으로 결정되었으며 비소세포폐암 세포주에 대한 실험농도에^{31,32} 비해 수지상세포의 IC₅₀은 적어도 2배 이상 높은 것으로 나타나 단핵구 유래 수지상세포의 생존에 미치는 gefitinib의 영향은 적을 것으로 생각되었으며 이러한 사실은 세포자멸사를 확인한 Annexin V-FITC 실험에서도 gefitinib 10 μ M 에서 89% 이상의 수지상세포가 생존하여 일치된 결과를 보여 주었다(Figure 3).

본 연구는 기존의 세포독성 화학치료약제와는 다른 EGFR TKIs의 하나인 gefitinib을 이용한 복합 화학 면역치료의 가능성을 살펴본 연구라는 점에서 그 의미가 있다고 하겠으며 gefitinib이 수지상세포의 표면항원 발현과 세포

자멸사 유도에 미치는 영향이 미미하다는 점과 IL-12 생성 감소가 있었으나 비 특이 T세포의 면역반응 유도에 미치는 영향이 없다는 결과를 보여 주었다. 본 연구는 정상인의 단핵구를 이용하였으며 암환자와의 면역환경이 다르기 때문에 연구 결과를 그대로 적용할 수 없다는 제한점이 있다. 그러므로, 향후 암환자에게서 유도된 수지상세포를 이용한 보완된 연구가 필요하며, 비소세포폐암 세포주를 대상으로 한 gefitinib이 수지상세포의 종양 특이 면역반응에 미치는 영향을 확인하는 연구도 더 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

This study was supported by Medical Research institute Grant (2005-54), Pusan National University Hospital.

참 고 문 헌

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
2. Emens LA, Machiels JP, Reilly RT, Jaffee EM. Chemotherapy: friend or foe to cancer vaccines? *Curr Opin Mol Ther* 2001;3:77-84.
3. Lake RA, Robinson BW. Immunotherapy and chemotherapy—a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 2005;5:397-405.
4. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:59-73.
5. Ménard C, Martin F, Apetoh L, Bouyer F, Ghiringhelli F. Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:1579-87.
6. Haynes NM, van der Most RG, Lake RA, Smyth MJ. Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Curr Opin Immunol* 2008;20:545-57.
7. Slingluff CL Jr, Engelhard VH, Ferrone S. Peptide and dendritic cell vaccines. *Clin Cancer Res* 2006;12:2342s-5s.
8. Nemunaitis J, Serman D, Jablons D, Smith JW 2nd, Fox B, Maples P, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:326-31.
9. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lysterly 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;82:121-4.
10. Itoh T, Ueda Y, Kawashima I, Nukaya I, Fujiwara H, Fuji N, et al. Immunotherapy of solid cancer using dendritic cells pulsed with the HLA-A24-restricted peptide of carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:99-106.
 11. Ueda Y, Itoh T, Nukaya I, Kawashima I, Okugawa K, Yano Y, et al. Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2004;24:909-17.
 12. Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, Hanaoka J, Sawai S, Inoue S, et al. Dendritic cell vaccine immunotherapy of cancer targeting MUC1 mucin. *Int J Mol Med* 2003;12:493-502.
 13. Belardelli F, Ferrantini M, Parmiani G, Schlom J, Garaci E. International meeting on cancer vaccines: how can we enhance efficacy of therapeutic vaccines? *Cancer Res* 2004;64:6827-30.
 14. O'Mahony D, Kummar S, Gutierrez ME. Non-small-cell lung cancer vaccine therapy: a concise review. *J Clin Oncol* 2005;23:9022-8.
 15. Antonia SJ, Mirza N, Fricke I, Chiappori A, Thompson P, Williams N, et al. Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:878-87.
 16. Nowak AK, Lake RA, Robinson BW. Combined chem-immunotherapy of solid tumours: improving vaccines? *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:975-90.
 17. Choi GS, Lee MH, Kim SK, Kim CS, Lee HS, Im MW, et al. Combined treatment of an intratumoral injection of dendritic cells and systemic chemotherapy (paclitaxel) for murine fibrosarcoma. *Yonsei Med J* 2005;46:835-842.
 18. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004;34:336-44.
 19. Nakashima H, Tasaki A, Kubo M, Kuroki H, Matsumoto K, Tanaka M, et al. Effects of docetaxel on antigen presentation-related functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55:479-87.
 20. Casati A, Zimmermann VS, Benigni F, Bertilaccio MT, Bellone M, Mondino A. The immunogenicity of dendritic cell-based vaccines is not hampered by doxorubicin and melphalan administration. *J Immunol* 2005;174:3317-25.
 21. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res* 2003;63:4490-6.
 22. Correale P, Cusi MG, Del Vecchio MT, Aquino A, Prete SP, Tsang KY, et al. Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific CTL response with antitumor activity in vitro. *J Immunol* 2005;175:820-8.
 23. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD Jr, Morse D, et al. United states food and drug administration drug approval summary: gefitinib (ZD 1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res* 2004;10:1212-8.
 24. Rosell R, Viteri S, Molina MA, Benlloch S, Taron M. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as first-line treatment in advanced nonsmall-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2010;22:112-20.
 25. Chang A, Parikh P, Thongprasert S, Tan EH, Perng RP, Ganson D, et al. Gefitinib (IRESSA) in patients of Asian origin with refractory advanced non-small cell lung cancer: subset analysis from the ISEL study. *J Thorac Oncol* 2006;1:847-55.
 26. Kim ES, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, Wu YL, Li LY, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet* 2008;372:1809-18.
 27. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57.
 28. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
 29. Palucka AK, Ueno H, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells: a critical player in cancer therapy? *J Immunother* 2008;31:793-805.
 30. Fujii S, Takayama T, Asakura M, Aki K, Fujimoto K, Shimizu K. Dendritic cell-based cancer immunotherapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009;57:189-98.
 31. Choi YJ, Rho JK, Jeon BS, Choi SJ, Park SC, Lee SS, et al. Combined inhibition of IGFR enhances the effects

JH Cho et al: The effect of gefitinib on human dendritic cell

of gefitinib in H1650: a lung cancer cell line with EGFR mutation and primary resistance to EGFR-TK inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;66:381-8.

32. Puri N, Salgia R. Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. *J Carcinog* 2008;7:9.