

## 결장암에 대한 활성화 자연살해세포의 항암효능

성혜란\* · 김지연 · 박민경 · 김일희 · 이동욱 · 한상배 · 이종길 · 송석길#

충북대학교 약학대학, \*Moffitt Cancer Center and Research Institute  
(Received May 10, 2010; Revised May 18, 2010; Accepted May 18, 2010)

### Anticancer Effect of Activated Natural Killer Cells on Human Colorectal Tumor

Hyeran Sung\*, Jee Youn Kim, Min Gyeong Park, Il-Hoi Kim, Dong Wook Lee,  
Sang-Bae Han, Chong-Kil Lee and Sukgil Song#

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

\*Department of Comprehensive Melanoma Research Center (CMRC),

H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, 12902 Magnolia Drive, Tampa, Florida 33612

**Abstract** — Colorectal cancer is one of the most common alimentary malignancies. In this study, the antitumor activity of activated human natural killer (NK) cells against human colorectal cancer was evaluated *in vivo*. Human NK cells are the key contributors of innate immune response and the effective functions of these cells are enhanced by cytokines. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured with interleukin-2 (IL-2)-containing medium for 14 days and resulted in enriched NK cell population. The resulting populations of the cells comprised 7% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells, 25% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells, 13% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells, 4% CD3<sup>+</sup>CD16/CD56<sup>+</sup> cells, 39% CD3<sup>+</sup>CD16/CD56<sup>-</sup> cells, and 52% CD3<sup>+</sup>CD16/CD56<sup>+</sup> cells. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-2, IL-4, and IL-5 transcripts of the activated NK cells were confirmed by RT-PCR. In addition, activated NK cells at doses of 2.5, 5 and 10 million cells per mouse inhibited 10%, 34% and 47% of SW620-induced tumor growth in nude mouse xenograft assays, respectively. This study suggests that NK cell-based immunotherapy may be used as an adoptive immunotherapy for colorectal cancer patients.

**Keywords** □ natural killer cells, adoptive immunotherapy, SW620 colorectal cancer

결장암(Colon cancer)은 남녀 모두에게 흔히 발병하는 악성종양으로써 암 사망률3위에 해당된다.<sup>1,2)</sup> 결장암의 발생은 개발도상국과 선진국 모두 과거에 비해 증가하는 추세이며, 소화계에 새로이 진단되는 암 중 40%를 차지한다고 보고되었다.<sup>2)</sup> 결장암은 수술 및 보조 화학 요법으로 치료한다.<sup>3)</sup> 이러한 치료법이 확실히 암 치료의 향상에 도움을 주지만, 2기 혹은 3기의 결장암 환자의 경우 치료 3년 내에 재발하거나 전이가 발생한다.<sup>4)</sup> 사망자의 대부분이 간과 같은 기관으로의 전이가 발생하였으며, 이는 암환자 사망 원인 중 50%에 해당된다.<sup>5-7)</sup> 결장암 환자의 생존율을 높이기 위해서는 효과적인 대체 보조 요법에 대한 개발이 절실하다. 면역요법은 기존의 화학요법제인 항암제가 가졌던 독성 문제를 해결하고 암세포에 특이적으로 작용하며, 전이된 암

세포까지의 치료가 가능하다는 장점을 갖고 있어 새로운 치료 방법으로 부각되고 있다.

자연살해세포(NK cell)는 세포 독성 림프구로서 자극이나 면역억제(예방주사)없이 바이러스 감염 세포나 종양세포를 용해시키며,<sup>8)</sup> 표적에 대하여 직접으로 세포독성을 나타내거나, 세포매개형 세포 독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), Th1-type cytokine의 분비, 대식세포(DCs)와의 상호작용과 같은 다양한 매커니즘으로 조절된다. 일단 자연살해세포(NK cell)가 활성화되면, 이들은 perforin 및 granzyme 같은 세포독성과립을 분비하거나, TRIAL 혹은 FasL 그리고 Th1-type cytokine, chemokine 같은 세포사멸 유도인자를 발현시켜 표적 세포에게 손상을 입힌다. 또한, 자연살해세포(NK cell)의 세포독성활성은 세포표면의 수용체의 활성화와 억제 신호로 조절 된다. 자연살해세포의 활성을 억제하는 대표적인 수용체로는 inhibitory killer immunoglobulin-like receptors(KIRs)가 있다. 표적세포에게서 self-MHC class I분자 인식이 이루어지면, 이러한 수용체

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 043-261-2817 (팩스) 043-268-2732  
(E-mail) songs@chungbuk.ac.kr

들이 억제 신호를 전달하여 활성화 신호를 중지시키고, 자연살해세포의 용해와 매개된 normal MHC class I 발현한다. 활성화 수용체들로는 natural cytotoxicity receptors(NCRs)와 NKG2D가 포함되며, 표적 세포 표면의 리간드로 분산되어 세포독성에 대해 균형을 이룬다.<sup>9,10)</sup> 자연살해세포의 역할은 부분적으로 낮은 수준의 MHC class I 분자의 발현하는 종양에 대한 보조 면역치료법으로의 사용의 가능성을 보였다.<sup>11)</sup>

이 연구를 통하여 인간 결장암에 대한 활성화된 자연살해세포의 항암능력을 시험하였다. 우리는 IL-2를 이용하여 human peripheral blood mononuclear cells 에서 *ex vivo* expansion을 통해 자연살해세포를 세포 수를 증가시키고, phenotype을 결정하였으며 nude mouse xenograft model을 이용하여 NKM의 항암능력을 평가하였다.

## 실험방법

### 세포배양

SW620(ATCC # CCL-227)세포는 51세의 코카시안 남성으로부터 분리되어 확립된 colorectal adenocarcinoma cell로, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin(Invitrogen, CA, USA)를 함유한 RPMI-1640 medium에서 배양하였다. NK세포의 증폭은 건강한 지원자의 말초혈액 단핵세포(peripheral mononuclear cells, PBMC)로 만들어졌다. 지원자에게는 사전의 충분한 설명과 자유의사에 의한 동의를 거친 후, heparin과 함께 40 ml의 혈액을 채취하였다. 말초혈액 단핵세포는 buffy coats를 포함하고 있기 때문에 Ficoll-Hypaque density centrifugation분리법과 PBS를 이용하여 세척하였다. 세척 후, 5% human serum(Biowhittaker-Cambrex, Walkersville, MD)가 함유된 Lymphomedia로  $1 \times 10^6$  cells/ml로 현탁하였으며, 고정화시킨 anti-CD3 antibody(OKT-3 10 ng/ml; BD Pharmingen, NJ, USA)와 recombinant human IL-2(Proleukin 500 U/ml, Chiron, Emeryville, CA, USA) 함께 5일 동안 배양하였다. 5일 배양 후 OKT-3를 함유한 배지를 버리고, rhIL-2(500 U/ml)와 5% human serum이 함유된 새로운 배지로 교체한 뒤, rhIL-2가 함유된 배지로 매 배양주기 때마다 보충하여 준다. 배양 주기 동안 세포수는 약  $1 \times 10^6$  cells/mm를 유지하도록 한다. 이와 같은 배양 과정을 통해 얻은 세포의 생존률은 14일 배양 후 73%로 확인되었다.

### 세포 표현형 분석

인간항체인 anti-CD3-FITC/CD16+CD56-PE, anti-CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP(BD Biosciences, CA, USA)를 이용하여 enriched NK세포의 표현형을 분석하였다. 약  $1 \times 10^6$  cells를 1% bovine serum albumin(BSA)를 첨가한 PBS/BSA buffer로 한번 세척한 후, PBS/BSA buffer 100  $\mu$ l안에 현탁시켰다. 이들 세포

에 항체를 첨가한 후 4°C에서 20분 동안 반응시킨 후, PBS로 2번 세척하고 400  $\mu$ l의 PBS로 다시 현탁시켜 FACSCanto flow cytometer(BD Biosciences, CA, USA)로 측정하여 WinMDI statistical software(Scripps, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. NKM의 생존률은 FACSCanto flow cytometer(BD Biosciences, CA, USA)을 통해 측정했다. Propidium iodide(PI, 1  $\mu$ g/ml)를 이용하여 세포를 10분간 염색하였으며, PI positive 세포는 죽은 세포로 간주하였다.

### RNA분리 및 RT-PCR에 의한 mRNA 증폭

RT-PCR(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction)은 이 연구에서 사용하였던 활성화된 NKM의 cytokine 발현을 분석하기 위해 진행하였다. 세포는 phytohemagglutinin(PHA; 3  $\mu$ g/ml)에 0, 0.3, 1, 5시간 노출시킨 뒤, TRIZOL™ reagent(Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 얻어낸 total RNA는 AccuPower RT PreMix PCR kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)를 진행하였다. RT-PCR반응은 얻은 cDNA 1  $\mu$ l를 template로 하여, 94°C에서 30초 변성(denaturation), 54°C에서(IL-2, IL-4, IL-5, and  $\beta$ -actin) 혹은 57°C(TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ )에서30초 어닐링(annealing), 72°C에서 30초 신장(extension)의 과정으로 이루어지는 1사이클을 30회 반복 수행하였다(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

PCR반응에 사용된 primer의 염기서열과 증폭산물의 크기는 hIL-2, sense 5'-AACAGTGACCTACTTCAAG-3', antisense 5'-GTTGAGATGATGCTTTGACA-3', 398 bp; hIL-4, sense 5'-TCTCACCTCCCAACTGCTTCC-3', antisense 5'-CGTTTCA-GGAATCGGATCAGC-3', 321 bp; hIL-5, sense 5'-TGCTAC-GTGTATGCCATCCC-3', antisense 5'-CTTGCCCTCATTCTCACTGC-3', 438 bp; hTNF- $\alpha$ , sense 5'-GAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCA-3', antisense 5'-GGCAATGATCCAAAGTAGACCTGCCAGACT-3', 445 bp; hIFN- $\gamma$ , sense 5'-GCATCGTTTTGGGTTCTCTTGCTGTTACTGC-3', antisense 5'-CTCCTTTTTTCGCTTC CCTGTTTTAGCTGCTGG-3', 427 bp; hb-actin, sense 5'-GGGTGAGAAGGA TTCC-TATG-3', antisense 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3', 238 bp이다. Human  $\beta$ -actin은 cDNA 합성의 대조군(control)으로써 PCR을 진행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동을 하여 분석하였다.

### Nude mouse xenograft 분석

Human tumor xenograft 실험을 위해 SLC Japan, Inc에서 생산된 Specific pathogen-free female BALB/c-nu/nu mice(nude

mice)를 사용하였다. Mice는 (6~8 weeks old) 충북대학교 실험 동물연구지원센터의 SPF시설에서 1주일 동안 순화시킨 후 진행하였다. 시험 당일(0 day) SW620을  $2 \times 10^6$  cells/mouse의 농도로 nude mice에 피하 이식하였다. NKM은 1주일에 한번씩(day 0, 7, 14) 2.5, 5,  $10 \times 10^6$  cells/mouse로 정맥 투여하였다. 양성 대조군인 Adriamycin(ADR; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)도 매주 1회씩 총 3회 투여하였다. Tumor volume은 가로(mm)×세로(mm)×높이(mm)/2로 측정하였다. 최종일(16 day)에 종양을 분리한 후 무게를 측정하였다. NKM의 독성을 확인하기 위하여 nude mouse의 체중변화를 측정하였다.<sup>12)</sup>

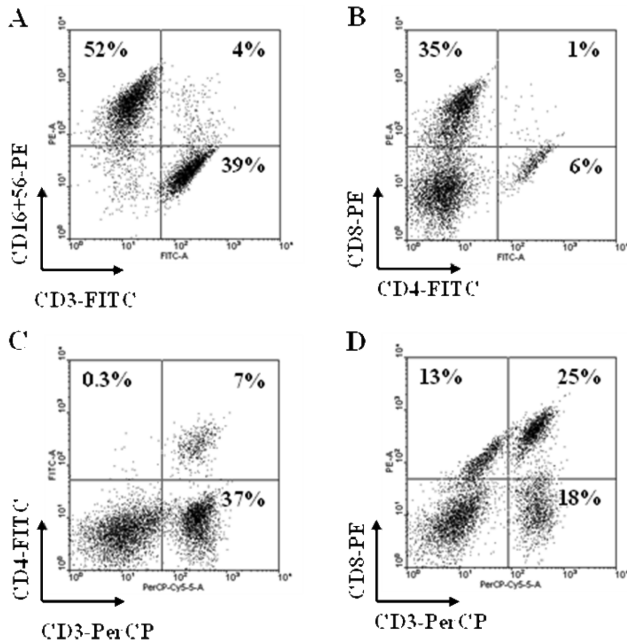
**자료분석 및 통계처리**

*In vivo* 실험결과는 실험 당 9마리 mice를 분석하였으며, *in vitro* 결과는 three samples의 mean values로 나타내었다. 표준편차(SD)와 *p*-values는 Student's *t*-test 및 ANOVA(GraphPad Prism, GraphPad Software, CA, USA)를 사용하여 산출하였다.<sup>13)</sup>

**실험결과**

**Activated human NK cell(NKM)의 표현형**

인간말초혈액에서 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells은 약 5% 이내를 차

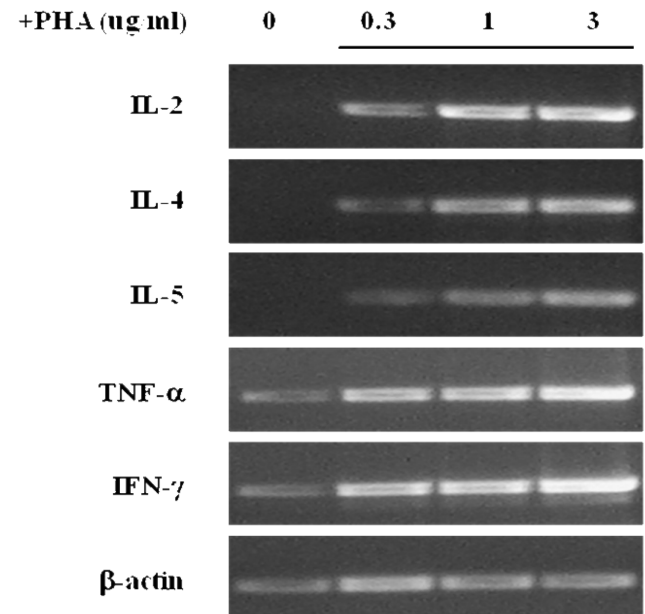


**Fig. 1** – The phenotypic characterization of the activated NK cells, which was used in nude mouse xenograft assay. Human PBMCs were cultured in the presence of IL-2 for 14 days and the resulting NK cell populations were stained with human antibodies, such as anti-CD3-FITC/CD16+CD56-PE (A) and anti-CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP (B, C, and D), followed with FACS analysis.

지하는 것으로 알려져있다. 하지만, IL-2를 함유하는 배지에서 14일 배양 후, 5배 이상의 면역세포의 증가가 나타났다. 배양한 세포를 fluorescence-activated cell sorting(FACS) 분석을 수행하여 NKM의 표현형을 확인하였다. NKM은 7% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells, 25% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells, 13% CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> cells, 4% CD3<sup>+</sup>CD16/CD56<sup>-</sup> cells, 39% CD3<sup>-</sup>CD16/CD56<sup>-</sup> cells, 52% CD3<sup>-</sup>CD16/CD56<sup>+</sup> cells로 구성되어 있었다(Fig. 1). Fresh PBMC의 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> cells은 보통 15% 미만이지만, IL-2와 함께 14일 배양한 후에는 73%로 증가했다. 대부분의 NKM은 CD3<sup>-</sup>CD16/CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD16/CD56<sup>-</sup> cells으로 거의 CD3<sup>+</sup>CD16/CD56<sup>+</sup> cells은 아니었다. 즉, NKM은 인체내에서 발견되는 NK cell의 표현형적 특성을 반영하고 있었다.

**Activated human NK cell(NKM)의 cytokine transcript 발현**

투여한 NKM의 human TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5의 mRNA transcript level의 분석을 위해 PHA-stimulated 혹은 unstimulated NK cells에서 추출한 total RNA를 이용하여 semiquantitative RT-PCR를 시행하였다. Normal NK cells에서의 IL-2, IL-4, IL-5 transcripts는 거의 발견할 수 없었지만, PHA에 노출된 NK cells에서는 현저하게 증가하였다. 하지만, normal NK cells과 PHA-stimulated NK cells에서의 TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  transcripts을 발현하였다(Fig. 2). INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  같은



**Fig. 2** – Cytokine expression of the activated NK cells. The activated NK cells were stimulated with 0, 0.3, 1  $\mu$ g /ml of phytohemagglutinin (PHA) for 5 h. Human TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4, and IL-5 gene expression levels were analyzed by semiquantitative RT-PCR.

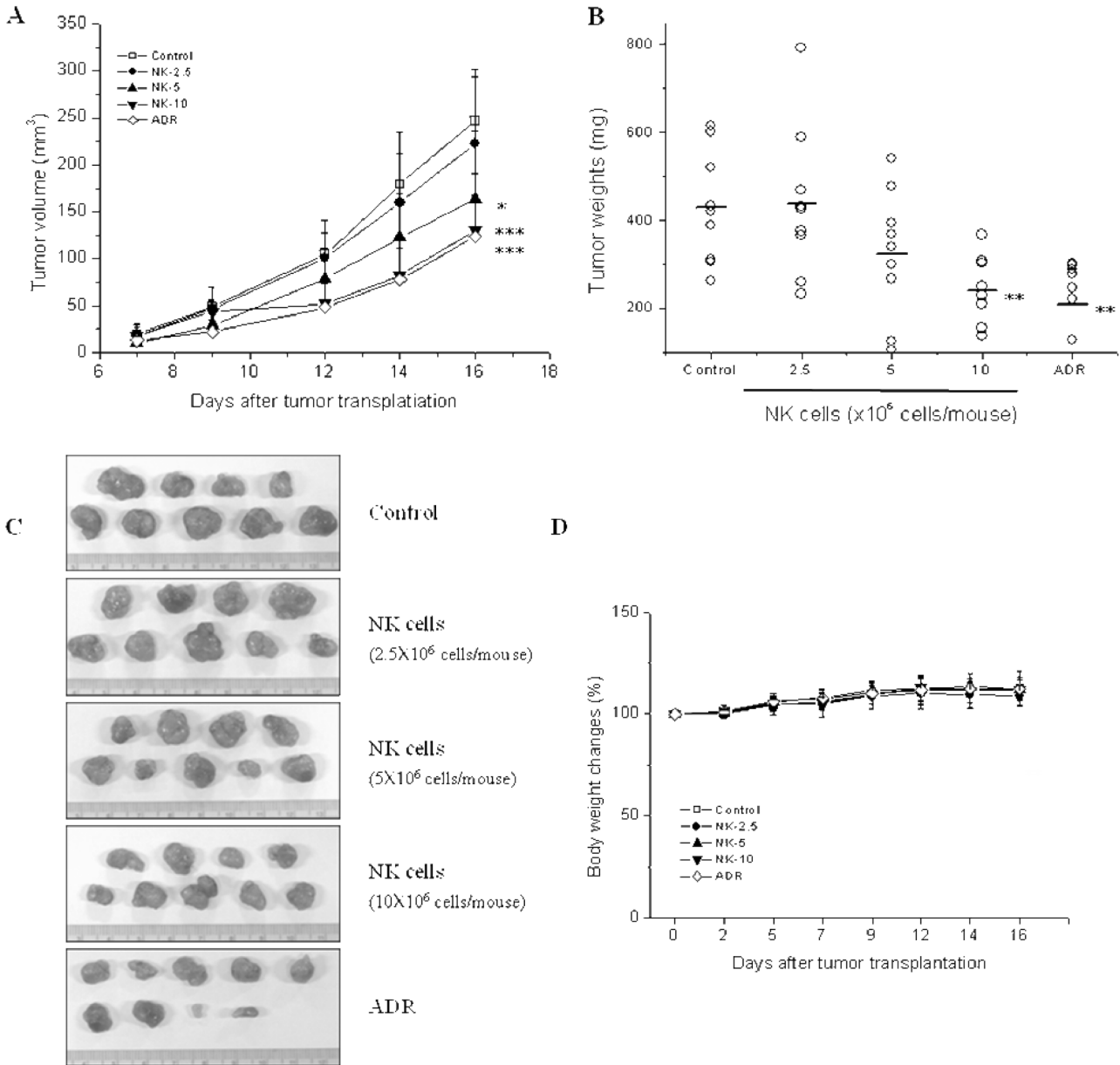
Th1-type cytokines은 주로 activated NK cells에서 생산된다. activated NK cells은 또한 perforin, granzyme B 같은 cytolytic molecules을 발현함을 확인하였다(data was not shown).

**NK cell의 *In vivo* antitumor 효과**

Nude mouse xenograft 분석을 통하여 NKM의 항암효과를 검

증하였다. 예비실험을 통하여  $3 \times 10^8$  cells(유효용량의 약 30배)의 NKM을 nude mice에 투여할 경우에도 탈모, 이상행동, 체중 감소의 유의한 독성은 관찰되지 않았다.

SW620 세포를 nude mice 에게  $2 \times 10^6$  cells/mouse를 피하 이식하여 16일 후 종양크기가  $247 \pm 47$  mm<sup>3</sup>(n=9)로 성장하였다 (Fig. 3A). NKM은 2.5, 5,  $10 \times 10^6$  cells/mouse의 농도로 정맥



**Fig. 3** – Inhibition of SW620-induced tumor growth by activated NK cells in nude mouse xenograft models. Nude mice (n=9) were implanted subcutaneously with two million SW620 cancer cells. The activated NK cells at doses from 2.5 to 10 million cells per mouse were injected intravenously once a week. Adriamycin (ADR) was injected intravenously at 2 mg/kg. Tumor volumes were estimated by the formula: length (mm)×width (mm)×height (mm)/2. Statistical significance was determined using the Student's *t*-test versus PBS-treated control group (\**p*<0.05, \*\*\**p*<0.001) (A). On day 16, the mice were sacrificed and the tumor weights were measured (B). Representative photographs are shown (C). Statistical significance was determined using the Student's *t*-test versus PBS-treated control group (\*\**p*<0.01). The body weights of the tumor-bearing nude mice were measured to estimate toxicity (D).

주사하였으며, *in vivo* 종양성장의 각각 10%, 34%, 47%를 억제하였다. Adriamycin(ADR)는 양성 대조군으로 사용하였으며, 이는 SW620 종양성장에 강한 억제능력을 지녔다.

최종일(16일)에 nude mouse에서 종양을 분리한 후 무게를 측정하여 SW620 종양에 대한 NKM의 영향을 증명하였다(Fig. 3B and C). SW620 종양의 무게는 주입 16일 후 429 mg으로 무게가 증가하였다. NKM을  $5 \times 10^6$  cells/mouse 투여군에서는 25%의 종양 성장 억제를, NKM을  $10 \times 10^6$  cells/mouse 투여군에서는 44%의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 ADR 투여군에서는 52%의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다.

전반적으로, NKM 투여군에서 109~112%의 체중증가를 보였으며, 이는 NKM이 체중에 미치는 영향이 없고 독성이 없음을 시사한다(Fig. 3D).

### 결론 및 고찰

본 연구에서는 활성화 자연살해세포의 인간 결장암(SW620)에 대한 항암효과를 nude mouse xenograft model을 이용하여 검증하였다. 활성화 자연살해세포의 독성을 확인하기 위하여 16일 동안 nude mouse의 체중변화와 행동변화를 관찰하여 유효용량에서의 독성이 없음을 검증하였다. Nude mouse에 이식된 SW620 세포는 7일째부터 육안으로 관찰되기 시작하였으며 16일째까지 꾸준한 성장을 보였다. 최종일에 종양을 분리한 후 무게를 측정한 결과 NKM을 2.5, 5,  $10 \times 10^6$  cells/mouse 투여에 의해 10%, 34%, 47%의 종양성장 억제를 확인하였다. 이러한 결과로부터 활성화 자연살해세포는 인간 결장암(SW620)에 대한 항암효과가 있음을 확인하였으며, 유효용량에서 독성이 없음을 검증하여 세포면역치료법으로의 가능성을 제시하였다.

결장암(Colon cancer)은 사망에 이르는 대표적인 암으로 면역성 종양으로 알려져있으며, 결장암의 기존 치료법으로는 수술과 화학요법이 있으나 이 치료법에 따른 생존율은 높지 않다.<sup>14)</sup> 5-fluorouracil-based regimens 나 irinotecan 같은 새로운 물질을 이용하여 진행하는 Adjuvant systemic chemotherapy는 고 위험 질병의 환자들의 생존율을 향상시켰다.<sup>15-18)</sup> 그럼에도 불구하고 결장암으로 진단받은 환자의 10년 후 생존율은 60%에 불과하다. 따라서, 수술과 화학요법을 대체할 보다 효과적인 치료법이 필요하다.

지난 수십년간, 종양 면역학에 대한 연구가 활발히 이루어졌다. 몇몇 mechanism은 결장암과 그에 대한 cellular 및 humoral immune responses에 대해 규명해주었다. 첫째, 많은 종양 세포들은 human leucocyte antigen(HLA) class I 발현을 억제하거나 감소시키기 때문에 cytotoxic T lymphocyte(CTL)이 필요로 하는 peptide를 제시하지 못해 항원과 결합하지 못한다.<sup>19)</sup> 둘째,

결장암에서 peptide transporting molecules(TAP)의 변성이 관찰되었으며, 이는 T cell epitope과 억제된cellular immunity의 결과로 초래되었다고 보여진다.<sup>20)</sup> 셋째, 결장암에서 기존 종양과 전이 종양 세포에서의 FasL발현이 보다 더 빈번했다.<sup>21)</sup> T세포 표면에서FasL이 Fas(Apo-1/CD95)이 결합하는 것은 활성화 된 T세포의 apoptotic cell death을 야기한다. 넷째, 결장암 환자에게서 peripheral blood lymphocyte와 T cell infiltrates(TIL)의 T 세포 수용체인 CD3 zeta chain의 발현 감소가 증명되었다.<sup>22)</sup>

면역세포에 기초한 암 치료법은 *ex vivo*로 확장되고 활성화 된 면역세포 이식을 통한 것이다. 대식 세포(dendritic cell), 자연살해세포, 림포카인활성 살해세포(LAK cell), 싸이토카인 유도 살해세포(CIK cell), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell)와 같은 면역세포는 암에 대한 active immunotherapy로 연구되었다.<sup>23-28)</sup> 하지만, DC therapy는 이식된 대식 세포가 activate effector T cells로의 변화가 어렵고 화학요법에 의해서 보통 억제된다.<sup>29)</sup> CTL therapy는 MHC-restricted mechanism, tumor-associated antigen의 억제, tumor-specific CTL의 적은 수에 의해 저해된다.<sup>30)</sup> Solid tumors에 대한 NK와 LAK cell therapy의 효능은 cancer cell에 대해 제한된 세포독성 활성을 나타내었다.<sup>31)</sup>

NK cell activity가 낮다면 암으로 발전하기 쉬우며,<sup>32)</sup> 암환자의 NK cell activity는 건강한 사람에 비해 현저하게 낮았다.<sup>33,34)</sup> NK cell infiltration은 gastric carcinoma, squamous cell lung carcinoma, colorectal cancer 같은 몇몇의 암 종류에서 positive prognostic parameter로 이용된다.<sup>35-37)</sup> 게다가, human malignant cells은 human NK cells 투여 후 약화되거나 전이가 억제되었던다는 것을 severe combined immunodeficiency(SCID) mouse model을 통한 실험으로 규명하였다.<sup>38,39)</sup> 이러한 결과가 tumor Immunosurveillance와NK cell의 Immunotherapy strategies로의 가능성을 제시해준다.

전이성 신장세포암에 대한 autologous NK cells 을 이용한 치료 시도 역시 놀랄만한 종양퇴화를 나타냈다. Brain tumor에서도 역시 긍정적인 치료 영향이 보고되었다.<sup>40,41)</sup> 이와 반대로, autologous NK cell의 adoptive transfer효능은 제한적이라고도 증명되고 있다.

Solid tumors에 대한 NK cells 치료 효과는 시험에 사용하는 NK cell에 따라 다른 효능을 나타냈다. 이는 고활성NK cells 를 충분히 배양하기 어렵다는 것을 의미한다. 따라서, 안전한 임상 결과를 얻을 수 없었으며 실용적인 NK cell expansion 방법 연구가 필요하다. 최근, GMP 조건하에 IL-2와 함께 *ex vivo*에서의 NK cell expansion이 증명되었으며 이를 통해 제공되는 activated NK cells은 대체 요법으로 사용되어지고 있다.<sup>42-45)</sup>

NK cell의 항암효능은 다양한 종류의 동물 모형에서 증명되었 왔으며,<sup>46-48)</sup> 현재 임상단계에서 평가되고 있다.<sup>49)</sup> *ex vivo* expanded human NK cells은 고 독성을 띄지 않을 뿐 아니라

Th1-type cytokines(e.g., IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ )을 다량 생산하며, LAK cells 에 비하여 10배 이상에 달하는 cytotoxic activity와 absolute number를 나타냈다.<sup>50)</sup> 따라서, 이전 실험방법과 비교하여, 높은 항암효과를 기대해 볼 만 하다.

본 연구에서는 결장암 유발 nude mouse xenograft 모델에 활성화된 NK cell의 항암효과를 관찰하였으며, NK cell immunotherapy 가능성을 증명하였다. Human PBMC를 IL-2가 함유된 배지에서 14일 배양함으로써 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 표현형을 나타내는 NK cell을 증폭시켰다. mouse xenograft model을 이용한 NKM의 결장암에 대한 항암효과는 항 후 결장암 치료를 위한 cell immunotherapy로 가능성을 증명하였다.

### 감사의 말씀

본 연구는 2008년 충북대학교 학술연구지원에 의하여 연구되었음.

### 참고문헌

- 1) Davis, D. L., Hoel, D., Fox, J. and Lopez, A. : International trends in cancer mortality in France, West Germany, Italy, Japan, England and Wales, and the USA. *Lancet* **336**, 474 (1990).
- 2) Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. and Thun, M. J. : Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.* **58**, 71 (2008).
- 3) Bar-Sela, G. and Haim, N. : Abnoba-viscum (mistletoe extract) in metastatic colorectal carcinoma resistant to 5-fluorouracil and leucovorin-based chemotherapy. *Med. Oncol.* **21**, 251 (2004).
- 4) de Gramont, A., Tournigand, C., Louvet, C., Maindrault-Goebel, F. and André, T. : First-line therapy for advanced colorectal cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **7**, 167 (2005).
- 5) Joosten, J., Jager, G., Oyen, W., Wobbles, T. and Ruers, T. : Cryosurgery and radiofrequency ablation for unresectable colorectal liver metastases. *Eur. J. Surg. Oncol.* **31**, 1152 (2005).
- 6) Gravalos, C., García-Sánchez, L., Hernandez, M., Holgado, E., Alvarez, N., García-Escobar, I., Martínez, J. and Robles, L. : Surgical resection of a solitary pancreatic metastasis from colorectal cancer: a new step to a cure? *Clin. Colorectal. Cancer* **7**, 398 (2008).
- 7) Renouf, D., Kennecke, H. and Gill, S. : Trends in chemotherapy utilization for colorectal cancer. *Clin. Colorectal. Cancer* **7**, 386 (2008).
- 8) Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H. : "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **5**, 112 (1975).
- 9) Lanier, L. L. : NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225 (2005).
- 10) Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. and Long, E. O. : Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol. Rev.* **214**, 73 (2006).
- 11) Ljunggren, H. G. and Malmberg, K. J. : Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 329 (2007).
- 12) Han, S. B., Lee, C. W., Jeon, Y. J., Hong, N. D., Yoo, I. D., Yang, K. H. and Kim, H. M. : The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* **41**, 157 (1999).
- 13) Han, S. B., Moratz, C., Huang, N. N., Kelsall, B., Cho, H., Shi, C. S., Schwartz, O. and Kehrl, J. H. : Rgs1 and Gnai2 regulate the entrance of B lymphocytes into lymph nodes and B cell motility within lymph node follicles. *Immunity* **22**, 343 (2005).
- 14) Greenlee, R. T., Murray, T., Bolden, S. and Wingo, P. A. : Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J. Clin.* **50**, 7 (2000).
- 15) Moore, H. C. and Haller, D. G. : Adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol.* **26**, 545 (1999).
- 16) Chung, K. Y. and Saltz, L. B. : Antibody-based therapies for colorectal cancer. *Oncologist.* **10**, 701 (2005).
- 17) Kelly, H. and Goldberg, R. M. : Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J. Clin. Oncol.* **23**, 4553 (2005).
- 18) Pozzo, C., Barone, C., Szanto, J., Padi, E., Peschel, C., Bükki, J., Gorbunova, V., Valvere, V., Zaluski, J., Biakhov, M., Zuber, E., Jacques, C. and Bugat, R. : Irinotecan in combination with 5-fluorouracil and folinic acid or with cisplatin in patients with advanced gastric or esophageal-gastric junction adenocarcinoma: results of a randomized phase II study. *Ann. Oncol.* **15**, 1773 (2004).
- 19) Todryk, S. M., Chong, H., Vile, R. G., Pandha, H. and Lemoine, N. R. : Can immunotherapy by gene transfer tip the balance against colorectal cancer? *Gut.* **43**, 445 (1998).
- 20) Yip, D., Strickland, A. H., Karapetis, C. S., Hawkins, C. A. and Harper, P. G. : Immunomodulation therapy in colorectal carcinoma. *Cancer Treat. Rev.* **26**, 169 (2000).
- 21) Mann, B., Gratchev, A., Böhm, C., Hanski, M. L., Foss, H. D., Demel, G., Trojanek, B., Schmidt-Wolf, I., Stein, H., Riecken, E. O., Buhr, H. J. and Hanski, C. : FasL is more frequently expressed in liver metastases of colorectal cancer than in matched primary carcinomas. *Br. J. Cancer.* **79**, 1262 (1999).
- 22) Nakagomi, H., Petersson, M., Magnusson, I., Juhlin, C., Matsuda, M., Mellstedt, H., Taupin, J. L., Vivier, E., Anderson, P. and Kiessling, R. : Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK

- cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res.* **53**, 5610 (1993).
- 23) Bremers, A. J., Kuppen, P. J. and Parmiani, G. : Tumour immunotherapy: the adjuvant treatment of the 21st century? *Eur. J. Surg. Oncol.* **26**, 418 (2000).
- 24) Kalinski, P., Nakamura, Y., Watchmaker, P., Giermasz, A., Muthuswamy, R. and Mailliard, R. B. : Helper roles of NK and CD8+ T cells in the induction of tumor immunity. Polarized dendritic cells as cancer vaccines. *Immunol. Res.* **36**, 137 (2006).
- 25) Raja, Gabaglia, C., Diaz, de Durana, Y., Graham, F. L., Gaudie, J., Sercarz, E. E. and Braciak, T. A. : Attenuation of the glucocorticoid response during Ad5IL-12 adenovirus vector treatment enhances natural killer cell-mediated killing of MHC class I-negative LNCaP prostate tumors. *Cancer Res.* **67**, 2290 (2007).
- 26) Takashima, K., Fujiwara, H., Inada, S., Atsui, K., Araki, Y., Kubota, T. and Yamagishi, H. : Tracking of green fluorescent protein (GFP)-labeled LAK cells in mice carrying B16 melanoma metastases. *Anticancer Res.* **26**, 3327 (2006).
- 27) Thorne, S. H., Negrin, R. S. and Contag, C. H. : Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy. *Science* **311**, 1780 (2006).
- 28) Wang, W., Epler, J., Salazar, L. G. and Riddell, S. R. : Recognition of breast cancer cells by CD8+ cytotoxic T-cell clones specific for NY-BR-1. *Cancer Res.* **66**, 6826 (2006).
- 29) Kim, H. M., Kang, J. S., Lim, J., Park, S. K., Lee, K., Yoon, Y. D., Lee, C. W., Lee, K. H., Han, G., Yang, K. H., Kim, Y. J., Kim, Y. and Han, S. B. : Inhibition of human ovarian tumor growth by cytokine-induced killer cells. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 1464 (2007).
- 30) Grabert, R. C., Cousens, L. P., Smith, J. A., Olson, S., Gall, J., Young, W. B., Davol, P. A. and Lum, L. G. : Human T cells armed with Her2/neu bispecific antibodies divide, are cytotoxic, and secrete cytokines with repeated stimulation. *Clin. Cancer Res.* **12**, 569 (2006).
- 31) Burns, L. J., Weisdorf, D. J., DeFor, T. E., Vesole, D. H., Repka, T. L., Blazar, B. R., Burger, S. R., Panoskaltis-Mortari, A., Keever-Taylor, C. A., Zhang, M. J. and Miller, J. S. : IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant.* **32**, 177 (2003).
- 32) Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. and Nakachi, K. : Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet.* **356**, 1795 (2000).
- 33) Bobek, V., Boubelik, M., Fiserová, A., L'uptovcová, M., Vannucci, L., Kacprzak, G., Kolodziej, J., Majewski, A. M. and Hoffman, R. M. : Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer. *Lung Cancer.* **47**, 215 (2005).
- 34) Whiteside, T. L. and Herberman, R. B. : Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1**, 125 (1994).
- 35) Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S. and Aikou, T. : Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* **88**, 577 (2000).
- 36) Takanami, I., Takeuchi, K. and Giga, M. : The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **121**, 1058 (2001).
- 37) Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M. A., Vallejo, C., Martos, J. A. and Moreno, M. : The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* **79**, 2320 (1997).
- 38) Dewan, M. Z., Terunuma, H., Toi, M., Tanaka, Y., Katano, H., Deng, X., Abe, H., Nakasone, T., Mori, N., Sata, T. and Yamamoto, N. : Potential role of natural killer cells in controlling growth and infiltration of AIDS-associated primary effusion lymphoma cells. *Cancer Sci.* **97**, 1381 (2006).
- 39) Dewan, M. Z., Terunuma, H., Takada, M., Tanaka, Y., Abe, H., Sata, T., Toi, M. and Yamamoto, N. : Role of natural killer cells in hormone-independent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells *in vivo*. *Breast Cancer Res. Treat.* **104**, 267 (2007).
- 40) Escudier, B., Farace, F., Angevin, E., Charpentier, F., Nitenberg, G., Triebel, F. and Hercend, T. : Immunotherapy with interleukin-2 (IL2) and lymphokine-activated natural killer cells: improvement of clinical responses in metastatic renal cell carcinoma patients previously treated with IL2. *Eur. J. Cancer.* **30A**, 1078 (1994).
- 41) Ishikawa, E., Tsuboi, K., Saijo, K., Harada, H., Takano, S., Nose, T. and Ohno, T. : Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res.* **24**, 1861 (2004).
- 42) Carlens, S., Gilljam, M., Chambers, B. J., Aschan, J., Guven, H., Ljunggren, H. G., Christensson, B. and Dilber, M. S. : A new method for *in vitro* expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells. *Hum. Immunol.* **62**, 1092 (2001).
- 43) Klingemann, H. G. : Natural killer cell-based immunotherapeutic strategies. *Cytotherapy* **7**, 16 (2005).
- 44) Alici, E., Sutlu, T., Björkstrand, B., Gilljam, M., Stellan, B., Nahi, H., Quezada, H. C., Gahrton, G., Ljunggren, H. G. and Dilber, M.S. Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components. *Blood.* **111**, 3155 (2008).
- 45) Guven, H., Gilljam, M., Chambers, B. J., Ljunggren, H. G.,

- Christensson, B., Kimby, E. and Dilber, M.S. : Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy. *Leukemia*. **17**, 1973 (2003).
- 46) Alici, E., Konstantinidis, K. V, Sutlu, T, Aints, A., Gahrton, G., Ljunggren, H. G. and Dilber, M. S. : Anti-myeloma activity of endogenous and adoptively transferred activated natural killer cells in experimental multiple myeloma model. *Exp. Hematol.* **35**, 1839 (2007).
- 47) Basse, P. H., Whiteside, T. L. and Herberman, R. B. : Cancer immunotherapy with interleukin-2-activated natural killer cells. *Mol. Biotechnol.* **21**, 161 (2002).
- 48) Siegler, U., Kalberer, C. P., Nowbakht, P., Sendelov, S., Meyer-Monard, S. and Wodnar-Filipowicz, A. : Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia*. **19**, 2215 (2005).
- 49) deMagalhaes-Silverman, M., Donnenberg, A., Lembersky, B., Elder, E., Lister, J., Rybka, W., Whiteside, T. and Ball, E. : Posttransplant adoptive immunotherapy with activated natural killer cells in patients with metastatic breast cancer. *J. Immunother.* **23**, 154 (2000).
- 50) Terunuma, H., Deng, X., Dewan, Z., Fujimoto, S. and Yamamoto, N. : Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. *Int. Rev. Immunol.* **27**, 93 (2008).