

Near-infrared (NIR) 영상기법을 이용한 생체 내 수지상세포의 이동

이준호, 정남철, 이은계, 임대석*

In vivo Dendritic Cell Migration Tracking Using Near-infrared (NIR) Imaging

Jun-Ho Lee, Nam-Chul Jung, Eun Gae Lee, and Dae-Seog Lim*

접수: 2012년 9월 14일 / 게재승인: 2012년 10월 24일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Matured dendritic cells (DCs) begin migration with their release from the bone marrow (BM) into the blood and subsequent traffic into peripheral lymphoid and non-lymphoid tissues. Throughout this long movement, migrating DCs must apply specialized skills to reach their target destination. Non-invasive *in vivo* cell-tracking techniques are necessary to advance immune cell-based therapies. In this study, we used a DiD cell-tracking solution for *in vivo* dendritic cell tracking in naive mice. We tracked DiD (non-invasive fluorescence dye)-labeled mature dendritic cells using the Near Infrared (NIR) imaging system in normal mice. We examined the immunophenotype of DiD-labeled cells compared with non-labelled mature DCs, and obtained time-serial images of NIR-DC trafficking after mouse footpad injection. In conclusion, we confirmed that DiD-labeled DCs migrated into the popliteal lymph node 24 h after the footpad injection. Here, these data suggested that the cell tracking system with the stable fluorescence dye DiD was useful as a cell tracking tool to advance dendritic cell-based immunotherapy.

Keywords: Dendritic cell, DiD, NIR, *in vivo* cell-tracking, Immunotherapy

1. 서론

항암면역세포치료법은 정상세포에 영향을 주지 않고 암세포만을 파괴하는 중앙 특이면역의 유도가 가능하며 여기에 면역세포로서 수지상세포 (Dendritic cell, DC), 세포독성 T 세포 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL), 자연살해세포 (Natural killer cell, NK cell), 사이토카인 매개 살해세포 (Cytokine-induced killer cell, CIK cell) 등이 사용되고 있다. 이 중 수지상세포는 생체 내 가장 강력한 항원제시세포로서 면역반응을 유발하고 지속시키는데 핵심적인 역할을 담당하고 있다. 세포성 면역반응 (Cell-mediated immune response) 유도를 위해 수지상세포는 포식작용 (Phagocytosis), 세포내 이입 (Endocytosis), 또는 대음세포작용 (Macropinocytosis)를 통해 항원을 포획한 후 림프절 (Lymph node)로 이동하여 MHC (Major histocompatibility) 및 보조자극 분자 (Costimulatory molecule)를 발현하고, IL-12와 같은 염증성 사이토카인 (Proinflammatory cytokine)을 분비하여 암세포 특이적인 T 세포의 활성을 유도하는 역할을 한다 [1]. 이러한 수지상세포의 기능이 밝혀지면서 종양을 근본적으로 치료할 수 있는 가능성이 제시되어, 1996년 B 세포 임파종환자에 대한 첫 임상사례가 발표된 이후 각종 고형암, 혈액암 및 암 전이에 수지상세포를 이용한 면역치료법 연구가 활발하게 진행되고 있다 [2-5]. 수지상세포가 인근 림프절 (Draining lymph node)로 이동하는데 필수적인 요소인 Chemokine receptor CCR7은 CCL19/CCL21 두 가지 리간드를 가지는데, 염증성 사이토카인, TLR 리간드 혹은 MMP (Matrix metalloprotease) 등을 이용하여 이러한 메커니즘을 통한 수지상세포의 이동 효율을 높여려는 많은 연구가 진행되었다 [6,7]. 그러나 생체 내 세포 이동의 추적이 어렵고 *ex vivo*에서 generation한 수지상세포의 경우

차의과학대학교 바이오산업융합학과
Department of Applied Bioscience, CHA University, 222 Yatap-dong,
Bundang-gu, Seongnam, Gyeonggi-do, Korea
Tel: +82-31-725-838, Fax: +82-31-725-8387
e-mail: dslim@cha.ac.kr

주사 부위에서 림프절로의 이동은 5% 정도로 매우 낮아 기존의 분석방법으로 정확한 이동에 관한 정보를 얻기는 어려운 실정이다. 최근 바이오이미징 기법들이 급속도로 발전되고 있으나 기존의 CT, MRI, PET 등의 비 침습적 영상 진단 방법을 이용한 생체 조직 분석은 세포치료제에 있어서 임상 실험용 동물 이미징을 하기에는 아직 미흡한 실정이다 [8]. 항암면역세포치료제에서 면역세포의 이동과 생체 내 분포에 대한 정보는 세포치료제의 효과를 극대화함에 있어서 매우 중요한 요소이다. 최근 Near-Infrared (NIR)를 이용한 영상기법이 생체 내 세포 이동 추적에 적용되면서 높은 해상도를 가진 비 침습적인 이미지를 얻을 수 있다고 보고되고 있다 [9-12]. NIR 파장영역은 700~1000 nm로 장파장이기 때문에 생체에 무해하며, 조직 투과력이 높고 생체 조직의 autofluorescence를 최소화할 수 있다는 장점을 가지고 있다 [13,14]. 이 근적외선 영역에서 형광의 특성을 나타내는 물질을 도입한다면 실험동물모델에서 수지상세포의 이동에 관한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다. Non-targeted probe 중 하나인 DiD는 NIR 형광색소로써 *in vitro*, *in vivo* cell-tracking을 광학영상을 통해 관찰 가능한 물질이다 [15]. 이를 이용하여 사람 중간엽 줄기세포에 표지하여 생체 내 cell tracking을 시도한 보고 뿐 아니라 T 세포에도 활용하여 암세포와의 면역반응을 이미지화한 보고도 있다 [16].

이에 본 연구에서는 수지상세포를 DiD로 표지하고 광학영상 장비 (Optical imaging system)를 이용하여 비 침습적 NIR 영상기법으로 생체 내 이동능을 평가하고 이에 따른 활용방안을 모색하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 마우스

수지상세포의 제조, 림프구 (Lymphocytes) 분리 및 *in vivo* cell-tracking을 위한 동물모델로써 6~8주령의 암컷 C3H/HeNcrjOri 마우스를 오리엔트바이오 (Seongnam-si, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 동물실험은 차의과학대학교 동물실험윤리 규정에 따라 진행하였다 (CHA university Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

2.2. 배지와 시약

수지상세포배양은 10% 우태아 혈청 (Fetal bovine serum, GIBCO Laboratory, Cergy Pontois, France)과 1% Antibiotics and Antimycotics (Lonza, MD, USA)가 포함된 RPMI 1640 with 25 mM HEPES, L-glutamine (Lonza, MD, USA) 배지에 재조합 마우스 GM-CSF와 IL-4 (JW Crea Gene, Korea)를 첨가하여 사용하였다. TNF- α , IFN- γ , Mip-3 β (Peprotech, NJ, USA), PGE2와 Poly I : C (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 유세포 분석을 위해 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD14 (clone; rmC5-3), anti-CD54 (clone; 3E2), anti-CD86 (clone; GL1), anti-H-2D (BD Phamingen, San Diego, CA, USA)와 phycoerythrin-(PE) conjugated anti-I-A [b] (clone; AF6-120.1),

anti-CD11c (clone; HL3), anti-CD80 (clone; 16-10A1), anti-CD40 (clone; 3/23), anti-CD197 (clone; 4B12) (BD Phamingen, San Diego, CA, USA)를 사용하였다. 세포독성 분석을 위하여 propidium iodide staining solution (BD Phamingen, San Diego, CA, USA)을 사용하였다. FITC와 PE의 isotype으로는 Rat IgG_{2a}와 Hamster IgG₁ (BD Phamingen, San Diego, CA, USA)를 사용하였다.

2.3. 수지상세포 배양

C3H 마우스에서 경골 (Tibias) 및 대퇴골 (Femurs)로부터 골수세포 (Bone marrow cells)를 수확하여 수지상세포 배양배지 (RPMI 1640, 10% FBS, 1% Antibiotics and Antimycotics, 20 ng/mL GM-CSF, 10 ng/mL IL-4)로 현탁하고 100 mm 배양접시에 2×10^6 cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양 2일째, 비부착 세포를 제거한 후 새로운 배양매지를 첨가하고 4일째 배양매지의 절반을 모아 원심분리 후 배지를 채워주었다. 배양 6일째, 성숙 수지상세포의 분화를 유도하기 위하여 부유세포만을 새로운 배양 용기에 옮기고 재조합 마우스 TNF- α , IFN- γ 를 10 ng/mL로 첨가하고 PGE₂와 Poly I : C를 1 ug/mL로 첨가하여 현탁한 후 100 mm 배양 접시에 분주한 후 24시간 동안 성숙화를 유도하였다. 성숙화 후 배지에 떠 있는 세포들을 수거하여 실험에 사용하였다.

2.4. 유세포 분석

성숙 수지상세포의 표면의 표현형 (Surface phenotype) 분석을 위해 $2 \sim 5 \times 10^5$ 개의 세포를 0.5% FBS/PBS로 2회 세척한 후 PE conjugated-CD11c, CD40, CD80과 FITC conjugated CD14, CD54, CD86, CD197 단클론 항체로 표지하고, 세포 생존율을 확인하기 위하여 PI 염색을 4°C, 암소에서 20분간 실시하였다. Isotype control으로는 Rat IgG_{2a}와 Hamster IgG₁를 사용하였다. 20분간 염색된 세포는 0.5% FBS/PBS로 2회 세척한 후 FACSCalibur (BD Bioscience, Mountain View, CA, USA)를 사용하여 유세포 분석을 실시하였다. 모든 data는 FlowJo (Tree Star, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.5. 수지상세포의 형광 표지

성숙 수지상세포를 1×10^6 개를 1 mL의 HBSS로 현탁한 후 5 uL Vybrant[®] DiD Cell-Labeling Solutions (Molecular Probes)을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 후, RPMI 1640배지에 10% 우태아 혈청이 포함된 배지로 2회 세척하였다.

2.6. 림프구 증식능 확인

C3H 마우스로부터 비장을 적출하여 40 μ m pore-size의 cell strainer를 통과시켜 비장세포 (Splenocytes)를 수확한 다음, Nylon wool column을 이용하여 림프구를 분리하였다 [17]. 분리한 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에 현탁하여 96-well plate (U-bottom)에 5×10^4 cells/well로 각각 분주하였다. 여기에 림프구 대 수지상세포의 비율이 10 : 1,

20 : 1, 40 : 1, 80 : 1, 160 : 1이 되도록 첨가하여 72시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 공동배양 하였다. 배양 후 96-well plate의 각 well에 MTT dye solution을 첨가하고 4시간 동안 반응시킨 후 Stop solution으로 반응을 종결시킨 다음 흡광도 570 nm 파장에서 측정하였다. 또한 림프구를 0.1% BSA가 포함된 PBS 용액에 1 mL 당 1×10^6 개 세포로 현탁하여 10 μ M CFSE (Invitrogen, USA)로 표지 하였다. CFSE-labeled 림프구를 이용하여 DiD-표지 수지상세포와 비표지 수지상세포를 10 : 1의 비율로 72시간 동안 배양한 후 FACSCalibur (BD, San Diego, CA, USA)를 이용하여 세포의 증식능을 확인하였다.

2.7. In vitro 및 in vivo 수지상세포 이동능 추적

수지상세포의 *in vitro* migration을 확인하기 위하여, 8 μ m pore polycarbonate transwell® plate (Coaster)를 사용하여 CCL19/Mip-3 β 가 포함 (50 ng/mL) 또는 미포함된 배지를 아래쪽 chamber에 넣고 transwell 위쪽에 수지상세포를 5×10^5 개씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1시간 동안 세포가 충분히 이동할 수 있게 하였다. 이동한 세포의 수를 확인은 FACSCalibur (BD, San Diego, CA, USA)로 60초 동안 획득한 세포의 수 (events)를 기록하였다. 생체 내 수지상세포의 이동을 추적하기 위하여 DiD 표지 수지상세포를 PBS로 현탁하여 C3H 마우스의 발바닥 (footpad)에 1×10^5 개를 피하 주사하였다. 주사 직후부터 24시간 간격으로 72시간 동안 FOBI *in vivo* Imaging System (NEO science, Gyeonggi, Korea)를 이용하여 수지상세포의 이동을 확인하였다. 마우스 전체에서 검출된 형광값 (Fluorescence intensity)을 100%로 환산한 후 날짜별로 슬와림프절 (popliteal lymph node)로 이동한 형광값을 대비하여 이동 효율을 수치화 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Vybrant DiD cell-labeling solution®을 이용한 수지상세포 표지

형광색소인 DiD solution은 세포막 또는 막구성지질에 발현되며 파장 영역은 Near-Infrared (700-1000 nm)의 파장범위에 속한다. 또한 유세포 분석기에서 FL-3 detection channel에서 확인이 가능하여 형광은 적색의 이미지를 가진다 (Fig. 1(a)). 수지상세포에 DiD solution을 표지한 후 PBS로 현탁한 상태인 수지상세포를 1.5 mL microcentrifuge tube에 옮겨 담고, FOBI *in vivo* Imaging System을 이용하여 665 nm 파장에서 1초간 노출시켰다. DiD-labeled 수지상세포와 non-labeled 수지상세포는 665 nm에서 노출시키기 전에는 차이를 보이지 않았지만 665 nm 파장에서 적색으로 표지된 수지상세포를 확인하였다 (Fig. 1(b)). 또한 DiD-labeled 수지상세포를 유세포 분석기를 이용하여 FL3-detection channel에서 형광 발현을 확인하였으며, 세포독성 확인을 위해 PI 염색을 하였을 때 수지상세포의 사멸이 관찰되지 않음으로서 세포 독성을 나타내지 않는 것으로 확인하였다 (Fig. 1(c)). 이로써, 본 실험에 사용한 DiD solution이 수지상세포에 독성을 나타

내지 않으며, NIR 파장영역인 655 nm에서 검출이 가능함을 확인하였다.

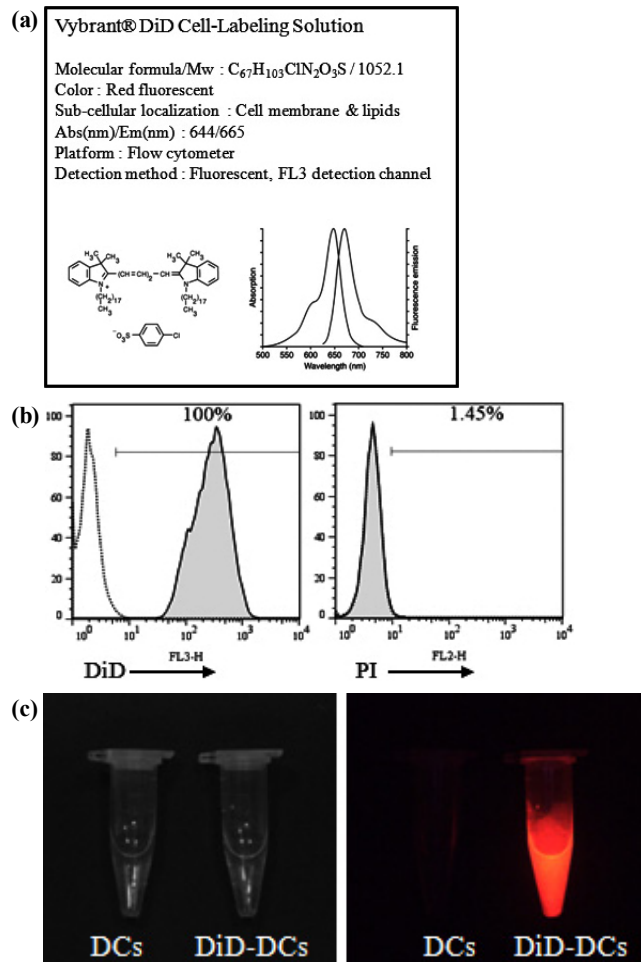


Fig 1. The lipophilic fluorescence dye, DiD-labelling of DCs. (a) Used to the carbocyanine dye, DiD profiles. (b) After DiD labelling, fluorescent intensity and DC viability was examined by flow cytometry analysis. Gray histogram represents the positive percentage of DiD-labelled DCs. Open histogram represent unlabelled DCs. (c) *In vitro* NIR signals (exposure time: 1s) of DiD-labelled DCs.

3.2. DiD 표지 후 수지상세포 표면 마커 분석

마우스 골수세포로부터 분화시킨 성숙 수지상세포는 단핵구 (Monocytes) 표면 분자인 CD14의 발현은 전혀 관찰되지 않았고, 대표적인 표면 항원인 CD11c의 발현은 DiD 표지, 비표지 수지상세포간에 차이가 없었다. 또한 naive T 세포 자극 분자인 CD40와 T 세포의 CD28 또는 CTLA-4와 부착하는 CD80 (B7-1), CD86 (B7-2)의 발현 또한 차이가 없었다. T 세포의 LFA-1과 부착하는 CD54 (ICAM-1)의 발현정도도 두 세포간의 차이는 없었다. 또한 성숙한 수지상세포의 귀소 수용체 (homing receptor)인 CCR7의 발현 또한 차이가 없는 것으로 확인하였다. 또한 항원 정보전달을 할 수 있는 MHC class I, II의 발현 또한 DiD-표지, 비표지 수지상세포간에 차이를 보이지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이로써, 본 실험에 사용한 DiD solution은 수지상세포의 표면 항원의

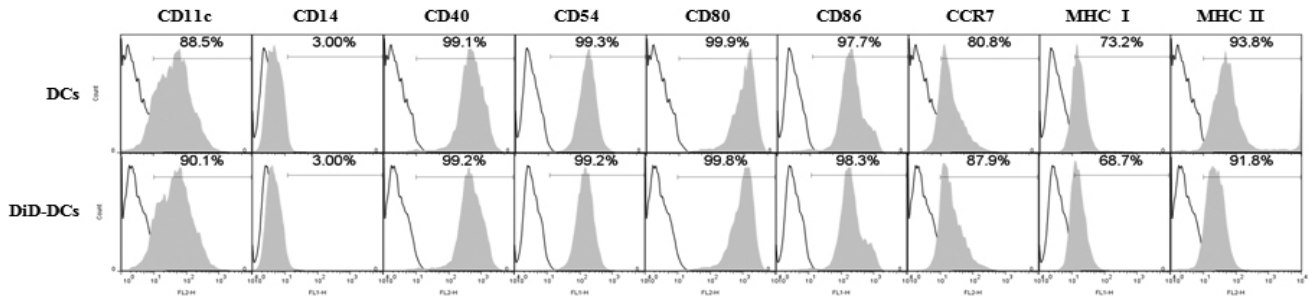


Fig 2. Surface phenotype of DCs with DiD-labelling or not. DCs were stained with FITC- or PE- conjugated CD11c, CD14, CD40, CD54, CD80, CD86, CCR7, MHC I, and MHC II specific mAbs and analyzed by percentage of positive cells by flow cytometry. Open histograms represent isotype control. All data analyzed by FlowJo software.

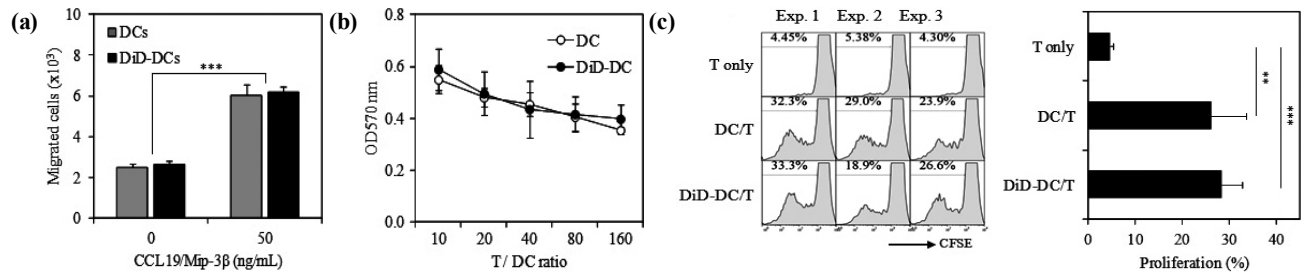


Fig 3. Non-cytotoxic effects of DiD on DCs nature. (a) Migration assay was performed by measuring the migrated DiD-labelled DCs through 8 μm pore size polycarbonate membranes in 24-well transwell chambers. DiD-labelled DCs (5×10^4 cells/well) suspended in complete medium of upper well migrate to the bottom well containing without CCL19/Mip-3β (50 ng/mL). After incubation at 37°C, 5% CO₂ for 1 h, the cells in the bottom were collected and acquired for migrated cells counting with FACS analysis during 60s². Results represent means ± SD of triplicates. (b) For compare with DiD-labelled DCs and non-labelled DCs, Lymphocytes (1×10^5 cells/well) and DCs were co-incubated at ratios of 10, 20, 40, 80, 160 : 1 (DC : T). After 3 days incubation, lymphocyte proliferation was measured by MTT assay (means ± SD of triplicates). (c) Lymphocytes were co-cultured with non-labelled DCs or labelled DCs for 72 h at a ratio of 1 : 10. As a controls, CFSE-labelled lymphocytes were cultured under the same conditions without the addition of DCs. Proliferation was assessed as loss of CFSE fluorescent capacity. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

발현과 귀소수용체에도 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

3.3. *In vitro* 수지상세포의 이동

*In vitro*에서 chemokine 반응성 수지상세포의 이동능을 확인하기 위하여 transwell plate와 CCL19/Mip-3β를 이용하였다. CCL19이 미포함된 배지보다 50 ng/mL로 포함된 배지에서 수지상세포의 이동이 증가함을 확인하였고, 두 세포군 간 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 3(a)). 이는 수지상세포의 귀소수용체 (CCR7)의 발현이 동일한 수준임을 반영한 결과이며 DiD-표지에 따른 chemokine 반응성 이동능에도 영향을 주지 않으므로 수지상세포의 체내 이동 분석을 위해 DiD 표지가 물리, 생물학적 특성 변화를 야기하지 않는 유용한 물질임을 확인하였다.

3.4. 수지상세포의 림프구 증식 유도

DiD-표지 또는 비표지 수지상세포의 림프구 분화 유도능을 확인하기 위해 림프구 proliferation assay (MTT)로 확인하였다. 비장세포로부터 분리한 림프구를 수지상세포와 공동 배양하여 자극한 후 세포의 증식능을 확인한 결과 DiD-표지, 비표지 수지상세포 간의 림프구 증식 유도능은 차이가 없는 것으로 확인되었다 (Fig. 3(b)). 또한 림프구 proliferation의

비율을 확인하기 위하여 림프구에 CFSE를 표지한 후 각 수지상세포와 10 : 1의 비율로 72시간 동안 공동배양을 실시하였다. 림프구 단독 배양보다 수지상세포와 같이 배양하였을 경우 각각의 수지상세포에 의해 림프구가 증식하는 것을 확인할 수 있었다. 각 수지상세포는 25~28% 정도 림프구의 증식을 유도하는 것으로 확인할 수 있었다 (Fig. 3(c)). 림프구 증식 유도능 확인시험 결과 수지상세포에 DiD 표지를 하여도 수지상세포의 림프구 증식유도 기능에는 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

3.5. NIR 기법을 이용한 DiD 표지 수지상세포의 추적

생체 내 성숙 수지상세포가 슬와림프절로 이동하는 것을 추적하기 위해 5×10^5 개의 DiD 표지 수지상세포를 PBS에 현탁하여 C3H 마우스 왼쪽 발바닥 (left footpad)에 피하 주사한 후 24시간 간격으로 72시간 동안 FOBI *in vivo* Imaging System을 이용하여 665 nm에서 2초간 노출시켜 이미지를 얻었다 (Fig. 4(a)). 주사 직후, 형광 이미지가 발바닥에만 관찰되다가 24시간 후 슬와림프절로 이동한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4(b)). 또한 48시간, 72시간까지 점차적으로 주사부위에서 슬와림프절로 이동하는 것을 확인하였으며, 세포의 이동은 주사 직후보다 72시간째 10% 정도 증가한

것을 확인하였다 (Fig. 4(c)). 생체 내 수지상세포의 이동능을 DiD solution과 NIR기법을 이용하여 이미지화할 수 있었으며, DiD solution이 수지상세포의 *in vivo* cell-tracking 연구에 적합함을 알 수 있었다.

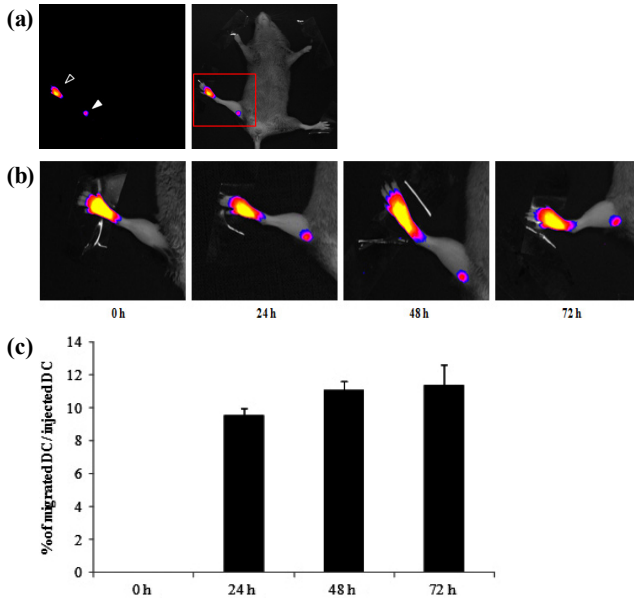


Fig 4. DiD-labelled DCs migration from footpad to popliteal lymph node. (a) DiD-labelled DCs were injected onto the left footpad. *In vivo* NIR signals were obtained on the popliteal lymph node after DiD-labelled DCs injection (at 48 h). The filled and open triangle represent the popliteal lymph nodes (target region) and left footpad injection site (starting spot). (b) Enlarged images of left popliteal lymph node at different time points. (exposure time: 2s) (c) The migration capacity measured percentage of the migration DC/injected DCs at each day (means \pm SD of triplicates).

4. 결론 및 고찰

본 연구에서 수지상세포를 NIR 파장 영역의 DiD 적색 형광 물질로 표지하고 *in vivo* 광학 영상법을 이용하여 생체 내 이동을 확인하였다. DiD solution은 수지상세포에 독성을 나타내지 않았으며, 빠른 시간 내에 표지가 가능하였다. 수지상세포의 체내 활성화에 중요한 표면 분자의 발현 및 귀소수용체인 CCR7의 발현에도 DiD 표지에 의한 영향은 관찰되지 않았다. 그리고 *in vitro* 이동능, T 세포의 증식 유도에서는 특이적인 차이가 관찰되지 않으므로써, 세포의 물리·생물학적 특성의 변화없이 추적 가능한 근적외선 형광물질을 수지상세포에 표지하여 생체 내 추적이 가능함을 보여주었다. 실제로 피하 주사된 수지상세포는 문헌에 보고된 수준과 유사하게 10% 정도의 이동능을 보였다. 이러한 생체 이동에 관한 정보를 정확한 이미지를 통해 얻을 수 있었으며, 이는 본 실험에 사용한 광학 영상법이 수지상세포의 치료과정을 모니터링하는데 활용될 수 있음을 시사한다. 수지상세포의 생체 내 추적 연구는 Tat-NIR-emissive polymersome [9] 및 quantum dots (QDs) [11]을 이용한 경우가 보고되었으나,

DiD solution을 이용한 연구는 보고된 바가 없다. Tat-NIR-emissive polymersome을 이용하였을 경우, 수지상세포는 생체 내에서 33일까지 세포 추적을 가능하게 하였으며, quantum dot의 경우에는 본 연구와 마찬가지로 72시간까지 세포추적을 조사한 경우였다. 특히, 상기의 두 표지인자들은 세포 내 표지 처리시간이 최소 10시간 이상이 소요되었으나, 본 연구에서 활용한 DiD solution은 단 20분 만에 수지상세포에 표지 가능하였다. 수지상세포를 이용한 면역치료에는 *ex vivo* generation 단계가 필수적인데 여기에는 항원감작 (Antigen pulsing) 과정이 포함된다. 수지상세포 제조의 핵심적인 과정은 암세포 특이적인 강력한 항암면역을 유도하도록 암 특이 재조합 항원, 펩타이드 혹은 암세포 과쇄물 등을 감작시키는 과정이다. 상기의 표지인자들은 항원감작과정에서 동시에 처리되어 장시간 표지 과정을 거침에도 불구하고 이들이 수지상세포의 항원 흡입활성 및 항원 제시에 미치는 영향은 간과하고 있다. 반면 DiD solution은 제조 과정이 완료된 후 단시간에 표지가 이루어지므로 항원감작에는 영향을 미치지 않는 장점이 있다. 이러한 점들은 DiD solution이 수지상세포의 생체 내 세포추적 연구에 있어서 상기의 화합물들보다 효율적이며 경제적 측면에서 연구적 활용가치가 클 것으로 판단되었다. 뿐만 아니라 이를 이용하여 면역요법 개발에 활용되는 암세포 특이 T 세포, 자연살해 세포, 사이토카인 매개 살해세포 등의 생체 내 이동 및 분포에 관한 연구에도 성공적인 적용이 가능할 것으로 전망된다. 하지만 향후, DiD solution을 이용한 수지상세포 내 형광 유지 기간, 세포의 생존 기간 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendra, and K. Palucka (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811.
- Jung, N. C., H. J. Kim, M. S. Kang, J. H. Lee, J. Y. Song, H. G. Seo, Y. S. Bae, and D. S. Lim (2012) Photodynamic therapy-mediated DC immunotherapy is highly effective for the inhibition of established solid tumors. *Cancer Lett.* 324: 58-65.
- Lim, D. S., J. H. Kim, D. S. Lee, C. H. Yoon, and Y. S. Bae (2007) DC immunotherapy is highly effective for the inhibition of tumor metastasis or recurrence, although it is not efficient for the eradication of established solid tumors. *Cancer Immunol. Immunother.* 56: 1817-1829.
- Zahradova, L., K. Mollova, D. Ocadlikova, L. Kovarova, Z. Adam, M. Krejci, L. Pour, A. Krivanova, V. Sandecka, and R. Hajek (2012) Efficacy and safety of Id-protein-loaded dendritic cell vaccine in patients with multiple myeloma-phase II study results. *Neoplasma.* 59: 440-449.
- Koski, G. K., U. Koldovsky, S. Xu, R. Mick, A. Sharma, E. Fitzpatrick, S. Weinstein, H. Nisenbaum, B. L. Levine, K. Fox, P. Zhang, and B. J. Czerniecki (2012) A novel dendritic cell-based immunization approach for the induction of durable Th1-polarized anti-HER-2/neu responses in woman with early breast cancer. *J. Immunother.* 35: 54-65.
- Legler, D. F., P. Krause, E. Scandella, E. Singer, and M. Groettrup (2006) Prostaglandin E2 is generally required for human

- dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. *J. Immunol.* 176: 966-973.
7. Kalinski, P. (2012) Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol.* 188: 21-28.
 8. Jeong, J. G. (2004) General perspective for molecular nuclear imaging. *The Korean Society of Nuclear Medicine* 38: 111-114.
 9. Christian, N. A., F. Benencia, M. C. Milone, G. Li, P. R. Frail, M. J. Therien, G. Coukos, and D. A. Hammer (2009) *In vivo* dendritic cell tracking using fluorescence lifetime imaging and near-infrared-emissive polymersomes. *Mol. Imaging Biol.* 11: 167-177.
 10. Ahrdts, E. T., R. Flores, H. Xu, and P. A. Morel (2005) *In vivo* imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat. Biotechnol.* 23: 983-987.
 11. Noh, Y. W., Y. T. Lim, and B. H. Chung (2008) Noninvasive imaging of dendritic cell migration into lymph nodes using near-infrared fluorescent semiconductor nanocrystals. *FASEB* 22: 3908-3918.
 12. Kim, S., Y. T. Lim, E. G. Soltész, A. M. De Grand, J. Lee, A. Nakayama, J. A. Parker, T. Mihaljevic, R. G. Laurence, D. M. Dor, L. H. Cohn, M. G. Bawendi, and J. V. Frangioni (2003) Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* 22: 93-97.
 13. Ntziachristos, V., C. Bremer, and R. Weissleder (2003) Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable *in vivo* molecular imaging. *Eur. Radiol.* 13: 195-208.
 14. Shah, K., E. Bureau, and D. E. Kim (2005) Glioma therapy and real-time imaging of neural precursor cell migration and tumor regression. *Ann. Neurol.* 57: 34-41.
 15. Giepmans, B. N., S. R. Adams, and M. H. Ellisman (2006) The fluorescent tool-box for assessing protein location and function. *Science* 312: 217-224.
 16. Sutton, E. J., T. D. Henning, B. J. Pichler, C. Bremer, and H. E. Daldrup-Link (2008) Cell tracking with optical imaging. *Eur. Radiol.* 18: 2021-2032.
 17. Julius, M. H., E. Simpson, and L. A. Herzenberg (1973) A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 10: 645-649.