

큰갯버섯 추출물의 종양면역 증진 효과

한경훈¹ · 김도희¹ · 송관영¹ · 이계희¹ · 강태봉² · 윤택준^{3*}

¹서울의료원 의학연구소, ²건국대학교 의료생명과학부, ³유한대학교 식품영양학과

Enhancement of Anti-tumor Immunity by Administration of *Macrolepiota procera* Extracts

Kyung-Hoon Han¹, Doh-Hee Kim¹, Kwan-Yong Song¹, Kye-Heui Lee¹,
Tae Bong Kang² and Taek Joon Yoon^{3*}

¹Division of Clinical Research, Medical Institute, Seoul Medical Center, Seoul 135-740, Korea

²Department of Biotechnology, Konkuk University, Chungju-si 380-701, Korea

³Department of Food & Nutrition, Yuhan University, Bucheon 422-749, Korea

Abstract – To examine the potentiation of *Macrolepiota procera* extracts (MPE-4) to act as adjuvant enhancing the tumor specific anti-tumor immune response, tumor vaccine prepared by boiling (HK vaccine) admixed with MPE-4 and immunized in mice. Vaccination of mice with HK vaccine in combination with MPE-4 resulted in higher inhibition in tumor metastasis compared with the mice of HK vaccine alone treatment against live syngeneic tumor cell challenge. The splenocytes from mice immunized HK vaccine mixed with MPE-4 was able to elicit a stronger cytotoxic T lymphocyte (CTL) response as compared with HK vaccine alone. In addition, the splenocytes from MPE-4 admixed HK vaccine immunized mice secreted a higher concentration of Th1 type cytokine such as IFN- γ , and GM-CSF. Furthermore, the adoptive transfer of splenocytes from mice immunized HK vaccine and MPE-4 led to a more robust anti-tumour response than the HK vaccine alone. Overall, these results indicate that MPE-4 is a good candidate adjuvant of anti-tumor immune response.

Key words – Tumor immunity, *Macrolepiota procera*, Adjuvant, Cytokine, Adoptive transfer

종양의 극복을 위한 방법으로 종양에 대한 유효한 면역반응을 유발하는 면역요법에 대한 연구는 꾸준히 진행되고 있다.¹⁻³ 동물실험에서 살해된 종양세포 혹은 암항원의 면역은 종양의 예방 및 치료효과가 인정되기에 충분한 항종양면역반응을 유도하고 있으나,¹ 아직 임상에서 실질적으로 악성종양을 극복하기에 충분한 방법은 개발되어 있지 않다.⁴⁻⁷ 임상에서 종양의 면역요법이 실패하고 있는 가장 중요한 이유는 종양세포의 중요한 특징인 면역회피기전에 의하는 것으로 알려져 있다.^{8,9} 즉, 악성 종양세포는 class I- 및 II-MHC 발현이 억제되거나 혹은 면역반응 유도하는 항원이 없거나 혹은 있다 하여도 sialic acid가 포함된 점액다당류에 의해 항원이 숨어있어 세포독성 T 세포(cytotoxic T lymphocyte; CTL)의 작용 및 helper T cell의 기능을 방해하며,¹⁰ tumor cell이 T cell을 자극하는 co-stimulator signal

을 만들어내지 않아 T cell을 무기력상태 (anergy)로 전환하게 한다.^{2,4,11} 또한 종양세포는 조절 T 세포(regulatory T cell; Treg)의 발현을 촉진시킴으로 면역억제작용을 가지는 TGF- β 를 생산하여 종양에 대한 면역반응을 중지시킴으로써 암세포에 대하여 살해능을 획득한 작동세포의 살해기전을 무능화 시킨다.^{5,12} 암세포의 면역원성 측면에서, 아직 여러 종류의 종양에 대하여 면역반응을 유도하는 항원에 대한 확실한 증거는 없고, 일부 종양세포에서 얻은 단일항원으로는 유효한 종양면역이 유도되지 않기에 여러 연구자들은 최소한 3개 이상의 항원을 동시에 면역하는 다가 항원 혹은 whole tumor vaccine을 면역하는 방법을 연구하고 있다.^{6,13-17} 궁극적으로 종양에 대하여 유효한 면역반응을 유도하기 위하여 선행되어야 할 점은 악성종양 항원의 규명 및 종양항원 자체의 낮은 면역원성의 극복이다.^{2,6,18,19} 악성종양 고유 항원의 규명에 대한 연구는 현재에도 지속적으로 행해지고 있으며, 종양항원의 효과적인 면역반응의 유도를 위하여 낮은 면역원성의 극복을 위한 면역증강제(adjuvant)

*교신저자(E-mail): yoon_tj@yuhan.ac.kr
(Tel): +82-2-2610-0804

의 개념이 접목되어야 한다.^{7,19)} 종양에 대한 성공적인 면역능의 획득을 위하여 전문적 항원제시세포(professional antigen presenting cell; APC)인 dendritic cell (DC) 또는 macrophage에 의한 종양세포 포식(phagocytosis), 가공(processing) 및 T 세포에 대한 항원제시(antigen presenting)는 종양면역의 유도단계에서 필수적인 요소이다.^{4,6)} 즉, 항원제시세포의 항원제시능의 증진에 의한 종양 살해활성을 가지는 CTL의 생산은 종양면역의 유도에서 가장 중요한 요소이며, 따라서 APC의 활성화 기능을 가진 adjuvant의 도입은 종양세포가 가지는 고유의 악성종양 항원의 규명과 함께 항종양면역의 유도에 가장 중요한 요소로 사료된다.^{6,19)}

주름버섯과(Agaricaceae)에 속하는 큰갓버섯(*Macrolepiota procera*)은 우리나라를 포함하여 세계 각지에 분포하며 우리나라에서는 특히 말의 목장지대에서 많이 서식하기에 말뚝버섯 혹은 초이버섯으로 불리고 있다. 큰갓버섯은 식용버섯임에도 불구하고 생리활성에 대한 논문으로 항돌연변이 원성,²⁰⁾ 항산화작용²¹⁾ 및 항암작용²²⁾에 대한 것이 일부 있지만, 다른 식용버섯의 생리활성 연구가 진행된 것과 비교하여 국내외에서 거의 연구가 되어 있지 않은 버섯 중의 하나이다. 본 연구는 이전의 연구결과 얻은 큰갓버섯 추출물의 선천면역계 자극에 의한 항종양 효과²²⁾를 기초로, 암세포를 살해하여 얻은 종양백신의 면역에 의한 항종양 면역능의 유도에 있어서 큰갓버섯 추출물이 종양면역 반응을 증진시키는 adjuvant 활성이 있는지 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 - 생후 6-8주령의 자성 BALB/c를 (주)오리엔트에서 분양 받아 유한대학교 실험동물장에서 사육하였다. 마우스는 사육조에 5-10 마리씩 넣어 정수 된 물과 실험동물용 펠렛사료(삼양사료주식회사)를 자유 공급하였고, 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

시약 및 세포배양 - 비장세포 및 종양세포의 배양을 위한 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential medium (EMEM) 배지, fetal bovine serum (FBS), vitamin solution, non-essential amino acid, L-glutamic acid 등은 Gibco(Carlsbad, CA, USA)사에서 구입하였다. 종양세포주인 colon26-M3.1 lung carcinoma 및 B16-BL6 melanoma의 배양은 7.5% FBS, vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 함유된 EMEM 배지를 lymphocytes의 배양은 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 각각 이용하였다.

큰갓버섯 추출물 제조 - 본 실험에 사용한 큰갓버섯은 강원도 양양군 양양면의 진상원, 진중호님으로부터 기증받았고 유한대학교 식품영양과에서 검증하였다. 큰갓버섯의 추출은 버섯 자실체를 세절하고 중량의 10배되는 증류수를 첨

가한 후 4°C에서 16시간 추출하였다.²²⁾ 추출물은 원심분리(1,800×g, 30 min)를 통하여 상등액을 회수하고, 동결건조함으로서 큰갓버섯 물추출물을 준비하였고, 편이상 MPE-4로 칭하기로 하였다. MPE-4는 PBS를 이용하여 50 mg/ml의 농도로 조정 후, 0.2 μm의 pore size를 가지는 membrane filter(Whatman, Philadelphia, PA, USA)를 이용하여 여과 후 4°C에 보관하면서 실험에 적용하였다.

종양백신의 제조 - 백신 제조에 사용한 종양세포는 colon26-M3.1 carcinoma이며 기 발표된 방법으로 제조하였다.¹⁷⁾ 약술하면, 배양중인 종양세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 세포배양 flask로부터 분리 후, 배양배지를 넣고 1회, 그 후 PBS를 넣고 3회 세척함으로서 FBS 성분을 제거하였다. 종양백신의 제조는 세포 (1×10⁷/ml)를 PBS에 현탁 후, 100°C에서 30분간 중탕함으로 종양백신(HK-vaccine)을 제조하였다.

종양전이 모델 및 백신의 면역 - 시료의 항종양 효과는 colon26로부터 얻은 고전이성 세포주인 colon26-M3.1 carcinoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다.¹⁷⁾ 백신의 면역에 의한 항종양 활성의 측정을 위하여 colon26-M3.1 carcinoma 세포주 2×10⁵로 제조된 HK-vaccine 백신 단독 혹은 HK vaccine+MPE-4(50 μg)를 BALB/c 마우스의 피하에 1회 혹은 2주 간격으로 총 2회 면역하였다. 최종 면역 14일 후 배양 중인 colon26-M3.1 carcinoma (2.7×10⁵ cells)를 혈관 주사하였다. 종양 접종 14일 후에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 종양의 군집 수를 측정하였다.

마우스에서 NK-cell의 제거 - 마우스로부터 NK-cell의 제거는 기논문에서 발표된 것을 참고로 실시하였다.²³⁾ 즉, anti-asialo GM1 혈청(Wako Pure Chemicals Industries, Ltd., Osaka, Japan) 50 μl를 종양접종 1일 및 3일전에 각각 실험 마우스에 복강주사 하였다.

비장세포의 종양세포 살해 - BALB/c 마우스에 HK vaccine 단독 혹은 HK vaccine+MPE-4(50 μg)를 1주 간격으로 총 2회 면역하였다. 최종면역 1주 후 살아있는 colon26-M3.1 carcinoma 세포를 주사 후, 14일이 경과된 마우스 혹은 정상마우스로부터 비장을 준비하였다. 각각의 비장 세포는 5 × 10⁵ cells/well이 되도록 round bottom 96 well plate에 plating 하였으며 colon26-M3.1 carcinoma 세포(1 × 10⁴ cells/well)를 첨가하고 6시간 배양하였다. 배양 완료 후, 상등액 10 μl를 수집하고 비장세포에 의하여 살해된 종양세포의 정도를 측정하기 위하여 LDH kit (Bio Vision, Mountain View, CA, USA)의 용액을 제조사의 지침에 따라 첨가하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비장세포에 의한 암세포 살해활성은 다음식에 의하여 구하였다.

Cytotoxicity (%) = [(OD value of experimental group - OD value of spontaneous group) / (OD value of untreated group - OD value of spontaneous group)] × 100

Cytokine 유도 양식 - 비장세포의 종양세포 살해 활성에 서 사용한 비장세포 및 암세포를 동일한 조건으로 준비 후 3일간 배양하였다. 비장세포 배양상등액에 유도된 cytokine 인 IFN- γ , GM-CSF, IL-2 및 IL-4의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit (Pharmingen, USA)을 이용하여 조사하였다.

Adoptive Transfer - 입양전달에 사용한 비장세포는 HK-vaccine 혹은 HK-vaccine+MPE-4를 면역하고 최종면역 후 7일 후 살아있는 colon26-M3.1 carcinoma를 혈관주사하고 14일 된마우스로부터 비장세포를 적출하였다. 새로운 마우스에 colon26-M3.1 lung carcinoma를 혈관주사(2.7×10^5 cells)를 실시하고 1일 후, 군당 5마리씩 마우스를 준비하였다. 암 접종 1일 후 준비한 각각의 비장세포(2×10^6 cells/mouse)는 혈관주사를 통하여 입양전달 하였다. 암세포 접종 14일 후에 마우스를 희생시켰고, 폐에 전이된 종양의 군집수를 측정하였다.¹⁷⁾

통계처리 - 대조군에 대한 실험군 간의 통계적 유의성은 Student's two-tailed *t*-test로 분석하였다.

결과 및 고찰

종양백신 면역에서 큰갯버섯에 의한 항종양 면역의 유도 - 악성종양의 극복을 위한 연구결과 암세포가 스스로 면역 반응을 유도한다는 것은 인정되고 있으나, 현재까지 확실한 항종양 면역을 유도하는 종양항원의 실제 및 방법에 대한 논란은 계속되고 있다.^{1,6,13,16)} 항종양 활성의 유도를 위한 종양 백신은 whole vaccine의 일종인 기연구된 HK-vaccine을 이용하였다.¹⁷⁾ 실험동물에서 HK-vaccine의 면역은 종양에 대한 유효한 항종양 면역능을 유도하는 기능이 있음이 보

고되었다.¹⁷⁾ 실제로 HK-vaccine에 의한 항종양 활성의 유도에서 HK-vaccine의 면역은 항원제시세포의 CD11b 및 CD86의 발현을 촉진시킴으로 항원제시세포의 항원제시능을 증진시킴으로서 암세포 살해능을 가진 T 세포의 활성화를 유도하는 항 종양면역능을 유도하는 기능이 있음을 확인하였다.¹⁷⁾ 항원특이적인 면역반응을 유도는 선천면역계의 활성화를 기초로 한다. 앞선 보고에서 큰갯버섯 추출물은 선천면역계를 활성화시키는 작용이 있음을 확인하였다.²²⁾ 큰갯버섯의 선천면역 활성화 기능을 근거로 본 실험은 큰갯버섯 추출물이 종양백신의 면역에 의한 종양면역반응의 유도에서 종양에 대한 특이적 면역반응에 도움을 주는 adjuvant 활성이 있는지 확인하고자 실시하였다. 즉, 종양백신으로 HK-vaccine을 1회 혹은 2주일 간격으로 총 2회 실시하였으며 면역증강제로 MPE-4를 동시에 투여하였다. 실험결과, 종양 대조군에 비하여 HK-vaccine만을 1회 면역시 74.2%를 HK-vaccine에 MPE-4를 혼합하여 면역한 결과 약 96.5%의 종양전이능이 인정되었다. 한편 2회 면역시에는 HK-vaccine 단독의 면역으로도 약 90.9%의 높은 종양전이 억제 활성을 보였으며 이때 MPE-4를 동시에 면역한 군은 99.1%의 종양전이 억제 활성을 보임으로서 통계적으로 유의하게 높은 활성이 인정되었다(Table I). 이러한 실험결과는 MPE-4가 HK-vaccine의 면역에 의한 종양면역 반응을 증진시키는 adjuvant 활성이 있음을 보여주는 결과였다. 항종양 활성을 증진시키는 adjuvant 활성은 항원제시세포의 항원제시능을 촉진시킴으로서 유도된다.^{4,6,19)} 이러한 adjuvant의 기능은 주로 항원제시세포의 보조자극인자(co-stimulatory molecule) 생성 혹은 세포성 면역활성을 증가시키는 IL-12과 같은 cytokine의 생산에 의한다고 보고되고 있다.^{17,24)} 이전의 연구에서 MPE-4는 스스로 대식세포로부터 IL-12를 생산하는 cytokine inducer로서의 기능이 있음을 확인 한 바,²²⁾ MPE-4의 항종양 활성을 유도하는 adjuvant 활성을 유도하는 이유 중의 하나는 그의 IL-12 생산과 같은 cytokine inducer로서의 기능

Table I. Inhibition of tumor metastasis produced by colon26-M3.1 carcinoma following vaccination with HK vaccine and MPE-4

Group	No. of tumor colonies	Mean±SD	Inhibition %
Tumor control	111, 115, 106, 121, 138, 149	123.3±16.7	
1 time immunization	HK alone	25, 37, 31, 30, 38, 30	31.8±4.9*
	MPE-4 alone	102, 98, 89, 145, 121, 116	111.8±20.1
	HK+MPE	4, 5, 4, 3, 6, 4	4.3±1.0*
2 time immunization	HK alone	11, 9, 11, 16, 9, 11	11.2±6*
	MPE-4 alone	112, 98, 136, 129, 105, 142	120.3±17.9
	HK+MPE	0, 2, 2, 2, 0, 1	1.2±1.0*

Five BALB/c mice per groups of mice were vaccinated and inoculated i.v. with colon26-M3.1 carcinoma cells 14 days after final vaccination and killed 14 days after tumor inoculation for evaluation. The mean ± SD of metastasized tumors are shown. **p*<0.05 compared with the indicated compared group by Student's two-tailed *t*-test

과 관계가 있을 것으로 사료되었다.

MPE-4의 종양세포 특이적 면역증강 활성 - 종양세포에 대하여 살해활성을 가지는 가진 대표적인 작동세포는 NK-세포와 세포독성 T-세포(cytotoxic T-lymphocyte; CTL)가 알려져 있다.^{5,7,23} 본 실험은 HK-vaccine에 MPE-4를 혼합하여 유도된 항종양 활성이 종양 비특이적 면역세포 즉 선천 면역계를 구성하는 세포중의 하나인 NK-세포의 활성화에 의한 기능인지를 확인하기 위하여 실시하였다. 마우스에서 NK-cell의 제거는 anti-asialo GM-1 항체를 주사함에 의하여 실시하였다.²³ 실험 결과, anti-asialo GM1 항체를 처리하지 않은 정상마우스에 종양만을 접종한 경우는 약 72개의 암괴가 형성이 되었고 HK-vaccine+MPE-4를 동시에 면역한 결과 약 10개 정도의 암괴가 형성됨으로서 Table I과 동일한 양식의 종양전이 억제능이 인정되었다. 한편, NK-세포 제거를 위하여 anti-asialo GM1 항체를 처리한 군에서는 그보다 3배 이상인 약 309개의 암괴가 형성이 되어 실험마우스에서 NK-세포 제거가 우수하게 이루어져 있음을 확인하였다. NK-세포가 제거된 마우스에서 HK-백신을 MPE-4와 혼합하여 면역한 경우, 약 11개의 암괴가 형성이 되어 NK-세포가 제거된 경우에도 유의한 종양전이 억제효과가 인정되었다(Fig. 1). 따라서 HK-vaccine+MPE-4의 면역에 의하여 유도되는 종양전이 억제효과에 관여하는 작동세포는 최소한 NK 세포가 관여되지 않는 결과를 얻었으며 동시에 면역에 의하여 종양세포를 살해하는 작동세포는 세포독성 T-세포가 관여한다는 것을 강하게 시사하였다.^{17,23} 이미 이전의 연구에서 HK-vaccine의 면역은 주로 종양세포에 대항하는 T-세포의 활성화를 유도한다고 보고되었다.¹⁷ 따라서 HK-vaccine의 면역에 의한 항종양 면역의 유도에서 MPE-4의 효과에 대한 정확한 해석을 위하여 HK-vaccine 단독 및 HK-vaccine에 MPE-4를 혼합하여 면역하고 살아있

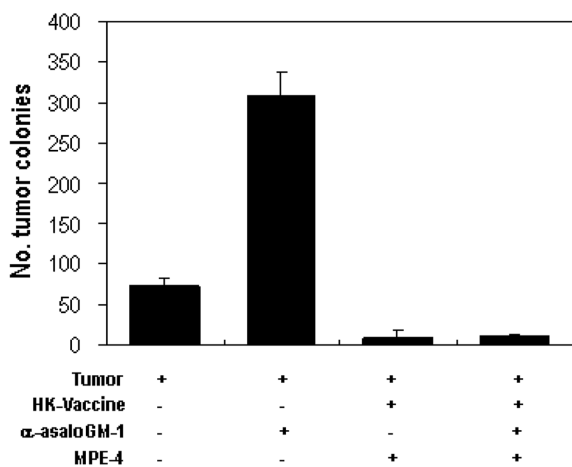


Fig. 1. Effect of anti-asialo GM1 Ab on tumor metastasis by colon26-M3.1 carcinoma following immunization with MPE-4 and HK-vaccine in mice.

는 colon26-M3.1 세포를 접종한 마우스로부터 얻은 비장세포의 colon26-M3.1 세포에 대한 세포독성 T-세포 활성을 조사하였다. 실험 결과, MPE-4는 HK-vaccine 면역 마우스의 의한 세포독성 T-세포의 암세포 살해 활성이 유의하게 증진키는 결과를 나타냈다(Fig. 2). 이러한 세포독성 T-세포에 의한 종양세포 살해 활성은 주로 T 세포가 생산하는 cytokine에 의하여 조절^{6,19,25}되고 있기에 면역마우스로부터 얻은 비장세포가 생산하는 각 cytokine의 생산 양식을 조사하였다.

종양세포 특이적 cytokine 생산에 미치는 효과 - HK-vaccine의 면역에서 MPE-4의 종양면역 유도 증진 효과를 검토하기 위하여 면역마우스로부터 얻은 비장세포의 종양세포 특이적인 cytokine 생산양식을 조사하였다(Fig. 3). 암세포의 재자극 없이 비장세포만의 배양상등액에서 IFN- γ 의 생산능을 조사한 결과, 정상마우스(normal), 종양만을 접종한 마우스(tumor control) 및 MPE-4만을 종양접종 14일전에 주사한 마우스(MPE-4 alone)로부터 얻은 비장세포는 유의한 IFN- γ 의 생산 활성이 없었다. 그러나 HK-vaccine 단독(HK-vaccine alone) 혹은 HK백신+MPE-4를 면역하고 종양세포를 접종한 마우스(HK-vaccine+MPE-4)의 비장세포는 재자극원인 암세포의 자극 없이도 유의한 IFN- γ 의 생산양식을 보였다. 그러나 두 군간의 IFN- γ 의 생산양식은 HK-vaccine+MPE-4 면역군이 HK-vaccine 단독 면역군스에 비하여 약 2배 정도 높은 IFN- γ 생산 양식을 보였다. HK-vaccine 면역 마우스의 비장세포가 암세포 재자극 없이 높은 IFN- γ 의 생산성을 보인 것은 마우스 희생시 마우스에 존재하는 접종한 암세포에 대하여 높은 세포성 면역반응을 유도하고 있는 것으로 생각되었고, MPE-4를 동시에 면역한

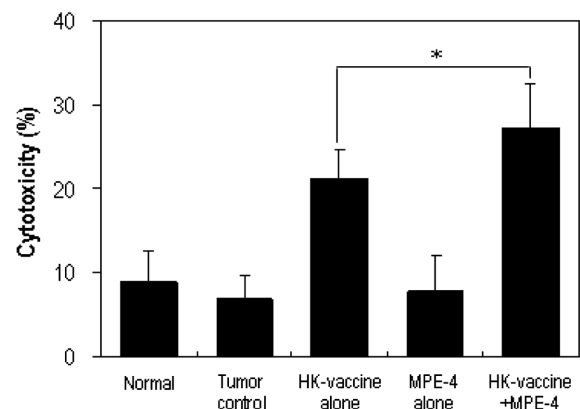


Fig. 2. Effect of MPE-4 on enhancement of CTL activity against syngeneic tumor cells. Splenocytes from mice immunized each vaccine were harvested and incubated with colon26-M3.1 cells. Cytotoxicity activity was determined by commercially available LDH kit after 6 hour of culture. The mean \pm SD of triplicate determinations are shown. * p <0.05 compared with the indicated compared group by Student's two-tailed t -test.

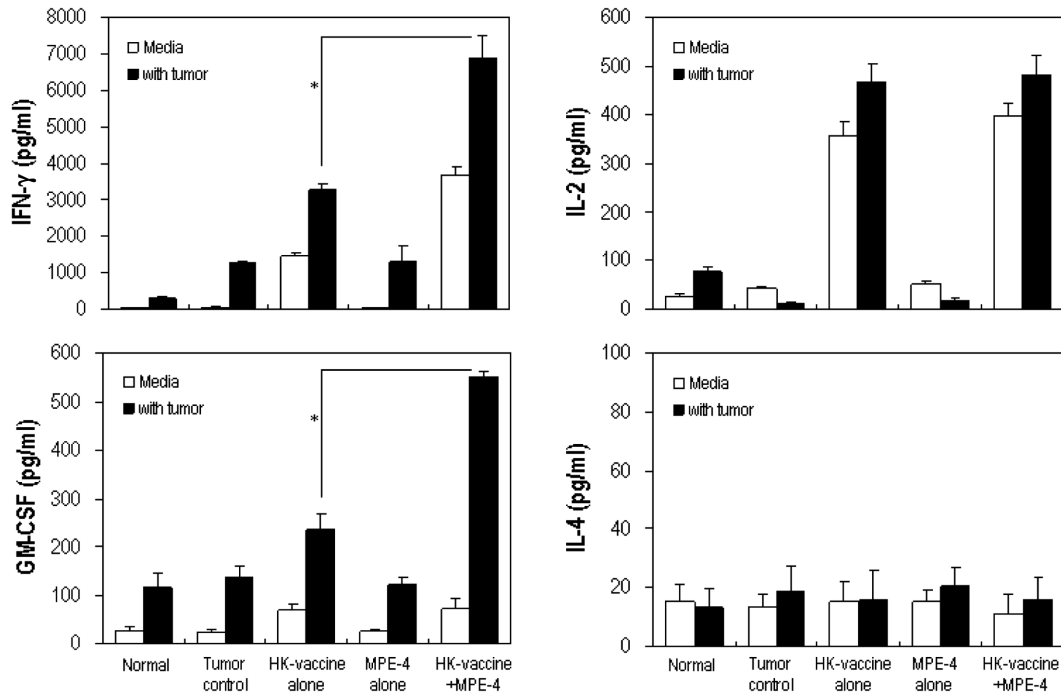


Fig. 3. Cytokine production from splenocytes of mice immunized with HK vaccine and MPE-4. The splenocytes of each immunized groups were collected from mice and cultured with live colon26-M3.1 cells for three days. The levels of cytokines in the culture supernatant were measured using an each ELISA kit. The mean \pm SD of triplicate determinations are shown. * $p < 0.01$ compared with the indicated group by Student's two-tailed *t*-test.

경우 더 높은 IFN- γ 의 생산효과가 나타난 것은 앞서 MPE-4가 HK-vaccine의 면역에 의한 면역반응을 증진시키는 활성이 있음을 증명하는 결과로 사료되었다. 동시에 HK-백신의 면역에 의한 항암효과는 주로 T세포 매개의 면역증강 활성이 기인하는 결과임을 시사하였다.⁵⁻⁷⁾ IFN- γ 는 주로 Th1 type의 T cell, 혹은 종양세포에 대하여 살해력을 가지는 CTL이 생산하는 cytokine으로 MPE-4가 HK-vaccine의 면역에 의한 IFN- γ 의 생산을 약 2배 정도 증가시킨 것은 MPE-4가 HK-vaccine의 면역에 의한 CTL을 활성화(Fig. 2) 또는 helper T cell을 경유하는 cross-priming에 의한 CTL의 활성화를 증진시키는 기능이 있음을 강하게 시사하였다.^{5-7,19,26)} 한편, 골수세포로부터 granulocyte 및 monocyte 등의 면역작용세포로의 분화 및 증식을 촉진하는 GM-CSF의 생산능력도 IFN- γ 의 생산과 동일한 경향을 보였다. 이러한 결과는 MPE-4가 종양세포와 동시에 면역시 종양면역반응을 유도하는 dendritic cell (DC) 혹은 macrophage와 같은 항원제시세포의 항원제능을 증진시킴으로서, 결국 종양에 대항하는 T 세포를 활성화 시키는 기능이 있는 것으로 사료되었다.^{25,26)} T세포 성숙 인자인 IL-2의 경우 HK-vaccine의 면역 및 HK백신+MPE-4가 비슷한 경향을 보였으나 종양 대조군에 비하여 유의하게 높은 생산양식을 보였다. 이상의 결과는 MPE-4가 HK-vaccine의 면역에 의하여 유도되는 종양특이적 반응에서 항원제시능 및 T 세포의 종양세포 살해능을 높이는 adjuvant

활성이 있다는 것을 보여주었다. 한편, 대표적인 Th2 type의 cytokines인 IL-4는 주로 B-세포의 항체생성을 유도하는 cytokine으로 알려진 바, 각 군의 마우스의 비장세포의 IL-4 생산양식에는 유의한 차이가 인정되지 않았다. 따라서 MPE-4를 adjuvant로 면역한 결과 유도되는 HK-vaccine에 의한 항종양 활성 증진 효과는 IL-4와 같은 Th2 type의 cytokine에 의한 B-세포의 활성화 측면 보다는 IFN- γ 등이 주를 이루는 세포성 면역계의 활성화에 의한 면역증강 효과임을 암시하였다.^{2,17)}

면역마우스의 비장세포 입양전달에 의한 항종양 효과 – MPE-4는 HK-vaccine 면역에 의한 항종양 활성을 유의하게 증진시켰기에, 백신을 면역 후 암세포가 이식된 마우스의 비장세포의 입양전달(adoptive transfer)에 의한 항종양 활성의 유도 효과를 조사하였다(Fig. 4). 즉, Table I 결과에서 백신 2회 면역 마우스와 동일한 조건의 마우스로부터 얻은 비장세포를 이미 colon26-M3.1 carcinoma가 접종된 마우스에 혈관주사법으로 입양전달하고 종양전이 억제효과를 조사하였다. 실험 결과 HK-vaccine을 면역 후 암세포를 이식한 마우스로부터 얻은 비장세포를 입양전달한 마우스는 대조군에 비하여 약 42.4%의 종양전이 억제효과를,¹⁷⁾ HK-vaccine +MPE-4를 면역한 경우는 약 71.4%의 증가된 종양전이 억제효과를 보였다. 이 결과는 MPE-4가 HK-vaccine의 면역에 의하여 유도되는 CTL의 암세포 살해력(Fig. 2)을 증진

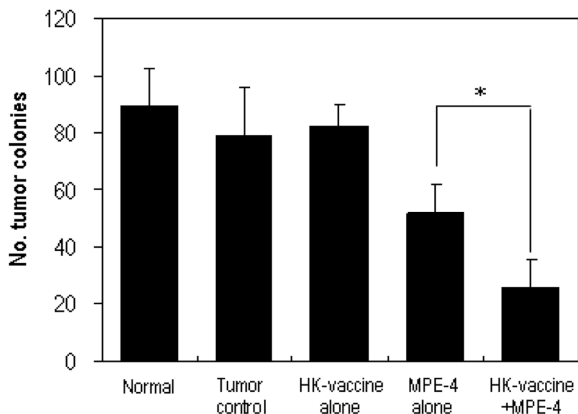


Fig. 4. Induction of T cell-mediated anti-tumor immunity. Spleen cells from indicated treated mice were transferred to colon26-M3.1 carcinoma cell inoculated BALB/c mice. * $p < 0.05$ compared with the indicated group by Student's two-tailed t -test.

시키는 기능에 의한 것으로 사료되었다.^{17,27,28)} 실험동물에서 바이러스 혹은 암 특이 T 세포의 입양전달은 항원에 대항하는 작동세포의 역할 특히 T세포의 역할에 대한 연구에서 많이 수행되어 왔다. 이러한 연구는 암세포에 대한 $CD4^+$ T 세포 혹은 $CD8^+$ T 세포가 종양에 대한 작동세포로 매우 중요함을 제시하고 있고, 최근에는 이러한 T세포의 작동력을 증진시키기 위하여 암세포에 대하여 감작된 수지상 세포를 T 세포와 동시에 입양전달 함으로서 암을 극복하려는 노력도 진행되고 있다.²⁸⁾ 따라서 본 실험에서 MPE-4와 HK-vaccine을 동시에 면역한 경우가 HK-vaccine 단독을 면역한 비장세포의 입양전달에 비하여 우수한 항종양 활성이 인정된 것을 해석하기 위하여 MPE-4에 의하여 활성화되는 여러 가지 종류의 작동세포에 대한 자세한 연구가 필요하다 사료되었다. 약용식물 혹은 버섯으로부터 분리한 lentinan 등의 다당체 성분은 외래물질에 대한 면역반응을 증진시키는 기능이 있다는 것은 잘 알려져 있다.^{22,23)} 본 연구에서 사용한 큰갯버섯 추출물은 선천면역계의 활성화에 의한 항암 작용이 있다는 것은 이미 보고²²⁾되었고, 본 연구에서 종양에 대한 면역 반응을 증진시키는 adjuvant 활성이 있음이 밝혀진 바, 앞으로 큰갯버섯에서 면역반응을 조절하는 대표 성분의 분리 및 동정에 대한 연구가 요구되었다.

결 론

큰갯버섯 추출물인 MPE-4의 종양에 대한 특이적 면역증강 효과를 조사하기 위하여 colon26-M3.1 carcinoma로부터 제조된 HK-vaccine과 혼합하여 면역 후, 살아있는 암세포를 이식하여 면역된 마우스의 종양 전이 억제능을 조사하였다. HK-vaccine만을 면역한 경우에 비하여 HK-vaccine에

MPE-4를 혼합하여 면역한 결과 유의한 종양전이 억제효과가 나타났다. MPE-4와 HK-vaccine의 면역에 의한 항종양 활성은 NK-cell의 활성화에 의한 것은 아니었으며 MPE-4는 HK-vaccine의 면역에 의한 CTL 활성을 높이는 기능이 있었다. 또한, HK-vaccine 단독 혹은 HK와 MPE-4를 혼합하여 면역한 마우스의 비장세포를 살아있는 colon26-M3.1 cell로 재자극 후 배양 상등액에 생산된 cytokine을 조사한 결과 백신 특이적인 $IFN-\gamma$ 및 GM-CSF의 생산이 증가되는 경향을 보였다. HK-vaccine에 MPE-4를 동시에 면역하고 암세포를 이식한 마우스로부터 얻은 비장세포를 colon-M3.1 carcinoma를 이식한 마우스에 입양전달 한 결과 HK-vaccine을 면역한 마우스의 비장세포를 입양전달한 경우에 비하여 높은 항종양 활성이 인정되었다. 이 결과로부터 MPE-4는 종양백신의 면역시 종양에 대한 세포성 면역반응을 증진시켜 종양의 전이를 유의하게 억제하는 adjuvant 활성이 있음을 확인하였다.

인용문헌

1. Burnet, F. M. (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**: 1-27.
2. Rosenberg, S. A., Yang, J. C. and Restifo, N. P. (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* **10**: 909-915.
3. Emens, L. A. (2006) Roadmap to a better therapeutic tumor vaccine. *Int Rev Immunol.* **25**: 415-443.
4. Gough, M. J., Melcher, A. A., Ahmed, A., Crittenden, M. R., Riddle, D. S., Linardakis, E., Ruchatz, A. N., Emilusen, L. M. and Vile, R. G. (2001) Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res.* **61**(19): 7240-7247.
5. Schnurr, M., Scholz, C., Rothenfusser, S., Galambos, P., Dauer, M., Robe, J., Endres, S. and Eigler, A. (2002) Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res.* **62**: 2347-2352.
6. Strome, S. E., Voss, S., Wilcox, R., Wakefield, T. L., Tamada, K., Flies, D., Chapoval, A., Lu, J., Kasperbauer, J. L., Padley, D., Vile, R., Gastineau, D., Wettstein, P. and Chen, L. (2002) Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res.* **62**: 1884-1889.
7. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. and Zitvogel, L. (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* **7**: 297-303.
8. Ahmad, M., Rees, R. C. and Ali, S. A. (2004) Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**: 844-854.

9. Seliger, B. (2005) Strategies of tumor immune evasion. *Bio-Drugs* **19**: 347-354.
10. Gutzmer, R., Li, W., Sutterwala, S., Lemos, M. P., Elizalde, J. I., Urtishak, S. L., Behrens, E. M., Rivers, P. M., Schlienger, K., Laufer, T. M., Eck, S. L. and Marks, M. S. (2004) A tumor-associated glycoprotein that blocks MHC class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol.* **173**: 1023-3102.
11. Ogino, T., Bando, N., Hayashi, T., Miyokawa, N., Harabuchi, Y. and Ferrone, S. (2003) Association of tapasin and HLA class I antigen down-regulation in primary maxillary sinus squamous cell carcinoma lesions with reduced survival of patients. *Clin. Cancer Res.* **9**: 4043-4051.
12. Witham, T. F., Villa, L., Yang, T., Pollack, I. F., Okada, H., Robbins, P. D. and Chambers, W. H. (2003) Expression of a soluble transforming growth factor-beta (TGFbeta) receptor reduces tumorigenicity by regulating natural killer (NK) cell activity against 9L gliosarcoma *in vivo*. *J. Neurooncol.* **64**: 63-69.
13. Cheuk, A. T., Chan, L., Czepulkowski, B., Berger, S. A., Yagita, H., Okumura, K., Farzaneh, F., Mufti, G. J. and Guinn, B. A. (2006) Development of a whole cell vaccine for acute myeloid leukaemia. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**: 68-75.
14. Copier, J. and Dalglish, A. (2006) Overview of tumor cell-based vaccines. *Int. Rev. Immunol.* **25**: 297-319.
15. Prasad, S. J., Farrand, K. J., Matthews, S. A., Chang, J. H., McHugh, R. S. and Ronchese, F. (2005) Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* **174**: 90-98.
16. Korbelik, M. and Sun, J. (2006) Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**: 900-909.
17. Yoon, T. J., Kim, J. Y., Kim, H., Hong, C., Lee, H., Lee, C. K., Lee, K. H., Hong, S. and Park, S. H. (2008) Anti-tumor immunostimulatory effect of heat-killed tumor cells. *Exp. Mol. Med.* **40**: 130-144.
18. Berzofsky, J. A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I. M., Ahlers, J. D., Janik, J. E. and Morris, J. C. (2004) Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J. Clin. Invest.* **113**: 1515-1525.
19. Miconnet, I., Koenig, S., Speiser, D., Krieg, A., Guillaume, P., Cerottini, J. C. and Romero, P. (2002) CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J. Immunol.* **168**: 1212-1218.
20. Kim, H. J. and Lee, I. S. (2004) Antimutagenic and cytotoxic effects of Korean wild mushrooms extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**: 662-668.
21. Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Morais, J. S. and Ferreira, I. C. (2007) Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 4781-4788.
22. Han, K.H., Kim, D. H., Song, K. Y., Jo, S. Y., Lee, S.W. and Yoon, T. J. (2010) Activation of innate immunity by *Lepiota procera* enhances antitumor activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 115-121.
23. Ha, E. S., Hwang, S. H., Shin, K. S., Yu, K. W., Lee, K. H., Choi, J. S., Park, W. M. and Yoon T. J. (2004) Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 217-224.
24. Zhang, S., Li, W., Xia, Z. and Mao, Y. (2011) CD4 T cell dependent tumor immunity stimulated by dendritic cell based vaccine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **413**: 294-298.
25. Fields, R. C., Shimizu, K. and Mule, J. J. (1998) Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9482-9487.
26. Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Bell, D., Burkeholder, S., Kraus, E. T., Davoust, J. and Palucka, K. A. (2000) Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J. Immunol.* **165**: 3797-803.
27. Pandolfi, F., Cianci, R., Lolli, S. and Dunn, I.S., Newton, E. E., Haggerty, T.J., Boyle L.A. and Kurnick, J. T. (2008) Strategies to overcome obstacles to successful immunotherapy of melanoma. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **21**: 493-500.
28. Song, S., Zhang, K., You, H., Wang, J., Wang, Z., Yan, C. and Liu, F. (2010) Significant anti-tumour activity of adoptively transferred T cells elicited by intratumoral dendritic cell vaccine injection through enhancing the ratio of CD8(+) T cell/regulatory T cells in tumour. *Clin. Exp. Immunol.* **162**: 75-83.

(2011. 12. 5 접수; 2012. 1. 2 심사; 2012. 2. 17 게재확정)