

CEA와 Tat 융합 단백질을 이용한 CEA 특이 항종양 면역능의 유도 증가

가톨릭대학교 의과대학 외과학교실, ¹미생물학교실

안창혁 · 강원경 · 오승택 · 조현일¹ · 김태규¹

Enhanced Induction of CEA Specific Tumor Immunity by TatCEA Fusion Protein

Chang Hyeok An, M.D., Wong Kyung Kang, M.D.,
Seong-Taek Oh, M.D., Hyun Il Cho, Ph.D.¹, Tae Gui Kim, M.D.¹

Departments of Surgery and ¹Microbiology, Catholic University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: The human carcinoembryonic antigen (CEA) is expressed in several tumor types, including colorectal cancer, and is a tumor-associated antigen used as a target for antigen-specific immunotherapy. CEA is a self-antigen associated with development, expressed in fetal cells and rarely expressed in normal colorectal epithelial cells. The induction of immune response to CEA is very difficult. In this study, we attempted to increase the tumor immunity specific to CEA by using dendritic cells pulsed with fusion proteins of CEA and Tat (transactivator of transcription), which transduces extracellular proteins into cytoplasm and causes antigens to be presented with MHC class I pathway.

Methods: The Tat gene was amplified in the PNL4-3 HIV plasmid and then inserted into PCEP4 plasmid vector. The CEA gene was cloned from cDNA from LoVo human colorectal cell line and then amplified through polymerase chain reaction method. After cloning of PCEP4 plasmid vector, the dendritic cell was sensitized and internalized with CEA and Tat-CEA protein. Then the Western blot analysis of the expression of CEA in the gene-modified dendritic cell and the immunofluorescent staining of the expression of CEA in CEA or Tat-CEA-pulsed dendritic cell were performed. A detection of IFN- γ -releasing CD8+ cell and a cytotoxicity of T-cell were assessed using ELISPOT assay. The Immunoglobulin (Ig) G isotypes were analyzed with enzyme-linked immunosorbent assay. The statistical significance was assessed using Students t-test.

Results: CEA pulsed in dendritic cells was distributed over the cell surface and TatCEA was observed in the cytoplasm. The cellular immune responses by immunization with dendritic cells pulsed with TatCEA ($322/10^4$ lymphocytes)

were significantly increased compared with those with CEA ($244/10^4$ lymphocytes) by IFN- γ ELISPOT assay ($P < 0.05$). The cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity using mouse T-cell, EL-4 pulsed peptide (EAQNTTYL) as target cells was $23.3 \pm 2.75\%$ (E : T = 1 : 100) in the CEA group and $22.9 \pm 2.23\%$ (E : T = 1 : 100) in the TatCEA group. In ELISA analysis of the IgG isotype, the titer of IgG2a and IgG3, representing Th1 immune response, was lower than that of IgG1, representing Th2 immune response, in both the CEA group and the TatCEA group.

Conclusions: These results suggest that TatCEA could be used for the development of a tumor vaccine and cellular immunotherapy using CTLs induced in vitro. *J Korean Soc Coloproctol 2003;19:121-128*

Key Words: Carcinoembryonic antigen (CEA), Tat, Dendritic cell (DC), Cytotoxic T lymphocyte (CTL)
암태아성 항원, Tat, 수지상세포, 세포독성 T세포

서 론

항종양 면역반응에는 일반적으로 세포성 면역반응이 관여하고, 이러한 반응은 CD8+ 세포독성 T세포 (CD8+ cytotoxic T lymphocyte; CTL)의 역할이 중요한 것으로 알려졌다.¹ 이들 항종양 T세포를 유도하기 위해 종양-연관 항원(tumor-associated antigen; TAA)에 대한 연구가 지속되어 왔으며, 재조합 DNA 기술의 발달로 종양에 대한 T세포 면역치료법의 개발을 위한 연구가 최근 계속되고 있다.² 종양-연관 항원에는 prostate-specific antigen,³ HER-2/neu,⁴ MUC-1,⁵ point mutated or wild-type overexpressed p53,⁶ MAGE antigen,⁷ 그리고 carcinoembryonic antigen (CEA) 등이 알려져 있으며, 종양 항원 유래의 펩타이드 항원결정기(peptide epitope)를 규명하고 이들 종양 항원에 특이적으로 작용하는 세포독성 T 세포를 이용하여 종양을 치료하기 위한 면역 치료법이 개발되고 있다.⁸

책임저자: 오승택, 서울시 서초구 반포동 505
가톨릭대학교 강남성모병원 외과(우편번호: 137-701)
Tel: 02-590-2781, Fax: 02-595-2992
E-mail: stoh@catholic.ac.kr

CEA는 180 kDa의 당단백질로서 대장암, 위암, 췌장암에서 95% 이상 발현되고, 유방암의 약 50%, 비소세포성 폐암의 70%에서 발현되는 것으로 보고되었다.⁹ 종양세포에 특이적으로 작용하는 항원-특이 세포독성 T세포가 유도되기 위해서는 MHC class I 분자에 항원이 제시되는 과정이 필수적이다. 이러한 과정은 세포 내의 단백질이 large multifunctional proteasome에 의해 처리되어 transporter associated with antigen processing 단백질에 의해 소포체(endoplasmic reticulum)로 이동하여 MHC class I 분자와 결합되고, 골지체를 경유하여 세포 표면에 제시되는 과정으로 이루어진다.¹⁰

CEA를 이용한 항종양 효과 연구에서 MHC class I 항원제시 과정에 의한 세포독성 T세포를 유도하기 위하여 초기에는 CEA를 발현하는 재조합 vaccinia 바이러스를 이용하였다. 마우스 모델에서 재조합 vaccinia를 면역 주입하여 CEA에 특이적인 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 유도하여 CEA를 발현하는 종양세포에 대하여 방어적인 면역반응이 일어나는 것을 확인하였다.¹¹ 최근에는 전이성 선암 환자에서 재조합 vaccinia를 이용하여 항종양효과를 유도하기 위한 연구가 시도되고 있다.¹² 또한 몇몇 MHC class I 분자에 제한적인 CEA 항원 결정기(CEA peptide epitope)가 규명됨으로서 수지상세포와 CEA peptide를 이용하여 종양에 대한 세포독성 T세포를 유도하고자 하는 연구가 있으며,¹³ CEA를 암호화하고 있는 DNA를 결장직장암 환자에 주입하여 CEA에 특이적인 세포독성 T세포 생성을 유도함으로써 효과적인 항종양 면역반응을 유도한 보고가 있다.¹⁴ 그러나, 이러한 MHC class I 분자에 의한 항원제시 과정은 세포 내부에서 발현되는 단백질에 국한되어 나타나는 특징이 있으므로 최근에는 외래 단백질을 직접 MHC class I 분자에 제시되도록 하는 연구가 시도되고 있다. 일반적으로 백신으로 사용되는 외래 단백질은 세포내에 이입(endocytosis)된 후 대부분 MHC class II 분자에 의해 제시되어 Th (CD4+) 세포를 자극하게 되므로 항종양 면역반응을 증가시키는 데 부적합한 것으로 알려져 있다.

HIV Tat (transactivator of transcription) 단백질은 N-terminal domain, cystein rich domain, core domain, basic domain, 5th domain의 다섯 domain 구조로 이루어져 있으며, chemokine으로 작용하여 단핵구의 화학주성을 유도하고, 세포내 이입 과정을 거치지 않고 세포질 내로 전달되는 특징이 있다.¹⁵ 이 중 Tat 단백질이 세포질 내로 전달되는 특징은 residue 49에서 57 아미노기(RKKRRQRR)에 해당하는 부분에 의한 것으로 밝

혀져 있으며,¹⁶ 세포질 내로 전달된 Tat 단백질은 아직 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 세포질 내에서 단백질 분해 과정을 거쳐 소포체 내에서 MHC class I 분자와 결합하여 세포 표면에 제시되는 것으로 알려져 있으므로, 이러한 특징은 종양 항원들에 대한 MHC class I 분자에 제한된 세포독성 T세포 면역반응을 유도하기 위해 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 대장암 환자의 임상 치료를 위한 기초 연구로서 외부 단백질을 세포질 내로 이동시킬 수 있는 성질을 가진 Tat 단백질을 CEA와 융합하여 CEA를 단백질 형태로 제공하여 MHC class I 항원 제시 과정을 경유한 항원 제시가 가능하도록 종양 항원을 변형함으로써 CEA에 특이적인 항종양 면역능, 즉 세포독성 T세포에 의한 세포성 면역반응을 증가시킬 수 있는 종양 백신을 개발하고자 하였다.

방 법

1) CEA와 TatCEA 융합 유전자의 클로닝과 발현

HIV 유전자를 포함하는 PNL4-3 HIV plasmid에서 Tat 유전자를 증폭하기 위하여 다음의 primer를 이용하였다. Sense primer 5'-GCATAGATCTGATGTGTTT CATGACAAAAGCCT-3', antisense primer 5'-CGTAG GATCCGATTGCTTTGATAGA-GAAGCTTG-3'으로 증폭된 유전자 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하고, Gel extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 HIV-1 Tat 유전자를 분리하였다. CEA 유전자는 primer (sense 5'-GACTTTTTTAACACAG AATTGGG-3', antisense 5'-CCTTGTGCCCATGGAAC ACAGAC-3')를 이용하여 사람 대장암 종양 세포주인 LoVo 세포주(ATCC# CCL-229)로부터 분리된 cDNA에서 PCR법으로 증폭하였다. 분리된 Tat 유전자를 *Bgl II*와 *BamH I*으로 자른 후 동일한 제한효소로 처리한 pCEP4 plasmid vector (Invitrogen, Groningen, Netherlands)에 삽입하였다. 재조합 pCEP4 plasmid vector를 다시 *BamH I*으로 처리하고 CEA 유전자를 삽입하여 TatCEA가 삽입된 재조합 pCEP4 plasmid vector와 CEA 유전자만 삽입된 pCEP4 plasmid vector를 클로닝하였다.

2) 세포주 및 배양

EBNA 단백질을 발현하는 293EBNA 세포주와 CEA를 발현하는 293EBNA/CEA, TatCEA가 발현되는 293EBNA/TatCEA는 2 mM L-glutamine과 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS: Gibco BRL, Grand Island,

NY, USA)이 포함된 DMEM (Gibco BRL) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 마우스 T 세포 림프종 EL-4 (ATCC, Manassas, VA, USA)세포는 위와 같이 제조된 DMEM 배지에서 배양하였다.

3) CEA와 TatCEA 융합 단백질로 감각시킨 수지상 세포를 이용한 면역

실험쥐 유래의 수지상 세포를 배양하기 위하여 6~8주령 암컷 C57BL/6 마우스의 골수로부터 분리한 골수 세포에서 T세포, B세포 및 대식세포를 제거한 후 100 ng/ml GM-CSF (Genzyme, Cambridge, MA, USA)와 500 U/ml IL-4 (Genzyme)가 포함된 RPMI 1640 배지 (Gibco BRL)에서 7일간 배양하였다. 수지상 세포에 단백질 감각은 TatCEA 융합 단백질과 CEA 단백질을 다양한 농도로 처리한 후 상온에서 10분 반응시키고 형광염색하여 형광현미경으로 관찰하거나 형광 분석기를 이용하여 단백질 전이를 확인하였다.

적정 농도의 CEA 융합 단백질과 TatCEA 융합 단백질로 처리한 수지상 세포(5×10^5 /마리)를 각 실험군당 4마리씩 마우스에 정맥주사하였다. 대조군으로 단백질을 처리하지 않은 수지상 세포를 주입하였다. 제 1차 수지상 세포의 정맥주사 후, 2주일 후 재주사하고, 재주사 2주 후에 체액성 면역 반응과 세포성 면역 반응을 측정하였다.

4) ELISPOT에 의한 INF- γ 발현 림프구 측정

CEA 펩타이드에 대한 세포성 면역반응 유도 효과로서 INF- γ 를 측정하기 위해 마우스에서 분리하여 1주간 배양한 수지상세포에 10 μ g/ml로 CEA 펩타이드를 감각시켜 항원제시세포로서 사용하였다. 마우스 capture mAb INF- γ 가 코팅된 후 96-well 배양조에 면역 주입한 마우스의 비장세포를 분리하여 적혈구를 제거한 다음 CEA 펩타이드가 감각된 수지상 세포와 같은 비율(1 : 1)로 혼합하여 1×10^4 /well 농도로 배양조에 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 반응시켰다. PBS (phosphate-buffer saline)/Tween (0.05%)로 3회 세척 후 2 μ g/ml Biotinylate가 부착된 항 INF- γ 항체를 첨가하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 4번 수세한 다음 avidin/alkaline phosphatase를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 발색하여 각 well의 spot 개수를 ELISPOT 측정기(AID, ELISPOT Reader System, Strassberg, Germany)를 이용하여 측정하였다.

5) CEA 특이 T세포주의 세포 살해능 측정

면역되지 않은 수지상 세포 1×10^6 /ml에 H-2K^b로 제한된 CEA 펩타이드를(EAQNTTYL) 10 μ g/ml 농도로 4시간 반응시킨 세포를 2번 수세한 다음 표적 항원이 첨가된 수지상 세포를 3,000 cGy로 방사선 조사하였다. 면역 주입한 마우스의 비장세포를 분리하여 20 : 1 비율로 혼합하고 24-well 배양조에 접종한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 2~3일 마다 세포를 관찰하면서 20 U/ml의 IL-2 (Genzyme)를 첨가하였다. 배양 7일 후 자극된 림프구를 수득하여 CEA에 대한 특이 CTL 살해능을 측정하기 위해 EL-4 세포에 CEA 펩타이드를 10 μ g/ml 농도로 4시간 반응시킨 후 2회 수세한 다음 표적세포로 사용하여 종양에 대한 특이적인 세포 살해능을 측정하였다. 표적세포를 100 Ci ⁵¹Cr/ 5×10^5 세포로 90분 동안 표지한 다음 4회 수세 후 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지에 부유하여 V-형의 96-well 배양조에 1×10^4 /well 농도로 접종하고 시험관내에서 배양된 T 세포주를 100 : 1 비율로 첨가하였다. 배양조를 1,500 rpm에서 10분 원심 침전시킨 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양한 후 100 μ l의 상층액을 수거하여 γ -counter (Packard, Meriden, CT, USA)를 이용하여 방사량을 측정하고 다음의 계산식을 이용하여 세포살해 정도를 측정하였다.

$$\% \text{ specific release (SR)} = \frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Maximal release} - \text{Spontaneous release}} \times 100$$

Experimental release: 표적세포와 세포독성 T 세포를 함께 배양하여 얻은 값

Spontaneous release: 배지만으로 배양된 표적세포에서 얻은 값

Maximal release: 1% Triton X-100을 첨가하여 배양한 표적세포에서 얻은 값

6) CEA 특이 형광항체 역가 측정 및 IgG의 isotype 분석

면역 주입한 마우스에서 분리한 혈청을 단계별로 희석하여 CEA를 발현하는 LoVo 세포주를 spot 슬라이드에 코팅하고 고정시킨 후 혈청을 단계별로 희석하여 30분 반응시킨 다음 3번 수세한 후 CEA에 대한 항체 역가를 형광이 부착된 anti-IgG를 이용하여 형광 현미경하에서 관찰하였다.

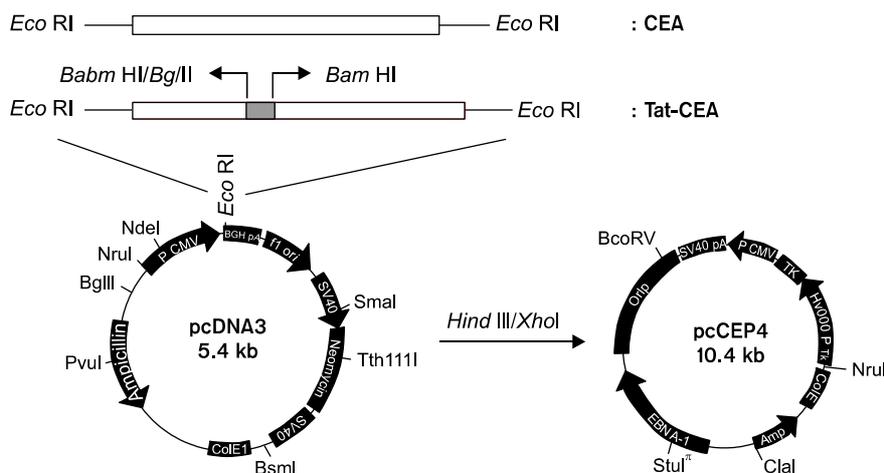


Fig. 1. Map of recombinant plasmid, pCEP4-CEA and pCEP4-TatCEA. The direction of transcription is indicated by an arrow. Restriction endonuclease sites containing the *Eco*RI, *Bam* HI, *Bgl* II cloning site are showed and cloned with CEA, TatCEA.

마우스 혈청에 포함된 CEA의 항체 타입을 측정하기 위해 96-well 배양조에 CEA를 발현하는 LoVo 세포 주로 코팅하여 고정된 다음 면역 주입한 마우스의 혈청을 1 : 500으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG)의 항체를 이용하여 포함된 농도를 ABTS {2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)}기질 (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 발색시킨 다음 Spectra MAX 250 ELISA 측정기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 분석하였다.

7) 통계학적 분석

모든 측정 결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 자료의 유의성을 검정하기 위하여 Student's *t*-test로 통계 처리하여 유의성을 검정하였으며 통계학적 유의수준은 P<0.05 이하로 하였다.

결 과

1) TatCEA 융합단백질 발현 및 단백질 전이능 확인

TatCEA 융합단백질과 CEA 단백질을 생산하기 위해 재조합 pCEP4-TatCEA와 pCEP4-CEA plasmid를 사람 태아 신장세포주인 293EBNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA)에 전이한 후 hygromycin으로 선택배양하여 안정된 세포주를 확립하고 항-CEA 항체를 이용하여 180 kDa인 CEA와 183 kDa인 TatCEA를 western blot으로 발현을 확인하였다(Fig. 1, 2).

수지상세포에 대한 단백질의 전이능을 조사하기 위

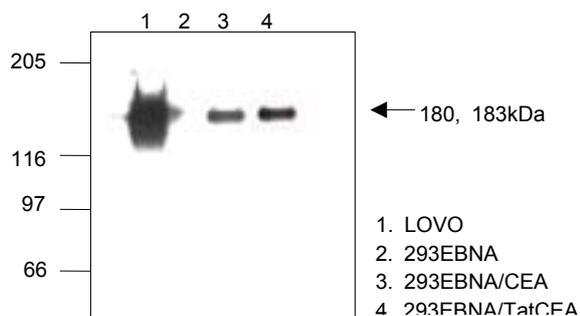


Fig. 2. Expression of pCEP4-CEA and pCEP4-TatCEA in 293EBNA cell line. Protein extracts of cell lysates were analyzed by 8% SDS-PAGE gel and subjected to western blot analysis with an anti-CEA antibody. CEA was expressed at 180 kDa and TatCEA at 183 kDa.

해 CEA와 TatCEA로 10분간 감작시킨 후 고정시킨 수지상세포를 CEA 특이 단세포군 항체로 형광염색한 결과 CEA는 세포표면에 분포하고 있으며, TatCEA는 세포질내로 이동하는 양상을 보였다(Fig. 3).

2) IFN-γ 발현 림프구 빈도 측정에 의한 CEA 특이 세포성 면역능 평가

CEA와 TatCEA로 감작시킨 수지상세포에 의한 세포성 면역반응 유도 효과를 측정하기 위해 면역시킨 마우스에서 분리한 비장세포를 CEA 펩타이드 (EAQNTTYL)로 감작시킨 수지상세포로 시험관 내에서 자극하여 IFN-γ 발현 림프구의 빈도를 측정하였다. IFN-γ 발현 림프구 빈도는 대조군으로 사용한 CEA로 감작되지 않은 수지상세포군에서는 14.5±4.5

개/10⁴ 림프구, CEA로 감작시킨 수지상세포군에서는 244±29.5개/10⁴ 림프구, 또한 TatCEA로 감작시킨 수지상세포군에서 322개±28.2개/10⁴ 림프구로 유의하게 증가됨을 관찰하였다(P<0.0001)(Fig. 4, 5).

3) CEA 특이세포 독성 T 세포 면역능 측정

면역시킨 마우스에서 분리한 비장세포를 CEA 펩타이드(EAQNTTYL)로 감작시킨 수지상 세포로 시험관 내에서 자극하여 1주일간 배양 후 EL-4와 CEA 펩타이드 감작 EL-4를 표적세포로 이용하여 CEA 특이 세포 독성 T세포 면역능을 측정하였다. EL-4에 CEA 펩타이드를 감작시킨 표적세포에 대해 DC만을 면역시킨 실험군에서는 CEA 특이 CTL이 유도되지 않았으나, DC/CEA로 면역시킨 실험군에서 23.3±2.75% (effector cell: target cell, E : T=1 : 100), DC/TatCEA로 면역주입시킨

실험군에서는 22.9±2.23% (E : T=1 : 100)로 두 군간에 차이가 없었다. 음성대조로 CEA 펩타이드가 감작되지 않은 EL-4를 표적세포로 이용한 경우 모든 군에서 T 세포에 의한 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 6).

4) CEA 특이 형광항체 역가 및 IgG의 Isotype 분석

면역시킨 마우스에서 분리한 혈청의 CEA 특이 IgG 형광항체 역가는 DC/CEA 군과 DC/TatCEA를 면역시킨 실험군에서 1 : 1280으로 동일하였다. Isotype를 분석한 결과 OD 410 nm의 흡광도가 DC/CEA군에서는 IgG1 (0.812±0.132)에 비해 IgG2a (0.372±0.149)와 IgG3 (0.383±0.1308)였으며, DC/TatCEA를 면역시킨

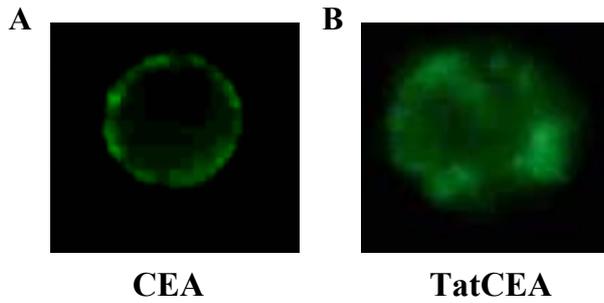


Fig. 3. Immunofluorescent staining of expression of CEA in CEA or TatCEA-pulsed dendritic cells. The dendritic cells were cultured for 10 days and pulsed with CEA (A) and TatCEA (B) at the ratio 1 : 1 at 37°C for 2hr. CEA was expressed on the surface of DCs. TatCEA was expressed in intracellular space of DCs (×400).

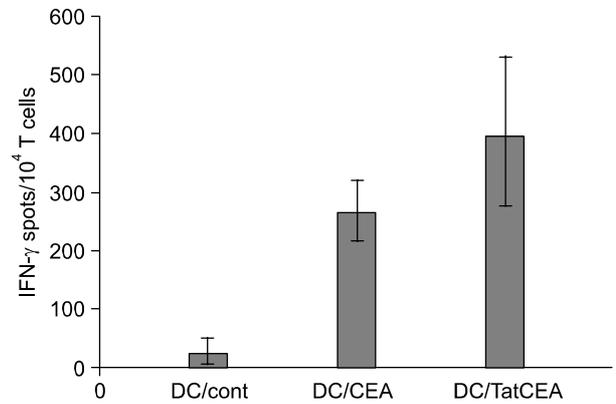


Fig. 5. DCs pulsed with CEA peptide induces CEA specific DC8+ T cell responses in IFN-γ ELISPOT assays. Splens from mice immunized with DCs pulsed with 293EBNA/CEA and 293EBNA/TatCEA lysates were incubated with 10⁴ DCs pulsed with CEA peptide for 24 h. Each bar represents the mean of the results from four mice±S.D.

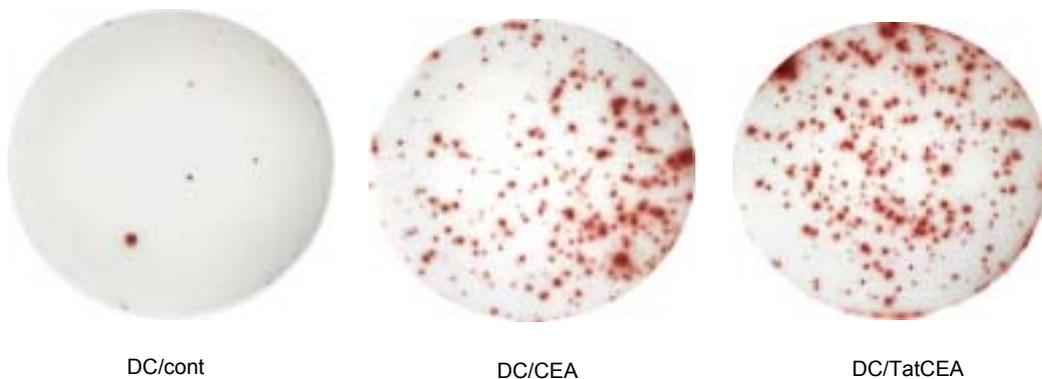


Fig. 4. Detection of antigen-specific CD8+ T cells by ELISPOT in the spleen cells of mice immunized with DCs pulsed with 293EBNA/CEA and 293EBNA/TatCEA cell lysates. Representative ELISPOT wells are shown after plate development. Cells are incubated with DCs pulsed with 10 ug/ml CEA peptide. These spots were visualized and counted as described in the method.

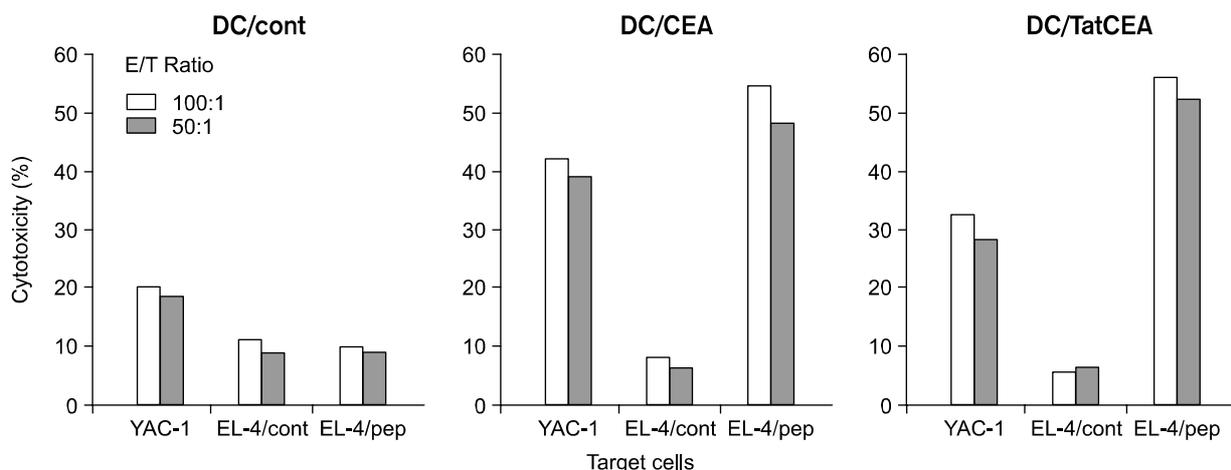


Fig. 6. Induction of the CTL response using dendritic cells pulsed with CEA peptide. DCs pulsed with CEA peptide at 37°C and used as stimulators. Spleen cells of immunized mouse were used as responders. Targets consisted of EL-4 untransduced or transduced with 10 ug/ml of CEA peptide.

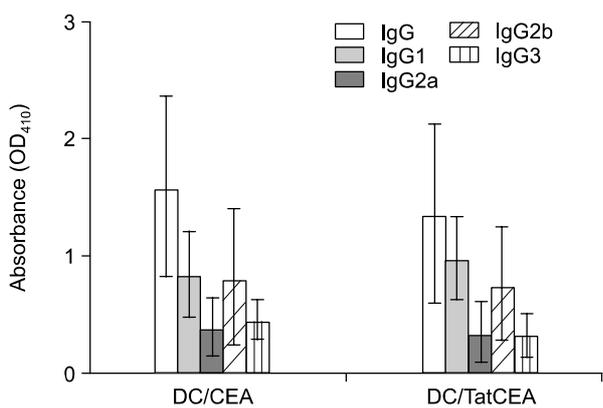


Fig. 7. Analyses of IgG isotypes in immunized mice. Mice (four mice/group) were given 5×10^5 DCs and DCs pulsed with 293EBNA/CEA, 293EBNA/TatCEA lysate in HBSS twice at 2-week intervals. Two weeks after the final treatment, mice were bled and serum was tested for the presence of immunoglobulin. Data are the mean \pm S.D. of the OD 410 nm value for each group.

실험군에서는 IgG1 (0.974 ± 0.044)에 비해 IgG2a (0.368 ± 0.139)와 IgG3 (0.316 ± 0.176)로 두 군 간에 유의한 차이가 없었으며, 이는 Th2에 의한 면역반응이 높았음을 보여준다(Fig. 7).

고 찰

CEA는 다양한 종양에서 발현되는 자가 항원의 일원이며 면역치료에서 강력한 표지 인자로 정의되고 있다.⁷ 지금까지 CEA는 태아 세포에서 자가 항원으로

발현되고 정상 결장 표피세포에서 아주 적게 발현되어 CEA에 대한 내성을 나타내므로 CEA에 대한 면역 반응의 유도가 어려웠다. 최근 항원-특이 CTL을 유도 함으로서 항원제시세포로 수지상세포를 이용하여 세포성 면역 치료에 많이 응용되고 있으며 시험관내에서 항원 존재 시 수지상세포의 발달은 악성종양의 면역치료에 중요한 방법으로 연구되고 있다. 수지상세포를 이용하여 종양-특이 T 세포를 유도하기 위한 방법으로 이용되는 항원으로서 펩타이드, RNA 등이 있으나,¹⁷ 본 실험에서는 수지상세포에 CEA와 TatCEA 융합 단백질을 감작시킨 후 면역 주입하여 *in vivo* 상에서 CEA 특이 세포 독성 T 세포의 유도를 확인하였다.

Tat 단백질은 HIV의 조절 단백질의 일종으로, 세포 외 환경에서 HIV에 감염된 세포에 전이되어 각 유전자의 발현을 활성화시킴으로써 잠복기의 HIV가 활성화된다는 사실이 발견되었다.¹⁸ Stephen 등¹⁹은 Tat 단백질의 37-72 부위의 아미노기를 효소에 접합시켜 배지에 공급해 준 뒤 배양된 세포 내 효소의 활성도를 측정하여 Tat 단백질의 전이특성을 확인하였다. 최근의 연구에서 Tat 단백질의 전이 특성을 이용하여 MHC class I 분자에 CTL에 대한 표적항원을 제시하기 위한 시도가 이루어져 왔다. Tat 단백질과 이중 단백질을 융합하여 수지상세포에 접종한 뒤, 실험쥐에 투입하여 *in vivo* 상에서 CTL의 유도를 확인하였고, 종양항원과 같이 면역 유도능이 낮은 항원에 대한 CTL 유도 연구에 응용되어 왔다.²⁰ 이러한 연구들에서는 항원에 Tat 단백질을 화학적으로 결합시키거나 Tat 융합 단백질을 *E. coli*와 같은 세균에서 발현한 후 정제하여 동물에

주입하여 면역 유도 기능을 보고하였다.²¹ 그러나 이러한 과정은 순수한 단백질 분리 과정을 거쳐야 하므로 본 연구에서는 CEA의 중간 부위인 883번째 아미노산 다음에 Tat의 123 아미노산 부위를 삽입한 융합단백질을 293EBNA세포에서 발현시킨 후 세포 용해 분획을 직접 수지상세포에 감작시켜 단백질전이를 확인한 결과 10분내에 세포질 내로 이동하는 것을 확인하였다. 또한 CEA 자체만으로도 세포표면에 CEA가 효율적으로 전이되는 것은 CEA의 C-말단부위에 세포표면으로 단백질을 이동시키는 특성이 있는 GPI (glycosylphosphatidylinositol, a complex glycolipid) 가 있기 때문에²² 수지상세포에 감작 시 CEA 자체만으로도 생체 내에서 세포성면역반응을 유도할 수 있었던 것으로 생각되었다.

Th1의 대표적인 사이토카인으로 알려진 IFN- γ 는 항원 또는 미토젠 자극으로 활성화된 T 세포에서 생성되며 MHC class I에 의해 제시되는 펩타이드에 대한 항원 특이 T 세포 반응 시 분비되어 세포성 면역반응 유도 효과를 측정하는 인자이다.²³ 항원에 특이하게 반응하는 T 세포의 빈도를 직접 측정할 수 있는 IFN- γ ELISPOT 검사에서 TatCEA로 감작시킨 수지상세포군이 CEA로 감작시킨 군보다 세포성 면역 반응을 더욱 효율적으로 유도할 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Tat에 의해 CEA가 세포질 내로 직접 이동함으로써 MHC class I 항원처리과정과 항원제시가 더욱 효율적으로 이루어졌음을 시사한다.

Rice 등²⁴은 마우스의 CEA 펩타이드(EAQNTTYL)를 발견하여 이용함으로써 CEA 특이 세포 독성 T 세포 반응을 유도하였다. 동일한 펩타이드로 감작된 수지상세포로 비장세포를 자극하여 1주일간 배양시킨 결과 CEA와 TatCEA로 면역한 마우스에서는 CEA 특이 세포 독성 T 세포 면역능을 유도할 수 있었으나 두 실험군 간의 차이를 나타내지 않았다. 이는 CEA의 특이 세포 독성 T 세포 면역능을 정량적으로 반영하지 못한 것으로 생각된다. 그러므로 두 군 간의 차이를 확인하기 위해 백신의 횟수, 항원의 양, 표적세포 등의 특성을 고려하여야 할 것으로 생각된다.

종양에 대한 면역반응에 중요한 세포성 면역반응은 Th1에 의해 나타나는 것으로 알려져 있으며, 대표적인 Th1 세포의 사이토카인인 IFN- γ 는 세포 독성 세포의 성숙을 항진시켜 세포독성 T 세포의 표적세포 파괴는 물론 CD4+ T 세포의 항원인지 반응을 효율적으로 항진시킬 뿐 아니라 B 세포의 항체분비를 항진시키며 특히 IgG2a로 class-crossmatch를 항진시킨다. 그러므로 특정 항원에 대한 항체의 isotype 분포는 면역반응의

특성을 반영하는 것으로 알려져 있다. CEA와 TatCEA 군에서 모두 IgG1에 비해 IgG2a와 IgG3가 낮게 나타나 Th2 면역 반응이 강하게 나타났으며 이러한 결과는 본 연구에서 충분히 성숙시키지 않은 수지상세포를 사용하였기 때문인 것으로 생각된다. 종양항원에 대한 Th1 반응을 증가시키기 위해 수지상세포의 성숙을 유도하는 것이 필요할 것이다. 특히 CEA가 세포질 내로 이동함으로써 항원처리과정이 효율적일 것으로 생각되는 TatCEA군에서 IgG1에 대한 IgG2a, IgG3의 비율이 더욱 낮은 결과에 대해 자세한 연구가 필요하다.

결 론

이상의 결과로서 TatCEA는 종양백신이나 시험관내 세포 독성 T 세포를 유도하여 세포성 면역치료를 개발하는 데 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다. 앞으로 TatCEA와 수지상세포를 이용한 면역치료의 최종적인 효과를 검증하고 전임상 연구를 위해 동물 모델에서 종양의 발생을 억제하거나 종양의 치료 효과를 증명하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Alters SE, Gadea JR, Sorich M, O'Donoghue G, Talib S, Philip R. Dendritic cells pulsed with CEA peptide induce CEA-specific CTL with restricted TCR repertoire. *J Immunother* 1998;21:17-26.
2. Schultze JL, Maecker B, Von Bergwelt-Baildon MS, Anderson KS, Vonderheide RH. Tumour immunotherapy: new tools, new treatment modalities and new T-cell antigens. *Vox Sang* 2001;80:81-9.
3. Oesterling JE. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1991;145:907-23.
4. Fisk B, Chesak B, Pollack MS, Wharton JT, Ioannides CG. Oligopeptide induction of a cytotoxic T lymphocyte response to HER-2/neu proto-oncogene in vitro. *Cell Immunol* 1994;157:415-27.
5. Ioannides CG, Fisk B, Jerome KR, Irimura T, Wharton JT, Finn OJ. Cytotoxic T cells from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. *J Immunol* 1993;151:3693-703.
6. Houbiers JG, Nijman HW, van der BurgSH, Drijfhout JW, Kenemans P, van de Velde CJ, et al. In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild-type p53. *Eur J Immunol* 1993;23:2072-7.
7. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der

- Bruggen P, Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994;12:337-65.
8. Ockert D, Schmitz M, Hampl M, Rieber EP. Advances in cancer immunotherapy. *Immunol Today* 1999;20: 63-5.
 9. Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 1991;5:344-66.
 10. Germain RN. The biochemistry and cell biology of antigen presenting by MHC class I and class II molecules: implications for development of combination vaccines. *Ann NY Acad Sci* 1995;754:114-25.
 11. Kass E, Schlom J, Thompson J, Guadagni F, Graziano P, Greiner JW. Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. *Cancer Res* 1999;59:676-83.
 12. Conry RM, Khazaeli MB, Saleh MN, Allen KO, Barlow DL, Moore SE, et al. Phase I trial of a recombinant vaccinia virus encoding carcinoembryonic antigen in metastatic adenocarcinoma: comparison of intradermal versus subcutaneous administration. *Clin Cancer Res* 1999;5:2330-7.
 13. 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.
 14. Conry RM, White SA, Fultz PN, Khazaeli MB, Strong TV, Allen KO, et al. Polynucleotide immunization of nonhuman primates against carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res* 1998;4:2903-12.
 15. Anna R, Alessandro P, Roberto S, Raffaella MZ. HIV-1 tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol Today* 1998; 19:543-5.
 16. Mann DA, Frankel AD. Endocytosis & targetting of exogenous HIV-1 Tat protein. *Embo J* 1991;10:1733-9.
 17. Arthur JF, Butterfield LH, Roth MD, Bui LA, Kiertscher SM, Lau R, et al. A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 1997;4: 17-25.
 18. Alan DF, Carl OP. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988;55: 1189-93.
 19. Staphen F, Joe S, Yasmin D, Claire M, Ling LC, Blake P, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:664-8.
 20. Dewey TK, Dennis JM, Dirk GB, Lawrence F, Garry PN, Garrison CF, et al. Introduction of soluble protein into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J Immunol* 1997;159:1666-8.
 21. Nakamura T, Tanaka T, Takagi H, Sato M. Cloning and heterogeneous in vivo expression of Tat binding protein-1 (TBP-1) in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1399:93-100.
 22. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999; 9:67-81.
 23. Tau GZ, Cowan SN, Weisburg J, Braunstein NS, Rothman PB. Regulation of IFN-gamma signaling is essential for the cytotoxic activity of CD8(+) T cells. *J Immunol* 2001;167:5574-82.
 24. Rice J, Elliott T, Buchan S, Stevenson FK. DNA fusion vaccine designed to induce cytotoxic T cell responses against defined peptide motifs: implications for cancer vaccines. *J Immunol* 2001;167:1558-65.