

수상세포를 이용한 자가 암 백신의 전이성 간암에 대한 항암 효과

아주대학교 의과대학 ¹외과학교실, ²미생물학교실

서광욱¹ · 강승현¹ · 김애영² · 김형일²

Antitumor Effect of Dendritic Cell Pulsed with Tumor Cell Lysate Against Hepatic Metastases in Murine Model

Kwang Wook Suh, M.D.¹, Seung Hyun Kang, M.D.¹, Ae Young Kim, Ph.D.², Hyung Il Kim, M.D.²

Departments of ¹Surgery, ²Microbiology and Immunology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Purpose: Activated bone marrow-derived dendritic cells (DCs) express high level of MHC class I and II molecules as well as intercellular adhesion molecule and B7, required for T cell activation. This study was designed to examine whether DCs pulsed with tumor lysates were capable of inducing tumor specific CTLs.

Methods: To generate mature DCs, bone marrow cells of female BALB/c mice were cultured in the presence of GM-CSF and IL-4. Mature DCs were identified by surface expression of MHC class II molecules and costimulatory molecules. By FACS analysis, it was found that most DCs highly expressed B7-1, B-7-2 and CD40 as well as MHC class II molecules. BALB/c were immunized subcutaneously. Cytolytic activity was determined by chromium release assay using splenocytes harvested from immunized mice 7 days after the immunization, Cytolytic activity was measured against CT-26 and RAG tumor cells. In vivo protection experiment was performed. Mice were immunized subcutaneously with DCs pulsed with CT-26 lysates (1×10^6 per mouse) and were challenged intrahepatically with wild type CT-26 (5×10^4 per mouse) two weeks following immunization. Three weeks after the challenge, animals were euthanized for identification of hepatic tumors.

Results: Lysis of CT-26 cells were significantly greater with the splenocytes from the immunized mice. Incidence and mean volume of hepatic cancer in the immunized group were 50% (5/10) and $78 \pm 22 \text{ mm}^3$. These results were significantly different from those from control groups:

100% (10/10) and $1014.5 \pm 667.8 \text{ mm}^3$ in media treated group, 90% (9/10) and $855.5 \pm 270.6 \text{ mm}^3$ in mice treated with irradiated CT-26, 100% (10/10) and $994 \pm 255 \text{ mm}^3$ in the animals treated with DC alone.

Conclusions: DCs pulsed with CT-26 lysates could successfully induce antitumor immunity in the BLAB/c against syngeneic CT-26 carcinoma cells. Pulsing method was so simple that neither genetic engineering nor cellular fusion were not necessary. Even though the present study did not conduct survival experiments, it was thought that clinical application of DC-based immunotherapy could be expected by pulsing of tumor lysate into the DCs. **J Korean Soc Coloproctol 2003;19:129-136**

Key Words: Dendritic cell, Tumor cell lysates, Metastatic hepatic cancer

수상세포, 암백신, 전이성 간암

서 론

1896년 뉴욕의 외과의사 Dr. Coley가 암의 절제 수술 후 체내의 면역기능을 호전시키고자 하는 의도에서 *Corynebacterium parvum*의 추출물을 환자에게 투여한 것이 암에 대한 면역치료의 효시라 할 수 있다.¹ 이후로 분자 생물학의 발전에 힘입어, 종양 면역학 분야에서도 놀라운 발전을 보이는데, 그것은 첫째로 암 유전자들의 산물인 여러 가지 단백질들이 종양 특이 항원으로서의 역할을 할 수 있다는 것,² 둘째로, 항원 단백질이 존재한다 하더라도, 세포질 내에서 잘게 부서어져, 9~12 mer의 oligopeptide의 형태로 제 1형 주 조직 적합항원 물질(major histocompatibility complex I, MHC I)과 같이 제시되지 않으면, 세포성 면역계가 인식하지 못한다는 사실,³ 그리고 악성 흑색종 환자에서 종양에 특이적임은 물론 다른 개체로 이식이 가능한 흑색종 관련 항원을 발견한 것⁴ 등이었다.

암세포가 특이 항원들을 가지고 있다는 사실이 확인되고 그 존재가 분자 생물학적으로 증명되어 암세

책임저자: 서광욱, 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5
아주대학교 의과대학 외과학교실(우편번호: 442-721)
Tel: 031-219-5208, Fax: 031-219-5755
E-mail: kwsuh@ajou.ac.kr

본 연구는 한국 학술진흥재단 2000년 선도연구자 연구비로 시행되었음.

본 연구의 요지는 대한대장항문학회 제35차 추계학술대회에서 구연되었음.

포의 면역내성의 기전이 암세포의 문제라기보다는 숙주의 면역체계의 이상으로 초점이 맞춰지게 되었고 Muul 등⁵과 Rosenberg 등⁶ 그리고 Fearon 등⁷의 연구결과 암에 대한 내성의 주 원인이 T 살세포(cytotoxic T cell, CTL)보다는 T 조세포(helper T cell, Th) 활성화 단계에서 면역세포들 간의 상호작용에 있다는 문제가 있다는 사실이 알려지게 되었다. 이를 바탕으로 Dranoff 등⁸은 여러 종류의 cytokine 유전자들을 암세포에 형질도입하여 만들어진 암 백신들의 역할을 비교하였는데, 이 중 과립세포 거식세포-집락 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)를 형질도입한 암백신이 가장 월등한 항암 효과를 나타냄을 관찰하였다. GM-CSF는 전문적인 항원 제시세포인 수상세포를 분화시키는 대표적인 cytokine으로서 자가 종양 백신의 개발에서 수상세포를 이용한 백신의 개발이 제시되게 되었다.^{9,11}

수상 세포는 전문적인 항원제시 세포로서 두 가지 구조적 적합항원을 모두 가지고 있을 뿐 아니라 B7-CD28의 상호작용으로 활성화된 Th에 이차자극을 줄 수 있다는 점 외에도 거식세포로서의 기능을 가지기 때문에 자신이 적극적으로 암세포에서 떨어져나온 항원물질들을 탐식(pinocytosis)할 수 있기 때문에 유전자 형질도입을 이용한 암백신의 개발에서 가장 어려운 문제인 유전자 조작의 필요성이 배제될 수 있다는 장점을 가지고 있다. 수상세포를 이용한 암백신이 임상적으로 응용될 경우 매우 이상적인 암 백신으로 개발될 수 있으나 기술적인 접근이 용이하지 않으면 이론적인 상태에서 그칠 수밖에 없을 것이다. 현재까지 수상세포를 이용한 자가 암 백신의 개발에서 몇 가지 해결되어야 할 문제들이 남아 있는데 그것은 첫째로 적정 수의 수상세포를 획득하는 기술적인 문제, 둘째로 암의 특이 항원이 되는 많은 단백질들 중에서 어느 것을 대표적인 항원으로 선택하여야 하는가의 문제, 셋째로 수상세포 내로 선택된 항원 단백질을 투입시키는 기술적인 문제, 즉 유전자를 형질도입할 것인지, 순전히 수상세포의 대식능력만을 이용할 것인지 등에 관한 문제 등이 그것이다.

수상세포를 이용한 자가 종양 백신의 개발에서 문제가 되는 기술적인 문제점들, 즉 임상적으로 수상세포를 이용한 자가 종양 백신이 유용해지려면 유전자의 형질도입이나 암세포와의 잡종세포 생성 등의 어려운 문제들이 해결되어야 하는데 이 점에 착안하여 저자는 본 연구를 계획하게 되었다. 본 연구의 가설로서 수상세포가 적극적인 대식세포이므로 암조직으로

부터 유리되는 항원 단백질을 탐식할 수 있을 것이며 그렇다면 암조직을 분쇄하여 만들어진 물질을 수상세포의 배양 시 첨가하기만 하여도 수상세포는 필요한 모든 종류의 암 항원물질을 탐식하여 제시할 수 있을 것이라는 것이다. 이 가설을 증명하기 위하여 저자는 BALB/c 마우스와 여기서 기원한 대장암 세포주 CT-26를 이용하여 전신적으로 투여된 수상세포 자가 종양 백신이 전이성 간암의 형성을 예방할 수 있는지를 관찰하고자 본 연구를 시행하였다.

방 법

1) 마우스

모든 실험을 위해 6 내지 10주령의 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였다(대한 실험동물 연구소, 음성, 대한민국).

2) 암세포주

본 연구에서 전이성 간암 모델을 위해 CT-26 세포주를 이용하였으며 이는 BALB/c 마우스에서 유래된 원발성 대장선암 세포주이다. 같은 BALB/c 마우스의 직장에서 유래된 CMT-93 세포주도 대조군의 실험을 위해 사용되었으며 암 세포주들은 모두 한국 세포주은행에서 구입하였다. 암세포들은 DMEM이 함유된 10%의 우태아 혈청 배지에 100 U/ml의 페니실린, 100µg/ml의 스트렙토마이신 및 2 mM의 L-글루타민을 첨가하여 5% 이산화탄소 배양기에서 37°C 항온상태에서 배양하였다.

3) 배지와 사이토카인

수상세포 배양을 위해 RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 56°C에서 30분간 비동화시킨 우태아 혈청 10%, 100 IU/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 그리고 50µM 2-mercaptoethanol을 첨가하여 사용하였다. 재조합 마우스 GM-CSF는 Peptotech (London, UK)와 PharMingen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, IL-4는 Endogen (Woburn, MA, USA)에서 구입하였으며 20 ng/ml 혹은 100 ng/ml로 배양배지에 첨가하여 사용하였다. 하이브리도마 세포배양을 위해서 DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 혹은 RPMI 1640 배지에 10% 혹은 20%의 우태아 혈청을 첨가하여 사용하였다.

4) 골수세포 및 수상세포의 준비

약 6 내지 8주령 암컷 BALB/c 마우스의 대퇴골과 경골을 근육으로부터 잘 분리하여 70% 에탄올이 담겨진 60mm 배양접시에 1분간 놓아둔 후 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline; 이하 PBS로 약함)로 2회 세척하고 RPMI 1640 배지가 들어있는 배양접시로 옮겼다. 뼈의 양 끝을 잘라준 후 RPMI 1640 배지를 2 ml 채운 주사기(대퇴골 23 gauge, 경골 30 gauge)를 사용해 골수를 배지쪽으로 흘러나오게 밀어주는 과정을 두 번 반복하였다. 흘러나온 골수를 15 ml 시험관에 넣어 잘 부유시킨 후 4°C에 5분간 세워두고, 작은 뺨조각이나 찌꺼기가 가라앉게 되면 상층액만 조심스럽게 50 ml 시험관으로 옮긴 후 400×g에서 10분간 원심분리하여 골수세포를 얻었다. 얻어진 세포에 적혈구 용해 완충액(Tris-buffered ammonium chloride; 30 ml of 0.16 M NH₄Cl, 10 ml of 0.17 M Tris, pH 7.2)을 3 ml 첨가하여 잘 섞은 후 4°C에서 3분간 처리하여 적혈구를 용해시켰으며 Hank's balanced salt solution(이하 HBSS로 약함)으로 충분히 세척한 후 세포수를 산정하였다. 림프구와 I-Ab+세포에 대해 보체 매개 세포용해를 수행한 후 남은 골수세포를 rmGM-CSF와 mL-4 (각각 20 ng/ml)가 첨가된 완전 배양배지에 부유시킨 후 2일 간격으로 새로운 배지로 교환해 주면서 9 내지 10일까지 배양하였다. 배양 2일째부터 GM-CSF에 반응하는 세포들이 세포괴(aggregate)를 형성하기 시작하여 이들 중 일부는 바닥에 고착되어 증식하였고 일부는 배지내로 부유하였다. 이 부유 세포들은 배지를 갈아주는 동안 제거되었고 여기에 다시 GM-CSF와 IL-4를 첨가하여 배양하였다. 배양 4일째에는 증식세포괴의 크기와 수가 증가하면서 바닥에 약하게 붙어서(loosely adherent) 증식하고 있는 세포괴와 배지 내에서 부유하고 있는 세포괴를 확인할 수 있었으며 배지 내에서 부유하고 있는 세포괴를 효과적으로 제거하기 위해 현미경으로 관찰하면서 채워주고 다시 제거하는 과정으로 2 내지 3회 반복한 후 GM-CSF가 함유된 새로운 배지를 첨가하였다. 배양 6 내지 7일째까지 약하게 붙어서 증식하던 새로운 세포괴들이 배양 7일째가 지나면서 배지 내로 하나씩 떨어져 나오기 시작하였으며 이 중 일부는 세포표면에 돌기를 가진 수상세포의 형태를 나타내었다. 배양 8일째가 되면 대부분의 세포들이 수상세포의 형태를 보이면서 배지 내로 부유하였으며 배지 내에 부유하는 세포만을 다시 48시간 동안 2차 배양하였다.

5) 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용한 수상세포의 비율 분석

2% 우태아 혈청이 포함된 PBS 50ml에 부유시킨 후 FITC가 결합된 단클론 항체들(PharMingen, San Diego, CA, USA: anti-CD80 (B7-1; 16-10A1), anti-CD86 (B7-2; GL-1), anti-CD40 (3/23))을 4°C에서 30분간 염색하였다. 염색된 세포들을 PBS로 두 번 세척한 후 1% para-formaldehyde로 고정하여 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.

6) 수상세포의 세포 내 이입능(endocytosis)

골수에서 얻어진 수상세포의 세포 내 이입능을 알아보기 위해 1×10⁶개의 수상세포를 FITC-텍스트란(42,000 Da, Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 mg (ml)과 함께 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포들은 HBSS로 두 번 세척하였고 FACS Vantage (Bekcon Dickinson, USA)를 이용하여 유세포 분석을 시행하였다.

7) 수상 세포 백신의 제조(수상세포로의 암 항원 물질의 투입)

제8일째에 얻어진 수상세포들에 암세포 용해질(lysate)을 투입시키기 위하여 암세포 CT26의 수와 수상세포의 수를 1 : 3의 비율로 준비하였다. 먼저 CT-26를 -70°C의 액화질소속에서 2분간 동결한 후 꺼내어 3분간 37°C에서 해동시키는 방법을 4회 반복하여 암세포벽이 파괴되도록 하였으며 trypan blue로 염색하여 살아있는 암세포가 없음을 확인한 후 10분간 600 rpm에서 원심분리하여 최종적인 세포용해질을 준비하였다. 이 세포용해질과 수상세포를 섞어 배양하였다. 배양 18시간이 지난 후 HBSS로 두 번 세척하여 0.2 ml의 PBS에 1×10⁶개의 세포를 섞어 백신(이하 수상세포 백신으로 칭함)으로 준비하였다.

8) in vivo 백신 및 in vitro 세포독성 분석

얻어진 수상 세포 백신의 면역능을 확인하기 위하여 9마리의 BALB/c 마우스를 3군으로 나누어(군당 3 마리) 1×10⁶개의 수상세포 백신, 같은 수의 방사선 조사를 받은 CT-26, 그리고 PBS를 동물의 우측 배부에 피하주사하였다. 7일 후 마우스로부터 비장을 적출하였다. 적혈구를 용해한 후 얻어진 비장 세포들을 방사선 조사된 CT-26 세포들과 3일간 시험관에서 반응시킨 후 효과기 세포로 사용하였다. CT-26 세포를 sodium chromate [⁵¹Cr] (NEN, Boston, MA, USA; 100 uCi

isotope per $1-2 \times 10^6$)와 37°C 에서 1시간 동안 배양하여 표적 세포로 사용하였다. 방사성 동위원소가 부착된 표적 세포들을 세척한 후 100 ml의 10% RPMI 1640 용액에 다시 부유시켜 100 ul의 효과기 세포들과 96칸의 U자 모양의 배양판(Corning, NY, USA)에 혼합하였다. 효과기 세포: 표적세포의 비율은 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1, 5 : 1로 연속적으로 희석하였으며, 3회 반복하였다. CMT-93 세포주를 대조군의 표적 세포로 하였다. 배양판 중에서 배양액만 담기거나 트리톤-X-100과 표적세포가 담긴 칸을 ^{51}Cr 의 자발성 유리 및 최대 유리의 대조군으로 하였다. 37°C 5% 이산화탄소 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 배양판을 원심분리(00xg에서 10분간) 각각의 well에서 상층액 중 100 ul를 채취하고 감마 카운터(Packard, Grove, IL, USA)를 이용하여 방사능을 측정하였다. 특이적 용해도는 $[(\text{cpm}_{\text{experimental}} - \text{cpm}_{\text{spontaneous}})] / [(\text{cpm}_{\text{maximum}} - \text{cpm}_{\text{spontaneous}})] \times 100$ 으로 계산하였다.

9) 동물의 수술 및 전이성 대장암의 형성

전신 마취 후 쥐를 개복하여, 간의 좌엽을 확인한 후, 30-게이지 세침을 이용하여, 간의 캡슐 안쪽으로 5×10^4 개의 암세포를 10 ul의 배양액에 섞어 약 30초간 서서히 주사한다. 간으로 암세포 주사 후 제3일이 되면, 실험 동물의 전부에서 육안으로 식별이 가능한 정도의 전이성 간암으로 자라게 되며, 제28일이면 실험군의 90% 이상이 사망하게 된다¹².

10) 전이성 간암에 대한 수상세포 백신의 효과

피하 주사한 수상세포 백신으로부터 전신적 면역능의 획득 여부를 관찰하기 위해, 실험 제 1일 1×10^6 개의 수상세포백신을 동물의 배부에 피하로 주사한 후 제 14일에 개복하여, 간의 캡슐 내로 5×10^4 개의 CT-26를 주사하고, 그로부터 21일 후에 실험 동물을 정사시켜, 간암의 존재와 평균 크기를 대조군들, 즉 배양액을 같은 양 피하 주사한 군과 야생형의 CT-26를 같은 양 주사한 군과 비교하였다.

11) 통계학적 분석

각 군간의 비교에서 암의 빈도와 평균 용적은 student-t test로 분석하였으며,¹³ P값은 0.05를 유의 수준으로 하였다.

결 과

1) BALB/c 기원의 수상세포의 확인

6 내지 10주령의 암컷 BALB/c 마우스 한 마리의 골수로부터 약 1.5×10^7 개의 골수세포를 얻을 수 있었으며, 유세포 분석기로 분석한 결과 CD4+ 세포가 약 0.5%, CD8+ 세포가 약 1.5%, B220+세포가 약 12~15% 그리고 I-Ab+ 세포가 20~25% 존재하였다. IL-4와 GM-CSF를 첨가하여 배양한 후 얻어진 수상세포를 분석한 결과 B7-1, B7-2, CD40와 함께 제 2형 주 조직 적합 항원 등이 고농도로 표현되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 대조군으로 사용된 CT-26 암세포에

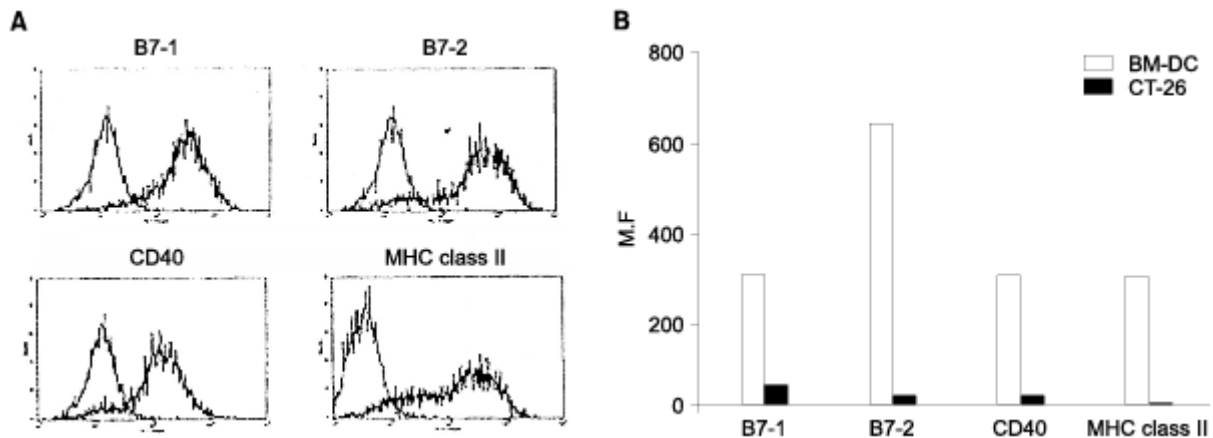


Fig. 1. Phenotypic analysis of DCs and CT-26. (A) Dendritic cells were generated from bone marrow cells of female BALB/c mice using GM-CSF and IL-4. (A) Expression of surface molecules of DCs was examined by flow cytometry. (B) This data represent the mean fluorescent intensity (M.F) of stained surface molecule, and percent of positive cells was marked on top of the bar. The positive rate of surface molecules of CT-26 cells was less than 5%.

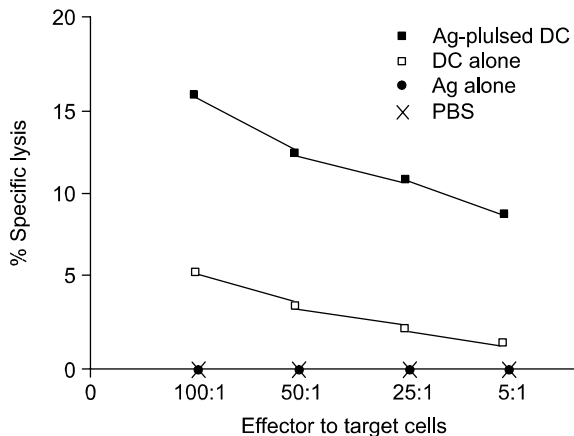


Fig. 2. Vaccination with Ag-pulsed DCs elicits Ag-specific cytotoxicity. Each group of mice was immunized twice with irradiated tumor lysate-pulsed DCs, DCs alone, tumor lysate, or PBS. One week after the immunization, spleens from each group of mice were harvested. Splenocytes were in vitro stimulated with irradiated CT-26 cells for 3 days, and used as stimulator for cytolytic activity. CT-26 was used as target cells in a standard 4 hour ⁵¹Cr release assay.

서는 B7-1, B7-2, CD40 및 제 2형 주 조직 적합 항원이 표현되지 않았다(Fig. 1B).

2) 수상세포 백신에 의한 종양 특이 T 살세포의 유도

CT-26에 대한 세포 독성능은 수상세포 백신을 시행 받은 쥐로부터 추출한 비장세포가 대조군들에 비해 유의하게 강함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

3) 전이성 간암에 대한 수상세포 백신의 효과

암 백신의 효과를 측정하기 위해 시행한 in vivo 실험에서, 수상세포 백신(CT-26/DC)을 전 처치한 군에서는 관찰된 간암의 빈도와 암의 평균용적은 50% (5/10) 및 78±22 mm³이었다. 대조군 중 세포 배양액을 전 처치한 군에서는 10마리 모두에서 간암이 관찰되었고 (100%), 그 평균 용적은 1,014.5±667.8 mm³이었다. 또 다른 대조군, 즉 야생형의 CT-26을 전처치한 군과 수상세포만을 전처치한 군에서의 간암의 빈도와 평균 용적은 각각 90% (9/10) 및 855.5±270.6 mm³, 100% (10/10) 및 994±255 mm³였다. 수상세포 백신 투여군은 세 가지 대조군들의 결과와 비교할 때 모두 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

고 찰

암은 숙주의 면역계가 인식할 수 있는 종양 특이 항

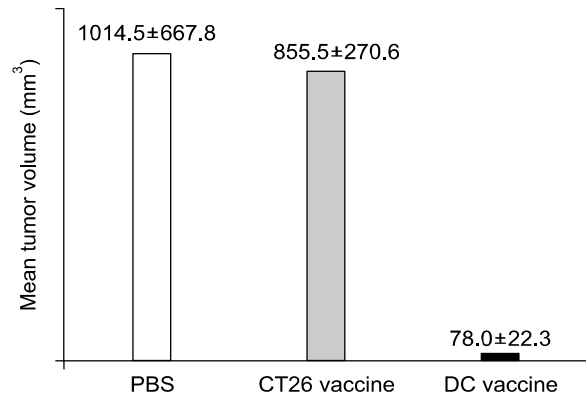


Fig. 3. Comparison of hepatic tumors between immunized group and controls. Mean tumor volume was measured three week after intrahepatic challenge of CT-26. Hepatic tumors from immunized mice were significantly smaller than those from controls. DC vaccine; immunized with DC pulsed with CT-26 lysates, PBS; treated with PBS, CT-26 vaccine; treated with CT-26 lysate.

원이나 종양 관련 항원들을 표현하지만 대부분의 암들이 면역반응을 일으키지 않거나 일으키더라도 매우 약한 반응을 일으킴으로써 숙주의 면역계를 피해 완성된 병변으로 자리잡을 수 있게 된다. 숙주의 면역계를 피하는 기전에 대해서 많은 연구가 있어 왔으나 T 세포를 활성화하는데 필요하거나 활성화된 T 세포가 증식하여 일정기간동안 면역계를 유지시키는 데 필요한 신호들의 표현이 하향조절되기 때문이라는 것이 현재까지 가장 일반적으로 받아들여지는 설명이다.² 이 신호들이란 주 조직 적합 항원의 표현,¹⁴ 2차 신호라 일컫는 보조 자극 요소(costimulatory factor),¹⁵ 그리고 항원을 세포 내에서 제시하기 위한 과정¹⁶ 등의 세 가지를 말한다.

암의 면역 치료에 이용되는 전략이란 바로 위의 세 가지 과정을 강화시키는 것으로서 암세포에 주 조직 적합 항원 유전자, 보조 자극요소 유전자, 혹은 사이토카인 유전자를 암세포에 형질 도입하는 방법들을 이용한 적극적이고 특이적인 면역치료로서 자리 잡게 되었다. 이것이 자가 종양 백신의 개념이며 바이러스 등의 매개체를 이용하여 필요한 유전자를 특정한 암세포에 형질 도입하고 암세포가 항원을 더욱 강하게 제시하게 하거나 보조 자극인자를 나타내게 하기도 하고 혹은 일정 기간 동안 암세포 주위로 사이토카인들을 분비하게 함으로서 숙주의 면역 체계를 자극하고 유지시키는 기전을 통해 숙주로 하여금 암에 대한 면역력을 가지게 하는 역할을 한다.

지난 10여년 동안 거의 모든 사이토카인들에 대해

서 형질도입이 시도되었으며 동물실험에서 여러 암 세포주들을 통해 항암 효과가 보고되어오고 있다.^{17,18} 그중에서도 과립세포 거식세포-집락 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)를 형질도입한 자가종양 백신이 가장 강력한 항암 효과를 나타내었다.⁸ GM-CSF는 여러 가지 기능을 가지고 있으나, 피부에서 랑거한(Langerhan)씨 세포를 수상세포로 변환시키는 대표적인 사이토카인으로서⁸ 종양에 대한 면역 내성의 주 원인이 Th이고, 이는 T 세포들의 활성화-비활성에 대한 기전 중, 활성화된 T 세포가 CD28-B7 연관 등의 2차 보조가 없는 경우 그 세포군(clone) 자체가 죽어버리기 때문에, 전문적인 항원 제시 세포가 아닌 거식 세포 등에 노출되었던 Th 세포들의 특이적인 클론이 이미 소실되어 있으리라는 이론에서 시작된다. 만일 이러한 Th의 클론소실이 중요한 원인이라면, 항원을 다시 면역 계통에 노출시켜 이번에는 전문적인 항원 제시 세포, 즉 수상 세포 등이 항원을 Th 세포에 제시하고, 2차 보조를 주게 되면, 강력한 전신적 항암 효과를 얻을 수 있을 것이라는 가설이 가능했던 것이다. 이러한 이론대로 Dranoff 등⁸은 여러 가지 사이토카인들의 항암역가를 비교함으로써 GM-CSF가 자가 종양 백신에 있어서 가장 강력한 사이토카인임을 관찰하였다.

GM-CSF 유전자를 형질도입한 자가 종양백신의 항암효과가 결국 수상세포를 활성화시키는 기전을 통한 것이라면, 수상 세포를 직접 이용하는 것이 더 쉽고 효율적일 것이라는 당연한 가설이 성립된다. 수상세포는 제1형 및 2형 주 조직 적합항원을 모두 표현함은 물론 활성화된 Th clone의 생존에 필수적인 B7 분자를 표현한다는 이론적인 장점을 가지고 있고¹⁹ 지난 수년 동안 수상세포를 이용한 면역치료의 연구와 임상적 적용에 대한 시도가 있어왔다. 초기에는 특정한 종양 특이 항원의 유전자를 수상세포에 형질도입하는 다소 기술적으로 어려운 방법으로 시작하였으나, 수상세포가 적극적인 탐식세포이므로 암세포로부터 유리된 종양 특이 단백질들을 탐식하기 때문에 종양 특이 단백질의 mRNA⁹나 펩타이드²⁰를 바로 수상세포에 투입(pulsation)시키거나 암세포와 수상세포를 융합한 잡종세포(hybridoma)를 만드는 방법¹⁰ 등이 연구된 바 있다. 그러나 본 연구에서 시도된 암세포 추출물(lysate)을 수상세포와 같이 배양함으로써 수상세포에 자연스럽게 항원들이 투입되도록 하는 방법은 기존의 유전자 형질 도입이나 항원 펩타이드 투입법 혹은 암세포-수상세포 융합 방법 등이 가지는 장점을 가지는 것 외에

도 기존의 방법들보다 기술적으로 훨씬 용이하다는 장점을 가진다.

수상세포를 이용한 암 백신 연구에서 가장 어려운 점은 체내에서 얻을 수 있는 수상 세포의 수가 제한적이라는 것이다. Inaba 등²¹에 의해 GM-CSF를 이용한 수상세포의 시험관내 분화 유도가 보고되면서 수상세포에 대한 활발한 연구가 가능하게 되었다. 이들은 GM-CSF를 500 내지 1000 U/ml 첨가하여 마우스 골수로부터 수상세포 분화를 유도하였는데 이들의 보고에 따르면 배양 초기의 수상세포 전구세포는 대식세포에 붙어 자라며 이들이 성숙하게되면 성숙 수상세포는 배지내로 떨어져 나온다고 하였다. 또한 배양 초기의 과립구는 대부분이 배지 내에 떠 있으므로 배지를 교환하는 과정에서 제거할 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 Inaba 등의 방법을 기초로 마우스 골수로부터 수상세포의 분화를 유도하였는데 이들이 사용한 농도보다 더 낮은 농도의 GM-CSF (20 ng/ml (100 U/ml))을 첨가하여 배양하였음에도 불구하고 수상세포의 성숙 양상이나 얻어지는 성숙 수상세포의 양이 다른 연구들의 결과들과 비교할 만하다는 것을 알 수 있었다.

마우스의 수상세포 배양에서 IL-4의 역할에 대해서는 아직 논란의 여지가 있지만 rat의 수상세포 배양에 GM-CSF와 IL-4를 첨가한 경우에 GM-CSF 단독 혹은 GM-CSF와 TNF- α 를 첨가한 경우보다 2배 가량 많은 수의 수상세포를 얻을 수 있었다는 사실이 보고된 바 있고²² 뿐만 아니라 Lu 등²³은 수상세포를 배양할 때 GM-CSF만을 첨가한 경우 B7-2 분자와 제2형 주조직 적합항원의 표현이 없어지고, B7-1 분자의 표현이 매우 약해지는 반면 IL-4를 추가하여 배양된 수상세포에서는 세가지 모두 강하게 된다는 사실을 제시하였다. 본 연구에서는 이 연구들을 참고하여 수상세포의 배양에 GM-CSF 및 IL-4를 모두 첨가하여 배양하였다. 배양하는데 필요한 사이토카인의 양이 많고 경비가 많이 들기 때문에 이 부분이 현재 수상세포를 이용한 면역 치료의 최대 문제점이 될 것이며 향후 유전자 형질 도입을 이용하여 GM-CSF나 IL-4 등을 일정하게 분비되는 세포주 등을 이용하는 방법이 필요할 것으로 생각된다.

본 연구의 목적이라 할 수 있는 암세포 용해질을 수상세포와 배양함으로써 필요로 하는 암 항원물질들이 효과적으로 탐식되어 수상세포에 제시되는가 하는 질문은 본 연구의 in vitro 실험을 통한 T 살세포의 세포 독성효과 실험으로도 증명이 되었다. 기존의 다른 방법들, 예를 들면 암 항원 단백질의 유전자 혹은 mRNA를

수상세포에 형질도입하는 방법이라든가 암세포-수상세포 잡종형성 등의 방법 등과 비교하지 않아 어느 방법이 더 우수한가에 대해서는 알 수 없으나, 암세포 용해질을 수상세포의 배양에 첨가한 것만으로도 효과적인 T 살세포가 형성됨을 확인할 수 있었고 이는 향후 수상세포를 이용한 면역 요법, 특히 자가 종양 백신의 개발에 기술적으로 용이한 접근을 가능케 할 것으로 생각된다.

면역 치료에 대한 많은 실험 연구들이 궁극적으로는 임상응용을 목표로 하면서도, 실험모델이 임상적으로 연관이 없는 경우들이 대부분이다.²⁴ 예를 들면 대장암 세포를 피부나 근육에 주사하여 암 발생 여부를 측정하는 것은 단지 실험적으로 관찰이 용이하다는 점 때문이지만 임상적으로 대장암이 피부나 근육으로 전이되는 경우가 거의 없다는 것을 생각하면 이상적인 방법이 아닐 것이다. 대장암의 원발 장기인 대장자체 혹은 호발 전이 장기인 간으로 암세포를 주입한 후 치료효과를 관찰하는 것이야말로 임상적으로 응용이 가능한 유용한 연구 모델이 될 것이다. 본 연구에서 궁극적으로 관찰하고자 했던 간전이 모델에서의 수상세포 백신의 효과를 위해 간의 캡슐 아래로 50,000개의 암세포를 주사하는 방법을 이용하였는데 그 이유는 이 방법이 간 문맥을 통해 암세포를 조사하는 방법에 비하면 임상적인 연관성이 낮지만 문맥을 통해 간으로 암세포를 주사하는 경우간에 발생하는 암 병소가 간 전체로 확산되어 생성되는 간암의 정량적인 비교가 어려운 문제점 때문이었다. 또한 본 연구에서 관찰한 수상세포 백신의 항암 효과는 백신을 먼저 주고 2주 후에 암세포를 주사한 암 예방 효과라 할 수 있는데, 특정한 암에 대해 예방 목적으로 그 암의 백신을 투여한다는 것이 임상적으로는 불가능한 모델이지만 원발암에 대한 치료 후 일어나는 원격전이를 예방하는 것이 암 치료의 중요한 부분이기 때문에, 이 예방 효과는 임상응용의 중요한 기초자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

암 백신은 그것이 아무리 특이적이고, 선택적이라 하더라도, 인체의 대부분의 암처럼 막대한 암 부담 (tumor burden)을 완전히 관해시키기에는 역부족이라는 데 이견이 없는 것 같다.²⁵ 본 연구에서 투여된 5만 개 정도의 암세포에 대해서 대조군에 비해 유의한 암 발생 억제효과와 생존율의 차이를 관찰할 수 있었지만 더 많은 세포수에 대해서도 같은 항암효과를 얻을 수 있을지는 의문의 여지가 있다. 또한 임상적으로 유관한 동물 실험이 되기 위해서는 궁극적으로 생존율

에 대한 비교가 있어야 하므로 향후 반복된 실험으로 수상 세포를 이용한 자가 종양 백신을 투여한 군과 대조군간의 생존율의 차이를 관찰하는 연구가 따라야 될 것이다. 아직 면역 요법 자체가 수술과 같은 기존의 암에 대한 국소 요법을 대체하는 개념보다는 보조요법으로서의 유용성이 연구되고 있고 이런 의미에서 볼 때 수술 등으로 숙주의 암 부담을 최소화한 상태에서, 전신적으로 남아있을 것으로 예상되는 현미경적인 잔존 암의 치료나 전이성 병변에 대한 예방 등에 수상세포 백신이 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

수상세포를 이용한 자가 암 백신이 미래의 가장 이상적인 면역치료 전략 중의 하나이다. 본 연구에서 수상세포내로 암세포 용해질을 투입(pulsing)시키는 것만으로도 수상세포가 효과적으로 숙주의 면역반응의 유도에 필요한 암 항원 물질들을 제시하는 것을 확인하기 위해 본 연구를 시행하였다. 백신을 투여한 동물로부터 얻은 비장세포가 대조군의 비장세포 보다 유의하게 암세포를 살해하는 것을 관찰할 수 있었으며, in vivo 암 억제 실험에서 백신을 투여 받은 동물들이 5만개의 암세포를 간에 주사하였을 때 대조군에 비해 유의한 암 발생 억제효과와 차이를 관찰할 수 있었다. 비록 본 연구에서 수상 세포를 이용한 자가 종양 백신을 투여한 군과 대조군 간의 생존율의 차이를 관찰하는 연구가 시행되지는 않았으나 아직 면역 요법 자체가 수술과 같은 기존의 암에 대한 국소 요법을 대체하는 개념보다는 보조요법으로서의 유용성이 연구되고 있고 이런 의미에서 볼 때 수술 등으로 숙주의 암 부담을 최소화한 상태에서, 전신적으로 남아있을 것으로 예상되는 현미경적인 잔존 암의 치료나 전이성 병변에 대한 예방 등에 수상세포 백신이 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893;105:487-511.
2. Shu S, Plautz GE, Krauss JC, Chang AE. Tumor immunology. *JAMA* 1997;278:1972-81.
3. Germain RN. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 1986;322:687-9.
4. van der Bruggen P, Traversari C, Lurquin CC, de Plaen

- E, van den Eynde B, Knuth A, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254:1643-7.
5. Muul LM, Spiess PJ, Director EP. Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *J Immunol* 1987;138:989-95.
 6. Alexander RB, Rosenberg SA. Long term survival of adoptively-transferred tumor infiltrating lymphocytes in mice. *J Immunol* 1990;145:1615-20.
 7. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, et al. Interleukin-2 produced by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 1990;60:397-403.
 8. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3539-43.
 9. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996;184:465-72.
 10. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic cells and carcinoma cells. *Nature Med* 1997; 3:558-61.
 11. Pogador A, Snyder D, Gilboa E. Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol* 1996;156:2918-26.
 12. Suh KW, Piantadosi S, Yazdi H, Pardoll DM, Brem H, Choti MA. Treatment of liver metastases from colon carcinoma with autologous tumor vaccine expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Surg Oncol* 1999;72:218-24.
 13. Zar JH(ed). *Biostatistical analysis.*, Englewood-Cliffs, N.J., Prentice-Hall, 1984.
 14. Restifo NP, Kawakami Y, Marincola F, Shamamian P, Taggarse A, Esquivel F, et al. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogene therapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother* 1993;14:182-90.
 15. Townsend SE, Allison JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transferred melanoma cells. *Science* 1993;259:368-70.
 16. Restifo NP, Esquivel F, Asher AL, Stotter H, Barth RJ, Bennink JR, et al. Defective presentation of endogenous antigens by a murine sarcoma: implications for the failure of an antitumor immune response. *J Immunol* 1991;147:1453-9.
 17. Pardoll D. Immunotherapy with cytokine gene-transduced tumor cells: the next wave in gene therapy for cancer. *Curr Opin Oncol* 1992;4:1124-9.
-