

## IL12 p40 형광 리포터 생쥐 시스템을 이용한 B16 F/T 항암 백신의 면역활성 연구

윤 대선, 윤 지 희<sup>1</sup>, 홍 석 만

세종대학교 공과대학 생명공학과

<sup>1</sup>한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

**간추림** : 암은 심장 질환 다음으로 사망률이 높은 질환으로 전 세계 인구의 다섯 명 중 한 명은 암으로 사망하는 것으로 알려져 있다. 따라서 안전하고 효과적인 치료용 항암 백신을 개발하는 것이 그 어느 때보다 절실하다. 본 연구에서는 냉동/해동(freezing/thawing, F/T) 방법으로 제조한 세포 항암백신의 하나인 B16 melanoma F/T 백신(F/T 백신)의 면역활성 효과를 조사하였다.

IL12 p40 형광 리포터 생쥐의 골수로부터 유래한 수지상세포(dendritic cell)를 이용하여 F/T 백신이 항암 면역반응 유도에 중요한 IL12 p40과 수지상세포 활성화 시에 수반되는 MHC 분자와 공동자극 분자의 발현 변화를 조사하였다. F/T 백신의 면역활성이 어떤 물질에서 유래하는지 DNase와 proteinase를 이용하여 조사하였다. MyD88 유전자 결손 생쥐를 이용하여 F/T 백신의 활성이 Toll 유사 수용체와 연관이 있는지 알아보았다.

F/T 백신은 IL12 p40의 발현을 유도하였고 MHC class II 분자와 공동자극 분자인 CD86의 발현을 증가시켰다. 흥미롭게도, F/T 백신은 항암 면역반응에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려진 자연살해T 세포의 활성화에 영향을 주는 CD1d 분자의 발현 증가도 유도하였다. 그리고 F/T 백신의 면역활성은 주로 단백질에 기인하고 이러한 면역활성은 MyD88 의존적이라는 것을 알 수 있었다.

종합해 보면, 본 연구결과는 IL12 p40 형광 리포터 생쥐 시스템을 통하여 F/T 백신의 면역보조제 효과를 확인하였고, 이러한 결과를 토대로 보다 정확한 F/T 백신의 면역활성 기전 규명을 통하여 새로운 치료용 항암 백신 개발에 대한 기초적인 지식을 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

**찾아보기 낱말** : B16 F/T 항암 백신, 형광 리포터 생쥐 시스템, 인터루킨 12, Toll 유사 수용체

### 서 론

최근 들어 암은 대부분의 선진국에서 심혈관계 질환 다음으로 높은 사망률을 차지하고 있는 질환으로, 전 세계 인구의 다섯 명 중 한 명은 암으로 사망하는 것으로 알려져 있다. 인체의 여러 다양한

조직에서 암이 발생하고 있으며 한 부위에서 발생하여 여러 부위로 전이 되어 장기간의 투병생활로 이어지게 된다(Ward 등 2006).

일반적으로 사용되고 있는 항암 치료방법으로는 기존의 수술, 방사선 요법, 화학요법 등이 존재하고 있으나 이러한 치료방법은 모든 암을 효과적으로 치료하지 못한다. 위의 치료 방법들은 대부분의 기본 틀은 세포분열을 억제 또는 핵산합성 등 세포의 기본 대사과정을 억제하는 형식이기에, 치료하고자 하는 암세포에 뿐만 아니라 다른 정상 세포에게도 비특이적으로 작용하여 심각한 부작용들을 유발시

\* 본 논문은 학술진흥재단의 기초과학연구 지원사업(KRF-2004-015-E00139, 홍석만)과 서울시 산학연 협력사업의 신기술 연구개발 지원사업(#10693M0207551, 홍석만)의 지원 하에 수행되었음.

교신저자: 홍석만(세종대학교 공과대학 생명공학과)  
전자우편: shong@sejong.ac.kr

킬 우려가 있다. 이러한 부작용 문제를 해결하기 위해 새로운 항암치료법으로 항암면역치료 방법이 최근 새롭게 대두되었다. 이 치료법은 발암자의 몸 안에서 암세포에 대해서만 특이적인 면역반응과 면역학적 기억을 유도하여 부작용 없이 암을 치료하고 나아가 암의 재발을 예방할 수 있는 방법이며 현재 많은 연구가 진행되고 있다(Ruttinger 등 2006).

항암면역치료 방법은 항암면역을 유도하는 방법에 따라 나누며 크게 수동적 면역치료와 능동적 면역치료로 나누어진다. 수동적 면역치료는 외부에서 유도한 암 특이적인 항체 또는 효과기 세포를 암 환자에 다량으로 투여하여 항암 면역반응을 유도하는 방식을 말하며 항암효과 기간이 짧아서 반복 투여가 필요하다는 단점이 있다. 반면에 능동적 면역치료는 항암 백신을 암 환자에 투여하여 암 환자 내에서 암 특이적인 항암 면역반응이 일어나도록 하는 방식으로 항암효과를 오랫동안 지속시킬 수 있는 장점이 있다. 항암 백신은 항원의 형태에 따라 단백질 백신, 폴리펩티드 백신, 바이러스백신, 세포 항암백신 등으로 나뉘게 된다. 이러한 백신의 대부분은 단독으로 강한 항암 면역반응을 유도 할 수 없기 때문에 면역보조제 (adjuvant) 또는 사이토카인과 같은 비특이적인 자극제들과 함께 사용하게 된다. 이러한 비특이적인 자극제 사용은 심각한 부작용을 유발할 수 있기 때문에 효과적이고 안전한 항암 백신을 개발하는 것이 필요하다 (Schuster 등 2006). 가장 이상적인 치료용 항암 백신은 면역 보조제의 첨가 없이 항암 면역반응을 유도할 수 있어야 한다. 즉, 면역보조제로 사용되는 화학물질에 의한 부작용을 근원적으로 배제하기 위해 일체의 화학물질을 처리하지 않고 괴사 과정에서 발현되는 위험신호의 표현으로서의 공동자극분자 발현을 면역보조제 기능으로 이용하면 될 것이다. 암세포 전체를 반복적인 냉동/해동 (freezing/thawing, F/T) 과정에 의해 제조된 백신은 암세포 항원으로만 이루어져 있지만 항암 면역반응을 일으킬 수 있기 때문에 위의 조건에 매우 잘 부합하는 치료용 항암 백신 후보로 여겨지고 있다.

항암 면역반응은 IFN $\gamma$ 을 주로 분비하는 1형도움T (type I helper T, Th1) 세포와 세포매개성 독성을 나

타내는 세포독성 T 림프구 (cytotoxic T lymphocyte, CTL)에 의해서 주로 일어난다 (Wang 등 2002). 뿐만 아니라 자연살해 (natural killer, NK) 세포와 자연살해T (natural killer T, NKT) 세포도 항암 면역반응의 중요한 효과세포로 역할을 담당하고 있다 (Cui 등 1997). 이러한 항암 면역반응이 개시되기 위해서는 내재면역 (innate immunity) 세포들의 활성이 먼저 선행되어야 한다 (Janeway와 Medzhitov 2002). 수지상세포 (dendritic cell)는 생리학적으로 가장 강력한 면역반응을 유발하는 내재면역 세포로서 외부 항원이 조직에 들어왔을 때 이를 섭취하고 활성화된 후 림프조직으로 이동하여 순환하는 항원특이적인 T 세포에 항원을 제시한다 (Guermonprez 등 2002). 활성화된 수지상세포는 IL6, IL12, IL18, IFN $\alpha$  등과 같은 여러 사이토카인을 생산한다. 이들 사이토카인 중에서 IL12는 항암 면역반응에 중요한 NK 세포의 활성화와 Th1 세포의 분화를 유도하는데 매우 중요하다 (Fong와 Engleman 2000, Colombo와 Trinchieri 2002). 최근 IL12의 발현을 형광 단백질 리포터 시스템으로 관찰할 수 있는 in vivo 생쥐 모델이 제작되었고 (Reinhardt 등 2006) 이러한 생쥐의 골수에서 수지상세포로 분화시킨 골수유래 수지상세포는 IL12 활성을 조사하는데 있어 매우 유용한 도구임이 보고되고 있다 (Im 등 2005).

이 연구에서는 B16 melanoma 세포를 F/T 방법으로 제작한 B16 F/T 항암 백신 (F/T 백신)이 가지는 면역활성 효과를 in vitro 실험을 통하여 알아보았다. 이를 위하여 사이토카인 IL12 p40 형광 리포터 생쥐의 골수로부터 분화시킨 수지상세포를 이용하여 F/T 백신의 IL12 분비 여부를 조사하였고 또한 항원제시세포의 활성화 시에 수반되는 여러 표면 분자들을 조사하였다. 그리고 F/T 백신의 면역활성 효과가 어디에서 유래하는지를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 1. B16 melanoma F/T 백신의 제작

B16 melanoma 세포를  $1 \times 10^7$  cells/mL 농도로 PBS에 희석하여 준비한다.  $-70^\circ\text{C}$ 에서 얼리고 난

후 상온에서 완전히 녹이는 과정을 총 3번 반복하여 F/T 백신을 제작하였다.  $2 \times 10^5$  수지상세포에 F/T 백신 20  $\mu$ L ( $2 \times 10^5$  cells 상당)를 round-bottom 96 well-plate에서 반응시켰다.

## 2. 사용한 실험 동물

6~12주령의 IL12 p40 형광 리포터 생쥐를 실험에 이용하였다. MyD88 knockout (Adachi 등 1998) 생쥐는 삼성의료원으로부터 얻어 이용하였으며, 세종대학교 동물 사육실에서 유지하였다. 방사선 멸균 사료와 멸균한 물을 자유롭게 섭취시켰고, 12시간 명암 조건을 유지하였다.

## 3. 사용배지 및 반응물

RPMI 1640 (GibcoBRL, USA)에 10% FBS, HEPES buffer, L-glutamine, penicillin-streptomycin, 2-mercaptoethanol을 첨가한 배지를 사용하였다. In vitro 상에서의 stimulation assay를 위해 사용한 TLR 리간드로는 nuclease-resistant phosphorothioate backbone을 갖고 있는 CpG oligodeoxynucleotide (CpG 1826: 5'-TCCATGACGTTCTCTGACGTT-3', GenoTech, Korea)와 Poly I:C (Sigma, USA)를 사용하였다. 사용 농도는 CpG의 경우 5  $\mu$ g/mL이고 Poly I:C는 100  $\mu$ g/mL이다.

## 4. 수지상세포의 생성

수지상세포를 생성하기 위하여 생쥐의 경골(tibia)과 대퇴골(femur)의 골수에서 주사기를 이용하여 골수세포 (Bone marrow cell)를 추출하였다. ACK lysis buffer (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 2 mM EDTA)를 이용하여 적혈구를 제거한 후 골수세포를 RPMI 1640 배지로 세척하고  $1 \times 10^6$  cells/mL 농도로 배지에 희석하고 recombinant mouse Flt3L (100 ng/mL; R&D Systems, USA)와 함께 24 well tissue culture plate에서 배양시켰다. 배양 시작 후 5일째와 10일째에 각각 배양액의 절반을 제거하고 그 만큼의 새 배양액을 recombinant mouse Flt3L (50 ng/mL)와 함께 첨가해주었다. 배양 12일째에 수지상세포를

수확하여 round-bottom 96-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well 밀도로 깔아주고 제시된 물질과 함께 제시된 시간 동안 배양 후 유세포 분석기로 분석하였다.

## 5. B16 F/T의 효소반응

$1 \times 10^7$  cells/mL 농도로 제작된 B16 F/T에 Qbiogene (USA)에서 구입한 DNase I (200 U/mL)과 Proteinase K (100  $\mu$ g/mL)를 각각 37°C에서 30분간 반응을 시키고 이 반응물들의 20  $\mu$ L ( $2 \times 10^5$  cells 상당)와 수지상세포  $2 \times 10^5$  cell을 round-bottom 96 well plate에서 반응시켜 결과를 확인하였다.

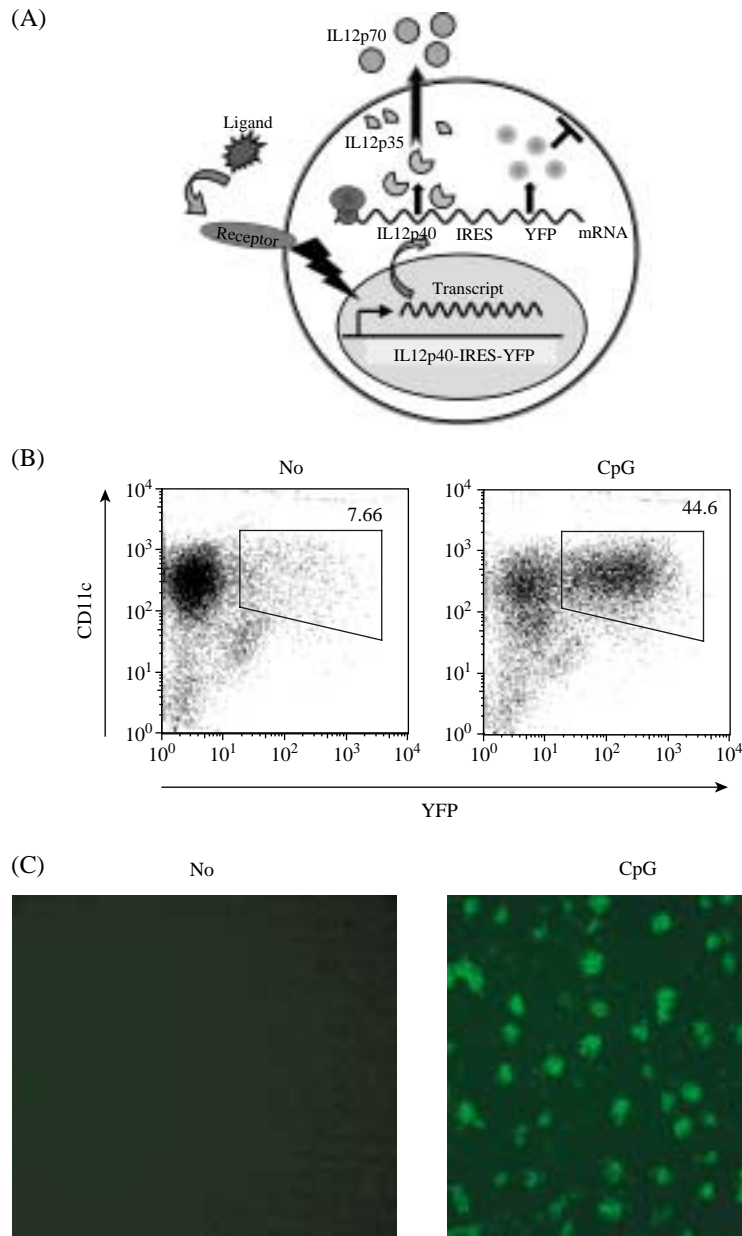
## 6. 유세포 분석 및 항체 염색

자극이 끝난 수지상세포를 획득하여 Phycoerythrin (PE)이 결합된 anti-CD11c, anti-CD1d, anti-MHC II anti-CD40 단클론항체, Tricolor (TC)가 결합된 streptavidin, anti-CD11c monoclonal 항체, allophycocyanin (APC)이 결합된 anti-CD11c 단클론항체, biotin이 결합된 anti-CD80, anti-CD86 단클론항체를 이용하여 세포를 염색하였다. 항체로 염색한 세포의 획득은 CellQuest software와 FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) 기기를 이용하였으며 분석은 FlowJo (Tree Star, USA)를 이용하였다.  $2 \times 10^5$  수지상세포에 각각의 항체로 염색 (4°C, 1시간)한 후, FACS wash buffer (1% FBS을 함유한 PBS)로 3번 세척하고 1% paraformaldehyde로 고정시켰다. 연구에 사용된 anti-CD11c, anti-CD1d, anti-MHC II, anti-CD40 항체는 BD Pharmingen에서 구입하였으며 anti-CD80, anti-CD86 항체는 Caltag에서 구입하였다.

## 결 과

### 1. IL12 p40 형광 리포터 시스템의 유용성

Naive CD4 T 세포의 분화에 매우 중요한 역할을 담당하는 사이토카인인 IL12의 발현을 측정하거나 IL12을 생산하는 세포를 모니터링함으로써 내재면역



**Fig. 1.** The cytokine reporter system. (A) Diagram for the IL12 p40-YFP knockin reporter system. The YFP gene is linked to the genomic IL12 p40 gene via the IRES element. When DCs are stimulated with TLR ligands, the induction of IL12 p40 gene generates the bicistronic transcript encoding both IL12 p40 and YFP gene. While IL12 p40 proteins are secreted extracellularly, YFPs remain in the cytosol, consequently marking the cells yellow. (B) Flt3L-cultured BMDCs from IL12 p40 reporter mice were stimulated with CpG (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and the medium only. Sixteen hours later, the cells were stained with anti-CD11c mAb and were analyzed by flow cytometry. Values are the percentage of YFP<sup>+</sup> cells among CD11c<sup>+</sup> cells. (C) Confirmation of YFP expression in Flt3L-cultured BMDCs derived from IL12 p40 reporter mice using fluorescence microscopy. BMDCs were stimulated with CpG (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and the medium only.

세포의 활성화를 직접적으로 관찰할 수 있다. 최근 IL12를 구성하는 단백질 중 하나인 IL12 p40을 생산하는 세포가 형광을 띠도록 고안한 생쥐 모델이 제작되었다(Reinhardt 등 2006). 이러한 IL12 p40 형광 리포터 모델은 yellow fluorescence protein (YFP) 유전자를 IL12 p40 유전자 뒤에 internal ribosomal entry site (IRES)을 붙여 knockin시켜 만들어졌기 때문에 수지상세포가 Toll 유사 수용체 (Toll-like receptor, TLR) 리간드에 의해 자극을 받아 p40 유전자를 발현할 때 p40과 YFP 유전자가 함께 bicistronic하게 발현되어 p40 단백질과 YFP 단백질이 함께 생성되게 된다. 생성된 p40 단백질은 p35 단백질과 결합하여 IL12를 형성하여 세포 밖으로 분비되는 반면 YFP 단백질은 세포 내에 축적되고 유세포 분석기를 통하여 IL12 p40을 발현하는 세포를 FL1 채널에서 측정할 수 있게 된다(Im 등 2005)(Fig. 1A).

IL12 p40 형광 리포터 시스템이 실제 IL12 발현 여부를 잘 반영할 수 있는지 조사하기 위해서 강력한 IL12 p40 발현 유도 분자인 CpG를 사용하여 검증하였다. IL12 p40 형광 리포터 생쥐에서 골수세포를 추출하여 Flt3L (100 ng/mL)와 함께 12일간 배양하여 수지상세포로 분화를 유도하였다. 이렇게 유도된 수지상세포를 CpG (5 µg/mL)로 자극하고 16시간 후, 수지상세포의 특이 표지 분자인 CD11c에 대한 항체로 표지하여 유세포 분석기를 통해 분석하였고 (Fig. 1B), 또한 형광현미경을 이용하여 결과를 확인하였다 (Fig. 1C). 수지상세포를 CpG로 자극하였을 경우를 그렇지 않은 것과 비교해볼 때 YFP의 발현이 급격히 증가하였다. 그러므로 IL12 p40 형광 리포터 모델을 이용하면 YFP 발현 세포의 측정으로 IL12 p40의 발현 세포를 intracellular cytokine staining 방법을 쓰지 않고 용이하게 측정할 수 있음을 확인하였다.

## 2. 수지상세포에서 B16 F/T 백신에 의한 IL12 p40의 유도

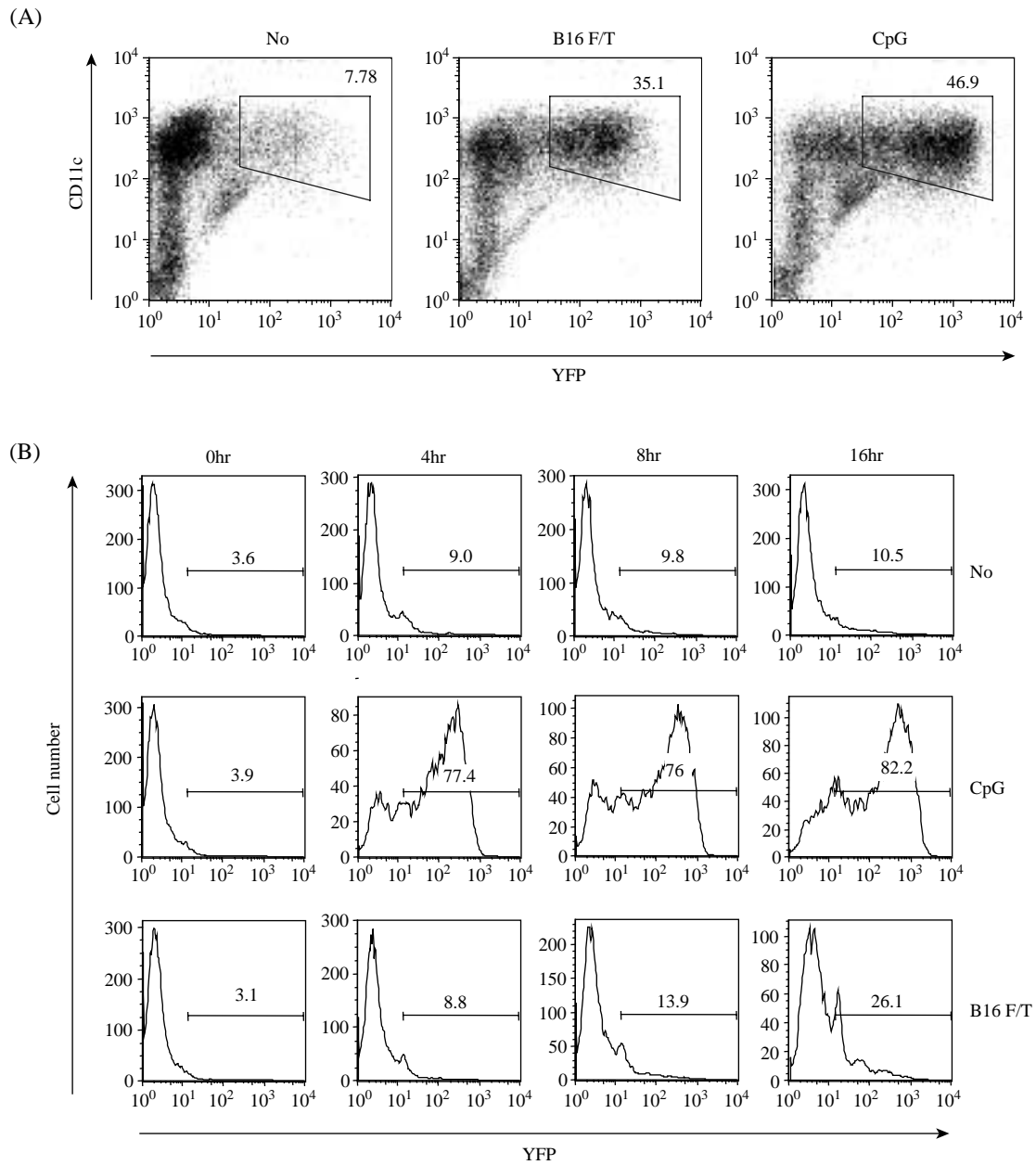
본 연구에서는 치료용 항암 백신 후보 물질로서 F/T 백신에 대한 면역보조제 효능을 조사하였다. 우선 IL12 p40 형광 리포터 생쥐에서 유도한 수지상세포

포에 F/T 백신을 처리하여 IL12 발현을 in vitro 상에서 측정하였다. 양성대조군으로는 CpG를 사용하였다. F/T 백신을 처리한 수지상세포를 아무 것도 처리하지 않은 수지상세포와 비교해 보면 IL12 p40을 발현하는 세포가 약 5배 정도 증가하였다 (Fig. 2A). 그리고 다음 단계로 F/T 백신의 수지상세포 활성화 kinetics를 조사하였다. 앞의 실험과정과 동일하게 실험을 진행하였고, F/T 백신을 수지상세포에 처리한 후 0시간, 4시간, 8시간, 16시간 시점에서 수지상세포의 IL12 p40의 발현을 측정하였다. CpG 처리시에는 4시간이 지난 시점부터 IL12 p40의 충분한 발현 정도를 나타내고 있지만 B16 F/T 백신의 경우는 16시간 정도가 경과한 이후부터 수지상세포의 IL12 p40 발현에 영향을 주는 것으로 미루어보아 기존의 TLR 리간드와는 다른 방식에 의해 수지상세포를 활성화할 가능성이 있다 (Fig. 2B).

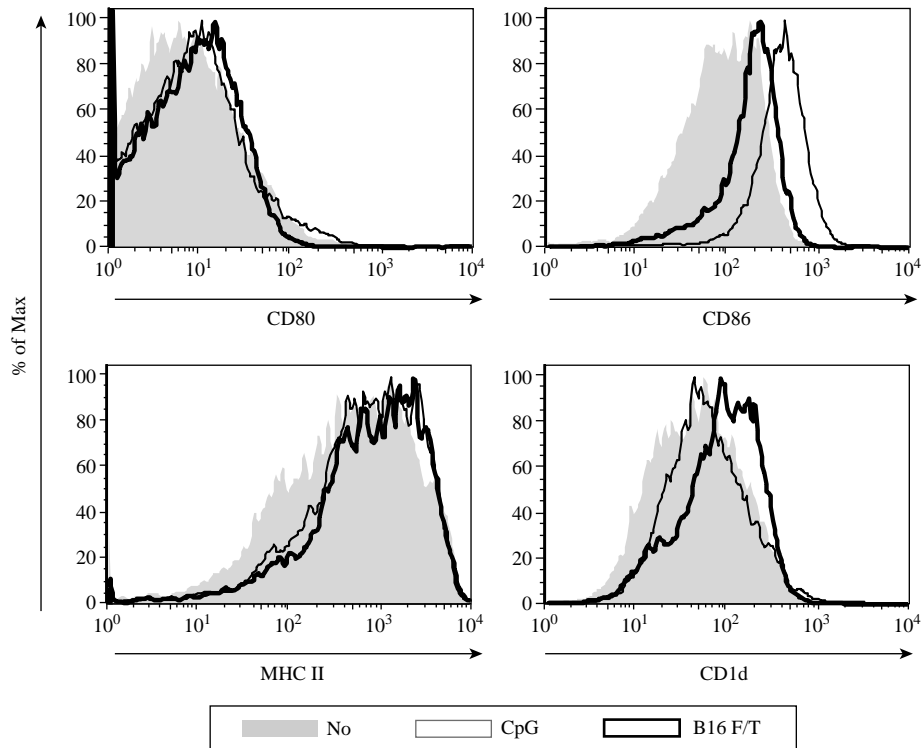
## 3. B16 F/T 백신에 의해 유도되는 수지상세포의 표면 분자들

IL12 발현 유도 외에 F/T 백신을 처리함으로써 인하여 변화하는 수지상세포의 표면 분자를 조사하였다. 항원제시세포가 항암 면역반응에서 효과세포 역할을 하는 T 세포를 활성화 시키기 위해서는 공동자극 분자를 발현하여야 한다. T 세포가 활성화 되기 위해서는 항원제시세포가 제시하는 MHC/peptide에 의한 신호 이외에 T 세포의 CD28 분자와 결합하여 신호를 전달하는 공동자극 신호가 있어야 한다 (Appleman 등 2000). 공동자극 신호가 존재하지 않을 경우 T 세포는 항원 peptide가 제시되어도 anergy (Appleman와 Boussiotis 2003, Schwartz 2003) 상태에 빠지게 된다. 따라서 본 실험에서는 CD4 T 세포에 항원을 제시하는 MHC class II 분자와 항원제시 세포의 공동자극분자인 CD80과 CD86의 발현에 미치는 B16 F/T 백신의 영향을 조사하였다.

한편, 항암 면역반응의 중요한 한 축을 이루는 T 세포의 일종인 NKT 세포는 당지질을 제시하는 MHC I 유사분자인 CD1d와의 결합을 통하여 활성을 갖게 된다 (Bendelac 등 2007). 따라서 F/T 백신이 수지상세포에 작용하여 NKT 세포에 활성을 부여하



**Fig. 2.** The F/T vaccine induces IL12p40 gene expression in dendritic cells. (A) Flt3L-cultured BMDCs from IL12 p40 reporter mice were stimulated with F/T vaccine, CpG (5  $\mu$ g/mL) or the medium only and sixteen hours later, the cells were analyzed by flow cytometry. Values are the percentage of YFP<sup>+</sup> cells among CD11c<sup>+</sup> cells. (B) kinetics of the activation of BMDCs with F/T vaccines. BMDCs were stimulated for the indicated times (0, 4, 8, and 16 hrs) and then were stained with anti-CD11c mAbs. The frequency of IL12p40 expressing BMDCs was analyzed on CD11c<sup>+</sup> gated cells and was determined by flow cytometry for YFP intensity.



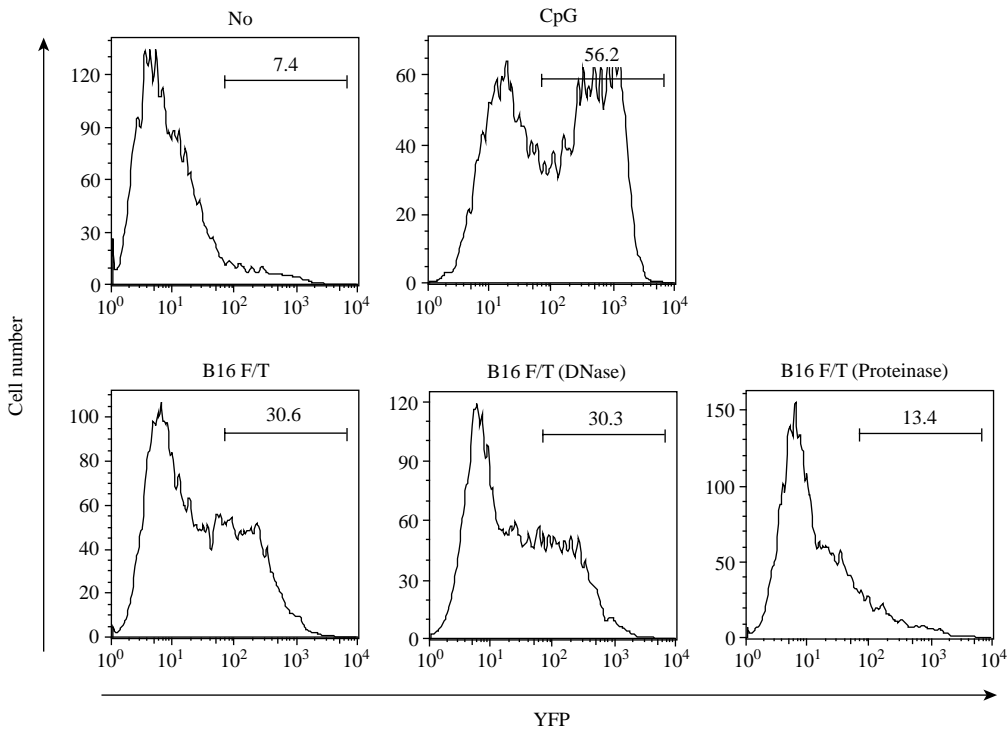
**Fig. 3.** The increase of both MHC molecules and co-stimulatory molecules on BMDCs by F/T vaccines. After the activation of Flt3L-cultured BMDCs with the indicated stimulators, the cells were stained with anti-CD11c, anti-CD80, anti-CD86, anti-MHC II or anti-CD1d mAbs. The expression level of CD80, CD86, MHC II or CD1d molecules was examined by flow cytometry and was evaluated on CD11c<sup>+</sup> gated cells.

는 CD1d 분자의 발현에 영향을 미치는지 조사하였다(Fig. 3).

Fig. 3을 보면, F/T 백신이 MHC II와 CD1d 분자 그리고 공동자극 분자인 CD80과 CD86의 발현을 모두 증가시켰다는 것을 알 수 있다. 흥미로운 점은 CD1d 분자의 경우 양성대조군으로 사용한 CpG와 비교하였을 때보다도 훨씬 강한 증가를 보였다는 것이다. 위의 결과들을 종합해 보면 항암 백신 후보 물질로 사용한 F/T 백신은 항원제시세포가 T 세포를 활성화시키는데 필요한 세포 표면 분자들을 효과적으로 증가시키는 면역보조제 능력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 F/T 백신이 이상적인 백신 후보 물질로 적합하다는 증거를 제시하고 있다.

#### 4. B16 F/T 항암 백신의 면역활성 물질

F/T 백신의 경우 냉동/해동의 반복작업을 거치는 동안 세포의 막이 파괴되어 세포 내부에 존재하는 구성물질들이 모두 외부에 노출되게 된다. 따라서 F/T 백신은 암세포에서 유래한 DNA, RNA, 단백질, 지질 등의 혼합물이다. 이러한 혼합물 속의 어떤 물질이 실질적으로 수지상세포의 활성화에 관여하는지 알아보는 실험을 진행하였다. 본 실험에서는 DNA와 단백질 중 어느 분자가 상대적으로 더 수지상세포 활성화에 중요한지 알아보았다. 이를 위하여 F/T 백신에 DNase와 proteinase를 각각 처리하여 DNA와 단백질을 백신으로부터 제거한 후 수지상세포 활성도를 IL12 p40의 발현 즉 YFP의 발현으로

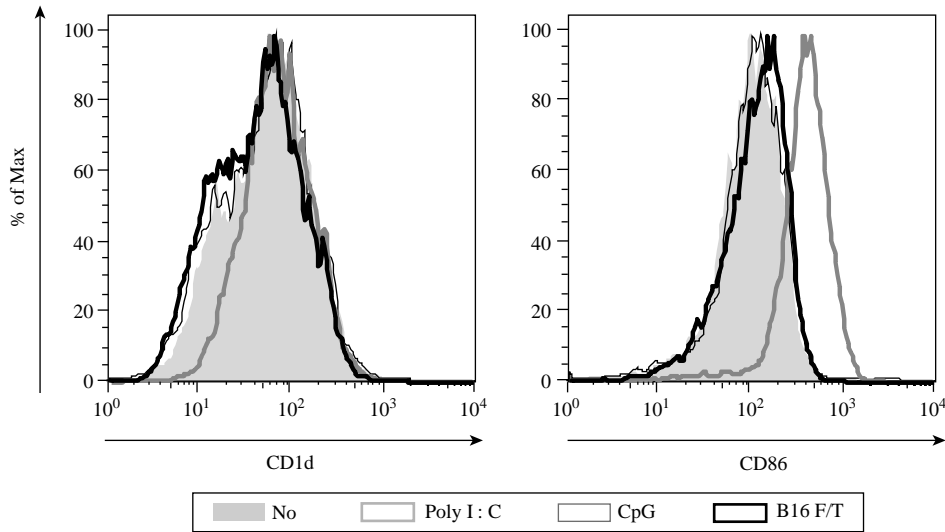


**Fig. 4.** The immunostimulatory activity of the F/T vaccine comes mainly from proteins. BMDCs were stimulated with the medium only, CpG (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), F/T, DNase-treated F/T or Proteinase K-treated F/T vaccines for 16 hrs and subsequently were stained with anti-CD11c mAbs. The frequency of IL12p40 expressing BMDCs was analyzed on CD11c<sup>+</sup> gated cells and was determined by flow cytometry for YFP intensity.

조사하였다. IL12 p40 형광 리포터 생쥐의 수지상세포에 DNase (200 U/mL)와 proteinase (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 각각 처리하여 준비한 F/T 백신으로 자극을 주고 CD11c<sup>+</sup> 세포군에서 IL12 p40 발현을 조사하였다 (Fig. 4). DNase로 처리한 F/T 백신의 경우 아무 처리도 하지 않은 F/T 백신으로 자극한 결과와 비교해 볼 때 IL12 p40 발현의 감소가 거의 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었다. 반면 proteinase로 처리한 F/T 백신의 경우 활성도가 완전히 없어지지 않았지만 상당한 수준의 감소를 보여 주었다. 이는 F/T 백신의 구성 물질 중 실제로 수지상세포의 활성을 유도하는 물질은 DNA가 아니라 주로 단백질임을 확인할 수 있었다.

## 5. B16 F/T 항암 백신의 MyD88 pathway 의존성

대개 TLR를 통한 IL12 발현은 Myeloid Differentiation factor-88 (MyD88) 신호전달 경로를 경유하여 일어난다. 현재 TLR3 리간드인 poly I:C를 제외하고는 대부분의 TLR 리간드들(한 예로 TLR9의 리간드인 CpG)에 의한 신호 전달은 MyD88 경로에 의존적인 것으로 밝혀져 있다 (van Duin 등 2006). 따라서 F/T 백신에 의한 IL12 발현 신호전달이 MyD88 경로에 의존적인지 아닌지 확인하기 위하여 MyD88 knockout 생쥐 모델을 이용하였다. 즉, MyD88 경로 의존성을 조사하기 위하여 MyD88 knockout에서 유래한 수지상세포에 MyD88-의존성 TLR 리간드인 CpG와 MyD88-비의존성 리간드인



**Fig. 5.** The activation of BMDCs by the F/T vaccine is MyD88 dependent. Flt3L-cultured BMDCs derived from MyD88<sup>-/-</sup> mice were stimulated for 16 hrs with the medium only, CpG (5 µg/mL), Poly I:C (100 µg/mL) or F/T vaccine. After stimulation, the cells were stained with anti-CD11c, anti-CD1d or anti-CD86 mAbs. The expression level of CD1d and CD86 was analyzed on CD11c<sup>+</sup> gated cells.

Poly I:C (100 µg/mL)를 사용하여 F/T 백신의 반응성과 비교하였다. 수지상세포의 활성화 여부를 판단하기 위해 CD1d 분자와 CD86 공동자극분자의 발현 변화를 조사하였다. 그림 5를 보면 MyD88에 의존적인 CpG는 아무 처리도 하지 않은 음성대조군과 마찬가지로 CD1d와 CD86의 발현 변화를 가져오지 못하는 반면 MyD88-비의존적인 Poly I:C의 경우 CD1d와 CD86 분자의 발현을 유도함을 알 수 있었다. F/T 백신을 처리한 MyD88<sup>-/-</sup> 수지상세포에서도 CpG와 동일하게 CD1d와 CD86 분자들을 증가시키지 못하는 것으로 미루어보아 B16 F/T 백신이 MyD88 경로를 통하여 수지상세포의 IL12 p40 발현을 유도함을 알 수 있었다.

## 고찰

본 연구에서 항암 백신의 하나인 F/T 백신의 면역활성 효과를 최근 개발된 사이토카인 IL12 p40 형광 리포터 생쥐에서 유래한 수지상세포를 이용하여 확

인하였다. 그리고 F/T 백신의 면역활성 효능이 단백질 부분에 주로 존재한다는 것을 밝혔다. 하지만 단백질 제거로 인해서 F/T 백신의 활성이 모두 사라지는 않은 점으로 미루어보아 단백질에만 면역활성 효과가 있는 않음을 알 수 있으며, 이는 단백질 외의 물질에도 면역활성 효과가 있다는 것을 시사한다. F/T 백신은 그 제조과정으로 볼 때 다량의 원형질막 지질 및 당지질 등이 포함되어 있을 것이고 이들은 DNase와 proteinase 처리에도 아무런 영향을 받지 않을 것으로 예상된다. 따라서 F/T 백신의 단백질 이외의 나머지 면역활성은 지질 성분에서 유래하였을 것으로 추정할 수 있는데, F/T 백신 처리가 수지상세포의 CD1d 발현을 증가시키는 사실이 이를 뒷받침해 주고 있다. CD1d는 MHC class I 유사 분자로 지질 및 당지질 분자와 결합하여 NKT 세포에 지질 항원을 제시하는 것으로 알려져 있다. 또한 F/T 백신에 RNA도 존재할 가능성이 있지만 이는 RNase inhibitor를 사용하지 않는 F/T 백신의 제조 과정 특성상 모두 분해되어 거의 없을 것으로 여겨진다. 그러나 그 가능성을 완전히 배제할 수는

없다.

그렇다면 F/T 백신에 포함되어 있는 단백질이 어떻게 수지상세포의 활성화를 유도하는지에 대한 의문이 생긴다. 왜냐하면 수지상세포를 활성화하는 외부(exogenous) 물질의 경우 박테리아의 편모 단백질인 flagellin을 제외하고는 대부분 비단백질이기 때문이다(van Duin 등 2006). 하지만 비록 내부(endogenous) 물질이면서 단백질이더라도 수지상세포를 활성화할 수 있는 한가지 가설이 최근 제시되었는데 바로 Hyppo 가설이다(Seong와 Matzinger 2004). 이 가설에 따르면 세포 내에 존재하는 여러 생체분자들은 대부분 분자 외부에는 친수성을 띠고, 분자 내부에는 소수성 부위(hydrophobic portion, Hyppo)를 지니고 있다. 외부환경의 변화로 세포 괴사가 일어나게 되면 생체분자들이 변형되거나 파손이 일어나게 되고 이런 과정에서 내부로 숨겨져 있던 Hyppo 부위가 외부로 노출되게 된다는 것이다. 이렇게 외부로 표출된 Hyppo는 수지상세포와 같은 항원제시세포의 Hyppo 수용체에 제시되게 되고 결과적으로 효과세포(특히 T 세포)의 활성을 가져올 수 있다는 설명이다. 즉, F/T 백신의 제조 과정인 해동과 냉동이 세포 내부의 단백질이 갖고 있는 Hyppo를 노출시킬 가능성이 충분히 있다. 그러므로, Hyppo가 노출된 단백질 분자 또는 지질 분자들이 F/T 백신에 다량 존재하게 되고 그 결과 수지상세포의 활성을 유도했다고 생각할 수 있다.

최근 암의 발생 원인과 기전이 속속들이 규명되고 있지만 실제 치료에 있어서는 아직 완치가 불가능하다. 이러한 현실 속에서 부작용이 적고 효율적인 항암치료를 위해 가장 각광을 받고 있는 항암면역 치료법의 실행을 위해 여러 물질들이 개발 중에 있다. 이들 물질은 앞서 이야기했던 항암면역에 필요한 효과세포들의 충분한 활성을 가져와야 되며 그 외의 부작용이 존재하지 않아야 한다. 이 연구에서는 항암 백신 후보 물질인 F/T 백신이 in vitro 상에서 수지상세포의 활성을 유도한다는 것을 증명하였다. 하지만 정확한 작용 물질과 작용 기전 그리고 in vivo 상에서의 효과 등 아직 밝혀야 할 문제들이 많이 존재하고 있다. 앞으로 F/T 백신의 효능을 규명하는 것뿐만 아니라 좀더 효과적이고 안정적인

물질로 발전시키기 위해서는 지속적인 연구가 요구된다.

## 참고 문헌

- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S : Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9: 143-150, 1998.
- Appleman LJ, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis VA : CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol* 164: 144-151, 2000.
- Appleman LJ, Boussiotis VA: T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 192: 161-180, 2003.
- Bendelac A, Savage PB, Teyton L: The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25: 297-336, 2007.
- Colombo MP, Trinchieri G: Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 155-168, 2002.
- Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M: Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278: 1623-1626, 1997.
- Fong L, Engleman EG: Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 18: 245-273, 2000.
- Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S : Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20: 621-667, 2002.
- Im W, Kim H, Yun D, Seo SY, Park SH, Locksley RM, Hong S : Cytokine reporter mouse system for screening novel IL12/23 p40-inducing compounds. *Mol Cells* 20: 288-296, 2005.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R : Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216, 2002.
- Reinhardt RL, Hong S, Kang SJ, Wang ZE, Locksley RM : Visualization of IL-12/23p40 in vivo reveals immunostimulatory dendritic cell migrants that promote Th1 differentiation. *J Immunol* 177: 1618-1627, 2006.
- Ruttinger D, Winter H, van den Engel NK, Hatz RA, Schlemmer M, Pohla H, Grutzner S, Schendel DJ, Fox BA, Jauch KW : Immunotherapy of lung cancer: an update. *Onkologie* 29: 33-38, 2006.

- Schuster M, Nechansky A, Kircheis R : Cancer immunotherapy. *Biotechnol J* 1: 138-147, 2006.
- Schwartz RH : T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21: 305-334, 2003.
- Seong SY, Matzinger P : Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4: 469-478, 2004.
- van Duin D, Medzhitov R, Shaw AC : Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends Immunol* 27: 49-55, 2006.
- Wang RF, Zeng G, Johnston SF, Voo K, Ying H : T cell-mediated immune responses in melanoma: implications for immunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 43: 1-11, 2002.
- Ward EM, Thun MJ, Hannan LM, Jemal A : Interpreting cancer trends. *Ann N Y Acad Sci* 1076: 29-53, 2006.

Abstract

## The Immunostimulatory Effect of B16 Freezing/thawing Anti-tumor Vaccine

Daesun Yun, Jeehee Youn<sup>1</sup>, Seokmann Hong

*Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University*

<sup>1</sup>*Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University*

---

Since cancer has become the second most common cause of death, next to heart disease and approximately 20% of human population dies from cancer, it is much desired to develop therapeutic anti-tumor vaccine with safety and efficacy. Here we investigated the immunostimulatory effects of B16 freezing/thawing (F/T) anti-tumor vaccine (hereafter F/T vaccine), one of whole cell anti-tumor vaccines.

To this end, we took advantage of the IL12 p40 reporter system which is designed for monitoring the induction of IL12 expression via the detection of co-expressed yellow fluorescent protein. First, we examined whether F/T vaccine can induce IL12 expression using bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) from IL12 p40 reporter mice. Second, we examined whether F/T vaccine can change the expression level of MHC molecules and co-stimulatory molecules during the activation of dendritic cells. Third, to dissect what component of F/T vaccines accounts for the immunostimulatory activities, we examined the effect of F/T vaccine on BMDC activation after treating it with DNase or proteinase. Lastly, we used MyD88 knockout mice to investigate whether F/T vaccine activates BMDCs in a TLR-dependent manner.

We found that treatment of BMDCs with F/T vaccine induced IL12 expression as well as the increase of MHC II expression and co-stimulatory molecules such as CD86. Interestingly, we also found that F/T vaccine increased CD1d expression on BMDCs, which may influence the activation of natural killer T cells known to be involved in anti-tumor immune responses. In addition, we found that treatment of F/T vaccine with proteinase but not DNase abolished its immunostimulatory effect, indicating that proteins in F/T vaccine mainly have its adjuvant activity. Furthermore, the activation of BMDCs with F/T vaccine was dependent on MyD88 adaptor molecule.

Taken together, our findings in this study demonstrated that the F/T vaccine might be one of the valuable reagents to provide a new insight for underlying mechanism of whole-cell anti-tumor vaccines and an important clue for the development of better therapeutic anti-cancer vaccines.

---

**Key words** : B16 F/T anti-tumor vaccine, Fluorescent reporter mouse system, Interleukin 12, Toll-like receptor