

면역 기능 연구

Studies on Immune Functions

Xenogeneic NK/LAK 세포를 이용한 면역암치료법 개발

Development of immunocancertherapy using
xenogeneic NK/LAK cells

연구기관
생명공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “면역기능연구에 관한 연구”과제의 (세부과제 “Xenogeneic NK/LAK 세포를 이용한 면역암치료법개발에 관한 연구”의 최종 보고서로 제출합니다.

1997 . 7 .

주관연구기관명 : 생명공학연구소
총괄연구책임자 : 최 인 표

연 구 원 : 조 대 호

“ : 윤 석 란

“ : 강 형 식

“ : 양 영

“ : 송 현 근

위탁연구기관명 : 시카고의대

위탁연구책임자 : 김 윤 범

여 백

요 약 문

I. 제 목

Xenogeneic NK/LAK 세포를 이용한 면역암치료법

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재의 암치료제개발은 주로 암세포증식에 관련하는 생리·생화학적 mechanics를 조절하는 것에 많은 연구가 진행되어 drug로 개발되어 기존의 방사선, surgery 등과 병행하여 몇몇 암치료에는 많은 효과를 보이고 있으나, 인체의 조절기능등에 대한 부작용이 많은 것으로 나타나고 있다. 한편 유전자를 이용한 치료법도 vector의 부작용, delivery등의 많은 제약을 보이고 있다. 이러한 기존의 방법등을 일시적인 암치료효과를 기대할 수 있지만 궁극적으로 tumor specific한 host immunity를 유도하여 암의 완치나 재발방지에는 많은 문제를 안고 있고 보다 새로운 면역치료법의 개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서는 기존의 autologous 및 allogenic NK나 NAK 치료법의 한계를 개선할 수 있고 새로운 개념의 xenogeneic immunotherapy를 이용한 면역치료법을 개발하여 피부암 그리고 나아가 간암 등 여러암의 치료용 vaccine으로 활용코자 한다.

최종목표

Porcine NK와 LAK을 이용한 새로운 항암치료법인 xenogeneic immunotherapy를 개발하고 이를 통해 암세포와 면역계의 상호관계를 밝혀내어 항암기작을 이해하고 항암치료제 개발을 하여 궁극적으로 피부암, 간암, 방광암등의 vaccine으로서의 가능성을 타진함을 목표로 하여 다음과 같은 4가지 specific aim을 갖는다.

(1) Porcine NK/LAK의 활성화 기작

- Cytokine, adhesion molecule, signaling molecule등을 통한 NK/LAK의 활성화 기작

(2) NK/LAK의 항암효과 증진

- Cytokine, NK activating monoclonal antibody, Fc receptor 등을 활용한 NK/LAK의 tumor 살상능 증진

(3) NK/LAK에 의한 host immunity 증진

- Delayed type hypersensitivity (DTH) tumor specific CTL 유도 등 host 면역 반응 증

가

(4) 항암치료제로서의 NK/LAK vaccine 개발

- Metastasis, 암재발 방지 및 항암제 vaccine으로 개발

III. 연구개발의 내용 및 범위

- (1) *In vitro* porcine NK/LAK cell이 죽일 수 있는 암 선정
- (2) murine system에 tumor 유발
- (3) porcine NK/LAK cell을 murine tumor에 injection하여 효과 측정
- (4) 항체, cytokine, signaling molecule등을 같이 사용하여 항암효과를 극대화시킬 수 있는 치료법 개발

IV. 연구개발결과

- (1) Porcine NK/LAK cell을 CD16을 이용하여 positive selection으로 분리:
Porcine NK/LAK cell을 95% 이상 순수 분리 성공
- (2) 간암 및 피부암에 Cr-release assay 를 통해 살상능 측정 성공
- (3) IL-12가 NK/LAK activity를 증가 시키고, 또한 PNK-E/G7 mAb가 NK/LAK을 활성화 시키는 것을 관찰하였고, 이두물질이 TNF생산을 유도하는 것으로 보아 TNF생산 증가를 통해 NK/LAK 활성화를 유도하는 것으로 추측된다
- (4) IL-12가 ICAM-1의 발현을 증가시키고, 살상능을 증가 시키며, ICAM-1 항체가 NK/LAK의 살상능을 감소시키는 것으로보아 ICAM-1 발현과 살상능이 밀접한 관계가 있음을 알수 있었다.
- (5) NK cell이 target cell을 인식하고 활성화시키는 molecule을 탐색하기위해 CAM에대한 mAb를 검색한 결과 4A10-60 mAb가 NK activity를 조절함을 알 수있었다.
- (6) Mice에 간암, B lymphoma, melanoma를 일으킨후 porcine NK를 투여한 결과 rejection이 일어나지 않고 tumor를 regression시키는 것으로 보아 항암효과가 있음을 알수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- (1) Purity NK cell를 통한 면역계의 이해증가 와 immunotherapy로서 활용
- (2) Cytokine의 영향을 분석하여 immunotherapy의 기반구축
- (3) Antibody 개발을 통해 산업화 촉구
- (4) 작용 조절 물질 탐색 및 cell line의 연구를 통해 항암효과의 vaccine 개발

S U M M A R Y

Now there are many approaches on the prevention and treatment of cancers, but several side effects still remain to be resolved. To overcome the limitation of present tumorthrapy, the development of new immunocancertherapy is needed to evoke the tumor-specific host immunity to cure the tumors completely and prevent recurrence of cancers. In this project we have tried to develop the xenogeneic immunocancertherapy using porcine NK/LAK cells to overcome the limitation of autologous and allogenic tumorthrapy. Furthermore we expect the this novel therapy can be applied to therapeutic vaccine for skin cancer and liver cancer.

In this regard, we have mainly focused four topics such as purification and measurement of cytolytic activity of porcine NK/LAK cells, activation of NK/LAK cells by cytokines and antibodies, investigation of NK/LAK activation modulators, and *in vivo* antitumor effects of porcine NK/LAK cells.

Porcine NK/LAK cells were isolated using positive selection by porcine CD16 monoclonal antibody. Purified porcine NK/LAK cells have the cytolytic activity on skin tumor cells and liver tumor cells. NK cells are activated by several cytokines and antibodies. ICAM-1 has five different domains. Anti-ICAM-1 antibody specific to second domain can inhibited IL-12-activated NK cells. This ntibody suppressed the Ca^{2+} uptake by NK cells. NK cells recognized target cells via different surface molecules such as NKR-P1, NK-TR, p58, and class I molecules. To identify the novel molecules recognized by NK cells, we generated monoclonal antibodies which recognized NK target cells. Among them, 4A60 antibody can inhibit cytolytic activity of NK cells by blocking NK and target cell interaction. *In vivo* antitumor effects of porcine NK/LAK cells were measured using liver tumor, melanomas, and lymphomas. Porcine NK/LAK cells regressed these tumors *in vivo*, suggesting they can be used as antitumorthrapy for several cancers.

여 백

C O N T E N T S

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. Introduction | 11 |
| 2. Present status of research | 13 |
| 3. Research contents and results | 15 |
| (1) research contents | 15 |
| (2) results | 19 |
| 4. Achievement | 27 |
| 5. Application | 29 |
| 6. References | 31 |

여 백

목 차

| | |
|-------------------------|----|
| 제 1 장 서론 | 11 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | 13 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 | 15 |
| 제1절 연구방법 | 15 |
| 제2절 연구결과 | 19 |
| 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 | 27 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 29 |
| 제 6 장 참고문헌 | 31 |

여 백

제 1 장 서 론

현재의 암치료제개발은 주로 암세포증식에 관련하는 생리·생화학적 *mechanics*를 조절하는 것에 많은 연구가 진행되어 drug로 개발되어 기존의 방사선, surgery 등과 병행하여 몇몇 암치료에는 많은 효과를 보이고 있으나, 인체의 조혈기능등에 대한 부작용이 많은 것으로 나타나고 있다. 한편 유전자를 이용한 치료법도 vector의 부작용, delivery등의 많은 제약을 보이고 있다. 이러한 기존의 방법등을 일시적인 암치료효과를 기대할 수 있지만 궁극적으로 tumor specific한 host immunity를 유도하여 암의 완치나 재발방지에는 많은 문제를 안고 있고 보다 새로운 면역치료법의 개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서는 기존의 autologous 및 allogenic NK나 NAK 치료법의 한계를 개선할 수 있고 새로운 개념의 xenogeneic immunotherapy를 이용한 면역치료법을 개발하여 피부암 그리고 나아가 간암 등 여러암의 치료용 vaccine으로 활용코자 한다.

가. 연구개발의 경제·사회·기술적 중요성

(1) 기술적 중요성

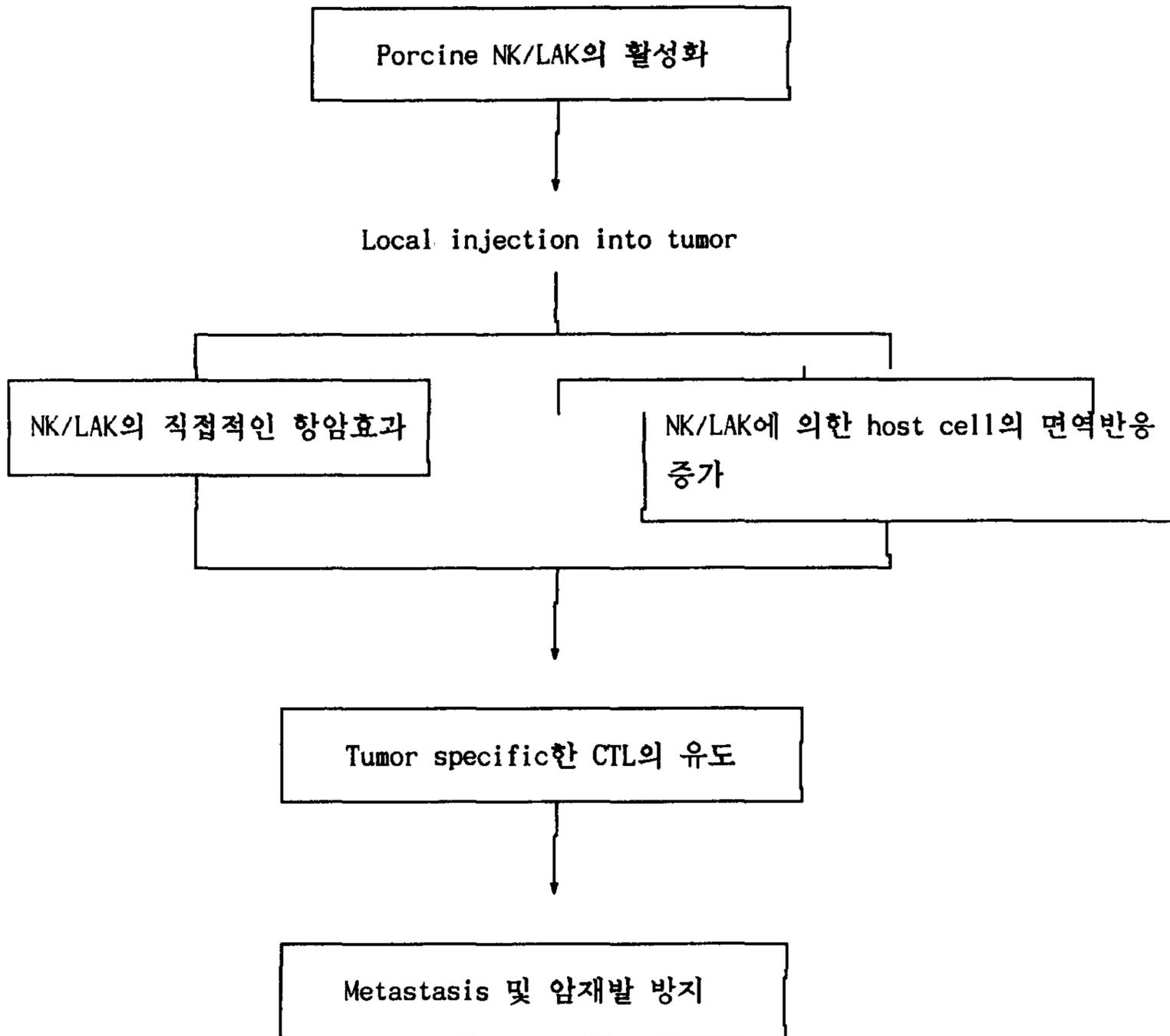
생명공학의 진보적인 발전속에서도 가장 큰 난제중의 하나로 남아있는 암에 관한 연구는 근래에 암 유전자와 종양억제 유전자의 발견에 따라 발암기전에 관한 분자수준에서의 연구, 새로운 치료제의 개발등 각분야에 걸쳐 심도있는 연구가 이루어져 왔으나 아직도 국내의 사망원인중 암으로 인한것이 1위를 차지하고 있으며 고령화 사회로 인하여 암환자의 수는 계속해서 증가추세에 있다⁽¹⁻⁵⁾. 뿐만 아니라 점차로 서양화로 바뀌고 있는 생활방식은 지금까지 미국, 유럽등에서만 크게 발생되던 암인 피부암의 발생을 빠른속도로 증가시키고 있어 이에대한 경각심을 불러일으키고 있다. 피부암의 발생요인으로 sunburn, UV light, age등 여러가지 factor들이 밝혀지고 있는데 근래에는 drug or disease immunosuppression에 의해 피부암이 발생된다고 보고되고 있어 주의를 요하고 있다. 그예로 immunosuppressed renal transplant 환자들이나 immunosuppression을 유발시키는 광화학요법으로 건선치료를 받는 환자들은 약 13배 정도로 피부암 발생율이 control환자보다 높다고 보고되고 있다⁽⁶⁻⁸⁾. 또한 피부암이 형성되었을 경우 암세포에 의해 host immunosuppression이 일어나 이로 인하여 metastasis가 발생한다고 알려지고 있다. Adoptive immunotherapy는 면역치료법의 한 방법으로서 active immunologic cell를 host에 transfer함으로써 항암효과를 발휘하게 되는데 이 치료법의 큰 장점은 immunosuppression associated with tumors 가 제한요인이 되지 않는다는 점이다.

Adoptive immunotherapy 의 한예로 *in vitro*에서 cytokine 을 이용해 NK cell를 LAK cell로 만들었을때 광범위한 항암효과를 autologous or allogenic tumors 에 대해 보인점에 기초하여 근래에는 *in vivo*와 clinical trial에 autologous or allogenic LAK cell를 만들어 연구하고 있는 중이다. 그러나 이러한 autologous or allogenic LAK cell를 이용한 adoptive immunotherapy도 문제들이 부각되고 있는데 autologous LAK cell를 이용할 경우

필요한 만큼의 LAK cell를 얻기위해 긴 시간의 culture를 필요로 하고 이기간동안 발생하는 contamination은 항상 문제로 대두되고 *in vivo*에서의 autologous LAK cell은 어느정도 항암효과는 보여주었지만 암세포에 의해 immunosuppressive한 host immune system을 activation시키지 못 하였다. Allogenic LAK cell인 경우에는 MHC구조가 비슷함으로써 GVH disease를 유발시킴으로써 autologous 와 allogenic LAK cell를 이용한 adoptive immunotherapy의 한계를 보여주었다⁽⁹⁻¹²⁾. 본 연구팀은 이러한 문제점을 보완하고 한층 더 진일보한 adoptive immunotherapy를 개발하기위해 시카고 의과대학팀과 공동연구하여 새로운 immunotherapy의 가능성을 제시하여 주고 있는데 이 방법은 xenogeneic immunotherapy다.

Xenotransplantation에서 가장 문제가 되는 것이 rejection문제인데 주로 IgM isotype의 natural antibody가 graft의 endothelial 세포에 결합하고 연쇄적인 complement 작용등에 의해 일어나는 hyperacute rejection이나 CD4⁺ cell 등에 의한 cell mediated xenoreactivity로 인한 rejection이 일어나므로 면역학적, 발생학적으로 가장 적합한 donor를 선택하는데 초점을 맞추고 있다. Pig는 이러한 면에서 많은 장점을 지니고 있는데 특히 풍부한 source와 사람과 해부학적, 생리학적으로 많은 공통점을 지니고 있다. 최근 간 기능이 마비된 환자에 porcine 간세포를 perfusion으로 이식한 경우 porcine 간세포가 정상적으로 해독과 합성작용을 하는것이 보고되는 등 많은 관심이 집중되어 지고 있다. 이러한 면에서 porcine NK/LAK 세포를 이용한 xenogeneic immunotherapy는 solid tumor 치료에 많은 장점을 제공할 수 있다 이 면역치료법의 개념은 porcine NK/LAK cell를 human의 tumor site에 local injection함으로써 첫째는 porcine NK/LAK cell의 anti-tumor activity로 암세포를 죽임으로써 항암효과를 볼 수 있고, 둘째는 porcine NK/LAK cell이 항원으로 작용하여 tumor site에서 immunosuppressive된 host immune cell를 activation함으로써 항암효과를 극대화할 수 있고, 셋째로는 tumor site에서 host immune cell의 한종류인 tumor-specific CTL를 유도함으로써 다른부위에 metastasis된 암세포를 죽일수있고 또한 tumor specific 면역세포의 활성화로 인해 암의 재발생을 막을수있다는 점이다.

일차적으로 본 연구팀은 피부암의 치료법으로서 xenogeneic immunotherapy를 시도할 계획인데 그 이유는 porcine NK/LAK cell를 tumor site에 local injection하기가 쉽고 피부암 세포를 NK/LAK cell이 쉽게 죽인다는점과 animal model를 위해 피부암을 쉽게 murine system에 만들수 있다는 점이다. 한편 이와 병행하여 NK/LAK 활성화 및 살상능 효율증대를 위해 IL-2, IL-12등의 cytokine과 더불어 항체, Fc receptor, 신호전달물질등을 이용한 활성화 유도등의 기초연구도 수행하고자 한다. 본 연구팀은 피부암의 치료에 의해 얻어지는 기술 정보를 통해 점차적으로 간암 방광암등의 다양한 암에 항암 치료법으로 발전시켜 나갈 계획이며 또한 tumor specific 면역세포를 이용하여 tumor specific Ag를 규명하여 궁극적으로 암의 vaccine개발의 가능성과 산업화를 추진할 예정이다.



(2) 경제·사회적 중요성

기존의 항암치료법(예: 방사선치료, 화학요법, 수술)으로서는 지금현재 20%정도의 치료율을 세계적으로 나타내고 있다고 보고되고 있고 가장큰 문제중의 하나인 암의 재발생과 metastasis는 면역계의 기능감소가 주원인 이라고 알려지고 있다. 이러한 문제점을 xenogeneic immunotherapy로 해결할수 있다는 점은 항암효과로 인한 사회적 파급효과 뿐만 아니라 이 치료법을 통해 밝혀질 면역계의 활성화과정과 조절물질을 통해 면역학의 발달과 암의 진단시약, 치료약, vaccine등의 개발에 중요한 자료를 제공함으로써 지금현재 선진국의 70% 수준정도에 해당하는 생명공학의 기술발달에 일조를 할것이며 2천년에 1백20억달러에 이르게 될 세계 항암제 시장에 중추적 역할을 함으로써 국가 경제력 향상에 도움을 줄것이라고 기대된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

Xenogeneic immunotherapy에서의 가장 큰 문제점으로 생각될것은 hyperacute rejection(HAR)으로서 이것은 porcine의 organ을 사람에 transplantation할때 일어나는 것으로 알려지고 있다. Hyperacute rejection이 일어나는 mechanism은 사람의 serum에 이미 존재하고 있는 natural antibody가 porcine organ의 endothelial cell에 결합하여 사람의 complement system과 immune system을 activation 시켜 rejection을 유발한다고 알려졌고 이 rejection은 수분내 혹은 수시간안의 빠른 시간내에 일어나고 있다. 그러나 사람의 serum에 있는 natural antibody는 porcine의 lymphocytes 또는 erythrocyte에 결합하지 않는다고 연구결과가 발표되었다. 본 연구팀은 이점에 착안하여 항암효과와 Ag으로써 host의 면역계를 활성화하여⁽¹³⁻²⁰⁾항암효과를 극대화 시킬수 있는 새로운 치료법으로 xenogeneic immunotherapy를 개발하고 있다. 일차적으로 *in vitro*에서 porcine NK/LAK cell이 죽일수 있는 암을 screen하였고 그 다음으로 porcine NK/LAK cell의 cytolytic activity를 극대화 하기위해 cytokine(예: IL-2, IL-12)⁽²¹⁻²⁵⁾과 mAb의 효과를 실험하였다. 실험결과 porcine NK/LAK cell은 피부암, 간암등을 비롯한 다양한 종류의 human tumor와 murine tumor에 대한 항암효과를 보였고 cytokine과 mAbs에 의해 항암효과를 한층더 증대 시킬수 있었다. 이러한 결과에 기초하여 일차적으로 lymphoma의 일종인 B9 tumor를 BALB/C mice의 subcutaneous에 injection하여 tumor를 유발시킨후 porcine PBL를 이용하여 *in vivo*실험을 통해 hyperacute rejection이 발생하는지에 대한 연구를 하였다. *In vivo*실험에서 본연구팀은 porcine PBL를 murine의 tumor site에 local injection시킬경우 hyperacute rejection이 발생하지 않는다는 점을 발견하였고 또한 암의 성장이 control에 비해 억제되었다는 점을 밝혔다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구 방법

(1) NK/LAK 세포의 분리

Porcine NK/LAK의 분리는, 무균 돼지로부터 blood를 얻고 Ficoll-Hypaque density centrifugation을 이용하여 PBMC를 얻는다. HBSS로 세 번 세척한 후 5×10^6 cells/ml로 complete media에서 1시간 배양한 후 nonadherent PBL를 얻는다. Porcine NK 세포는 porcine NK세포의 특이한 G-7 mAb를 biotinylation하고 세포와 20분간 ice에서 배양한 후 세포를 다시 세척하고 $1-2 \times 10^8$ cells/ml로 avidin coat된 CEPRATE LC cloumn을 이용해 세포를 분리하거나 G7 mAb가 coating된 AIS flask (CAIS, Inc.)를 이용한 panning으로 NK세포를 분리하여 95% 이상(Giemsa staining or FACS analysis)의 순수한 NK 세포를 얻는다⁽²⁶⁻²⁸⁾. LAK 세포는 정제한 NK 세포를 1×10^6 cells/ml로 24시간 10U/ml IL-12와 같이 배양하여 얻는다.

Human NK 세포의 분리는, 정상인의 말초혈액으로부터 Ficoll-Hypaque (Sigma, d=1.077) centrifugation에 의해 림프구를 얻고 37°C 에서 1시간 배양하여 부착세포를 제거하였다. 부착세포를 제거한 림프구를 NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech)로 처리하고, Super MACS (Miltenyi Biotech)를 이용하여 negative selection 에 의해 NK cell을 분리 하였다. 이렇게 얻은 NK cell은 CD3⁻ 이고 CD56⁺인 cell이 80-90%로 분석되었다⁽²⁹⁻³⁰⁾.

(2) Standard NK 살상능 assay

Target 세포를 100 μ Ci Na⁵¹Cr (5mci/ml, NEN, Boston, MA)로 37°C에서 1시간 배양하고 HBSS로 세 번 세척한다. 1×10^4 ⁵¹Cr-labeled된 target 세포를 여러 비율의 effector 세포와 섞은 후 96 well plate에서 4시간 배양한 후 100 μ l의 배양액을 얻어 release된 ⁵¹Cr를 gamma counter에서 측정한다. Spontaneous release를 배양액만 있는 조건에서 maximal release는 1% triton X-100로 배양한 후 release된 cpm으로 결정한다⁽³¹⁻³⁴⁾.

$$\% \text{specific release} = \frac{\text{Experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{Maximal release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

(3) 이종 면역조직 화학염색

Adhesion molecule (예: ICAM-1 혹은 CD18)과 면역세포들과의 상관관계를 알기 위해 이들간의 이중염색을 시행한다. Cytokine 혹은 항체들로 활성화시킨 면역세포를 cytopsin하여 slide를 만들고 여기에 adhesion molecule에 specific한 항체를 binding시킨 후 염색을 시행하여 결과를 분석한다. 사용되는 모든 항체들이 mAb들이기 때문에 이중 염색시에 첫 번째 염색은 biotinylated 1° mAb를 사용한다. Biotinylated Ab로 먼저 염색한 후 제 2° mAb를 이용하여 2차 염색을 시행한다⁽³⁵⁻³⁹⁾.

(4) FACS analysis

면역세포의 분리후 cell adhesion molecule의 expression 분포를 조사하기 위해 anti-ICAM-1를 ice속에서 30분간 반응시키고 세포를 다시 세척하고 FITC-goat anti-mouse IgG로 30분간 다시 배양한다. 그 후 세척과정을 거쳐서 flowcytometer를 이용하여 cell adhesion molecule의 분포를 조사한다⁽⁴⁰⁾.

(5) Conjugate formation assays

면역세포를 항체와 더불어 여러비율로 target cell과 5ml plastic tube에서 섞는다. 800rpm으로 5분동안 centrifuge하고 0.2ml complete media에서 30분간 37°C, 5% CO₂ incubator안에 배양한다. Incubation 후에 gently cell mixture를 pipett를 이용하여 hemocytometer에 가한다. Effector와 target세포간의 conjugate formation 정도를 hemocytometer를 이용하여 계산한다⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾.

(6) 각종 cytokine에 대한 ELISA assay

각각의 배양세포들로부터 배양액을 얻어내 이들에 대해서 각종 cytokine (TNF α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12)에 대한 항체가 도포되어 있는 96 well plate ELISA kit (R&D systems)를 이용하여 이미 채취된 혈청에 대해 ELISA를 실시한다.

먼저 각종 cytokine에 대한 ELISA에서 standard curve를 얻기 위해 농도가 알려진 standard solution으로 serial dilution을 만들어 biotinylated된 1° 항체를 30분간 반응시키고 다음에는 strept Avidin-HLP solution을 반응시킨다.

마지막으로 TMB substrate solution으로 발색 반응시키고 450nm에서 ELISA reader로 판

독한다. 여기에서 얻어진 결과를 가지고 standard curve를 만든다. Standard curve를 토대로 하여 sample 혈청 혹은 배양액 등에 있는 cytokine을 판독한다.

(7) In vivo에서 NK/LAK cell의 항암효과

In vitro에서 porcine NK/LAK의 cytokine assay를 통해 검정된 B lymphoma (B9), 간암 (75-TIB) 등의 세포주를 각기 syngeneic한 mouse에 1×10^6 cell를 피하에 주사한다. 7 - 10 일 후에 tumor가 형성이 되면 1×10^5 의 NK나 LAK 세포를 3일 간격으로 tumor site에 local injection한 후 tumor 크기를 측정한다. Host 면역 system의 효과를 보기 위해 500 rad로 γ -irradiation된 mouse나 SCID mouse를 사용하여 항암효과를 비교한다.

(8) 세포증식 assay

NK 세포를 96well plate (Corning, NY)에 1×10^4 cells/well로 넣은 후 여러가지 cytokine 혹은 antibody로 자극한 후 37°C에서 3일간 배양했다. 세포를 1 μ Ci [3 H] thymidine (NEN)으로 16시간 pulse한 후 [3 H] thymidine incorporation 양을 beta counter로 측정했다⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾.

(9) CTL의 유도 및 host 면역체계의 분석

처리된 tumor로부터 CTL의 유도를 측정하기 위해 tumor 조직으로부터 CTL을 분리하여 다시 in vitro에서 target 세포에 대한 cytolytic activity를 측정했다. Metastasis와 tumor specific CTL의 기능을 in vivo에 검정하기 위해 fresh한 tumor를 다시 mouse에 challenge하여 control과 비교하여 항암효과를 측정했다.

(10) NK/LAK 활성화 기작

NK 세포의 활성화기작을 연구하기 위해 IL-2, IL-12, mAb등의 효과를 측정하고 또한 Fc γ IIIA와 결합되어 있는 γ , ζ chain의 hybrid molecule (ex, CD4/ ζ hybrid) 혹은 ITAM (immunoglobulin gene tyrosine activation motif)을 multiple copy로 증폭시킨 후 NK cell 활성화 (tyrosine phosphorylation, cytokine production, 세포증식 등)의 효과와 살상능 증강 효과를 탐색했다.

(11) 쥐의 면역화

Hybridoma의 생산을 위해 NK sensitive tumor cell line인 human erythroleukemic cell line(K562) 또는 NK resistant cell line(Daudi)을 Balb/c mouse에 복강내 주사하였다. 2주간격으로 동일한 양의 cell을 boost하고 눈에서 소량의 혈액을 채혈하여 항체생성여부를 FACScan으로 측정하고 항체의 역가가 높을때까지 반복하였다. 마지막 주사는 직전의 boost로부터 1주일후에 동일양의 cell을 정맥주사하였다.

(12) 세포융합

K562로 면역된 생쥐의 spleen으로부터 세포를 적출하여 SP₂O 세포와 10:1의 비율로 섞은 다음 원심분리하였다. 원심분리된 pellet을 가볍게 두드려서 분산시키고 37°C에서 1분간 방치한 뒤 37°C에서 미리 데워진 50% polyethylene glycol(PEG 1,500) 1ml를 30초동안에 걸쳐 천천히 넣어 주었다. 이것을 1,200rpm에서 5분동안 원심분리한 후 cell pellet을 10% FBS가 포함된 HAT 배지에서 1-2X10⁶ cell/ml 정도로 희석하여 96 well flat bottomed plate에 100 μ l/well씩 분획하여 배양하면서 점종세포를 선별하였다.

(13) Hybridoma의 선별

Hybridoma clone에서 K562나 Daudi에 대한 항체의 생성유무는 세포융합후 약 1-2주 경과 시 hybridoma clone이 형성된 well의 배양상청액을 취하여 100 μ l씩 가하고 4°C에서 30분 반응시키고 세포를 PBS로 세척한 다음 Goat anti mouse Ig-FITC (Becton Dickinson)를 각각 4 μ l씩 가하여 4°C에서 다시 30분간 반응시켰다. 다시 세포를 PBS로 세척하여 형광도를 FACScan (Beckton Dickinson)으로 분석하였다.

(14) 단일클론항체의 생산

K562나 Daudi에 특이적인 항체를 생산하는 hybridoma를 선별하여 단일클론을 얻기위해 limiting dilution에 의해 single cloning을 행하였다. 다시 FACScan으로 K562 특이적인 single clone들을 선별하고 이들 비특이적인 여러세포에 대해서도 행하였다.

(15) Membrane fraction의 제조

1X10⁸세포를 회수하여 PBS로 2회 세척하고 그 pellet을 membrane lysis buffer(7.5mM sodium phosphate pH 7.5 1mM EDTA, 1mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin)을 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 lysis시키고 500rpm에서 5분간 원심분리하여 상청액만을 취하고 이를 다시 15,000rpm에서 30분 원심분리하여 pellet을 얻고 lysis buffer로 15,000rpm에서 20분간 세척하고 얻은 pellet에 1% NP40를 함유하는 lysis buffer를 가하여 solubilize시켜 사용하였다.

(16) Western blotting

Cell line각각의 membrane fraction을 Bradford assay에 의해 protein양을 정량하여 동량의 protein (40 μ g/lane)을 SDS sample buffer를 가하여 끓인다음 10% SDS PAGE를 실행하였다. gel을 PVDF membrane(Millipore)에 transfer시키고 2% BSA in PBS에서 blocking시킨다음, monoclonal 항체들로부터 얻은 상등액과 상온에서 1시간 반응시키고 PBST로 3번 세척하였다. 다시 anti-mouse IgG-HRP(Sigma)로 1시간 반응시킨 다음 PBST로 세척하고, ECL(Amersham)을 행하였다⁽⁵⁰⁾.

(17) F(ab)₂ fragment의 제조

정제된 단일 클론 항체를 acetate buffer (PH 4.0-4.5)로 투석한 다음 pepsin을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 반응한 후 2M Tris로 반응을 정지시켰다. 이를 PBS로 투석하고 protein A column을 통과시켜 pass through는 F(ab)₂로, elution액은 Fc로 사용하였다.

제2절 연구 내용 및 결과

가. 연구내용

세포면역학에서의 면역세포의 purity와 yield의 중요성에도 불구하고 기존의 방법들인 percoll gradients, cell panning, flow cytometry를 이용한 porcine NK cell의 분리는 purity나 yield 등에 문제점을 안고 있다. 본 연구팀은 이러한 문제점을 해결하기 위해 AIS MicroCELLector flask에 G7 mAb (porcine anti-CD16 mAb)를 binding시킨 후 PBL로부터 positive selection하여 순수한 purity와 충분한 yield의 porcine NK cell의 정제에 성공함으로써 xenogenic immunotherapy와 NK cell의 function과 molecular study를 위한 토대를 이루었

다.

NK cell의 살상능력을 극대화 시키기 위해 항체 (PNK-E/G7 mAb)와 cytokine (IL-12)을 사용하여 NK cell의 살상능력을 증가 시켰고 이러한 활성화된 NK cell은 앞으로 주요과제인 in vivo에서의 xenogenic immunotherapy의 효율성과 성공확률을 높일것으로 기대된다(Figure 1-4, Table 1).

NK/LAK cell의 활성화에 따른 살상능력의 증가에 관여하는 유도물질과 surface molecule의 연구를 통해 본 연구팀은 항체나 cytokine에 의해 활성화된 NK/LAK cell로부터 TNF- α production이 증가되고 있다는 사실과 ICAM-1 molecule expression의 중요성을 제시하였다 (Table 2, Figure 5-10).

ICAM-1은 immunoglobulin superfamily의 한종류로서 activated된 T cell에 express될 뿐만 아니라 T cell migration의 유발에도 관여하고 또한 또 다른 cell membrane protein receptor인 LFA-1(CD11a/CD18)과 결합하여 cell adhesion을 촉진시킴으로써 면역활성에 깊이 관여하고 있다고 밝혀지고 있지만 아직 NK cell에서의 역할은 미미하게 알려져 보다 심층적인 연구는 면역계의 중요한 요소로 대두되고 있는 NK cell의 이해와 이들 세포를 이용한 면역치료법 개발에 일조할 것으로 기대된다.

IL-12에 의해 활성화된 porcine NK cell을 이용한 xenogenic immunotherapy의 murine system에서의 시도와 그결과는 (Figure 11, Figure 12) 새로운 면역치료법의 개발가능성을 한층 더 진일보 시켜주었다.

Natural killer cell이 target cell을 lysis 시키는 기작은 우선 MHC-unrestrict하게 target cell을 인식하고 이에따라 natural killer cell이 활성화되어 cytolytic activity를 보여준다.

그러나 아직까지 NK-target interaction에 관한 정확한 기전이 밝혀지지 않고 있어, NK cell의 target molecule을 밝히기 위하여 NK susceptible한 target인 K562를 mouse에 immunize하여 항체를 생성시켰다. FACScan 분석과 western blotting으로 specific한 단일클론 항체를 선택하고(4A10-60), 이를 쥐에 복강내 주사하여 얻은 복수를 protein G column을 통하여 항체를 정제하였다. 항체의 Fc부분에 의한 작용을 배제하기 위해, pepsin digestion으로 F(ab)₂를 제조하였다. 이 항체가 NK의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 NK proliferation과 NK cytolytic activity를 각각 thymidine uptake와 ⁵¹Cr release 로서 측정

하였다.

한편, K562 세포에서 이항체와 반응하는 surface molecule을 동정하기 위해 K562 cDNA screening과 immunoaffinity purification도 수행하고 있다.

Fc γ R11IA를 통한 NK cell activation은 Fc γ R11IA의 intracellular signaling에 관여하는 γ 혹은 ζ subunit을 필요로 한다. 이들 subunit chains의 signal transduction capacity 조사는 관찰이 용이한 red blood cell의 phagocytosis를 이용 수행했다. 본 연구팀에 의한 과거의 연구 결과에 따르면 Fc γ R11IA- γ chain이 - ζ chain보다 phagocytic signaling이 6배 이상 효율적이었다. 따라서, 실험수행시 결과의 관찰이 용이한 이유로 Fc γ R11IA- γ chain이 주로 intracellular signaling potential 연구를 위해 이용이 되었다. Signaling capacity의 증가를 위한 노력으로는 Fc γ R11IA- γ chain의 cytoplasmic domain을 중복시키거나 특정 아미노산을 치환했다. In vitro에서 Fc γ R11IA의 signaling capacity 조사는 Fc receptor의 endogenous 표현이 결여된 COS-1 cells에 transient transfection을 통해 이루어졌다.

확보된 NK cell line의 효율적 배양은 용이하지만은 않다. 따라서 본 연구팀은 IL-2 보강이된 특수 첨가제를 확보 NK cell line의 배양을 수행중에 있다.

Optimal composition of NK cell culture medium

15% FBS (GIBCO or Hyclone)

15% lymphocult (IL-2 보강이된 첨가제)

Pen/Strep

L-glutamine

배양된 NK cells에 대한 activation cytokines의 첨가와 이에 따른 Fc γ R11IA receptor subunits (γ chain과 ζ chain) 표현에 대한 연구는 착수 단계에 있다. 현재로는 Fc γ R11IA subunits의 표현 정도를 조사하기 위한 PCR primers의 제작과 이를 이용한 quantitative RT-PCR 조건의 최적화가 이루어진 상태에 있다. 이러한 연구는 2-D western-immunoblot을 사용한 Fc γ R11IA subunit proteins의 표현과 인산화 (phosphorylation) 조사로 확장이 될 것이다.

나. 연구결과

1. 항체와 cytokine에 의한 NK/LAK cell의 활성화 기작

Porcine NK cell의 살상능력을 극대화시키기 위해 porcine NK cell에 specific한 PNK-E/G7 mAb와 IL-12 cytokine을 사용한 결과 이들 세포들의 살상능력을 증가시킴을 알수 있었다(Figure 3, Table 1 and Figure 4). 또한 항체나 cytokine에 의해 증가된 porcine NK cell의 살상능력은 Ca^{2+} channel blocker인 nifedipine에 의해 dose-dependent한 형태로 감소할수 있다는 것을 보여줌으로써 Ca^{2+} influx의 중요성을 제시하여 주었다(Figure 3 and Figure 4).

항체(PNK-E/G7 mAbs)와 cytokine(IL-12)에 의해 활성화된 NK/LAK cell에 의해 분비되는 유도물질탐색으로서 TNF- α production을 조사하였다. 순수한 NK cell를 항체(4 hr incubation)나 cytokine(18 hr incubation)에 의해 activation시킨후 50ul의 배양액을 얻어 ELISA kit를 이용하여 TNF- α production을 측정하였고(Table 2) TNF- α sensitive target cell인 WEHI-164를 이용한 ^{51}Cr release assay를 통해 (Figure 5) TNF- α 에 의한 항암효과를 측정하였다. 이 결과 PNK-E/G7 mAb와 IL-12 cytokine은 TNF- α production을 증가시켰고 이들 물질을 동시에 사용할 경우 synergitic하게 TNF- α 가 생산 되고 있다는 것을 알수 있었다(Table 2). Figure 5에서 볼수 있듯이 TNF- α production의 증가는 항암효과를 증가시킬수 있다는 것을 보여주었다.

2. NK/LAK cell의 활성화 유도물질 탐색

(가) ICAM-1에 의한 NK/LAK cell의 활성화:

TNF- α production을 비롯한 활성화 유도물질에 의해 NK/LAK cell의 surface molecule에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포간의 interaction에 중요한 역할을 하는 ICAM-1 molecule과 증가된 NK/LAK cell의 살상능력과의 관계를 분석하였다. Immunohistochemical assay (Figure 6)와 FACscan analysis(Figure 7)는 IL-12에 의해 ICAM-1 molecule의 expression이 증가되고 있다는 것을 보여주었고 kinetic (Figure 8)과 titration assay (Figure 9)는 3 day incubation이 optimal하다는 사실과 dose- dependent하게 ICAM-1 expression이 증가 된다는 것을 나타내주었다.

증가된 ICAM-1 molecule의 expression이 NK세포의 살상능력에 미치는 영향을 탐색하기 위해 ICAM-1 molecule의 mAb인 R6.5 mAb를 이용하여 blocking실험을 실시하였다. Figure.10에서 볼수 있듯이 IL-12에 의해 증가된 NK cell의 살상능력은 R6.5 mAb에 의해 억제될 수 있다는 것을 제시함으로써 ICAM-1 molecule의 expression과 NK cell의 살상능력과는 비례관계가 있다는 것을 알수 있었다.

(나) Fc γ RIIIA에 의한 NK/LAK cell의 활성화:

Fc γ RIIIA- γ or - ζ chain과 - α chain과의 co-transfection을 통한 intra-cellular signaling capacity 조사: COS-1 cells에 transient transfection을 통해 Fc γ RIIIA를 성공적으로 표현한 후 Fc γ RIIIA- γ or - ζ chain subunit에 의한 phagocytic signaling을 조사했다. Phagocytic signaling은 PI (phagocytic index, 100개의 transfection positive cells에 의해 phagocytose된 red blood cells의 숫자)로 나타내었다. α + γ co-transfection 은 PI=270 \pm 79를 α + ζ 는 PI=46 \pm 7을 나타내었다. ζ chain의 truncation mutant인 ζ 1은 PI=28 \pm 9를 보여주었다. 이러한 실험 결과로부터 Fc γ RIIIA- γ chain이 phagocytic signaling을 조사하는데 효율적인 system임을 알 수 있다. ζ chain에 있어서는 cytoplasmic signaling sequence의 중복이 signaling potential을 위해서 중요함을 나타낸다.

Cytoplasmic sequence의 중복을 통한 intracellular signaling 증폭: Fc γ RIIIA- γ 의 cytoplasmic domain을 2번 혹은 3번 중복을 시킨 후 이들의 signaling potential을 조사한 결과 phagocytic signal은 증가하지 않았다.

특정 cytoplasmic 아미노산의 치환: Fc γ RIIIA- γ 의 cytoplasmic sequence에는 signal transduction에 관련된 잘 보존된 아미노산 motif이 있다. 이러한 motif이 ITAM (Immunoglobulin receptor Tyrosine Activation Motif)으로 근래에 명칭이 되었다. ITAM은 YxxL-x7-YxxL로 되어 있는데 이들 sequence중 YxxL의 internal xx아미노산을 변경시켰다. N terminal YxxL의 xx sequence를 TG에서 GT, ET, 혹은 MT로 치환시켜 본 결과 GT는 차이를 보이지 않았으나 ET와 MT는 wild type TG와 비교해서 5배의 (PI \approx 13,100) signaling potential의 증가를 보였다.

Fc γ RIIIA- γ 와 - ζ 의 상대적 표현 정도를 측정하기 위한 quantitative RT-PCR: 배양된 NK cells로부터의 RNA 분리는 Trisol protocol (manufacturer recommended protocol)을 사용했으며 cDNA 합성은 random hexa-oligonucleotides를 primer로 사용하였다. γ 와 ζ chain의 RT-PCR을 위한 PCR

primers는 18mer를 사용했으며 개발된 PCR condition은 아래와 같다.

| | |
|----------------------------|-----------|
| cdNA (first strand cdNA): | 1 μ l |
| formamide (deionized): | 1 μ l |
| primer (0.5 μ g each): | 2 μ l |
| dd water: | 6 μ l |

상기의 mixture를 95°C로 가열한 후 식힌 다음 buffer, dNTP, enzyme을 더한 후 dd water를 더해서 최종적으로 100 μ l로 조정된 후 hot start PCR (denaturation temp. 98°C, annealing temp. 55°C)을 35회 반복한 결과 언제나 만족할 만한 PCR amplification을 관찰했다.

(다) NK receptor 및 ligand 탐색

또한 NK/LAK cell의 활성화물질을 찾는 연구의 일환으로 NK/LAK cell의 receptor 및 ligand를 찾는 연구를 시작하였는데, NK susceptible target인 K562를 immunize하여 monoclonal 항체를 생산하고 이를 여러 세포에 staining하여 FACScan으로 분석하여 single clone들을 선택하였다. 이들의 상등액으로 western blotting을 행한 결과, 4A10-60 clone에서 K562세포의 약 53kD protein을 강하게 인식하는 것을 볼 수 있었다. 또한 단일 클론들의 상등액을 처리하고, NK cell의 cytolytic assay행하여 3D6-32와 4A10-60 clone이 NK cytolytic activity를 유의성있게 neutralize시킴을 알 수 있었다. 위의 결과로 4A10-60 clone를 택하여 항체를 다량 생산하고 정제하여 NK proliferation에 미치는 영향을 알아 보았다. 그결과, IL-2에 의해 유도되는 NK proliferation이 이 단일 클론 항체에 의해 효과적으로 억제되었고 그 억제효과는 F(ab)₂ fragment에서 더 현저하게 나타났다. 그리고 항체를 전처리한 경우와 같이 처리한 경우 모두에서 유사한 경향을 보였다.

또한 이항체가 NK활성, 즉 cytolytic activity에 미치는 영향을 알아보기 위해 항체를 표적세포인 K562에 처리하여 ⁵¹Cr release assay를 행하였다. Proliferation에 미치는 영향처럼 현저하진 않지만 IL-2에 의해 증가된 NK의 cytolytic activity가 항체 처리에 의해 유의적으로 감소됨을 볼 수 있었고, IL-12에 의한 cytolytic activity도 약간 억제되었다. 이런 작용을 가진 항체는 K562의 surface에 있는 약 53kD의 molecule을 강하게 인지함을 western

blotting으로 확인하였다. 그리하여 이 molecule을 identify하기 위해 immunaffinity column으로 분리하거나 K562 cDNA library를 screening하는 방법을 진행중에 있다.

3. NK/LAK cell의 in vivo 항암효과의 측정

IN vitro 결과를 토대로 in vivo에서의 항암효과를 측정하기 위해 BALB/C mice의 피하에 B cell lymphoma(B9 tumor)와 liver tumor(75-TIB)를 injection하여 tumor를 발생시킨후 porcine NK cell을 이용한 xenogenic immunotherapy를 시도하였다. Tumor site에 local injection하기 위해 tumor mass의 지름이 1.0 cm된 후 3일에 한 번씩 purified 한후 IL-12로 활성화 시킨 porcine NK cell(1×10^5 cells)를 주사한 후 크기를 측정하여 항암효과를 조사하였다. Figure 11과 12에서 볼수 있듯이 porcine NK/LAK cell을 이용한 xenogenic immunotherapy는 murine system에서 항암효과가 있다는 것을 알수 있었다.

4. Porcine NK/LAK 세포의 분리및 특성분석 (위탁과제)

본과제의 성격상 porcine NK/LAK cell의 분리가 우선 중요한 과제인데 본 위탁과 통해, 멸균 porcine에서 NK/LAK cell의 분리와 cell의 공급을 본과제 연구자에게 무난히 제공하였다.

기존의 porcine NK cell의 분리를 위해 사용되고 있는 porcell density gradient나 Flow cytometry는 purity와 yield에 문제점을 나타내고 있다. 이러한 문제점의 가장 큰 요소 중의 하나인 monocyte의 contamination을 극복하기 위해 본 연구팀은 porcine serum을 이용하여 monocyte를 PBM(Peripheral Blood Mononuclear cell)으로 부터 분리하는데 성공함으로써 porcine NK/LAK cell의 새로운 정제방법의 개발에 근접하였고, 또한 porcine CD16에 대한 항체(Antibody)개발에 성공하여 이 항체를 통한 porcine NK/LAK cell의 purification의 가능성을 한층 더 증가시켰다.

즉, 지금까지 porcine NK cell를 분리하기 위해 사용되고 있는 방법으로서는 percoll gradients나 cell panning을 이용한 방법이 주를 이루며 사용되어 왔지만 yield가 낮고 purity가 떨어지는 문제점을 안고 있으며 flow cytometry를 이용한 porcine NK cell의 정제는 purity는 높여주었지만 yield가 낮아 순수 정제된 porcine NK cell를 이용한 functional study에 한계를 보여 주었다. 본 연구에서는 최근에 개발된 AIS MicroCELLector flask에

porcine CD16 mAb인 G7 mAb를 flask에 binding 시킨후 PBL로부터 porcine NK cell의 순수정제를 한결과 95%이상의 세포가 NK cell의 특성중의 하나인 azurophilic granules를 cytoplasm에 가지고 있는 것을 보여 주었고 (Chicago의대팀 위탁과제, Figure.1.), 정제된 NK cell의 yield도 $1-2 \times 10^7$ cell/flask가 되어 Xenogenic immunotherapy와 functional study에 필요한 porcine NK cell를 정제할수 있었다. 정제된 porcine NK cell를 이용해 human 이나 murine의 간암(75-TIB)이나 피부암(HTB-67)등을 in vitro에서 3hr NK assay를 통해 조사한 결과, NK sensitive target cell인 K562에 비해 탁월한 살상능력을 보여 주었다(Figure 2).

결론적으로, 무균 돼지로부터 blood를 얻고 Ficoll-Hypaque density centrifugation을 이용하여 PBM(Peripheral Blood Mononuclear cell)을 얻었다. porcine serum을 coating한 flask를 이용하여 monocyte를 제거하고, G7 mAb(anti-CD16 mAb)를 세포와 20분간 배양한 후 세포를 세척하고 이 세포들을 goat anti-mouse Ig가 Coating된 AIS flask에 한 시간동안 binding 시킨 후 non-adherent를 제거하고 adherent cell(NK cell)를 mechanical agitation으로 순수한 NK cell를 얻었다. LAK세포는 정제한 NK 세포를 IL-2나 IL-12와 같이 배양하여 얻었고, Cell line을 만들기 위해서는 PHA나 cytokine을 만들었으며, In vivo study를 통해 면역계의 이해와 vaccine개발의 가능성을 모색중이다.

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

| 구분 | 연구개발목표 | 추진실적 | 달성도(%) |
|---------------|--|--|--------|
| 1차년도 (’94) | | | |
| 2차년도 (’95) | <ul style="list-style-type: none"> - in vitro porcine NK/LAK 세포의 target 암 선정 - Porcine NK/LAK 세포의 항암효과 측정 | <ul style="list-style-type: none"> - Porcine NK/LAK cell을 CD16을 이용하여 positive selection으로 분리 - Porcine NK/LAK cell을 95% 이상 순수 분리 성공 - 간암및 피부암에 Cr-release assay 를 통해 살상능 측정 성공 | 100% |
| 3차년도 (’96) | <ul style="list-style-type: none"> - Cytokine에 의한 NK/LAK 활성화 기작 - NK/LAK 활성화 유도물질 탐색 -NK/LAK의 in vivo 항암효과 측정 | <ul style="list-style-type: none"> - IL-12가 NK/LAK activity를 증가 시키고, 또한 PNK-E/G7 mAb가 NK/LAK을 활성화시키는 것을 관찰하였고, 이두물질이 TNF생산을 유도하는 것으로 보아 TNF생산 증가를 통해 NK/LAK 활성화를 유도하는 것으로 추측된다 - IL-12가 ICAM-1의 발현을 증가시키고, 살상능을 증가 시키며, ICAM-1 항체가 NK/LAK의 살상능을 감소시키는 것으로보아 ICAM-1 발현과 살상능이 밀접한 관계가 있음을 알수 있었다. - NK cell이 target cell을 인식하고 활성화시키는 molecule을 탐색하기위해 CAM에대한 mAb를 검색한 결과 4A10-60 mAb가 NK activity를 조절함을 알 수있었다. - Mice에 간암,B lymphoma, melanoma를 일으킨후 porcine NK를 투여한 결과 rejection이 일어나지 않고 tumor를 regression시키는 것으로 보아 항암효과가 있음을 알수 있었다. | 95% |

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 1) Purity NK cell를 통한 면역계의 이해증가 와 immunotherapy로서 활용
- 2) Cytokine의 영향을 분석하여 immunotherapy의 기반구축
- 3) Antibody 개발을 통해 산업화 촉구
- 4) 작용 조절 물질 탐색 및 cell line의 연구를 통해 항암효과의 vaccine 개발

본 연구과제는 무균 porcine NK/LAK의 공급과 분리를 위해 시카고의대 팀과 공동연구가 반드시 필요하다. 1단계에서 위탁과제를 통해 이를 잘 협력하여 수행하였는데 앞으로 지속적인 지원이 필요하다.

여 백

제 6 장 참고문헌

1. Katz Ad, Urbach F, Lillienfeld AM. Cancer 10 : 1162, 1957.
2. Aubry F, MacGibbon B. Cancer 55 : 907, 1985.
3. Deborah R. Jaffe, Yvonne Montero-Puerner, Michael A. Beckett, Janet M. Cowan, Ralph R. Weichselbaum, Alan M. Diamond. Molecular carcinogenesis 5 : 278-285, 1992.
4. Margaret R. Karagas, Therese A. Stukel, Robert Greenberg, John A. Baron, Leila A. Mott, Robert S. Stern. JAMA 267 : 3305, 1992.
5. Douglas A. Ross, Juan A. Huaman, Sanford H. Barsky. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 118 : 1172, 1992.
6. Kohsuke Sasaki, Tomoyuki Murakami, Takuo Murakami, Masayuki Nakamura. Cancer 68 : 2403, 1991.
7. Deborah L. Ornstein, Leo R. Zacharski, Vincent A. Memoli, Water Kisiel, Bohdan J. Kudryk, Jane Hunt, Sandra M. Rousseau, David C. Stump. Cancer 68 : 1061, 1991.
8. Stern RS, Laird N, Melski J, Parrish JA, et al. N Engl J Med 310 : 1156, 1984.
9. Westbrug SP, Stone OJ. Arch Dermatol 107 : 893, 1973.
10. Franck N. Jiang, Daniel J. Liu, Herma Neyndorff, Michael Chester, Shiyi Jiang, Julia G. Levy. JNCI 83 : 1218, 1991.
11. Kathleen Conway, David Morgan, Karen K. Phillips, Stuart H. Yuspa, Bernard E. Weissman. Cancer Res. 52 : 6487-6495, 1992.
12. Israel Penn. Transplantation 55 : 742-747, 1993.
13. Lutzer MA. J Am Acad Dermatol 11 : 891, 1984.
14. Maize JC. JAMA 237 : 1857, 1977.
15. Dzubow LM, Rigel DS, Robins P. Arch Dermatol 118 : 900, 1982.

16. Epstein E, Epstein N, Bragg K, et al. Arch Dermatol 97 : 245, 1968.
17. Honeycutt WM, Jansen GT. Arch Dermatol 108 : 670, 1973.
18. Immerman SC, Scanlon EF, Christ M, Knox KH. Cancer 51 : 1527, 1983.
19. Heo, D.S., Whiteside, T.L., Johnson, J. T., Chen, K., Barnes, L., Herberman, R.B. Cancer Res., 47 : 6353-6262, 1987.
20. Letessier, E. M., Sacchi, M., Johnson, J. T., Herberman, R. B., Whiteside, T. L. Cell Immunol., 130 : 446-458, 1990.
21. Letessier, E. M., Heo, D.S., Okarma, T., Johnson, J. T., Herberman, R. B., Whiteside, T. L. Cancer Res., 51 : 3891-3899. 1991.
22. Rabinowich, H., Vitolo, D., Altarac, S., Herberman, R. B., Whiteside, T. L. J. Immunol., 149 : 340-349, 1992.
23. Cortesina, G., Sacchi, M., Galeazzi, E., Johnson, J. T., Whiteside, T. L. Acta Otolaryngol. (stockh.), 112 : 370-375, 1992.
24. Stacchi, M., Klapan, I., Johnson, J. T., Whiteside, T. L. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 177 : 321-326, 1991.
25. Eva Lotzova. Nat Immun 12 : 169-176, 1993.
26. Monika E. Ostensen, Dwain L. Thiele, and Peter E. Lipsky. J. Immuno 138 : 4185-4191, 1987.
27. Koji Kawai, Tetsuji Sasaki, Kaoru Saijo-Kurita, Hideyuki Akaza, Kenkichi Koiso, Tadao Ohno. Cancer Immunol Immunother 35 : 225-229, 1992.
28. Rayner AA, Grimm EA, Lotze MT, Wilson DJ, Rosenberg SA. JNCI 75 : 67-75, 1985.
29. Lotzova E, Herberman RB. Nat Immun Cell Growth Regul 6 : 109-115, 1987.
30. Minigari MC, Ferrini S, Pende D, Bottino C, Prigione I, Moretta A, Moretta L. Cancer 40 : 495-498, 1987.
31. Bluma G Brenner, Chryssa Gryllis, Mark A. Wainberg. Journal of

- Leukocyte Biology 50 : 628-640, 1991.
32. John R. Yannelli. J, of Immunological Methods 139 : 1-16, 1991.
 33. John W. Yarbro. Seminars in Surgical Oncology 7 : 183-191, 1991.
 34. David S. Cross, Jeffrey L. Platt, Steven K. Juhn, Fritz H. Bach, George L. Adams. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 118 : 526, 1992.
 35. Eric M. Letessier, Dae S. Heo, Thomas Okarma, Jonas T. Johnson, Ronald B. Herberman, Theresa L. Whiteside. Cancer Res. 51 : 3891-3899, 1991.
 36. Deborah R. Jaffe, Yvonne Montero-Puerner, Michael A. Beckett, Janet M. Cowan, Ralph R. Weichselbaym, Alan M. Diamond. Molecular Carcinogenesis 5 : 278-285, 1992.
 37. Katheleen Conway, David Morgan, Karen K. Phillips, Stuart H, Yuspa, Bernard E. Weissman. Cancer Res. 52 : 6487-6495, 1992.
 38. Israel Penn. Transplantation 55 : 742-747, 1993.
 39. Heinz-A. Horst, Hans-P. Horny. Cancer 68 : 2397, 1991.
 40. Andrew R. Lloyd, Joost J. Oppenheim. Immunology Today 13 : 169, 1992.
 41. Alberto Mantovani, Barbara Bottazzi, Francesco Colotta, Silvano Sozzani, Luigi Ruco. Immunology Today 13 : 265, 1992.
 42. Mladen Korbelik, Gorazd Krosi, David John Chaplin. Cancer Res. 51 : 2251-2255, 1991.
 43. Jung TT, Berlinger NT, Juhn SK. Laryngoscope, 95 : 307-312, 1985.
 44. Hirsch B, Johnston JT, Rabin BS, Thearle PB. Arch Otolaryngol, 109 : 298-301, 1983.
 45. David S. Cross, Jeffrey L. Platt, Steven K. Juhn, Fritz H. Bach, George L. Adams. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 118 : 526, 1992.
 46. Paciott, G. F., Tamarkin, L. Anticancer Res. 8 : 1233-1239, 1988.
 47. Eckhart Weidmann, Manuela Sacchi Stephane Plasance, Dae Seog Heo,

Satoshi Yasumura, Wen-chang Lin, Jonas T. Johnson, Ronald B. Herberman, Bruno Azzarone, Theresa L. Whiteside. *Cancer Res.* 52 : 5963-5970, 1992.

48. Jeffrey L. Platt, Fritz H. Bach. *Transplantation* 52 : 937-947, 1991.
49. C. Hammer, M. Suckfull, D. Saumweber. *Transplantation Proceedings* 25 : 336-338, 1993.
50. D. Latinne, P. Gianello, C. V. Smith, V. Nicheleit, T. Kawai, M. Beadle, C. Haug, M. Sykes, E. Lebowitz, H. Bazin, R. Colvin, A. B. Cosimi, D. H. Sachs. *Transplantation Proceedings* 25 : 336-338, 1993.

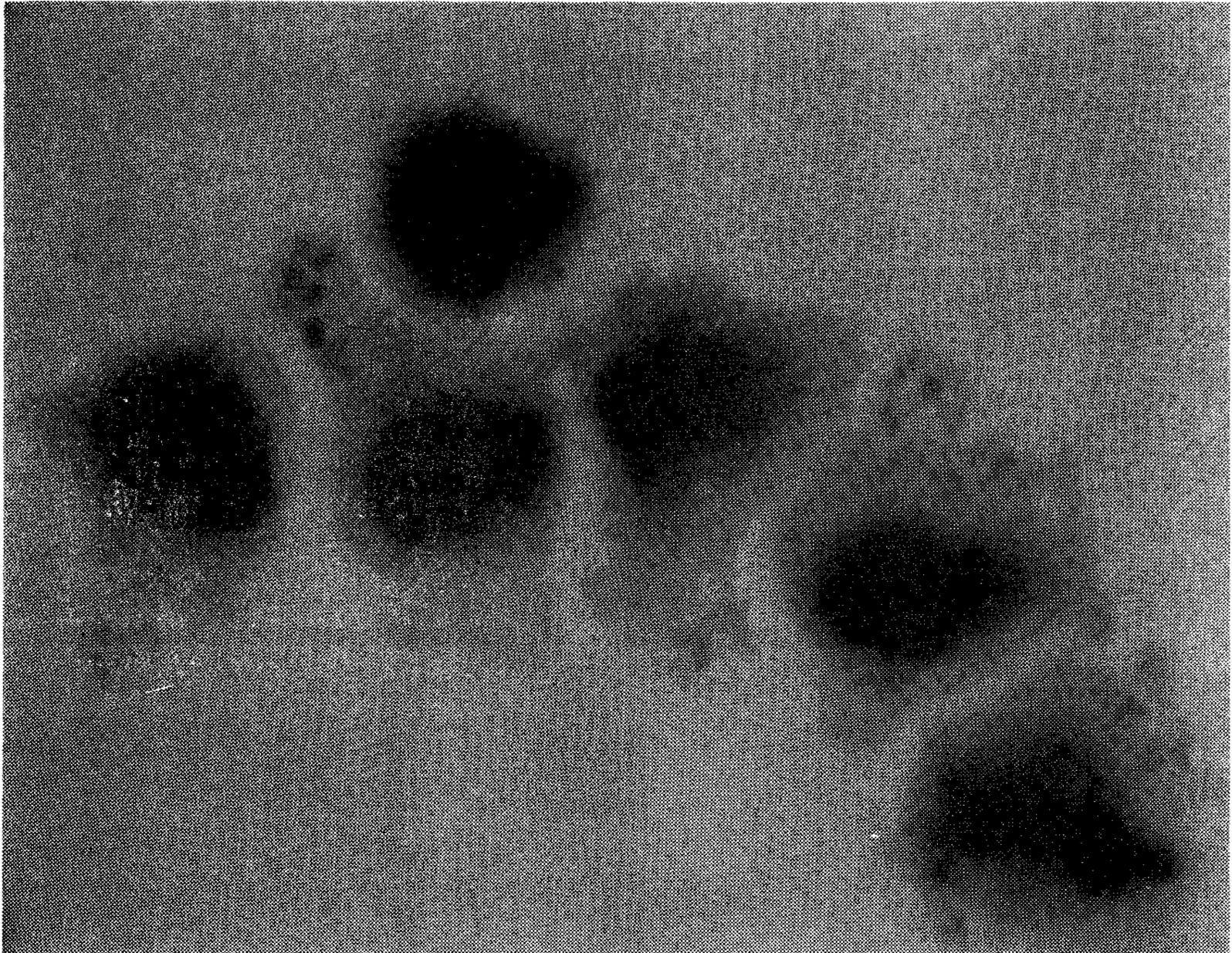


Figure 1. Morphology of purified NK cells.

Purified NK cells were collected using a AIS MicroCELLector flask.

Cytocentrifuged preparations of purified NK cells were fixed with methanol and stained with Giemsa. The magnification was x1000.

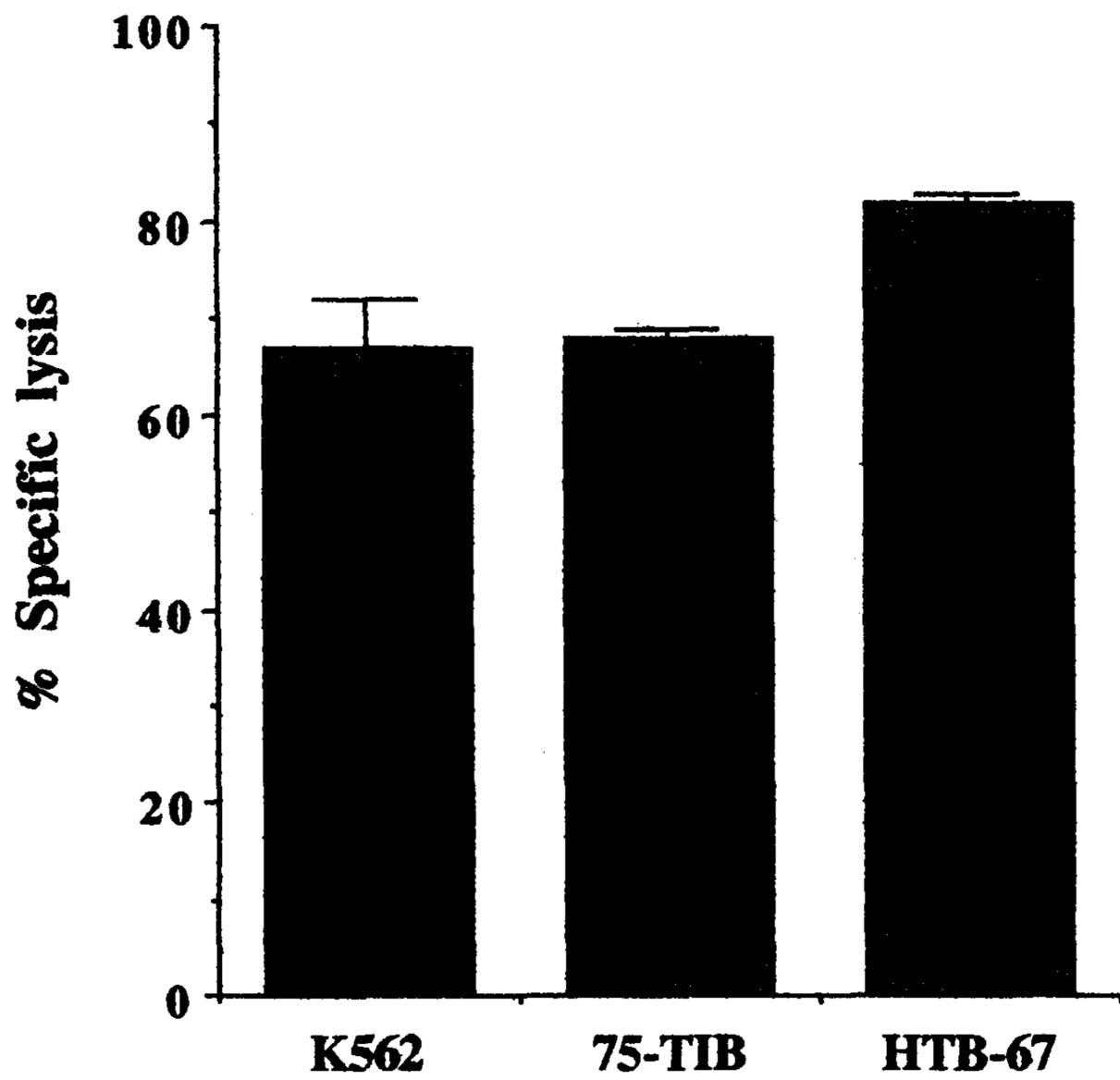


Figure 2. Anti-tumor activity of porcine NK cells

TABLE 1**Titration of rHu IL-12 Effects on Peripheral Blood NK Activity**

| Animal # | rHu IL-12 (ng/ml) | % Specific lysis \pm S.D. (K562)* | | |
|-------------------|------------------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|
| | | 100:1 | 50:1 | 25:1 |
| SPF 5555-5 | 0 | 6.3 \pm 0.8 | 2.6 \pm 1.0 | 1.3 \pm 0.7 |
| | 0.5 | 16.5 \pm 4.3 | 7.7 \pm 0.7 | 3.3 \pm 0.3 |
| | 5 | 24.9 \pm 1.8 | 10.6 \pm 0.9 | 5.1 \pm 1.1 |
| | 50 | 34.3 \pm 3.3 | 13.1 \pm 1.8 | 7.5 \pm 0.7 |
| SPF 6005-5 | 0 | 36.8 \pm 0.5 | 25.4 \pm 0.9 | 17.9 \pm 0.7 |
| | 1 | 53.8 \pm 0.6 | 44.2 \pm 0.3 | 29.4 \pm 1.3 |
| | 5 | 64.0 \pm 0.3 | 50.6 \pm 0.9 | 35.4 \pm 0.9 |
| | 25 | 66.2 \pm 0.1 | 56.2 \pm 0.4 | 37.7 \pm 0.0 |
| SPF 6004-2 | 0 | 32.3 \pm 2.8 | 28.9 \pm 0.9 | 22.5 \pm 1.8 |
| | 1 | 65.9 \pm 9.9 | 33.7 \pm 2.6 | 19.2 \pm 6.3 |
| | 5 | 75.0 \pm 3.0 | 40.4 \pm 6.1 | 25.9 \pm 4.5 |
| | 25 | 72.1 \pm 3.3 | 42.7 \pm 4.0 | 29.5 \pm 1.4 |
| SPF 5552-1 | 0 | 9.0 \pm 0.2 | 3.9 \pm 0.4 | 2.1 \pm 0.4 |
| | 5 | 28.0 \pm 2.2 | 18.0 \pm 0.2 | 8.7 \pm 2.7 |
| | 50 | 30.5 \pm 1.5 | 18.5 \pm 1.9 | 9.2 \pm 1.0 |
| | 100 | 34.5 \pm 1.8 | 24.1 \pm 1.2 | 12.2 \pm 1.0 |

* A standard 3 hr ^{51}Cr -release assay was performed using ^{51}Cr -labeled K562 cells as targets and 18 hr cultured PBL with media (0) or various concentration of recombinant human IL-12 (rHuIL-12) as effector cells. Percent specific release is expressed as the mean \pm S.D. of triplicates.

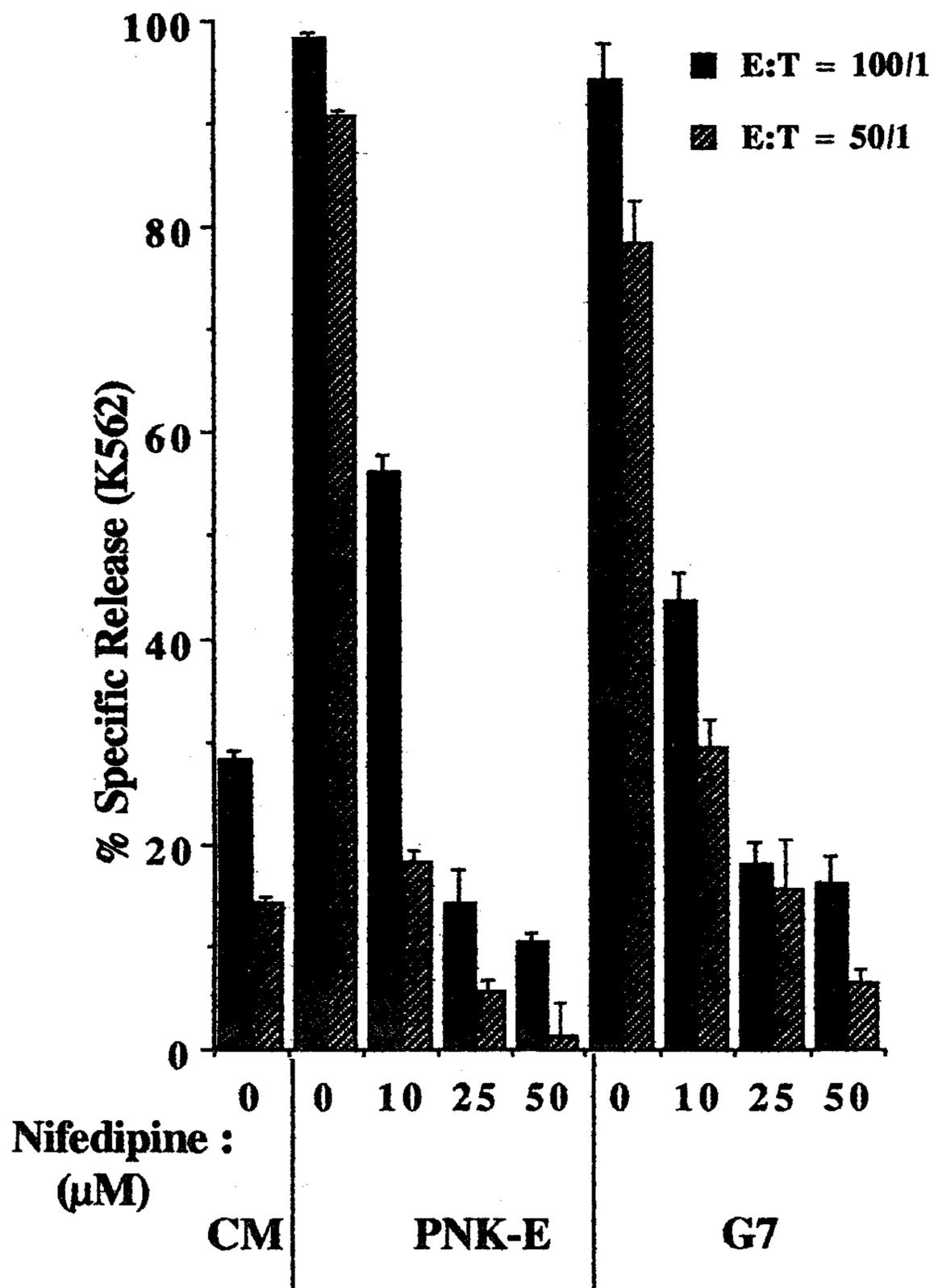


Figure 3. Effects of the calcium channel blocker nifedipine on PNK-E/G7 mAb enhanced NK activities.

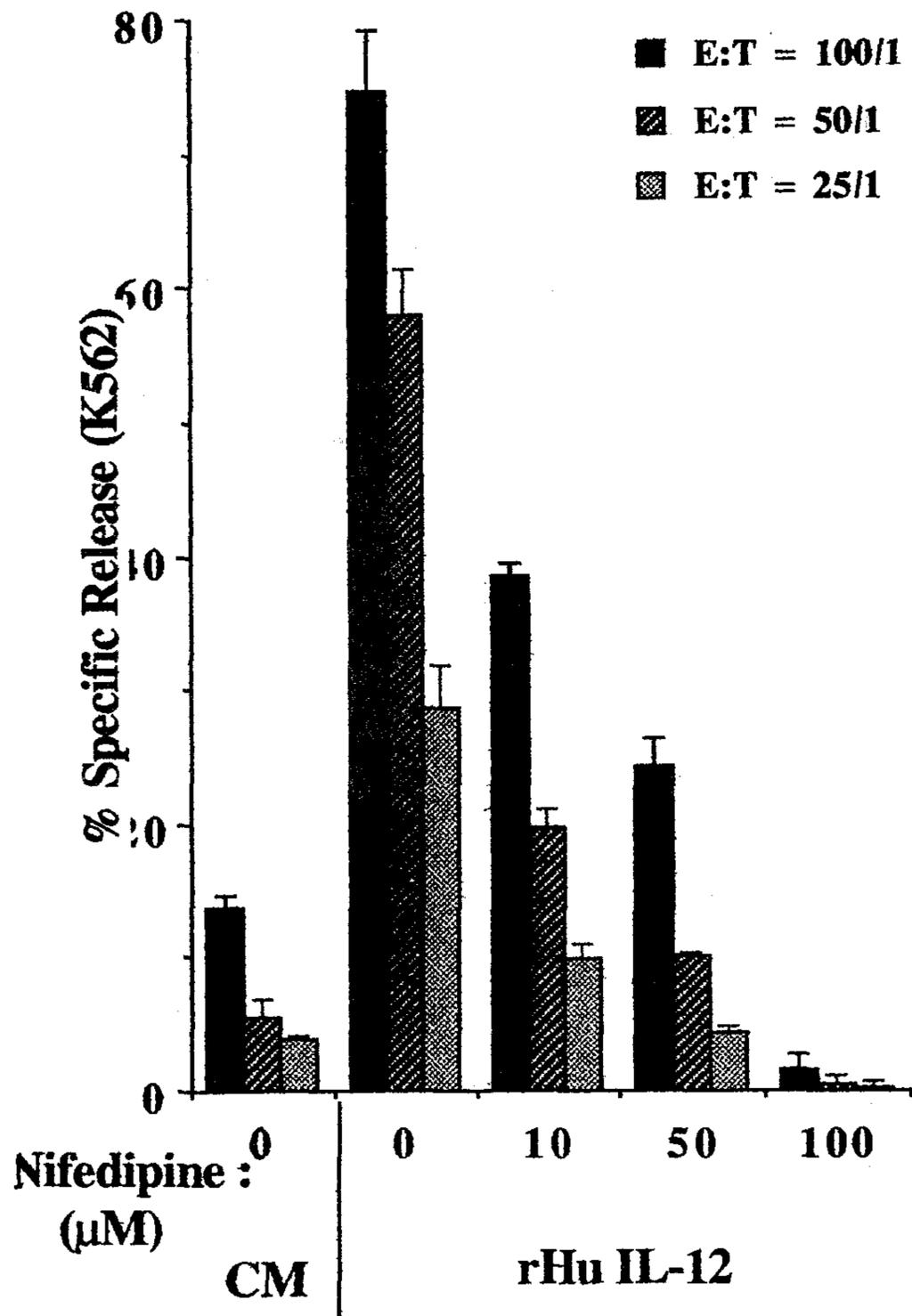


Figure 4. Effects of nifedipine on rHu IL-12 enhanced NK activities.

TABLE 2**TNF- α secretion in PNK-E/G7 mAbs and rHu IL-12
activated NK cells^a**

| Culture condition | TNF-α (pg/ml) |
|-------------------------------|--|
| K562 | 0.0 \pm 0.0 |
| NK | 5.2 \pm 1.1 |
| NK + K562 | 6.8 \pm 0.9 |
| NK + K562 + PNK-E | 9.1 \pm 0.9 |
| NK + K562 + G7 | 9.4 \pm 0.3 |
| | |
| NK + rHu IL-12 | 109.8 \pm 3.9 |
| NK + rHu IL-12 + K562 | 174.9 \pm 2.8 |
| NK + rHu IL-12 + K562 + PNK-E | 243.8 \pm 10.4 |
| NK + rHu IL-12 + K562 + G7 | 303.5 \pm 11.9 |

^a 18 hr cultured NK cells with or without rHu IL-12 (10 ng/ml) were added to a 96 well microtiter plate in the presence or absence of PNK-E (10 μ g/ml)/G7 (10 μ g/ml) mAbs prior to addition of K562 target cells (E:T = 10:1). After 4 hr incubation, 50 μ l culture supernatant was collected and tested using porcine TNF- α ELISA kit for TNF- α secretion. The data is a representative experiment of 3 experiments.

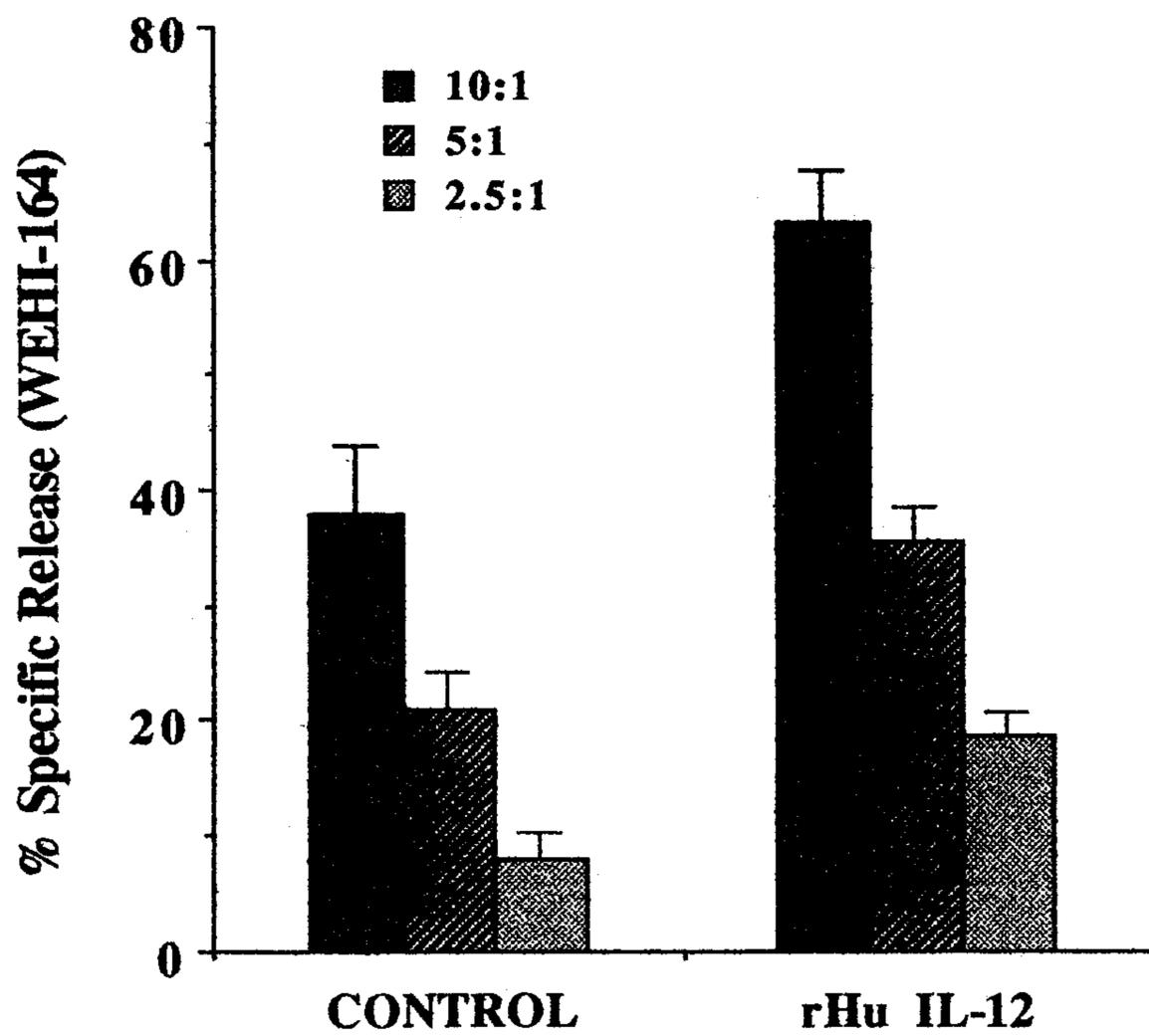


Figure 5. Effect of recombinant human IL-12 on production of TNF-a

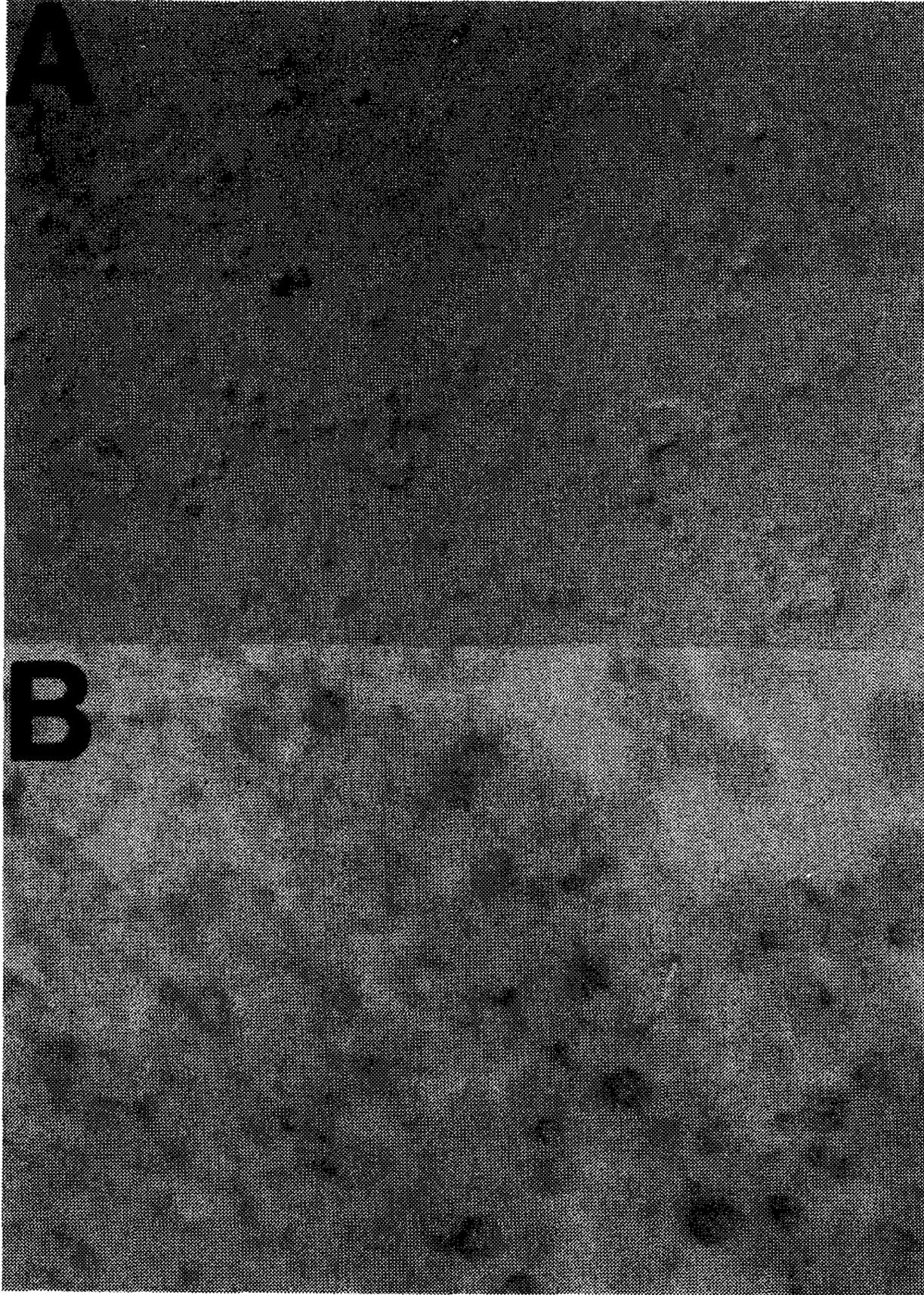


Figure 6. Expression of ICAM-1 molecules on NK cells by rHu IL-12.

NK cells were incubated with or without rHu IL-12 (10 ng/ml) for 18 hr. Cells were collected, washed, and used for immunohistochemical assay with ICAM-1 mAbs. (A) Cells cultured without rHu IL-12, and (B) cells cultured with rHu IL-12. Positive cells were stained as red color. The following magnifications were used : x100.

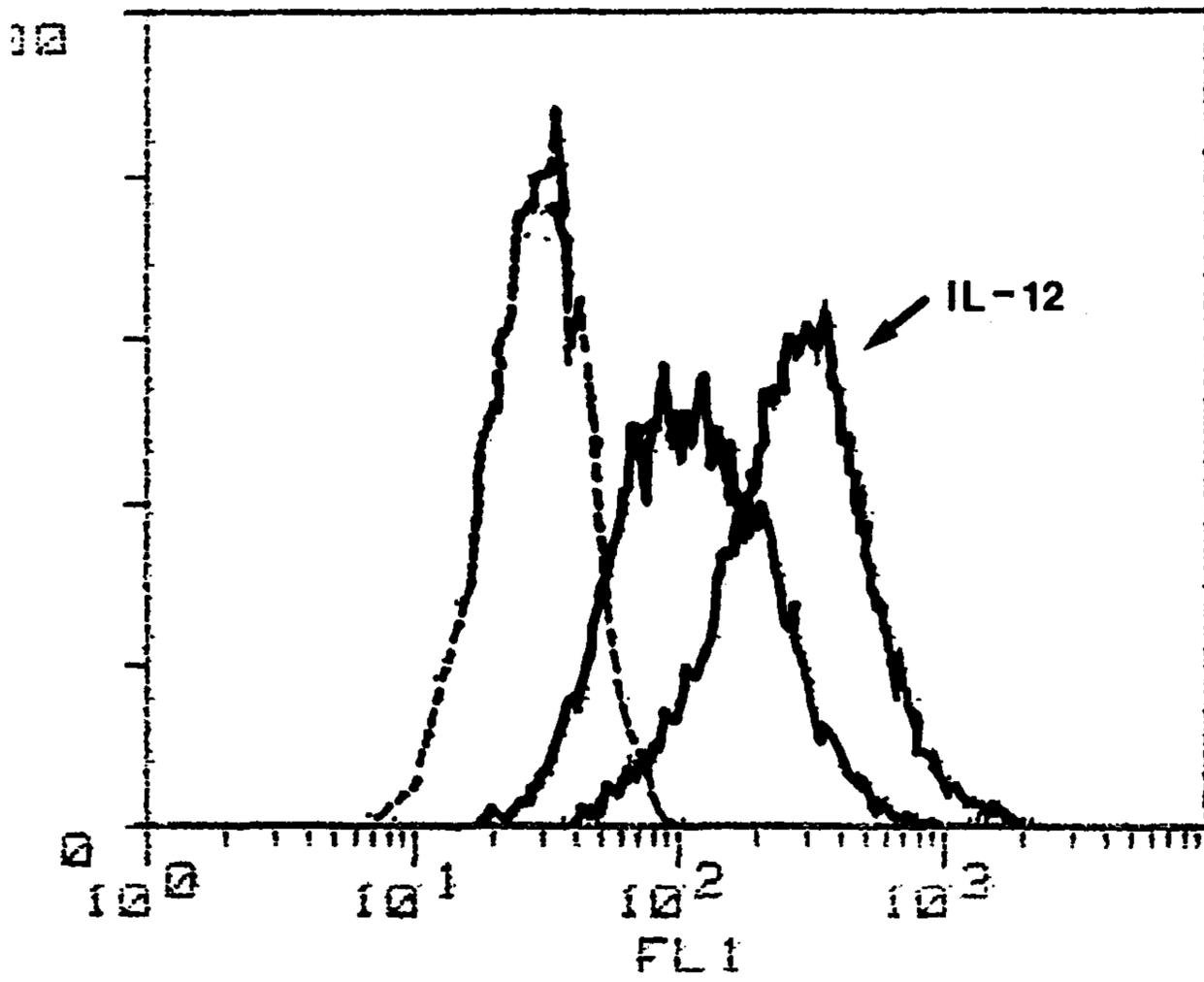


Figure 7. FACS analysis of ICAM-1 expression on rHu IL-12 activated NK cells.

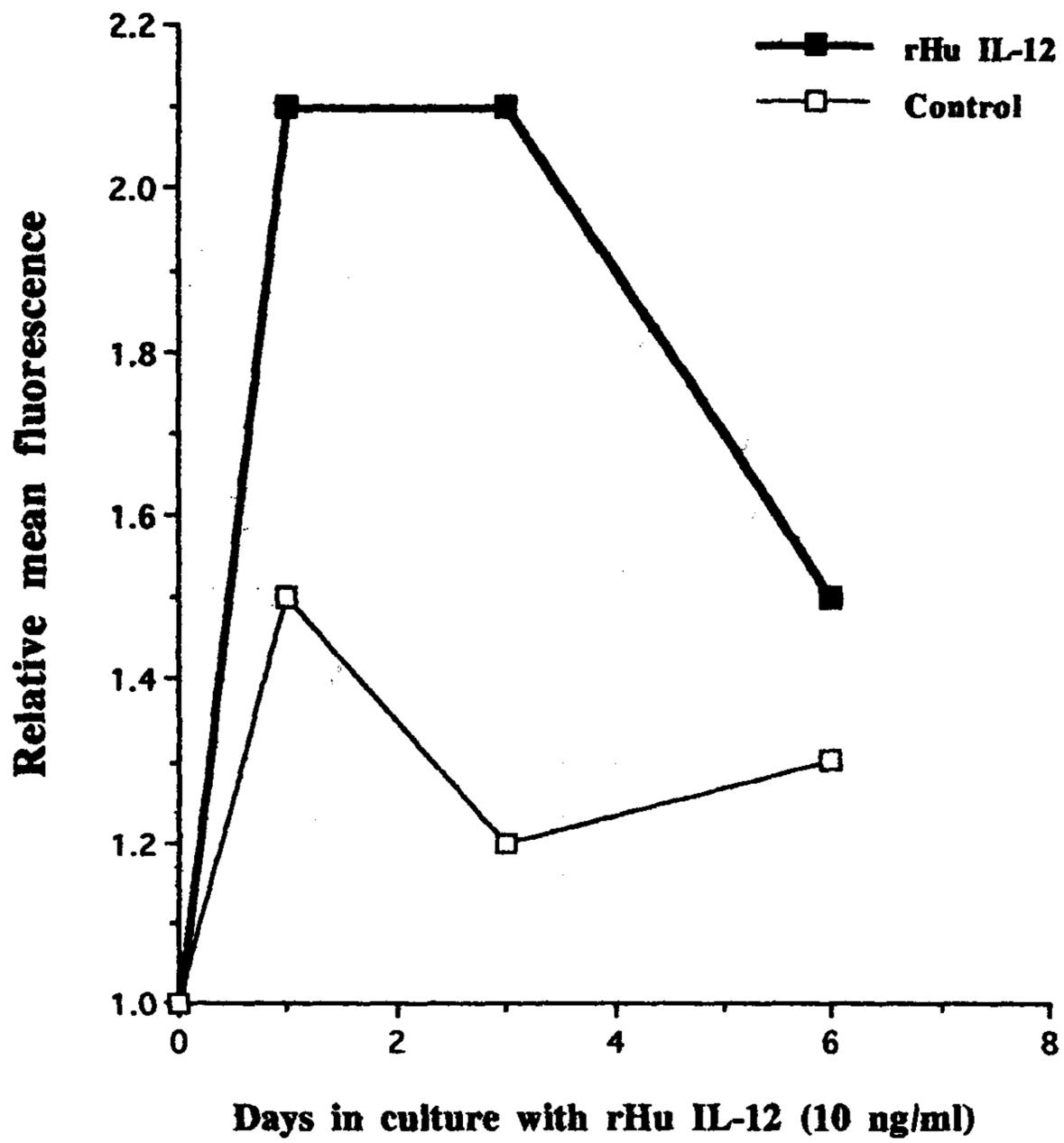


Figure 8. Kinetic assay of ICAM-1 expression

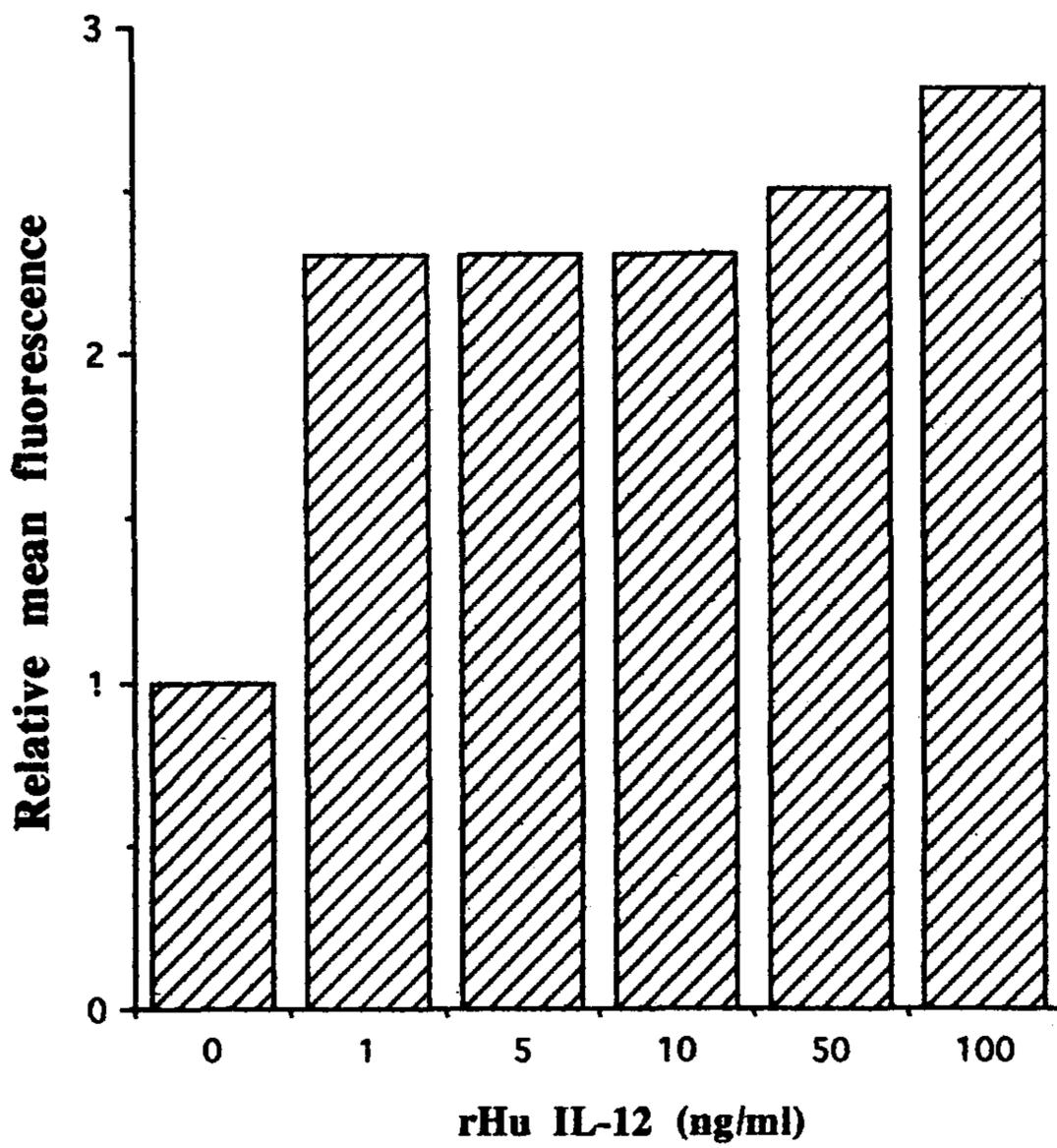


Figure 9. Titration of rHu IL-12 for the expression of ICAM-1 on NK cells.

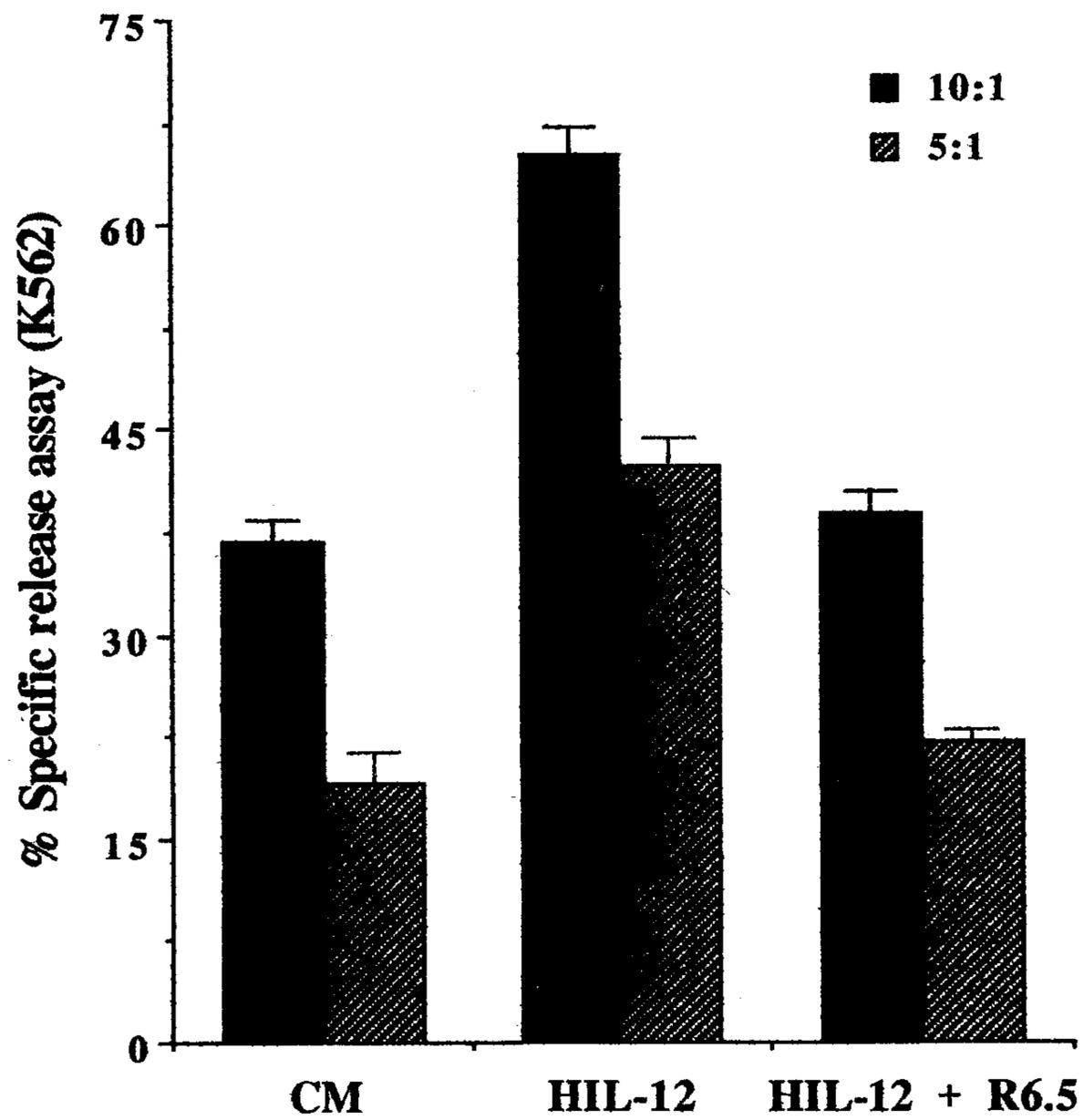


Figure 10. Effect of R6.5 mAb (anti-ICAM-1 mAb) on rHu IL-12 enhanced NK activities.

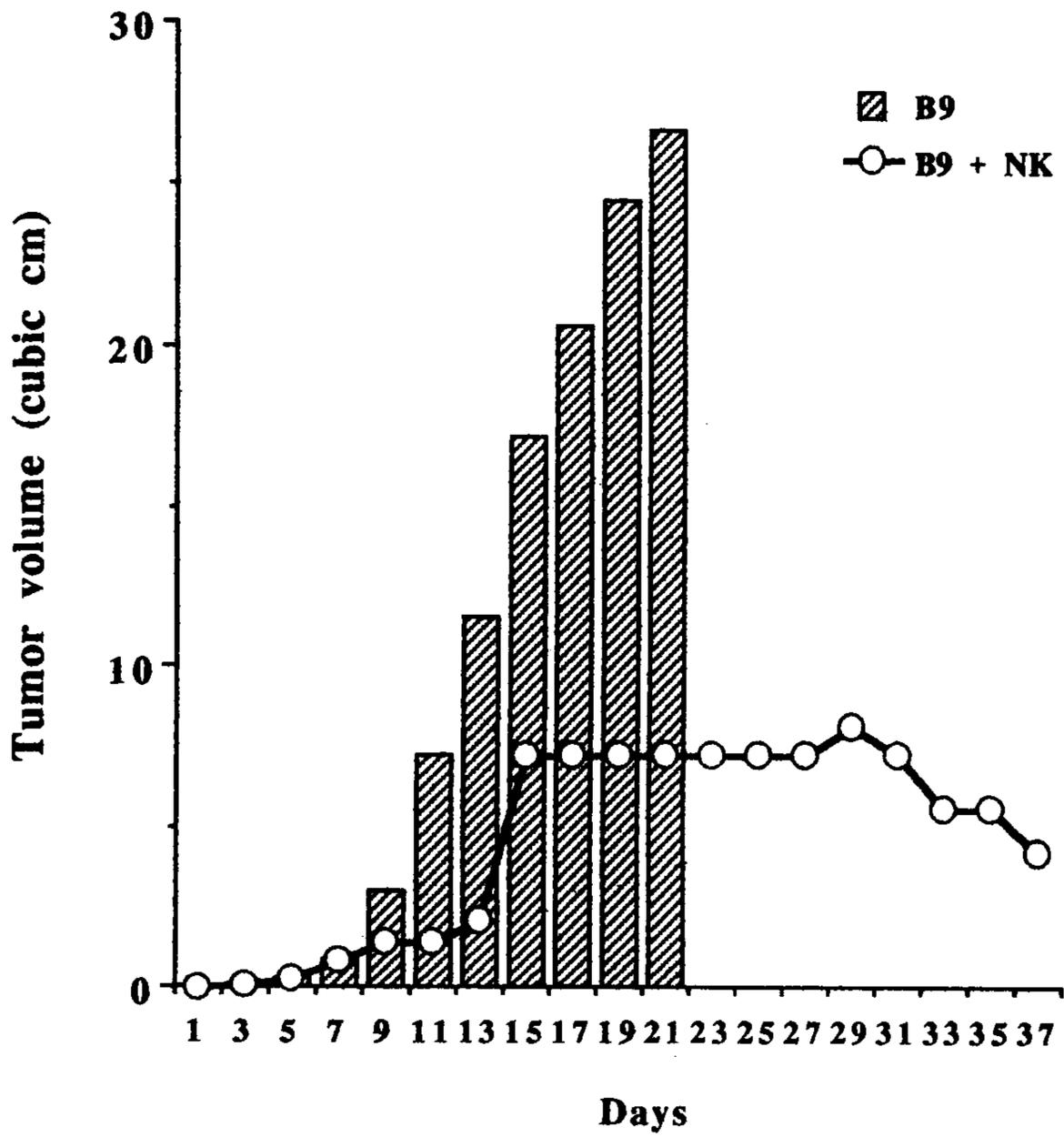


Figure 11. Anti-tumor activity of porcine NK cells on B9 tumor growth (in vivo).

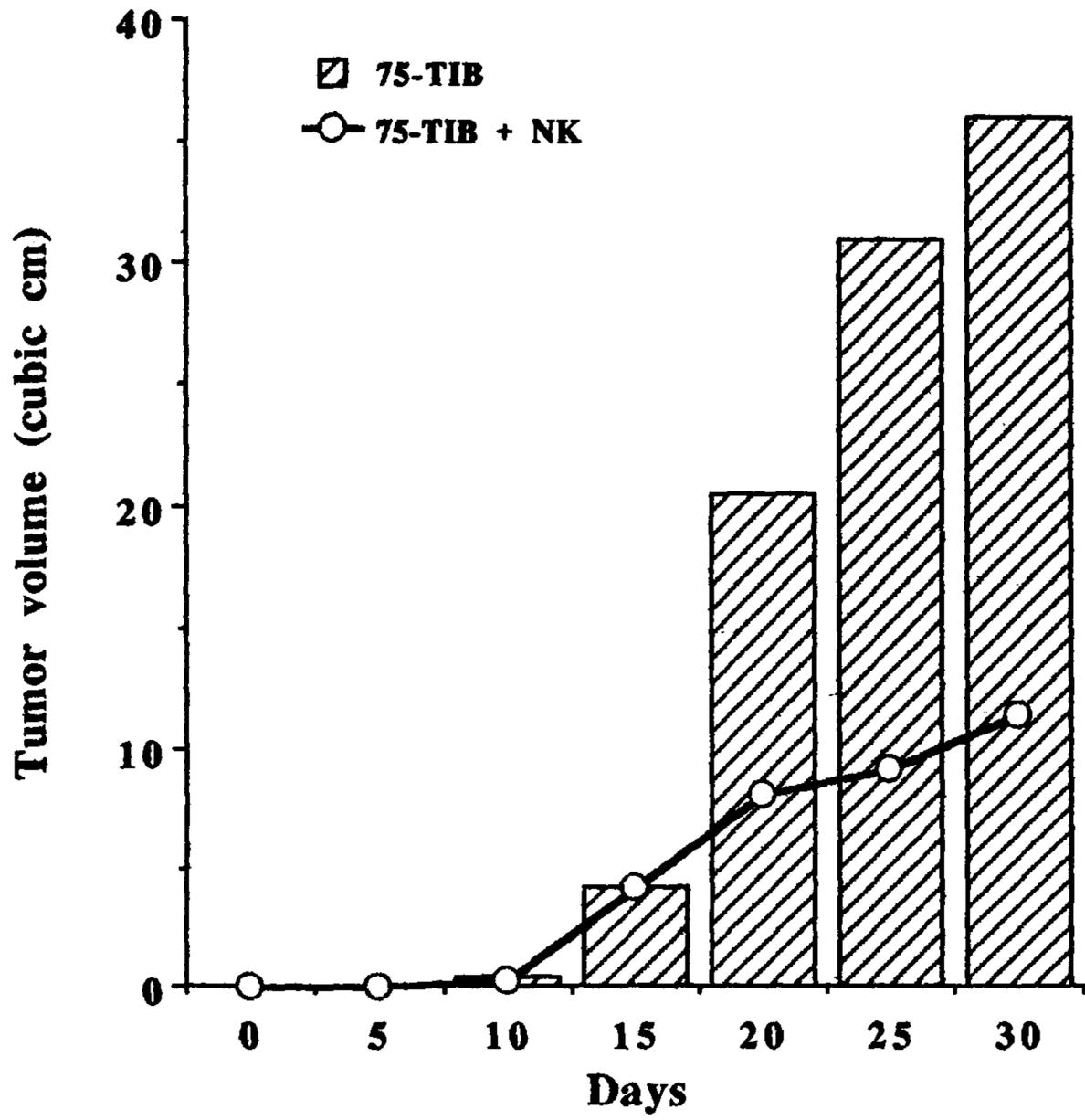


Figure 12. Anti-tumor activity of porcine NK cells on 75-TIB tumor growth (in vivo).