GOVP1200510537

SC13040

세포응용연구사업
Stem Cell Research

Natural killer cell의 분화유도기술 개발

Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells

한국생명공학연구원

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 과학기술부 특정연구개발사업 21세기프론티어연구개발사업 중 과학기술부가 지원하는 세포응용연구사업단 " 성체줄기세포에 관한 연구"과제 (세부과제 "natural killer cell의 분화유도기술 개발연구") 의 1단계보고서로 제출합니다.

2005 . 5 .

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 최인표

연 구 원 : 윤석란

: 정진웅

: 김세일

: 김정기

: 정미라

: 김미선

보고서 초록

과제관리번호	SC13040	해당단계 연구기간	2002.10.1-2005.3.30	단계 구분	1 / 3
연구사업명	중 사 업 명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	세포응용연구사업			
연구과제명	Natural killer cell 의 분화유도기술 개발				
연구책임자	최인표	해당단계 참여연구원수	총 : 9 명 내부 : 7 명 외부 : 2 명	해당단계 연구비	정부: 500,000 천원 기업: 천원 계: 500,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 면역학실		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		

요약	보고서 면수	48

1. NK세포 분화기술 확립

생쥐의 골수세포와 인간 제대혈로부터 조혈줄기세포를 분리하여, NK 세포로 분화시키는 기술 확립

2. NK 세포 분화 관련 유전자 동정

(1) Differential display PCR 법에 의해 NK분화관련 유전자 확보

(2) SAGE를 이용한 NK세포 분화 관련 유전자의 대량 발굴

: 총 170,464개의 tag, 59,657개의 unique transcript, 35,385개의 gene을 동정

(3) NK세포 분화과정 중 stage-specific하게 발현되는 유전자의 분석

: HSC에서 15개, pNK세포에서 31개, mNK세포부터 27개의 유전자를 동정.

3. NK 분화유도 유전자의 기능 분석

(1)VDUP1:VDUP-1 knockout mice 를 만들어 NK세포감소와 NK 활성 저하 확인

(2)AXL: AXL receptor tyrosine kinase 항체와 siRNA를 이용하여 NK분화조절능 확인

(3) Osteopotin (OPN): OPN을 처리 후 pNK의 분화도를 증가시킴을 확인

(4) Cathepsin: cathepsin inhibitor를 처리하여 NK 세포 와 NK 활성이 감소됨을 확인

(5) Leptin: Leptin R 가 결핍된 마우스에서 NK 분화저해와 NK 활성 감소.

4. 분화최적화 및 NK immunotherapy

분화된시킨 NK 세포를 투여한 결과 흑색종 암의 억제됨 확인

NK 세포와 수지상 세포의 혼합투여로 인한 면역치료의 상승효과

색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	조혈모세포. 자연살해세포, 분화조절, 세포치료, 항암
	영 어	SAGE, Natural killer cell, differentiation, cell therapy, VDUP-1

요 약 문

Ⅰ. 제 목

Natural killer cell의 분화유도 기술개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구에서는 살상능력과 다양한 면역조절 기능을 가지고 있는 Natural Killer (NK) 세포의 분화에 관련하는 유전자군의 대량발굴 및 기능 분석을 통해, NK 세포 분화조절 유전자를 발굴하며, 나아가 이들 분화조절 유전자를 이용하여 NK 세포의 분화조절 기술을 확립하고 나아가 암특성에 따른 맞춤 면역 암치료법을 개발한다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. NK 세포 분화 기술확립
   HSC에서 NK cell 분화
2. NK 세포 분화 관련 유전자 동정
   1) SAGE
   2) DD-PCR
3. NK 분화유도 유전자의 기능 규명
   1) RNAi를 이용한 유전자 기능 규명
   2) in vitro NK 배양을 통한 유전자 기능 규명
   3) Retrovirus를 이용한 in vivo 유전자 기능 규명
4. 분화 유전자를 이용한 NK 분화 최적화 기술개발 및 맞춤 면역 암치료법 개발
   1) 분화 유전자의 발현을 통한 NK 분화 최적화 기술
   2) 분화유도 인자를 이용한 NK 암치료법 개발

Ⅳ. 연구개발결과

계획서(협약서)상의 1단계 연구개발 세부목표	추진실적	달성도(%)
NK 세포 분화 기술확립	C57BL/6 마우스의 골수세포로부터 MACS를 이용하여 96%순도의 Lin^- $c\text{-}kit^+$인 조혈줄기세포(HSC)를 분리하여, 6일 동안 배양한 후, FITC 표지된 CD122항체와 magnetic bead가 붙은 anti-FITC 항체를 이용하여 MACS로 순도 92%이상의 $CD122^+$인 NK전구체 세포를 얻었고, IL-15 20 ng/ml의 존재 하에서 6일간 더 배양한 후 MACS를 이용하여 $NK1.1^+$인 mNK세포를 분리하였다. 인간의 재대혈로부터 같은 방법으로 pNK와 mNK를 분화시켜, 결론적으로 **마우스와 인간의 NK 분화기술 (2건)을 확립하였다.**	100%
NK 세포 분화 관련 유전자 동정	(1) Differential display PCR 법에 의한 NK세포 분화관련 유전자의 동정. NK세포 분화단계별로 얻은 세포로부터 total RNA를 분리하고 RT-PCR을 수행하여 pNK와 mNK 세포에서 특이적으로 발현량이 차이나는 band로부터 DNA를 추출하여 PCR로 reamplify하여 각각 차이 나는 clone을 **100여개 이상** 확보하였다. (2) SAGE를 이용한 NK세포 분화 관련 유전자의 대량 발굴 NK세포 분화과정에서 분화단계별 (HSC, pNK, mNK-OP9, mNK + OP9)로 4군의 독 립적인 SAGE library를 제작하였다. 전체적으로 4개의 SAGE library로부터 총 170,464개의 tag, 59,657개의 unique transcript, **35,385개의 gene**들이 동정하였다. (3) NK세포 분화과정 중 stage-specific하게 발현되는 유전자의 분석. HSC에서는 15개의 유전자, pNK세포에서는 31개의 유전자, mNK세포부터는 27개의 분화 유전자들을 분화 단계별로 동정하였다. 결론적으로 **단계별 특이 분화 유전자를 73종 확보하였다.**	100%
NK 분화유도 유전자의 기능 규명	(1)VDUP1: VDUP-1 knockout mice를 이용한 VDUP-1 기능연구. VDUP-1 gene knock out mouse를 만들어 Wild type 과 VDUP-1 deficient mouse를 phenoytyping하여 비교한 결과, VDUP-1 deficient mouse의 spleen, bonemarrow, lung, lymph node에서 mature NK (CD3- NK 1.1 +) population이 감소되어있고, VDUP-1 deficient mice에서 spenocyte의 cytolytic activity가 WT에비해서 현저하게 감소 되어있음을 확인하였다. (2)AXL: AXL receptor tyrosine kinase 의 기능 연구 pNK 세포에서 특이적으로 발현하는 여러 유전자들 중에서 AXL receptor tyrosine kinase가 NK 세포의 분화 및 활성에 미치는 영향을 분석하였다. AXL 항체의 처리에 의해 NK 세포로의 분화가 약 2배가량 증가하였다. (3)Osteopotin: NK를 분리후에 NK maturation을 유도하는 IL-15을 처리하여 opn의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. OPN이 pNK의 분화도를 증가시킴을 확인하였다. 또한, OPN에 대한 neutralizing antibody를 같이 처리하였을때 분화도가 감소하는것으로 보아, OPN 특이적 현상임을 검증하였다 (4) Cathepsin: HSC로부터 NK세포로 in vitro 분화과정중에 cathepsin inhibitor를 처리하여 NK 분화가 감소되었고, NK 활성을 감소하였음을 알 수 있었다. (5) Leptin Leptin R가 결핍된 마우스에서 NK 분화가 저해되어있는 현상을 알았고 더불어 CD122 분화유전자의 발현도 감소가 되어있어고, NK 활성도 감소됨을 검증하였다. 이상 결론적으로 **5종의 분화유전자의 기능을 검증하였다.**	100%
분화 유전자를 이용한 NK 분화최적화 기술개발	분화유전자(AXL, LPL, OPN)들을 처리해 분화시킨 NK가 분화도가 증가되었고 NK 활성도 증가됨을 알수 있었다. 분화된 NK세포의 in vivo 항암효과를 측정하기 위해, B16/F10 흑색종암 동물을 이용하여 NK 항암기능을 검정하였다. 분화된 NK 세포를 투여한 결과 흑색종 암의 억제됨을 알수 있었다. 결론적으로 **3가지 이상의 분화유전자를 이용해 NK 분화도를 증가시킬수 있었고 동물 암모델에서도 항암 활성이 증가함을 관찰하였다.**	95%

V. 연구개발결과의 활용계획

(1) 분화 단백질 개발
(2) 암등 난치성 치료 기술 개발
(3) 분화유도 기술 개발
(4) 줄기세포 자가재생산 기술 개발
(5) 기업화를 통한 산업화 유도

SUMMARY

Hemoatopoietic stem cell (HSC) is stimulated and differentiated by many growth factors including GM-CSF. In addition, Flt-3 ligand, SCF, IL-3, IL-6,IL-7,IL-1 are involved in HSC differentiation with other transcription factors, HSC is applied to BMT, cancer therapy, and other blood diseases. Recently it has been known that HSC can be differentiated into many other types of cells besides blood cells.
In this study, we are going to investigate the genes involved in NK cell differentiation from HSC. Then, using these genes we are going to modulate NK cell differentiate for customized NK cell therapy.

Specific aims:
1. NK cell differentiation From HSC to NK cells
2. Identification of genes involved in NK cell differentiation
   1) SAGE
   2) DD-PCR
3. Investigation of functions of NK differentiating genes
   1) RNAi
   2) in vitro functions
   3) in vivo functions
4. customized NK cell therapy
   1) Optimization of NK differentiation
   2) NK cell therapy

To accomplish these specific aims, we are going to identify the novel genes which are involved in NK differentiation. Then their *in vitro* and *in vivo* functions will be investigated.

C O N T E N T S

1. Introduction

2. Present research status in foreign and our country

3. Contents and results

4. Accomplishment of research proposal

5. Application of results

6. Scientific information collected from foreign country

7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 목적

살상 능력과 다양한 면역조절 기능을 가지고 있는 Natural Killer (NK) 세포의 분화에 관련하는 유전자군의 대량발굴 및 기능 분석을 통해, NK 세포 분화조절 유전자를 발굴하며, 나아가 이들 분화조절 유전자를 이용하여 NK 세포의 분화조절 기술을 확립하고 나아가 암특성에 따른 맞춤 면역 암치료법을 개발한다.

1. NK 세포 분화 기술확립
2. NK 세포 분화 관련 유전자 동정
3. NK 분화유도 유전자의 기능 규명
4. 분화 유전자를 이용한 NK 분화 최적화 기술개발 및 맞춤 면역 암치료법 개발

년도	세부연구목표	가중치 (%)	평가의 착안점 및 척도
1차년도 (2002.10-2003.6)	◦NK 배양 및 분화 기술확립	50	NK primary 배양여부 HSC에서 NK 단계별 분화 system 확립여부
	◦NK 분화관련 유전자 동정 (I)	50	NK 단계별 DD-RT-PCR 여부(5종) NK 단계별 SAGE 여부(500종)
2차년도 (2003.7-2004.3)	◦NK 분화관련 유전자 동정 (II)	60	NK분화유도 유전자 expression cloning 여부 NK 분화유전자 확보 (10종)
	◦NK 분화유도 유전자 기능 규명 (I)	40	RNAi system 확보여부 분화유전자의 in vitro 기능동정 여부
3차년도 (2004.4-2005.3)	NK 분화 기능조절	50	NK 분화 기능 조절 여부
	NK 유전자 조절 기능	50	NK 분화조절 유전자의 기능 조절 여부 (2종)
최종(단계)평가	◦NK 분화유도 유전자 기능 규명 (II)	60	분화 유전자 발굴 (10종) 및 기능 규명여부 (2종)
	◦NK 분화 최적화 기술 개발	40	분화유전자를 이용한 NK 세포의 분화능력 검정여부 다른 분화유전자와 혼합효과 측정여부 (1개)

2절 연구개발의 필요성

○ 기술적 측면

인체는 60조에서 100조에 이르는 세포들로 구성되어 있는데, 세포들은 모두 똑같은 유전자를 가지고 있으나 세포마다 실제로 기능하는 유전자는 달라 뼈세포, 혈액세포, 심장세포 등 모양과 기능이 다른 210여 가지의 세포로 분화된다. 그런데 난자와 정자가 합쳐져 수정란이 생긴지 5-6일 뒤에 나타나는 세포들은 아직 유전자의 어떤 부분이 기능할지 정해지지 않아 어떤 종류의 세포로도 분화될 가능성을 갖고 있다. 이것을 배아 줄기세포 (embryonic stem cell) 라고 하는데 생체내의 모든 세포로 분화할 수 있는 능력을 가졌기 때문에 전분화능 (totipotent) 세포로도 불리운다. 이 전분화능 세포는 하나의 세포로부터 특이한 세포 또는 기관으로의 분화가 가능하여 줄기세포를 이용한 기관이식 (organ transplantation) 또는 세포 대체요법 (cell therapy)의 치료에 지대한 관심을 모으고 있다. 배아 줄기세포를 이용하여 당뇨병 환자에게 인슐린을 발현하는 췌도나 베타세포를 이식하거나 Parkison's disease에 신경세포를 대체시켜 질병 치료를 가능하게 하고 손상되거나 병든 기관은 대체 이식하는 것도 가능할 것이다.

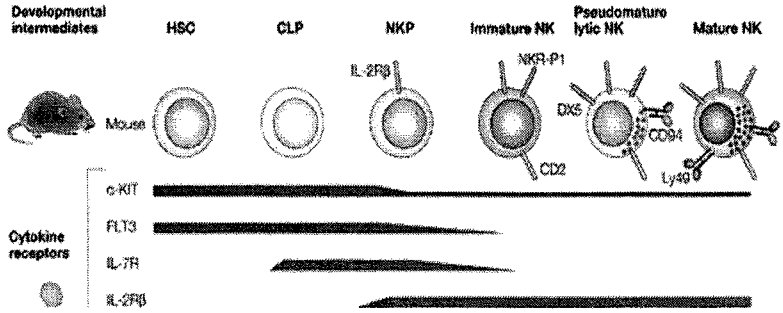
또한 인간의 배아뿐만 아니라 성체의 여러 기관 (organ)에서도 분화능과 자가 재생능 (self-renewal) 을 가진 성체 (adult) 줄기세포가 발견되는데, 배아줄기세포보다는 더 분화된 상태로 그 분화 범위가 특정 장기나 조직의 세포로 제한적이므로 다능성 (pluripotent) 세포라 불린다. 이는 특정기관의 세포로만 분화가 한정되어 있다고 알려졌으나 최근 2-3년 동안 성체 줄기세포도 배아 줄기세포와 마찬가지로 다른 장기의 세포를 만들 수 있다는 가능성도 제시되었다. 1998년 조혈모 세포가 근육 세포로 바뀔 수 있다는 결과가 보고된 이래 (Science 1998, 279:1528-1530), 신경 줄기세포에서 혈액 또는 근육세포로 (Science 1999, 284:534-537), 조혈모 세포에서 간세포 (hepatic cell) 로도 분화된다고 보고되었다 (Nature Med 2000, 6:1229-1234). 또 쥐의 피부에서 분리한 줄기세포가 신경, 근육, 지방세포로 분화 할 수 있다는 보고도 있었다 (Nature Cell Biology 2001, 3:778-784). 이 같은 성체 줄기세포의 성질을 잘 이용할 수 있다면 배아 줄기세포의 연구에서 오는 윤리적 문제를 피할 수 있고 타인의 장기 이식에 따른 거부 반응의 문제를 해결 할 수 있어 성체 줄기세포에 대한 활발한 연구가 요구되고 있는 실정이다. 그러나 아직도 성체 줄기세포의 다능성은 배아 줄기세포에 비해 미지수이고 그 수가 희귀하여 임상적용을 위해서는 해결해야 할 문제점으로 지적되고 있다.

성체줄기세포중 하나인 조혈줄기세포 (hematopoietic stem cell)는 혈액을 구성하는 모든 세포 (적혈구, 백혈구, 혈소판 및 림프구)로 분화 할 수 있는 세포로 생체의 면역체계를 구성하는 세포들은 주로 골수에 있는 조혈줄기세포로부터 지속적으로 자가 재생된다. 조혈 줄기세포는 태아의 발생 3주에서부터 혈섬 (blood island) 이라는 간세포가 나타나서 이들에 의해 조혈활동이 나타난다. 출생 전까지는 간(fetal liver)에서 조혈활동이 일어나다가 출생후에는 간에서 조혈활동이 정지되고 골수에서 조혈활동이 전적으로 일어난다. 조혈 줄기 세포는 자극인자에 의해 성장을 하는데 알려진 자극인자로는 적혈구계에 작용하는 Erythropoietin, 과립구/대식세포계에 작용하는 GM-CSF 등이 있다. 또한 Flt-3

ligand, SCF, IL-3, IL-6, IL-7, IL-1등의 cytokine들과 GATA-2, Ikaros, Pax-5같은 전사조절인자 (transcrpiton factor) 들도 조혈줄기세포들의 성장과 유지에 관여하는 것으로 알려지고 있다. 현재, 조혈줄기세포는 골수이식을 통하여 암이나 여러 혈액질환의 치료에만 사용되고 있으나 최근에는 동물모델에서 조혈줄기세포가 근육, 신경, 뼈와 같은 다른 형의 세포로도 분화가 가능하다고 보고되고 있어 이를 인간세포에 적용한다면 조혈줄기세포가 다양한 세포와 조직을 대체할 수 있게 됨으로써 당뇨병, Parkinson's disease, 척수손상을 비롯한 많은 질환의 치료를 가능하게 할 것으로 기대된다.

한편 조혈줄기세포로부터 림프계 전구체 (precursor)와 myeloid계 전구체가 발생하게 되는데 림프계 전구체는 분화하여 NK 세포, B 세포, T 세포로 발달하게 되고 (Nature 2000, 404: 193-197), myeloid계 전구체는 호중구 (neutrophil), 호염구 (basophil), 호산구 (eosinophil), 단핵구/대식세포 (monocyte/macrophage), 혈소판(platelet), 적혈구(red blood cell)로 분화한다 (Cell 1997. 91:667-672). Common lymphoid progenitor의 초기분화에는 IL-2, GM-CSF와 같은 cytokine 뿐만아니라 전사조절인자로써 GATA-2, Ikaros가 progenitor의 증식과 생존에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히, Natural killer (NK) 세포는 lymphocyte의 한 population이며 형태학적으로 세포질에 큰 과립을 가지는 세포 (large granular lymphocyte: LGL)로 혈액내 림프구의 약 10 - 20 %를 차지하며 T 세포 수용체, CD4, CD5 또는 면역글로불린 같은 세포표면수용체를 가지고 있지 않아 기존의 T림프구와 B림프구로부터 분리되는 독특한 림프구이다. 이들 세포들은 혈액이외에도 골수 (bone marrow), spleen, peritoneal exclude, liver, lung등에 존재하며, 일반적인 조건에서는 lymph node나 lymphatics에는 존재하지 않으나 염증반응시 이들 조직에서도 존재하는 것이 보고되었고 development는 골수에서 진행된다. 주요기능으로는 종양세포를 살해할 수 있는 능력을 가지고 있다고 알려져 있고 또한 바이러스 감염세포에 세포독성을 나타내고, 세균과 진균을 살해하는 능력을 가지고 있기 때문에 항종양 면역과 미생물에 대한 보호면역에 대하여 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. NK세포는 병원균, 암, allogeneic cell등을 제거하는 innate immunity에 관여하며, TNF-α, IFN-γ, IL-12등의 cytokine을 분비하여 adaptive immunity를 매개함으로써 암특이적인 memory 형성을 조절하는 기능을 가지고 있다 (Nature Immunol. 2002). 또한 NK세포는 perforin에 의한 용균 (lysis)을 할 수 있으며 IFN-γ와 TNF-α, GM-CSF와 MIP-1a/b를 생산한다. IFN은 세포독성을 활성화하고 성장을 매개하진 않으며 IL-12는 IFN생산을 유도한다. 또한 CD16의 발현을 통해 항체의존성 세포매개 세포독성(ADCC)기능도 밝혀졌다. 세포표면분자의 발현은 mouse의 경우 DX5 또는 NK1.1 세포표면분자를 세포특이적으로 발현하며 human의 경우는 CD56을 발현하고 human과 mouse 공통적으로 asialo-N-tetrasylceramide (AGM1)을 발현한다. NK세포의 발생은 태아흉선 (fetal thymus)에서 파생되어 골수에서 점진적인 분화단계를 거쳐 최종분화된다 (J. Immunol. 1995, 154:1653-1663).

Fig. 1. 조혈줄기세포로부터 NK 분화 단계



Nature Review Immunol (2003) 3:413

NK세포는 lineage (Lin)$^-$, c-kit$^+$, Sca-2$^+$ progenitor로 부터 NK1.1$^+$ 한 NK precursor세포로 분화과정중 IL-7, SCF, flt3-L, IL-15등이 필요하다 (Fig. 1. Nature Review Immunol. 2003). NK세포도 T세포와 마찬가지로 type 0, 1 (IFN-γ$^+$)과 2 (IL-13$^+$)의 세포로 나뉘는데 2→0→1의 분화단계를 거친다 (Nature Immunol. 2001). 즉, IL-2 receptor β chain+ (CD122$^+$) 골수세포가 NK세포 Lineage로 분화하게 되고 NK 전구체는 *in vitro*의 적당한 조건하에서 성숙한 lytic NK1.1+세포로 발전하며 IL-15Rα, Id2, GATA-3, Ets-1, 2B4를 발현한다고 알려져 있다 (J.I. 2001. 31: 1900-1909). NK세포의 증식과 활성화에는 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18이 관여한다고 알려져 있으나, knock out mouse 연구에 따르면 IL-2가 아닌 IL-15이 NK ontogeny에 중요하고 (Science 1993, 262:1059-1061), IL-2Rβ (J. Exp. Med 1997, 185:499-505)나 γ-chain 유전자가 없는 mouse에서 NK세포가 결여되어 있다고 보고되었다 (Proc.Natl.Sci.USA 1995, 92:377-381). 또한 IL-7 이나 SCF와 같은 cytokine도 NK세포 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다 (Blood 1997, 89: 4005). Mature한 NK 세포는 IL-12, IL-18들의 cytokine으로 더욱 활성화된다. 한편, NK 수용체는 대부분 NK세포의 기능에 대한 억제효과를 나타내며 autologous MHC를 높게 발현하는 정상적인 자가세포로 부터의 공격을 방지한다고 알려져 있는데, 이 inhibitory MHC 수용체의 참여가 NK 분화의 신호를 제공하고 (J. Immunol. 2000, 165: 91) 골수로부터 NK세포분화에 NK 수용체들의 순차적 발현이 중요하다고 알려졌다 (Eur. J .Immunol. 2000, 30: 2074-2082). NK세포는 표적 (target) 을 인식하는 여러 가지 수용체들을 발현하는데 MHC-I를 인식하여 저해 신호를 받는 KIR (human), Ly49 (mouse)를 발현하고 NK 활성화 수용체인 CD16, NKRP, NKG2D를 발현하여 저해신호와 활성화 신호간의 cross-talk이 매우 중요하다 (Nature Review 2001, Natue Immunol. 2001). In vivo의 NK maturation에서 (Nature Immunol. 2002, 3: 523), 초기 mouse NK세포는 CD122 (IL-2, IL-15β)를 발현하는데 NK1.1 (C57BL/6)는 초기에 발현되지 않고, mature NK세포에서 DX5 (α2β2, β2 intergrin)과 Mac-1 (CD11b)을 발현하는 것으로 보고되었다. Mac-1은 NK세포에서 발현되나 T 또는 NKT세포에서는 발현되지 않는다. NK 분화에는 두 가지의 전사조절인자 Id2 와 Ets-1이 중요하다고 알려져 있다 (Nature Immunol. 2001). Id family는 Id1, Id2, Id3, 와 Id4가 있는데 Id는 HLH (helix-loop-helix)를 가지고 있으나 basic domain이 없는 dominant negative의 역할을 한다. Id2는 basic helix-loop-helix 전사조절인자 (bHLH)의 inhibitor로 bHLH와 결합하여 bHLH의 기능을 저해한다. bHLH 는 NK 세포의 분화를 저해하고 Id2의 발현은 bHLH의

기능을 저해하여 NK 세포의 분화를 유도하는 것으로 추측하고 있다. Neuronal 세포의 분화단계에서 Id2의 발현은 변하는데 초기단계에서는 Id2가 활성화되어 있고 분화단계에 따라 발현이 감소된다. Id2의 knock-out mouse는 정상의 경우에 비해 약 10% 정도의 NK세포를 가지고 있다.

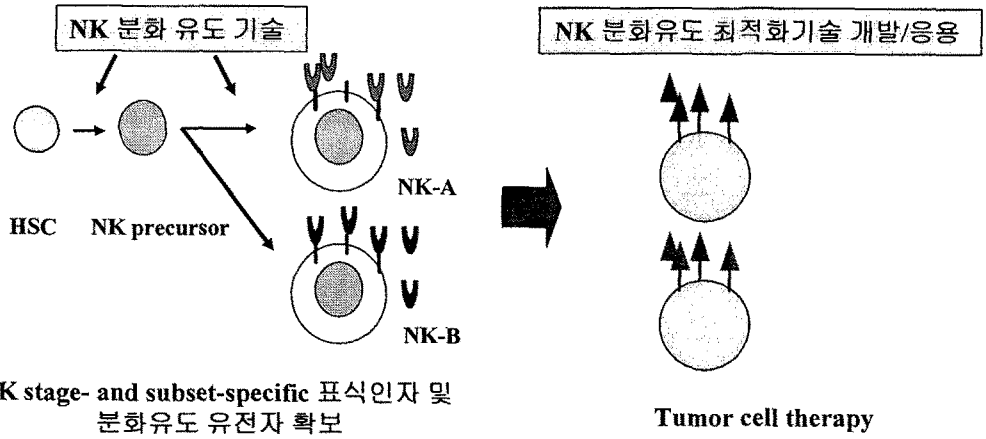


Fig. 2. NK 세포의 분화유도기술 개발

NK세포의 분화와 활성의 결함은 유방암, 흑색종암, 폐암등 다양한 질병들과 관련되어있음이 보고되었다. 따라서 이러한 질병들의 치료 요법으로써 NK의 살상능을 이용한 LAK (lymphokine activated killer cell)과 TIL (tumor infiltration lymphocytes)은 solid tumor나 donor lymphocyte infusion이 있는 면역치료법에 효과적이고 골수이식이나 장기 이식시 발생하는 거부반응을 방지하기 위한 세포요법이 응용되고 있다. 줄기세포로부터 NK세포로의 분화기작을 규명한다면 다른 세포들의 분화에 대한 이해에도 도움이 되어 NK세포를 임의대로 조작할 수 있는 기반을 구축하여 보다 효율적인 치료효과가 기대된다. 그러나 현재까지 NK 분화의 분자적인 조절에 대해서는 아직 분명하게 밝혀지지 않고 있어 줄기세포를 이용하여 NK세포의 유도와 그 치료적 응용을 위해서는 NK세포로의 분화 과정을 이해하는 것이 우선적이라 하겠다.

따라서 본 연구에서는 1단계의 연구를 통해, 조혈줄기세포로부터 NK 세포로 분화되는 배양기술을 동물과 인간줄기세포 시스템을 확보하였고, NK로 분화되는 동안에 관여하는 새로운 유전자들을 SAGE (Serial analysis of gene expression), DD-PCR (differential display-polymerase chain reaction)을 통해 대량발굴 하였다. 2단계에서는 이들 분화 유전자의 기능을 *in vitro* 배양을 통해 그 분화기전을 규명하고자한다. 또한 이들의 작용기작을 연구하기위해 각각의 신호전달과정을 연구할 예정이다. 이러한 기본 기술을 인간 배아세포주로부터 NK세포로의 분화 유도에도 적용하여, 그 분화 유전자의 기능을 규명함으로서 NK세포의 분화에 대한 최적화 기술을 개발하고 응용하여 궁극적으로 인간의 세포 치료요법에 적용을 용이하게 하고자 한다 (Fig. 2).

○ 경제 · 산업적 측면

새로운 줄기세포 분화유전자 및 표적 유전자 개발은 줄기세포 활용을 통한 새로운 치료법을

개발하는 근본적인 연구로 앞으로의 분화기술을 개발하는데 많은 경제적 부가가치를 기대한다. NK세포는 암치료 등에 널리 활용되는 면역세포로 분화기술을 이용하여 원하는 NK세포를 조절하여 얻는다면 많은 난치병 치료에 적용이 가능하다. 또한 새로운 표적 유전자 발굴을 통해 세포의 분화와 성장에 관련된 새로운 분야의 산업을 개발할 수 있다.

○ 사회·문화적 측면

줄기세포에 대한 연구는 사회적으로 많은 관심을 끌어 왔다. 배아줄기를 이용한 연구는 그 자원이 인공수정 후 얻은 냉동 배아나 유산된 태아로 이들을 하나의 생명체로 보아야 한다는 견해로 윤리적 종교적으로 논란의 대상이 되고 있다. 이런 상황에서 아무런 제재 장치 없이 인간 배아줄기 세포 연구를 허용한다는 것은 큰 사회적 갈등을 일으킬 수 있다. 만약 조혈줄기세포에서 원하는 세포로의 분화를 효과적으로 유도하거나 기존의 확립된 배아줄기세포주로부터 원하는 세포로의 분화를 유도해낼 수 있다면 이런 사회적 갈등에서 벗어 날 수 있을 것이다. 따라서 줄기세포 기술의 남용을 막기 위해서는 긍정적인 사용 모델이 제시되어야 하는데, 이러한 점에서 NK세포 분화기술은 암등의 난치성 질환 치료에 적용할 수 있는 좋은 모델이 될 것이다.

3절. 연구개발의 범위

본 연구에서는 NK 세포의 분화단계별로 유전자 발현을 동정하고 이들 유전자의 기능을 in vitro와 in vivo에서 규명하고 나아가 이들을 이용한 NK 분화 조절 기술을 확립하여 암치료를 위한 맞춤 면역 세포 치료법을 개발하고자 한다. 연구내용은

1. NK 세포 분화 기술확립
   HSC에서 NK cell 분화
2. NK 세포 분화 관련 유전자 동정
   1) SAGE
   2) DD-PCR
3. NK 분화유도 유전자의 기능 규명
   1) RNAi를 이용한 유전자 기능 규명
   2) in vitro NK 배양을 통한 유전자 기능 규명
   3) Retrovirus를 이용한 in vivo 유전자 기능 규명
4. 분화 유전자를 이용한 NK 분화 최적화 기술개발 및 맞춤 면역 암치료법 개발
   1) 분화 유전자의 발현을 통한 NK 분화 최적화 기술
   2) 분화유도 인자를 이용한 NK 암치료법 개발

제 2장 국내외 기술개발 현황

Hematopoietic stem cell (HSC)은 전체 골수세포중, 0.01-0.05%로 $CD34^+$, $Thy\text{-}1^+$, $c\text{-}kit^+$, $Sca\text{-}1^+$의 표현형 (phenotye)을 나타내며 blood (mesoderm), muscle cell, liver cell, GI cell (endoderm)등 여러종류의 세포로 분화되는 것으로 알려져 있다 (Science 1995, 265:1098-1101). 줄기세포의 분화능에 있어서 embryonic stem cell (ESC)은 totipotential 하고 HSC은 transdifferentiate 할 수 있어 blood나 muscle, liver cell등으로 최종분화할 수 있는 것으로 알려져 있으나 아직도 한 clone이 다른 종류의 organ으로 분화할 수 있는가 (totipotential/transdifferentiation)에 대한 확실한 증거는 부족하다 (Nature Immunol 2002, 3:311).

Human HSC는 주로 골수에 존재하지만 peripheral blood (PB) progenitor나 umbilical cord blood (UCB)가 에서도 발견된다. mouse HSC는 Lin^-, $c\text{-}Kit^+$, $Thy\text{-}1^+$로 구분되고 mouse HSC는 $CD34^+$가 항상 발현되지는 않는다. HSC의 ontogenic 한 차이가 있는데 murine fetal liver의 HSC가 BM의 HSC보다 증식성이 크고 인간 UCB가 BM보다 0-50배의 xenoplantation 가능성을 가지고 있다. 일반적으로 젊은 HSC가 혹은 fetal UCB가 더욱 자가재생능력을 가지고 있고 SCF나 G-CSF가 long-term population을 유지시킨다. HSC의 증식에는 microenvironment의 signal과 stroma로부터 분비되는 factor들이 중요하고 cytokine, glycosaminoglycans, bone morphogenetic proteins, hedghog protein, Notch family 등도 HSC 증식을 유도하며 LTRC를 유도하는 것으로는 jagged-1, Dlk등이 있다고 알려져 있다.

Ex vivo expansion의 장점은 1) chemotherapy나 transplantation이후 hematopoietic recovery의 시간을 줄임, 2) LTRC의 component를 증가시킴, 3) graft로 인한 cancer cell을 제거, 4) LTRC의 유전적 변형 등이다. Ex vivo expansion은 cytokine이나 stroma를 이용하여 시도하는데 대부분의 HSC은 Go 상태이고, β1 integrin이나 CXCR4의 발현이 증가한다. *In vitro*에서는 apoptosis의 증가, FasL의 증가와 bcl-2의 감소가 있다. 최근에는 Hoxb4의 과 발현이 in vivo에서 expansion을 유도한다고 보고되었다 (Cell 2002, 109:39-45).

HSC는 두가지 특징을 가지고 있는데 self-renewal, hematopoietic differentiation의 특징을 가지고 있다. Muscle cell도 HSC로, dedifferentiation or transdifferentiation하는가의 대답의 하나의 가정은 stem cell-like cell들이 BM에 있다는 것이다: mesoderm, hemagioblast, HSC등이 있고 분리한 세포 CD34+ cell은 heterogeneous하여 분리 정도에 따라 다른 세포로 분화될 수 있다(Nature Immunol Review 2002). HSC의 heterogeniety 때문에 실제로의 gene therapy가 사용되기에 어려움이 많다. Retroviral vector를 사용할 때 세포가 성장하도록 stromal cell, cytokine을 처리한 후 사용한다. Mice의 실험결과를 human에 사용하는데 어려움이 있었고 최근에 human을 이용한 결과가 나오기 시작한다 (Nature Immunol Review 2002). Lentivirus를 이용한 gene therapy: non-dividing, dividing 세포에 사용가능. clinical use에는 아직 어려움 (pathogen, validation 등)이 있다. In vivo transfer는 transfection, target 등의 어려움, transcription을 조절하는

regulatory element를 이용한 특이한 분화세포에 발현시키는 방법의 고안 필요하다 (transcriptional targeting). Stem cell gene therapy 와 lymphocytes gene therapy (stem cell: long-term engraftment/ expansion potential)가 장점이고 gene delivery susceptibility, BM의 space 한정등이 제한적인 면이다). Cancer cell의 Immuno-gene therapy 등에 활용가능하고, BM의 DC를 이용하는 전략으로 stem cell에 gene transfer한 후 DC로 분화되어 long-term으로 APC의 역할을 담당한다. Autoimmune disease에 적용하여 TH1, TH2 cytokine의 균형을 조절한다. Anti-idiotypic vaccine, IL-10, TGF-β 등을 이용한 치료법 개발에도 활용 가능하다.

국내 연구진도 잇달아 줄기세포에 관한 연구성과를 내고 있다. 한양대 의대 이상훈 교수는 미국국립 보건원(NIH)내 신경질환 뇌졸중연구소(NINDS) 김종훈 박사, 미국 연구진과 함께 생쥐 실험을 통해 배아줄기세포가 파킨슨병 등 뇌질환 치료에 유용하다는 사실을 확인하고 nature지에 발표했다. 연구진은 쥐 배아 줄기세포에 신경세포 분화에 관여하는 Nurr1 이라는 유전자를 넣어 과 발현시키고, 몇몇 단백질을 배양에 사용해 신경전달물질인 도파민을 만드는 도파민성 신경세포를 80%가 넘는 순도로 배양해 냈다. 이렇게 만든 신경세포를 파킨슨병에 걸린 쥐의 뇌에 이식한 결과 이 신경세포들이 주변 뇌세포와 연결(시냅스 형성)되면서 도파민을 생산했고 파킨슨병 증상도 점차 호전됐다는 것을 확인했다. 이번 연구는 배아줄기세포를 파킨슨병 치료에 활용할 수 있다는 가능성을 제시한 것이다. 오일환 가톨릭의대 교수는 캐나다 코니 이브스 교수와 공동으로 대표적 성체 줄기 세포인 골수 줄기세포를 몸에 이식했을 때 이들 줄기세포의 생착, 증식에 관여하는 핵심 유전자가 'STAT3' 임를 밝혔다. 이번 연구에서 생쥐 골수에서 추출한 줄기세포에서 유전자 기능을 제거 한 뒤 이를 다시 생쥐 골수에 이식한 결과 골수 재생능력이 크게 떨어진 것을 확인했고 STAT3를 활성화할 수 있다면 이식한 줄기세포 생착률을 크게 높일 수 있다는 점에서 가능성을 제시하였다.

NK 세포와 DC는 innate immunity에서 각각의 기능을 위해 특화된 cell type으로 소개되었으나 아직까지 그들의 상호관계에 대해서는 많이 알려지지 않았다. 초기의 DC와 NK cell의 관계는 NK cell이 DC를 죽이는 현상에 초점을 맞추어 관찰되었다. IL-2로 in vitro 배양된 NK cell은 iDC를 죽이는 것이 보고되었고 MHC class I이 증가되어 발현된 mDC는 autologouse NK cell로부터 살아남는 것이 보고되었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절 NK 세포 분화기술 확립

8-12주령 된 쥐 (C57BL/6)로부터 전체 골수세포를 얻어서 이들 세포를 고장액으로 적혈구를 제거하고 biotinylated antibody cocktail for lineage (CD11b, Gr-1, B220, NK1.1, CD2, TER-119, CD3)를 가하여 반응시킨 후 streptavidin-microbeads을 가하고 반응시킨 후 magnetic column을 Super MACS에 장착하고 준비된 세포를 통과시켜 Lineage depletion을 행하고, 세포를 c-kit microbead와 반응시켜 다시 MACS을 수행하여 (Fig1) 최종적으로 Lin-, c-kit+인 95% 이상의 순수한 조혈줄기 세포를 분리하였다 (Fig.2).

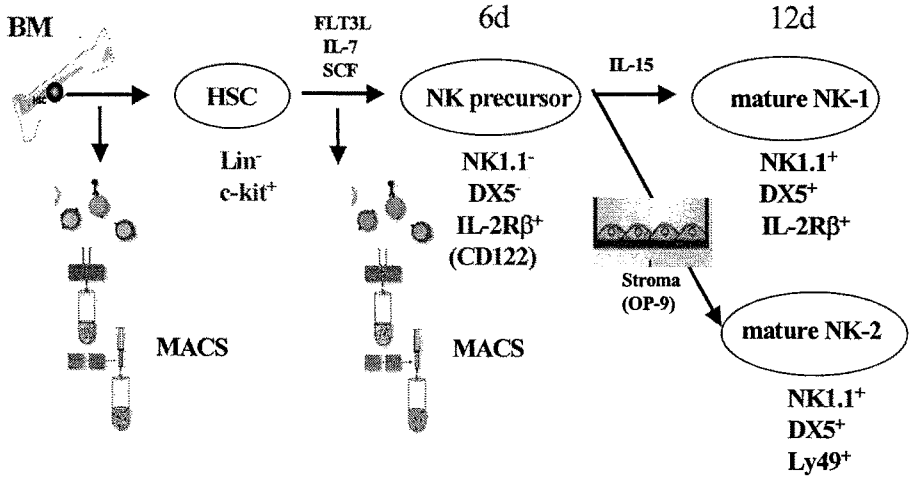


Fig.1. NK cell differentiation from mouse HSC

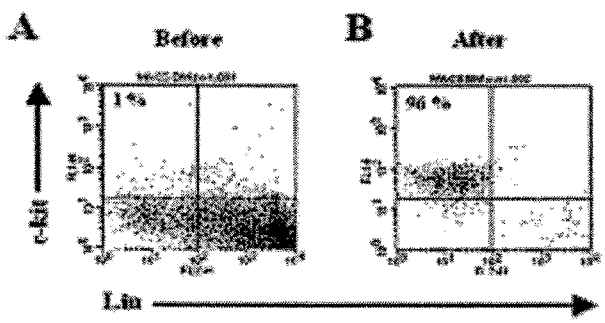


Fig. 2. Purity of HSC from BM cells after MACS column

이렇게 분리된 조혈줄기 세포를 NK precusor 세포로 분화시키기 위해 mouse stem cell factor (30ng/ml), Flt-3 ligand (50ng/ml), mIL-7 (0.5ng/ml), Indometacin (2μg/ml), Gentamycin (2μg/ml)이 첨가된 RPMI1640 배지로 3일마다 배지의 절반을 새롭게 갈아주면서 6일 동안 배양하였음. 이후 pNK 세포로 분화한 세포들을 얻기 위해서 CD122-FITC antibody를 첨가시켜 반응시키고 Multisort microbead와 반응시켜 MACS을 수행함으로써 CD122+한 세포를 얻었음. 이렇게 분화 시켜 얻은 pNK 세포의 일부는 purity을 알아보기 위해 pNK 세포의 marker 인 CD122, CD117과 FIT-3L등을 이용, FACS 분석을 통해 CD122+ 한 pNK 세포임을 확인하였다 (Fig. 3).

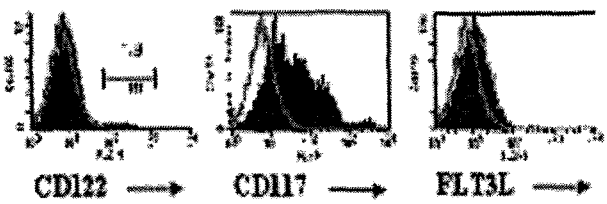


Fig. 3. differentiation of HSC into NK progenitor cells

나머지 세포는 mNK 세포로 분화시키기 위해서 또다시 6일 동안 IL-15 (20ng/ml), Indometacin (2μg/ml), Gentamycin (2μg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 배지를 이용하여 2가지 방법으로 mNK 세포를 분화시켰는데 stromal cell (OP9 cells)와 coculture 하여 mNK로 분화시키는 방법과, stromal cell (OP9 cells)과 coculture 하지 않고 mNK세포로 분화시키는 방법을 수행하였음. 이렇게 배양한 세포를 각각 harvest하여 NK1.1-FITC antibody를 첨가시켜 반응시키고 Multisort microbead와 반응시켜 MACS을 수행함으로써 NK1.1+한 mNK세포를 얻을 수 있었다. 특히 stromal cell (OP9 cells)과 coculture 하여 IL-15을 넣고 배양하여 분화시킨 mNK는 널리 알려진 NK세포와 관련된 maker들, 즉 NK1.1과 Ly49 NK 세포 수용체를 발현하고 있음을 FACS 분석을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

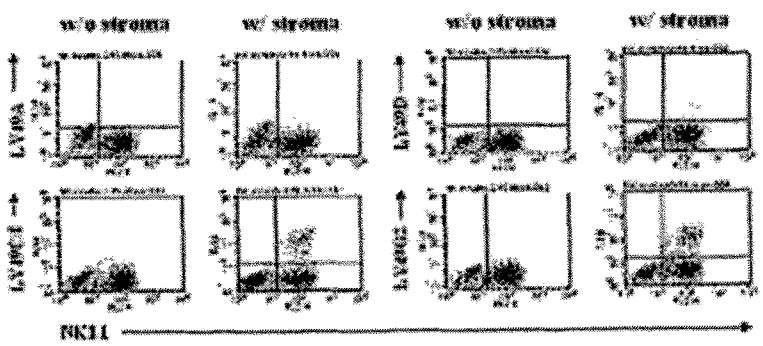


Fig. 4. Comparison of NK differentiation with or without stromal cell, OP9 cells

따라서 조혈줄기세포를 이용하여 여러 가지 cytokine을 통해 그리고 stromal 세포와의 coculture를 통해 NK세포로 분화시키는 *in vitro* system을 pNK세포부터 발현되는 CD122와 mNK세포에서만 발현하는 perforin의 발현을 통해서 다시 한번 분화조건 확립을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

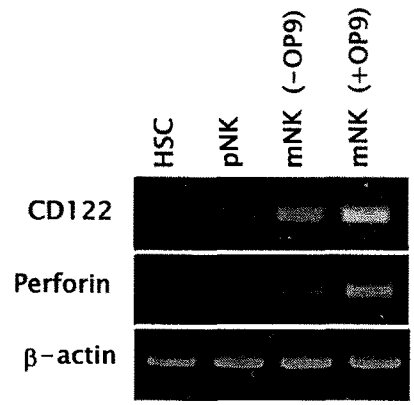


Fig. 5. Expression of representative NK cell associated gene from cells in the different stages during NK cell differentation

2절. SAGE를 이용한 NK분화관련 유전자의 발굴

조혈줄기 세포로부터 NK세포로 분화하는 과정 중에 각각의 stage에서 특이하게 발현되는 유전자의 정보를 알고자 본 연구팀은 SAGE (serial analysis of gene expression)을 수행하였음. 우선 8-12주령 된 생쥐 (C57BL/6)로부터 전체 골수세포를 얻어서 이들 세포를 고장액을 이용, 적혈구를 제거하고 biotinylated antibody cocktail for lineage (CD11b, Gr-1, B220, NK1.1, CD2, TER-119, CD3)를 가하여 반응시킨 후 streptavidin-microbeads를 가하고 반응시킨 후 magnetic column을 Super MACS에 장착하고 준비된 세포를 통과시켜 Lineage depletion을 수행한 결과 4×10^7 Lin- 세포를 얻었다. 이렇게 얻은 세포를 c-kit, Multisort microbead와 반응시켜 다시 MACS을 수행하여 최종적으로 1.5×10^7 Lin-, c-kit+인 조혈줄기 세포 (HSC)를 분리하였고, 그 HSC를 mouse stem cell factor (30ng/ml), Flt-3 ligand (50ng/ml), mIL-7 (0.5ng/ml), Indometacin (2μg/ml), Gentamycin (2μg/ml)을 첨가한 RPMI1640 completed media로 3일마다 배지의 절반을 새롭게 갈아주면서 6일 동안 배양하여 pNK를 얻었고, 또 이것을 IL-15와 stromal cell(OP9 cell)과 coculture시켜 얻은 mNK 세포, IL-15만을 첨가하고 stromal cell과 coculture하지 않고 얻은 mNK 세포를 얻었음. 이렇게 각 단계마다의 세

포, 즉 HSC, pNK, mNK with OP9 cell, mNK without OP9 cell를 얻어 각각 SAGE tag을 만들었다 (Fig. 6).

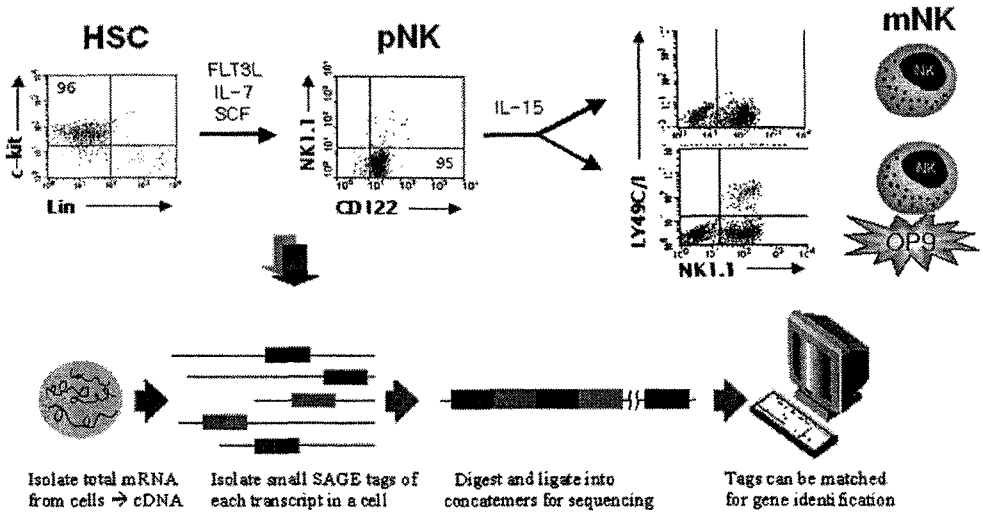


Fig. 6. Generation of SAGE tags from the indicated cells during NK cell differentiation

이렇게 각 분화 단계의 세포로부터 만들어낸 SAGE tags들을 sequencing 하여 알아본 결과, mouse HSC로부터 44,998개의 individual SAGE tags들을 얻었고 이들 중 총 19,380개가 unique SAGE tags임을 알게 되었음. 또한 mouse pNK 세포로부터는 40,771개의 individual SAGE tags를 얻었고 그중 17,745개의 unique SAGE tags를 얻었다. 한편, stromal cell (OP9 cells)과 coculture 하여 분화 시켜 얻은 mNK 세포로부터는 42,535개의 individual SAGE tags을, stromal cell (OP9 cell) 없이 분화시켜 얻은 mNK 세포로부터는 42,160개의 individual SAGE tags 얻었고 그중 각각 20,791개, 20,803개가 unique SAGE tags로 확인되었다 (Table 1).

Table I. A summary of SAGE for different stages in NK differentiation

Cells	No. tag	unique transcript	unique genes
HSC	44,998	19,830	12,899
pNK	40,771	17,745	11,684
-OP9	42,160	20,803	13,650
+OP9	42,535	20,791	14,335
Total	170,464	59,657	35,385

이들 SAGE tag을 이용하여 각 stage에서 특이적으로 많이 발현 하는 유전자를 발굴하고자 각 HSC, pNK, stromal cell과 coculture 하여 분화시킨 mNK (with OP9 cells), stromal cell과 coculture 하지 않고 분화시켜 얻은 mNK (without OP9 cells)에서 얻은 각각 tag들 중 copies 수가 100 copies 이상 되는 high copies tags들을 살펴보았다. Copy 수가 높은 tags들은 각각의 세포에서 많은 양으로 발현되고 있는 유전자에 matched 되는 것이므로 그 tags 들이 어떤 유전자에 match되는지를 알아보는 것이 중요하다. 여기서 SAGE 방법의 한계점이 나타나는데 그것은 이런 tags 들이 10bp로 짧은 sequences이기 때문에 이런 tags들은 여러 유전자에 match 된다는 것임. 그래서 이런 문제점을 극복하기 위해서는 GLG I(generation of longer cDNA fragments from SAGE tags for gene identification) technique을 이용하여 그 문제를 해결해야 한다. GLGI technique은 한 개의 SAGE tags이 여러 sequences와 match되는 것을 그 중 한 개의 정확한 sequence와 일치 됨 을 확인 할 수 있는 방법일 뿐 아니라 match되지 않는 SAGE tags 으로부터 novel genes 의 characterization에도 유용한 방법이다. 우선 각각의 HSC, pNK, mNK (with OP9 cells), mNK (without OP9 cells)의 SAGE tag중 100 copy 이상 되는 tag들을 정리하여 이들 중 pNK에서 특이적으로 발현되는 유전자들을 발굴하여 Table 2에 정리하였다.

Table 2. Top genes expressed in mouse pNK cells.

SAGE tag	Copy	NO.matched UniGene cluster	(GENE BANK ID)
TGTCAGTCTG	1321	2	BC002069 BC019611
TCAGGCTGCC	962	5	BC012314 NM_010239 M24509 J03941 X12812
CCCTGGGTTC	413	17	
ATAGCCCCAA	366	5	NM_021281 BC002125 AJ002386 AJ223208 AF038546
TCAGCTGCCT	259	2	X87096 NM_007529
CCTCAGCCTG	192	5	BC019682 X52886 X53337 NM_009983 AK093885
GTGTTCTTTC	189	8	
CATCGCCAGT	187	6	
GTGGCTCACA	182	115	
ATGTGGTGTG	175	6	
GTTCAAGTGA	164	4	AK002232 BC003476 AK020607 X00496
CCTGGGTTCT	146	0	EST
CCTGAGCTCC	136	4	NM_053110 BC026375 AF322054 AJ251685
TATTCCCCAT	132	2	BC013341 AK020799
AACAATTTGG	130	6	
TGTCATCTAG	127	3	AK011041 AK011043 AK010985
GATTGAGAAT	125	9	
CTGCCCCCCG	123	2	X03479 AK010675
AACTGAGGGG	119	3	AK093881 U27340 BC030842
TAGTTACTTA	115	0	EST
TGGGTTGTCT	114	2	X06407 NM_009429
GGCTTCGGTC	113	2	AK007832 AK010656
GCTGCCCTCC	113	0	EST
CCTTGCTCAA	109	5	AK013676 BC002072 AK002438 NM_009976 M59470
TTTTCAAAAA	109	4	AK019389 AK020632 X01838 NM_009735
TCAGGCTGCT	107	0	EST
GCCTTTATGA	100	10	

pNK세포의 경우 100 copy이상 되는 tag들은 27개, mNK (with OP9 cells) 세포는 29개, mNK (without OP9 cells)세포는 28개가 존재하고 이런 tag들은 각각 pNK 세포, mNK세포에서 발현이 많이 되고 있다는 것을 알 수 있었고 이들 중 유전자 또는 ESTs와 match 되는 정도를 살펴보면 많은 유전자와 multi matched 되는 tags도 있지만 single match 되는 tag들도 발굴하였다. 이를 이용하여 mouse pNK 세포에서만 발현되고 다른 단계에서는 발현되지 않는 matched tags들 중 single matched 되는 tags들을 중심으로 살펴본 결과, 차이가 나는 tags들 중에는 lysozyme, ferritin heavy chain, AXL, kit ligand, calgranulin B, interleukin 7 receptor, beta-2 microglobulin, Fc gamma receptor 등 많은 유전자들이 pNK 세포에만 특이적으로 많은 copy수로 나타남을 확인할 수 있었다 (Table 3).

Table 3. Analysis of single matched specific tags with mouse pNK cells

Gene name	HSC	pNK	mNK (-OP9)	mNK (+OP9)	Unigene Id
Lysozyme	14	1321	2	3	Mm.45436
Ferritin H chain	25	962	7	18	Mm.1776
Brevican	7	259	1	1	Mm.4598
AXL receptor tyrosine kinase	0	189	0	0	Mm.4128
Matrix metalloproteinase 12	0	69	7	1	Mm.2055
Cellular repressor of EIA-stimulated gene	5	45	0	0	Mm.459
c-kit ligand	0	62	0	1	Mm.4235
S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	1	42	0	0	Mm.2128
MPS1 protein	1	35	1	1	Mm.3999
Transglutaminse 2	0	25	0	0	Mm.18843
Serum and glucocorticoid-regulated protein kinase	0	20	0	0	Mm.28405
RIKEN cDNA5830413L19	0	18	0	0	Mm.159648
β2-microglobulin mRNA	0	17	0	0	Mm.163
Interferon-induced protein	0	17	0	1	Mm.951
Milk fat globule membrane protein EGF factor 8	3	16	1	1	Mm.1451
Fc γ receptor	3	15	0	1	Mm.22119
Cell-surface glycoprotein p91	0	13	0	0	Mm.3189
Arginase 1	0	12	0	2	Mm.154144
Tumor necrosis factor receptor 1	1	12	0	0	Mm.2666
Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	2	11	2	0	Mm.34126
Similar to hypothetical protein FLJ11000	0	11	0	0	Mm.46356
Interleukin-18 binding protein d precursor	0	10	1	0	Mm.45579
Chloride channel 7	0	9	0	0	Mm.22727
CD36 antigen	0	8	1	0	Mm.18628
Similar to putative zinc finger protein	1	8	3	0	Mm.205022
Carbohydrate binding protein 35	0	7	0	0	Mm.2970
C-type calcium dependent, carbohydrate	0	7	0	0	Mm.28263
Lipoprotein lipase	0	7	0	0	Mm.1514
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene	0	6	0	0	Mm.67919
Interleukin 7 receptor	0	5			Mm.389

이러한 sage tag의 정보를 바탕으로 실제로 pNK세포에서 그 유전자의 발현이 나타는지를 RT-PCR을 통해 알아본 결과, sage tag수와 일치하게 pNK세포에서 유전자의 발현이 확인되었다 (Fig. 7).

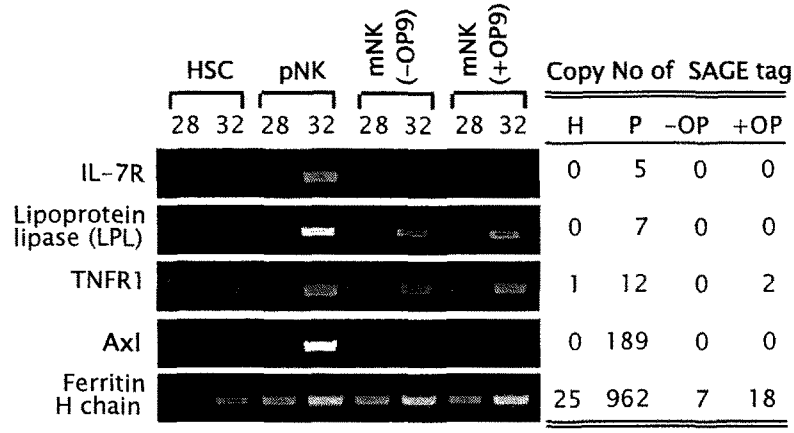


Fig.7. A correlated expression of RT-PCR analysis with SAGE results pNK cells.

3절. NK 분화관련 유전자의 기능 분석

1. AXL receptor tyrosine kinase 의 기능 연구

pNK 세포에서 특이적으로 발현하는 여러 유전자들 중에서 특히 AXL은 receptor tyrosine kinase인 Tyro 3 family 에 속하며 2개의 amino acid terminal Ig domains과 2개의 fibronectintype III domain, 그리고 cytoplasmic PTK domain으로 구성되어 있고 fibroblasts, myeloid progenigor cells, macrophages, neural tissue, ovarian follicles, skeletal muscle 등에서 발현되며, lymphocytes에서는 발현되지 않는다고 보고 된바 있다. 따라서 본 연구팀은 현재까지 NK세포의 분화와 관련하여 어떠한 연구도 되어 있지 않은 AXL가 NK 세포의 분화 및 활성에 미치는 영향을 분석하였음. 우선 1ug의 mouse AXL항체를 HSC로부터 NK 세포로 분화 과정중인 3일째와 6일째 (pNK 상태)에 처리하고 mNK 세포로 분화시키기 위해서 다시 6일 동안 40ng/ml의 IL-15, Indometacin (2 μg/ml), Gentamycin (2μg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 배지를 이용하여 stromal cell (OP9 cells)과 coculture를 수행하여 mNK 세포로 분화시킨 후 NK세포 분화단계별 특이 수용체들 (Ly49G2, Ly49A, Ly49C/F/I)의 발현정도를 분석한 결과, control에 비해, AXL 항체의 처리에 의해 NK 세포로의 분화가 약 2배가량 증가하였다 (Fig. 8).

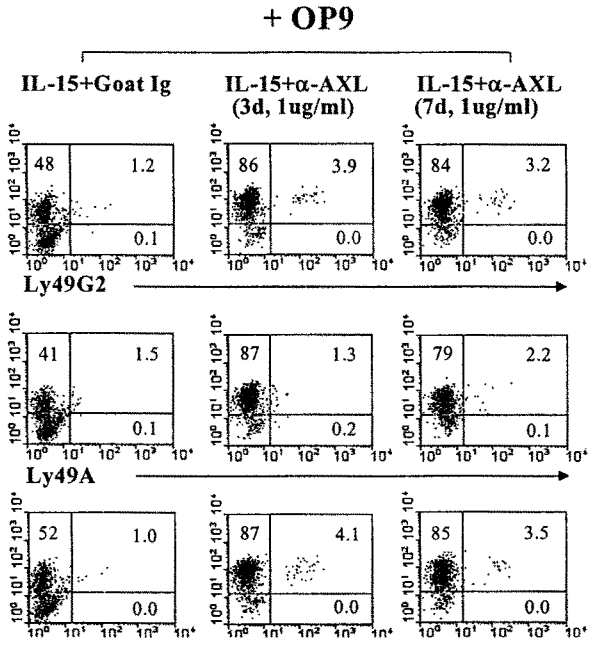


Fig.8. Effect of anti-AXL on NK cell differentiation

또 다른 방법으로 NK 세포의 분화에서 AXL 항체에 의한 agonistic effect를 IL-15의 농도를 25ng/ml로 감소하여 AXL 항체에 의한 NK세포의 분화를 확인하였음. plate에 AXL 항체를 immobilization 상태로 coating 한 후 pNK 세포를 가하고 OP9 stromal cell과 coculture 없이 mNK세포로 분화 시키는 조건에서 세포를 분화시킨 결과, immobilization 시킨 AXL 항체의 농도에 의존적으로 NK 세포의 분화가 증가 한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 9).

현재 receptor tyrosine kinase 인 AXL의 ligand로는 Gas6가 알려져 있음. Gas6 는 amino terminal Gla domain을 가지고 있으면 생물학적 활성 (biological activity)을 나타내기 위해서 gamma carboxylation 되어야 하며 이과정은 vitamin K-dependent 하다고 알려져 있다. 또한 4개의 EGF-like domains 과 signaling molecules과 같은 G domains으로 구성되어 있으며 이런 Gas6의 function은 serum starved NIH3T3 cell에서 PI3K와 Akt pathway와 관여하는 survival factor로써 NF-kB activation을 통해 anti-apoptotic signaling에 관여된다고 보고 된 바 있음. 또한 p42/p44 MAPK signalling을 통한 osteoclastic bone resorption에 관여하고 최근 pluripotential HSC support에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이 Gas6는 AXL의 ligand로써 AXL과 binding 하여 signal이 전달되는데 이때 NK 세포의 분화에 미치는 영향을 알아보고자 mouse recombinant Gas6를 분화과정 중에 처리한 결과, NK 세포의 분화에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타나 Gas6의 biological activity는 vitamin K-dependent 하게 γ-carboxylation 과정이 필요할 것으로 사료된다 (Fig. 10).

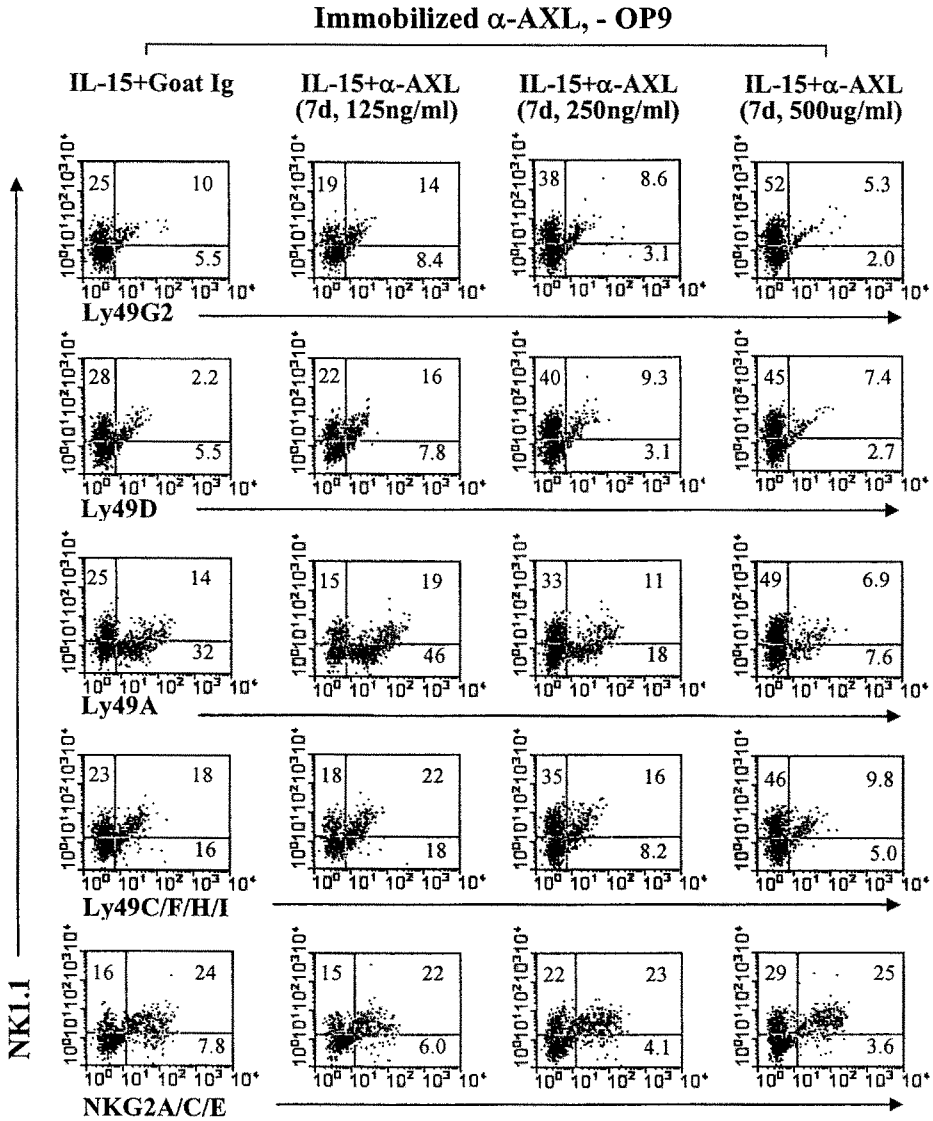


Fig. 9. Effect of anti-AXL on NK cell differentiation under immobilized condition without OP9 cells

Recombinant Gas6는 biological activity가 없기 때문에 AXL에 신호를 전달하지 못하여 AXL을 통한 NK 세포의 분화에는 큰 영향이 없으므로 biological activity를 갖는 Gas6가 AXL 과 binding하여 NK 세포의 분화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 우선 Gas6가 발현 되지 않은 cell line을 선별하기 위해서 여러 cell line에서 Gas6 의 발현을 RT-PCR을 이용하여 확인해 본 결과 NIH3T3 cell line에서는 발현되지 않지만 0.5% serum starvation 상태에서는 Gas6가 anti-apoptotic signaling에 관여하며, survival factor로 작용하기 때문에 starvation 조건에서 발현되는 것으로 나타났다 (Fig. 11).

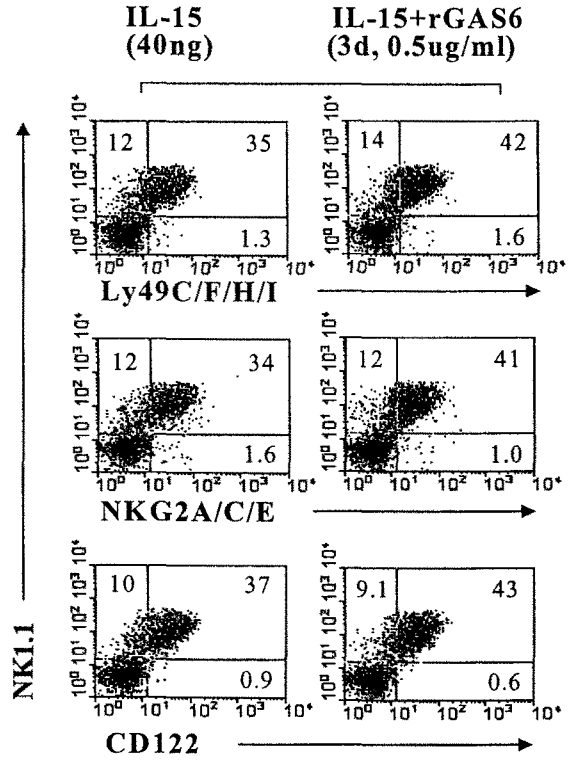


Fig. 10. Effect of recombinant Gas6 on NK differentiation

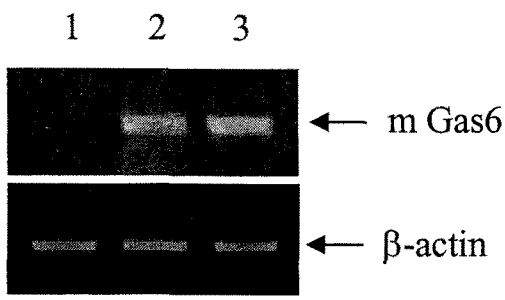


Fig. 11. Expression of mouse Gas6 in NIH3T3 and OP9 cells.
Line 1; NIH3T3 in DMEM supplemented with 10% FBS,
Line 2; NIH3T3 in DMEM supplemented with 0.5% FBS,
Line 3; OP9 in DMEM supplemented with 10% FBS.

따라서 mouse Gas6 full length를 pCDNA3.1 vector에 cloning 하여 NIH 3T3 cell line에서 over-expression 시키기 위해 transfection을 수행하고 G418 (500ug/ml)로 selection 하여 Gas6를 over-expression 하는 stable transfectant를 얻었음. Gas6를 over-expression하는 transfectant에서 Gas6 가 발현 하는지를 RT-PCR과 Immuboblot을 수행한 결과 NIH3T3 cell lines 과 mock control에서는 발현되지 않지만 transfectant에서는 발현되는

clone을 얻게 되었다 (Fig. 12).

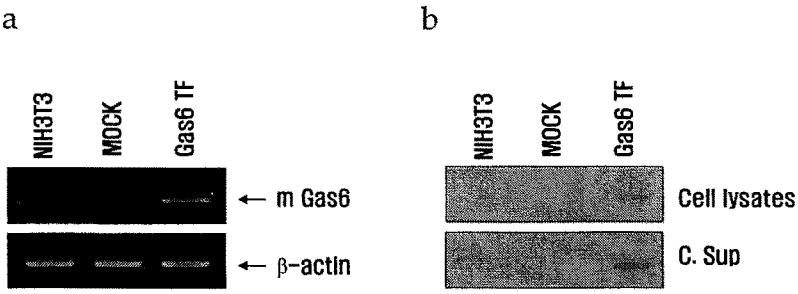


Fig. 12. Gas6 expression in transfectant (TF)
(a) RT-PCR, (b) immunoblot.

Gas6를 overexpression 하는 transfectant를 HSC 세포를 분화 시킬 때 co-culture 하는 OP9 대신 사용한다면 biological activity를 갖고 있는 Gas6가 분화과정 중의 pNK 세포에서 발현되는 AXL과 bidnging 하여 NK세포로의 분화에 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상되어 다음과 같은 실험을 수행하였다. 조혈줄기세포를 NK precusor 세포로 분화시키기 위해 mouse stem cell factor (30ng/ml), Flt-3 ligand (50ng/ml), mIL-7 (0.5ng/ml), Indometacin (2μg/ml), Gentamycin (2μg/ml)이 첨가된 RPMI1640 배지로 3일마다 배지의 절반을 새롭게 갈아주면서 6일 동안 배양하고 mNK 세포로 분화시키기 위해서 다시 6일 동안 IL-15 (20ng/ml), Indometacin (2μg/ml), Gentamycin (2μg/ml)이 첨가된 RPMI-1640 배지를 이용하는데 OP9 stromal 세포와 coculture 하지 않고 NIH3T3 세포, NIH3T3 세포에 vector를 transfection 시킨 세포, 그리고 Gas6를 over-expression하는 transfectant (#29)를 각각 $5x10^3$으로 조정하고 co-culture 하여 mNK로 분화시켰다. 그 결과 culture 7일째 되는 날부터 Gas6 transfectant와 co-culture 해준 세포는 다른 control에 비해 NK population이 약 14%에서 47%로 증가함을 알 수 있다 (Fig. 13). 따라서 조혈 줄기세포로부터 NK세포로의 분화에서 AXL receptor tyrosine kinase는 그 ligand인 Gas6과 interaction 하여 AXL signaling을 통해 NK 세포의 분화에 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다.

2. Si RNA of AXL receptor tyrosine kinase

가. Plasmid construction

AXL receptor tyrosine kinase 유전자를 silencing 시키기 위한 short hairpin oligonucleotide를 세포안으로 운반하는 vector로 LentiLox 3.7를 사용하였다. LentiLox 3.7는 mouse U6 promoter를 통하여 sh-RNA가 전사되고 CMV promoter에 의해 GFP 단백질을 합성할 수 있도록 고안된 lentiviral vector로 AXL receptor tyrosine kinase 유전자의 19개 염기서열을 인식하는 oligonucleotide를 합성 후 U6 promoter뒤의 HpaI과 XhoI 부위에 삽입하였다 (Fig. 14)

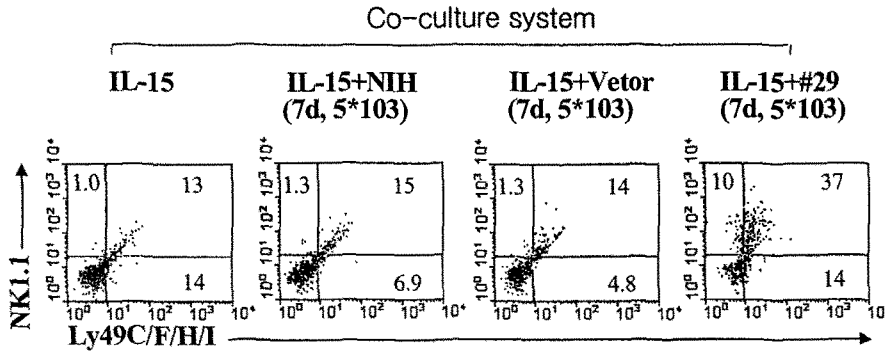
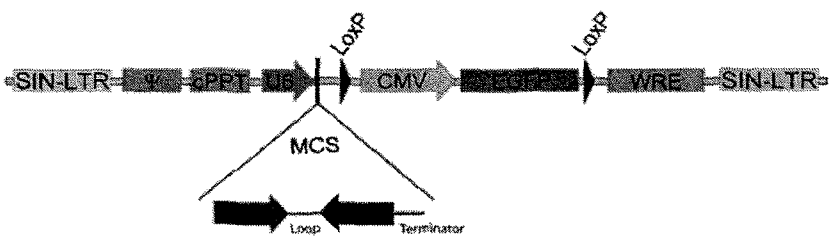


Fig. 13. Effect of Gas6 transfectant on NK differentiation



AXL receptor tyrosine kinase Stem Loop sequence

+1 Loop Terminator

TGCTCACCCACTGCAACCTG TTCAAGAGA CAGGTTGCAGTGGGTGAGC TTTTTT C
ACGAGTGGGTGACGTTGGAC AAGTTCTCT GTCCAACGTCACCCACTCG AAAAAA GAGCT

Predicted AXL receptor tyrosine kinase Stem Loop

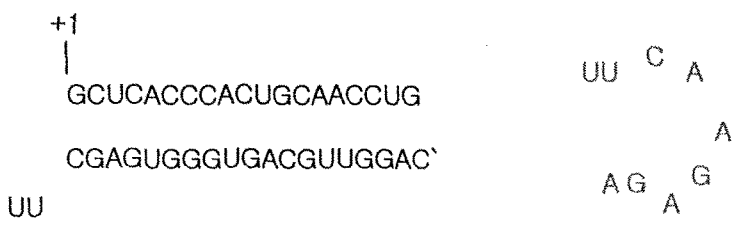
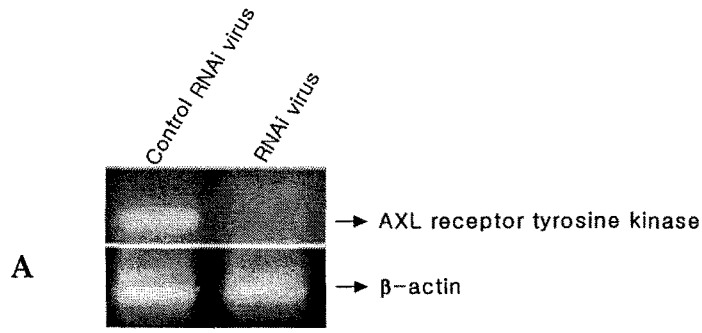


Fig.14. Representative of sh-RNA expressing Lentiviral vector

나. Production and titration of lentivirus.

Lentivirus particle을 생성하기 위하여 10㎍의 LentiLox-AXL, 10㎍의 VSV-G expressing vector, 10㎍의 RSV-Rev 그리고 10㎍의 packaging vector를 293T 세포에 co-transfection하였다. Transfection 후 30시간과 48시간 후에 배양액을 모으고 초원심분리기를 이용하여 25000rpm에서 2시간 동안 바이러스를 침전시켰다. 침전된 바이러스는 RPMI 배지로 현탁 후 -80℃에 보관하였다. 농축된 바이러스의 titer를 측정하기 위해서 연속 희석된 바이러스 현탁액을 293T 세포에 감염시킨 후 감염된 세포의 GFP 발현정도를 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. LentiLox-AXL 바이러스가 AXL receptor tyrosine kinase 유전자를 silencing 시키는지를 알아보기 위해서 NIH3T3 세포에 바이러스를 MOI 10으로 감염 시키고 72시간 후에 NIH3T3 세포의 RNA를 분리하여 RT-PCR로 AXL receptor tyrosine kinase 유전자의 발현정도를 측정한 결과 shRNA에 의해서 AXL receptor tyrosine kinase 유전자가 효과적으로 silencing 되었음을 확인하였다 (Fig 15 A). 바이러스에 감염된 세포의 수를 측정하기 위해 10배 희석된 바이러스를 NIH3T3 세포에 감염시켜 GFP가 발현되는 세포수를 flow cytometry를 통하여 확인한 결과 control RNAi 바이러스와 LentiLox-AXL는 동일하게 NIH3T3 세포에 감염됨을 알 수 있었다 (Fig 15 B)



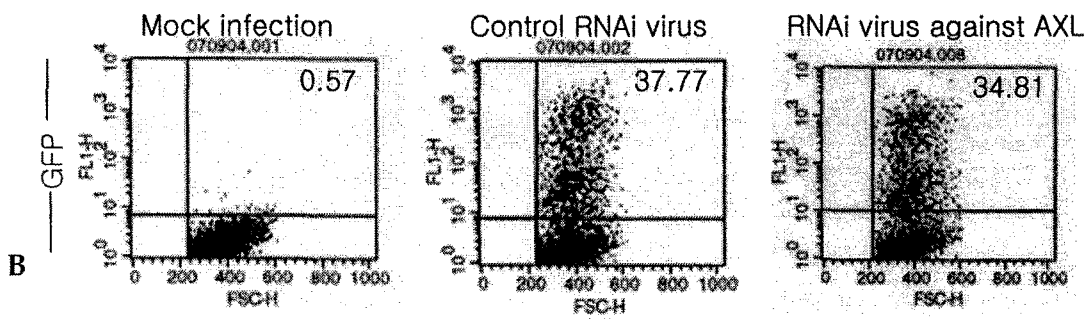


Fig.15. Silencing of AXL receptor tyrosine kinase gene *in vitro* by lentivirus

LentiLox-AXL 바이러스가 *in vitro*에서 분화 유도되는 natural killer세포에 감염하는지를 확인하기 위하여 C57BL/6 마우스에서 추출한 bone marrow에서 enrichment한 조혈모세포를 *in vitro*에서 natural killer 세포로 분화 유도 한 후 precursor stage와 mature stage에서 바이러스를 MOI 20으로 감염 시킨 후 바이러스의 감염정도를 확인한 결과 15-30% 정도의 세포가 감염됨을 flow cytometry를 통하여 확인하였다 (Fig.16).

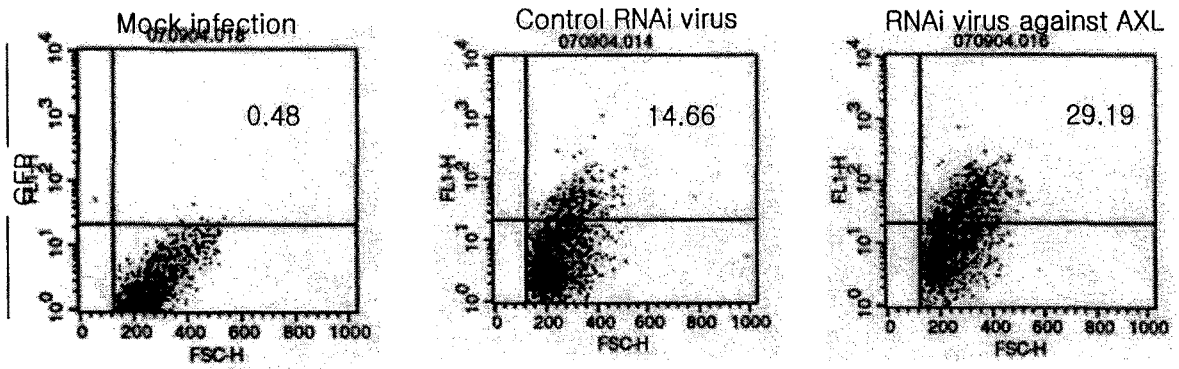


Fig.16. Infection of lentivirus into bone marrow-derived natural killer cells

3. VDUP-1 knockout mice를 이용한 VDUP-1 기능연구

C57 BL6 mice에 다음과 같은 construction을 이용하여 VDUP-1 knock out mouse를 만들었다 (Fig. 17).

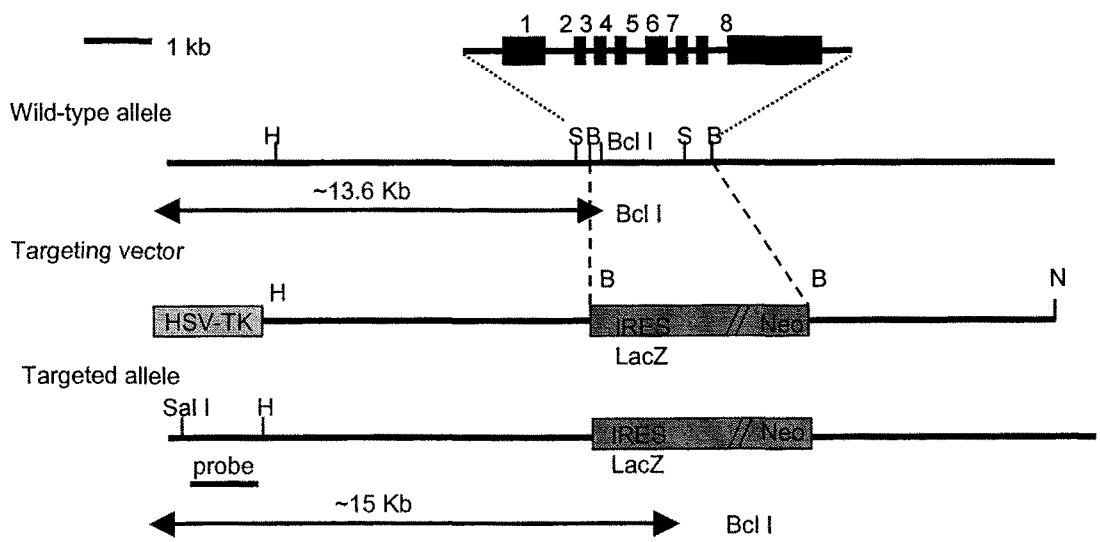
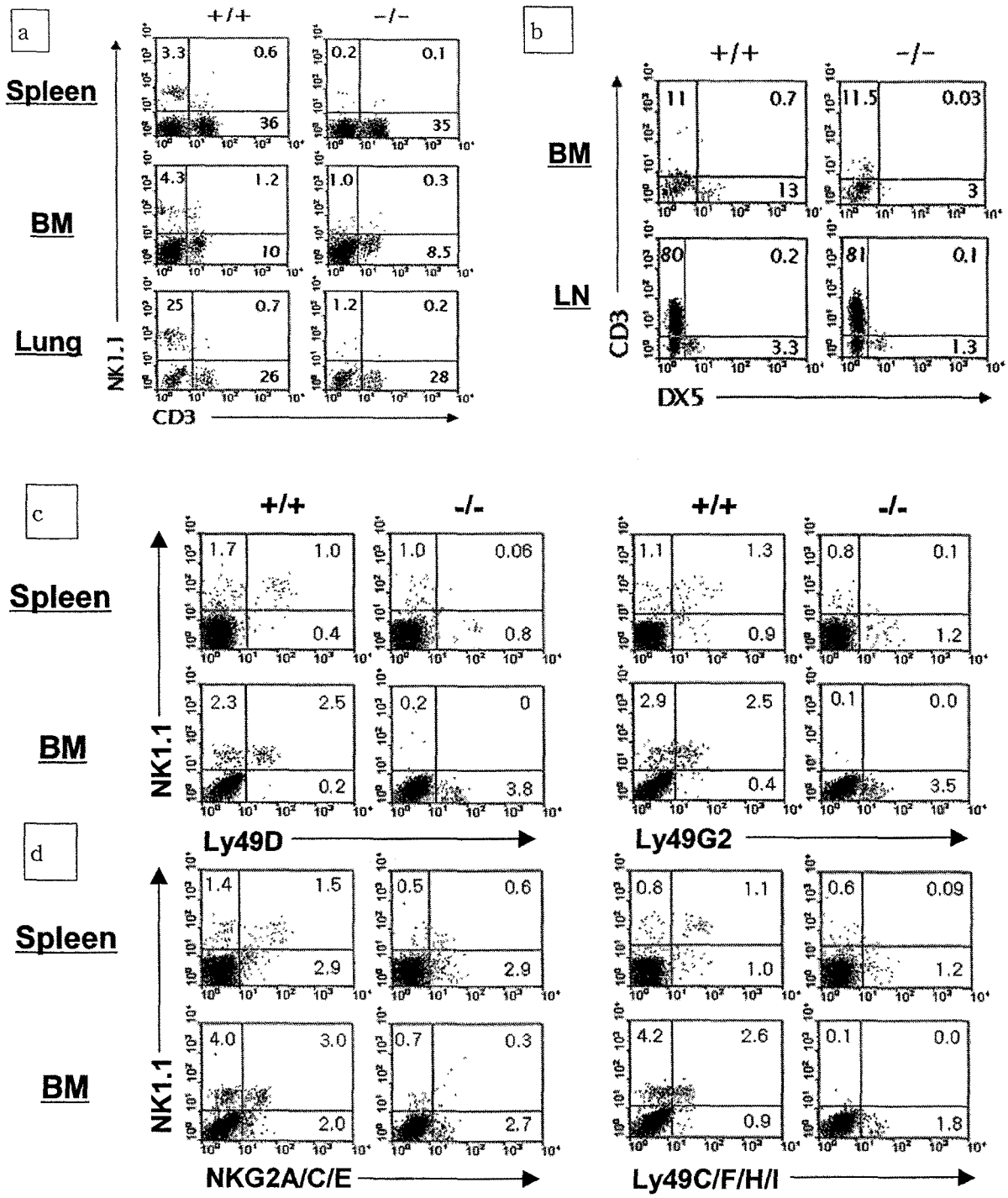


Figure 17. Targeted mutation and generation of VDUP1-deficient mice.

Wild type 과 VDUP-1 deficient mouse를 phenoytyping하여 비교한 결과, VDUP-1 deficient mouse의 spleen, bonemarrow, lung, lymph node에서 mature NK (CD3- NK 1.1 +) population이 감소되어있고 (Fig a,b), NK receptor인 Ly49 발현도 감소 되어있음을 알 수 있었다 (Fig c). 또한 Splenocyte를 가지고 Cr release assay를 수행한 결과, VDUP-1 deficient mice의 cytolytic activity가 WT에비해서 현저하게 감소 되어있음을 확인하였다 (Fig d).



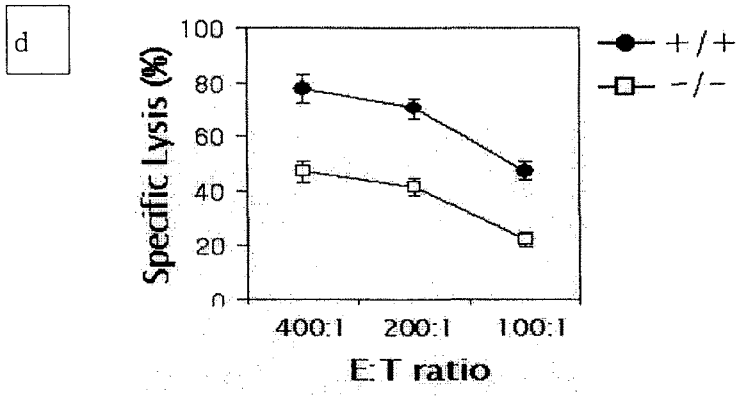
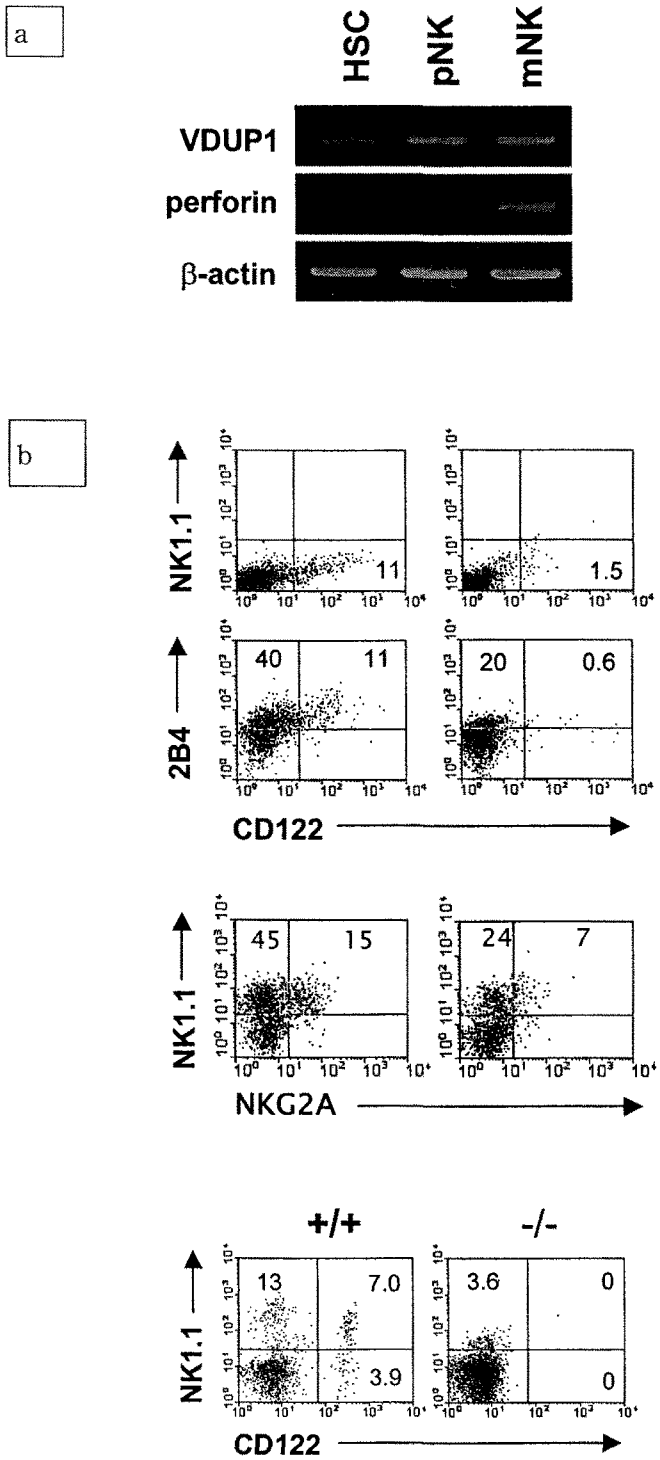


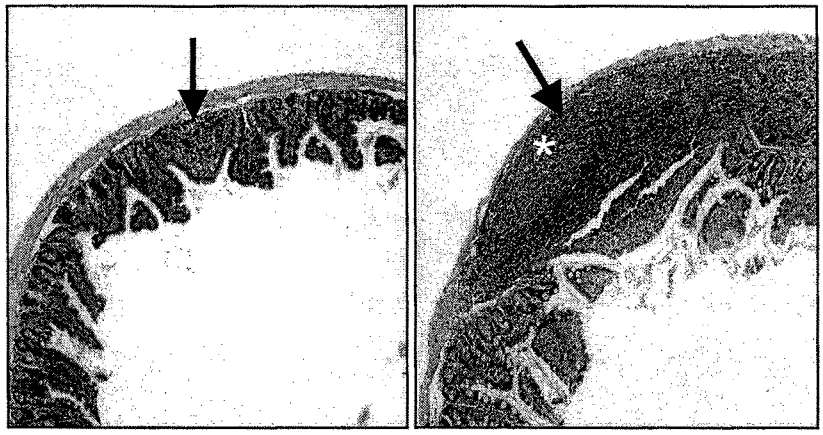
Figure 18. NK defection in VDUP1-deficient mice. (A) Single cell suspensions from the spleen, BM, and lung of WT and VDUP1-/- C57BL6 mice were stained with FITC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-NK1.1 as described in Experimental Procedures. The percentage of the NK cells was evaluated from the gated lymphocyte population. (B) To detect another surface marker expression for the NK cells, DX5 expression was analyzed from the BM and lymph nodes (LN) of WT and VDUP1-/- 129Sv mice using FITC-conjugated anti-DX5 and PE-conjugated anti-CD3. (C) The different Ly49 and NKG2 receptor expression was analyzed from the gated lymphocyte population of splenocytes and BM cells from C57BL6 mice. The results are a representative of at least eight independent experiments with similar results. (D) Splenocytes from (+/+) and (-/-) mice were cultured in the presence of IL-2 (10 U/ml) for 24 h. After washing the cells, NK cell cytotoxicity was determined by a 51Cr -release assay against YAC-1 target cells at the indicated E:T ratios. Data are expressed as a percentage of the specific release and represent the mean±SD of triplicate determinations.

정상쥐의 NK 분화과정중에서 VDUP-1 gene expression이 pNK , mNK 단계에서 증가함을 PCR로 확인하였고 (Fig. 19a), NK 분화과정의 핵심 marker인 CD122의 발현도를 In vitro NK 분화 과정 별로 비교한 결과, k/omice의 pNk 단계, mNK 단계에서 CD122의 발현이 WT에 비해 감소되어있음을 알 수 있었다 (Fig. 19b). 그리고 in vivo 에서도 CD122의 발현과 NK1.1.의 발현이 WT에 비해 k/o mouse에서 감소 되어있음을 확인하였다 (Fig. 19b).

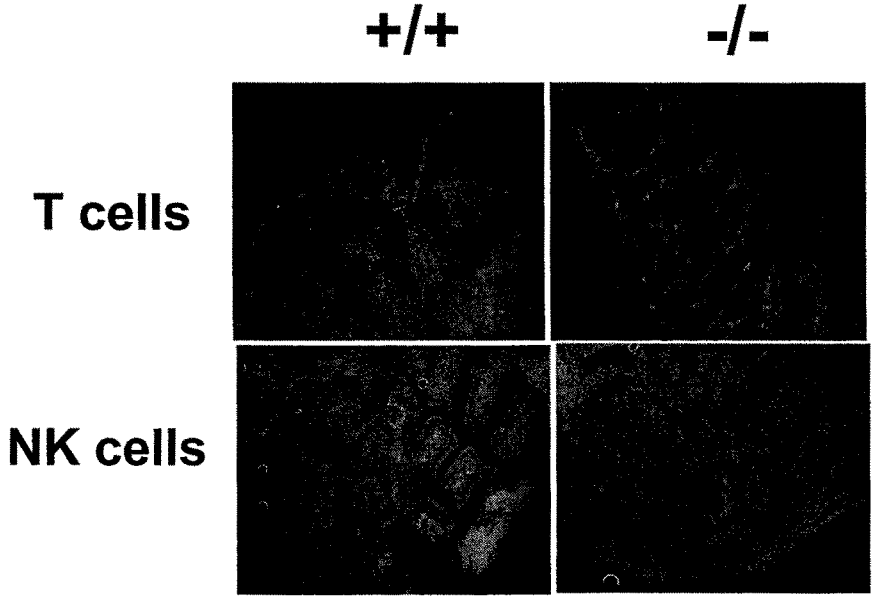


VDUP-1 k/o mouse의 조직학적 염색 결과, 정상에 비하여 lymphoid tissue의 hyperplasia가 관찰 되었는데 (Fig. 20A), T cell population은 증가하였으나, NK cell은 현저히 줄어있음을 관찰하였 (Fig. 20B). 특히 in vivo에서 NK 세포의 기능을 CSFE로 표지된 tumor cell 확인한 결과 VDUP K/O mice에서 NK의 살상능이 감소되어 있음을 알 수 있었다. (Fig. 20C)

A


+/+
-/-

B


+/+
-/-
T cells
NK cells

C

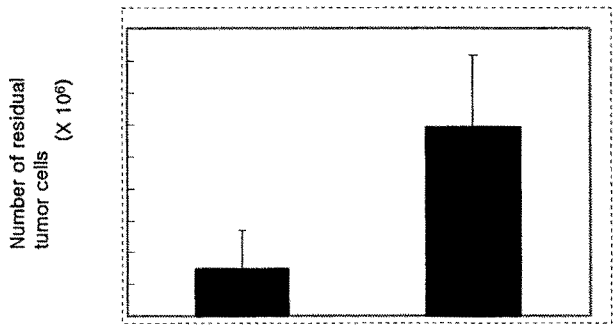

Number of residual tumor cells (X 10⁶)
+/+
9.7±2.3
-/-
12.8±1.0
Total number of exudated peritoneal cells (X 10⁶)

Figure 20. Intestinal hyperplasia and tumor rejection in VDUP1-/- mice. (A) Intestinal lymphoid hyperplasia in VDUP1-/-and WT mice. A small lymph nodule was present in the ileum of wild type mice, but there was diffuse hyperplasia of lymphoid tissue containing a large germinal center (*) in the ileum ofVDUP1-/- mice (arrows, lymph nodule; hematoxilin-eosin stain; original magnification, x100). (B) Immunohistological analysis of T and NK cells from WT and VDUP1-/- mice. J1j (T cell marker) and pk136 (NK cell marker) immunoreactive cells werepresent in the lamina propria of the ileum of wild-type mice. The number of pk136 immunoreactive cells decreased significantly in the ileum of VDUP1-/-mice (original magnification, x400). (C*) In vivo* tumor clearance assay in WT and VDUP1-/- mice. WT and VDUP1-/- mice were injected i.p. with CFSE-labeled tumor cells. The number of tumor cells recovered from the peritoneum after 3 days(depicted on y axis) was calculated on the basis of total number of peritoneal exudatescells (indicated on x axis) multiplied by the percentage that were tumor cells as determined by the flow cytometry. Data represent the meanSD of three independent experiments.

4. Involvement of Osteopontin in NK differentiation

HSC, pNK와 mNK에서 각각 RNA를 추출하여 opn specific primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 NK의 분화에 따라 osteopontin의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다.

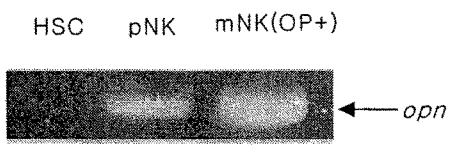


Fig.21 Stage-specific Expression of *opn* during NK differentiation

OP9 stromal cell의 OPN 발현에 대한 영향을 알아보기 위하여 OP9 과 공동 배양한 NK와 단독 배양한 NK에서 OPN의 발현을 RT-PCR로 관찰한 결과, OPN의 발현 자체에는 OP9의 존재 여부가 상관없음을 확인하였으나, OP9과 함께 배양한 NK에서 OPN의 발현이 다소 증가됨을 알 수 있었다.

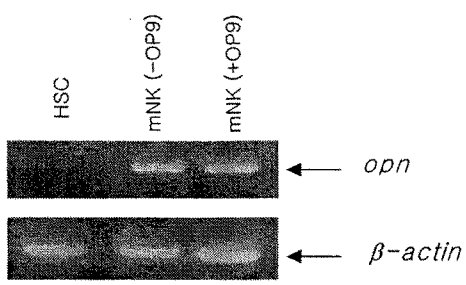


Fig 22. Stage-specific Expression of *opn* during NK diffe rentiation

pNK를 분리후에 NK maturation을 유도하는 IL-15을 처리하여 24시간 경과 후, RT-PCR을 수행한 결과, IL-15이 opn의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다.

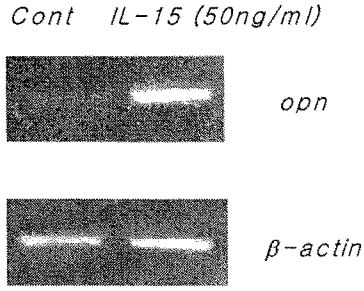


Fig.23. Effect of IL-15 on expression of *opn* in pNK

HSC의 분화에 대한 OPN의 영향을 알아보기 위하여 mouse HSC에 OPN을 처리한 후 일주일 후에 premature NK의 specific marker인 CD122의 발현을 flow cytometry로 측정하였다 그 결과 OPN이 그 처리양에 따라 pNK의 분화도를 증가시킴을 확인하였다. 또한, OPN에 대한 neutralizing antibody를 같이 처리하였을때 분화도가 감소하는것으로 보아, OPN에 의한 pNK의 분화 증진이 OPN 특이적 현상임을 검증하였다

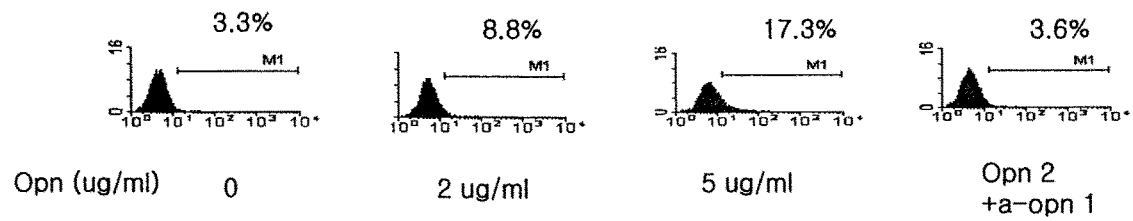


Fig .24. Effect of OPN on differentiation of HSC into pNK (CD122 expression)

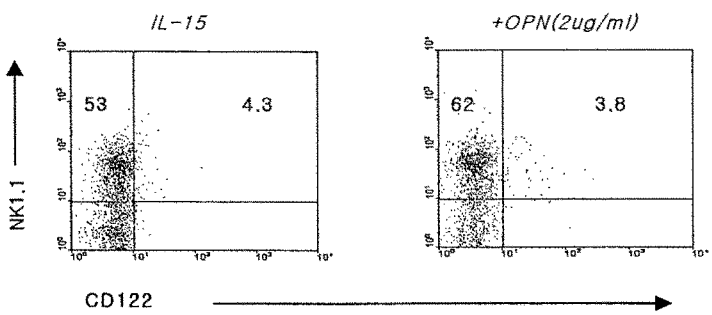


Fig. 25. Effect of OPN on differentiation of HSC into mNK

5. Effect of Cathepsins on NK differentiation in vitro

Sage 결과 pNK specific하게 copy수가 증가한 cathepsin을 RT-PCR로 확인한 결과 cathepsin 발현이 pNK stage에서 specific 하게 발현됨을 mouse와 human에서 확인할 수 있었다 (Fig. 26)

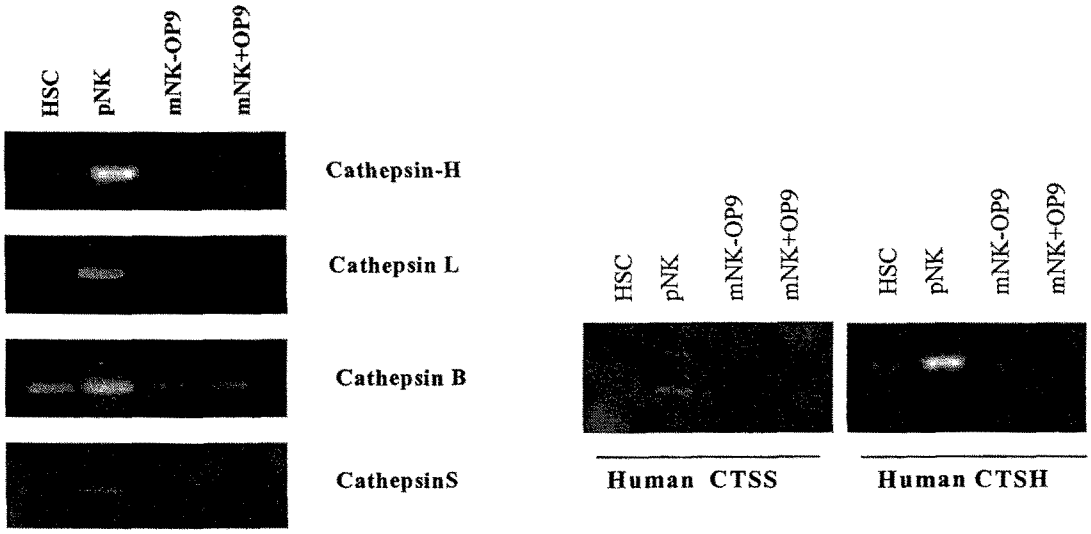
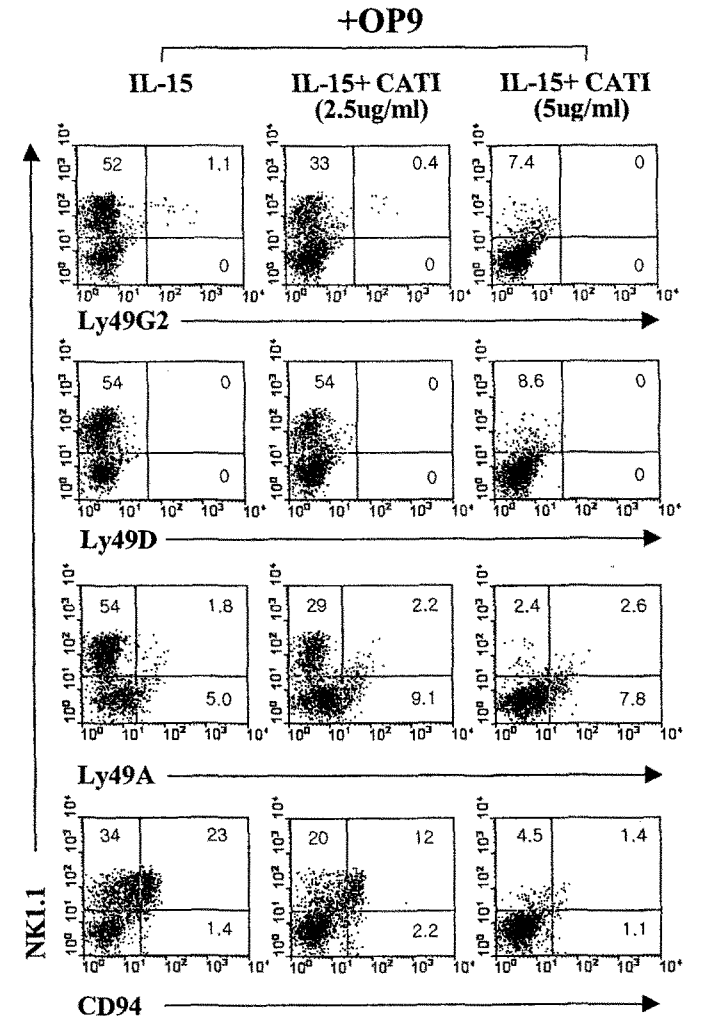
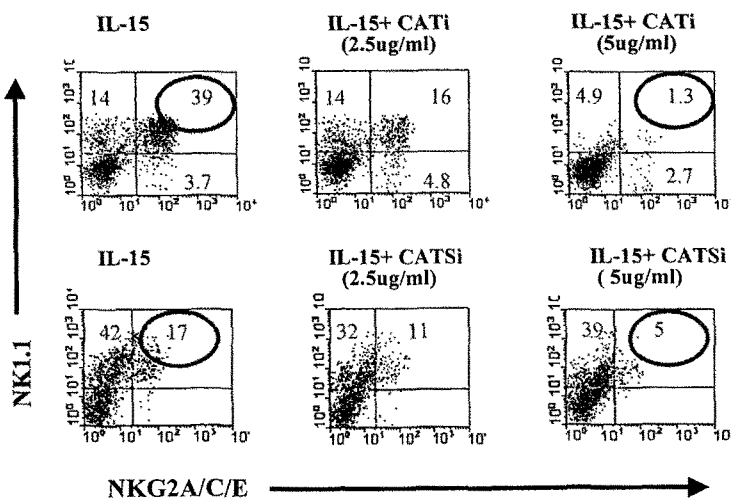


Fig. 26. Expression of cathepsins during NK differentiation

HSC로부터 NK세포로 in vitro 분화과정중에 cathepsin inhibitor를 처리하여 NK population을 조사한결과 Cathepsin inhibitor에의해 dose dependant하게 NK receptor발현과 population이 감소되어 있었고 (Fig 27A), Cathpsin S inhibitor에 의해서도 유사하게 NK세포가 감소되었고 Cr release assay 결과 분화과정 중 cathepsin inhibitor를 처리한 군에서 cytolytic activity가 감소하였음을 알 수 있었다 (Fig 27B).

A


+OP9
IL-15
IL-15+ CATI (2.5ug/ml)
IL-15+ CATI (5ug/ml)
52
1.1
0
33
0.4
0
7.4
0
0
Ly49G2
54
0
0
54
0
0
8.6
0
0
Ly49D
54
1.8
5.0
29
2.2
9.1
2.4
2.6
7.8
Ly49A
34
23
1.4
20
12
2.2
4.5
1.4
1.1
NK1.1
CD94


IL-15
IL-15+ CATi (2.5ug/ml)
IL-15+ CATi (5ug/ml)
14
39
3.7
14
16
4.8
4.9
1.3
2.7
IL-15
IL-15+ CATSi (2.5ug/ml)
IL-15+ CATSi (5ug/ml)
42
17
32
11
39
5
NK1.1
NKG2A/C/E

B

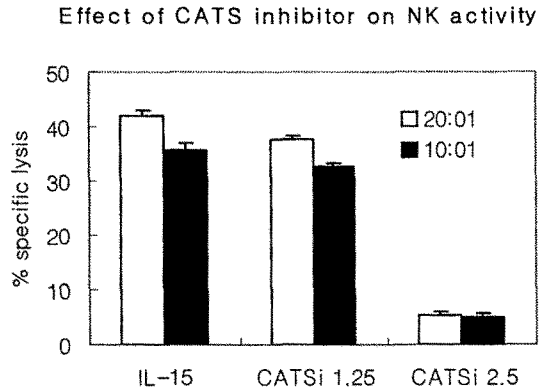
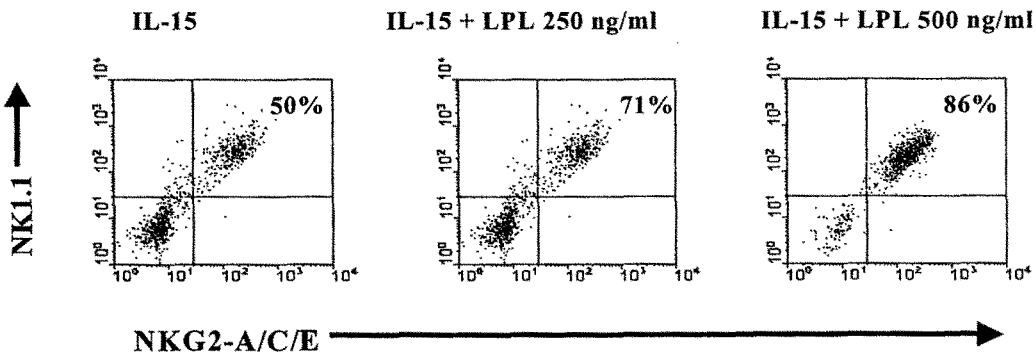


Fig. 27. Effect of cathepsin inhibitor on NK differentiation in vitro

6. Effect of LPL on NK differentiation in vitro

lipoprotein lipase (LPL)을 IL-15과 함께 처리하면, IL-15을 단독으로 처리한 대조군에 비해 mNK세포로의 분화가 증가하고, Yac-1 cell에 대한 cytotoxicity도 증가하였다 (Fig. 28)



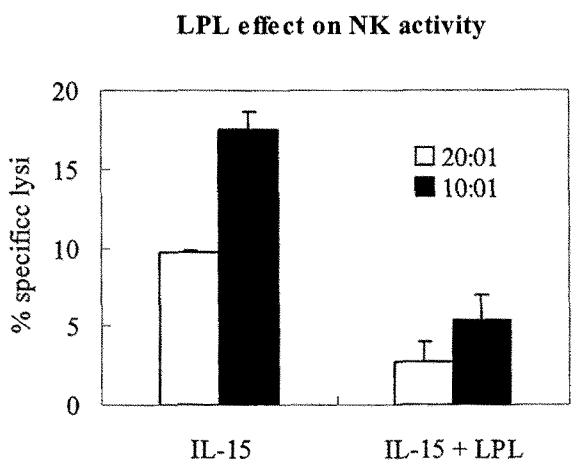
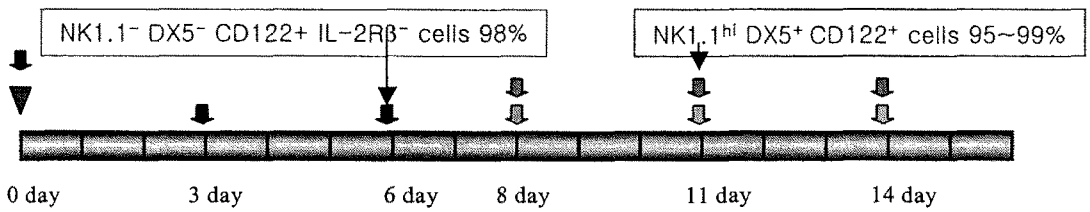


Fig. 28. Effect of LPL on NK differentiation in vitro

4절 Natural Killer Cell and Dendritic Cell for Immunotherapy

In vitro, NK cell culture



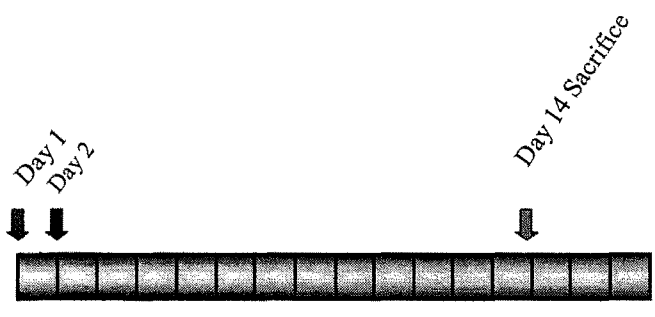
Collecting HSC (negative, positive selection by MACs)

Changing media (RPMI with SCF, Flt3-L, IL7)

Changing media (RPMI with IL15)

Co-culture with OP9

NK and DC therapy



Injection of B16/F10 Cell Therapy

Number of NK cell : $1X10^6$

Number of DC : $1X10^6$

Time of co-culture : 24hrs

Prep. Of NK cell : spleen or bone marrow derived differentiated NK

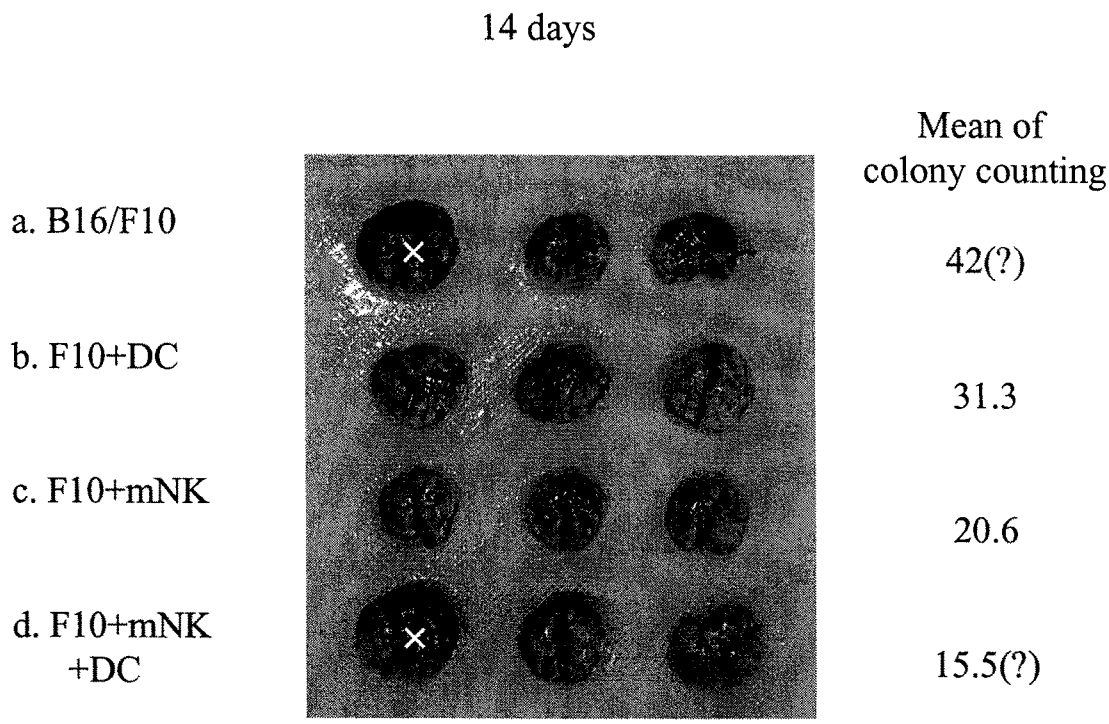


Fig.29. Immunotherapy by differentiated NK cell and bone marrow derived dendritic cell

Fig. 29는 분화시킨 NK 세포로 면역학적 치료 효과를 확인한 실험 결과이다. B16/F10 흑색암종 세포를 C57BL/6 마우스에 꼬리 정맥으로 투여하여 1일 경과 후 NK 세포와 괴사된 B16/F10 암세포를 식작용한 수지상를 투여하여 폐로 전이된 콜로니를 확인하였다. a열은 B16/F10만 주입한것으로, 폐로 전이되 모습이다. b열은 B16/F10을 식작용한 수지상 세포를 피하에 주입한 결과 감소되는 경향을 보였다. c열은 분화된 NK 세포를 면역치료로 사용한 결과 수지상 세포에 의한 암 전이를 억제하는 현상이 더 효과적으로 관찰되었다. d열의 경우 NK 세포와 수지상 세포의 혼합투여로 인한 면역치료의 상승효과가 있는 것으로 나타났다. 이 그림에서는 분화된 NK 세포를 면역치료에 적용하는 것이 보다 더 효과적인 작용을 나타낼 수 있는 가능성을 제시할 뿐만 아니라 기존의 수지상세포의 암 치료에 혼용하면 효과가 보다 더 상승하는 현상을 보이고 있다.

Fig. 30은 비장에서 세포들을 분리하여 NK 세포의 순도를 높여 수지상 세포와 같이 면역치료 효과를 확인했다. 모든 마우스에B16/F10 흑색종을 꼬리 정맥으로 주입하여 1일 경과 후 면역치료를 위한 NK 세포와 수지상세포를 적용시켰다. 1번 열은 B16/F10만 단독으로 투여 했고, 2번 열은 NK 세포를 투여하였고, 3번 열은 cytokine IL2로 감작된 NK 세포를 적용하였다. 4번과 7번 열은 NK 세포와 수지상 세포를 혼합 배양하여 각각 독립적으로 면역치료효과를 관찰했다. 5번 열은 NK 세포와 수지상 세포를 혼합 배양하여 동시에 적용시켰다. 6번 열은 혼합배양을 하지 않고 동시 적용했다. 8번은 수지상 세포만 투여하고 9번은 B16/F10를 uptake하지 않은 수지상 세포를 주입했다. 이 결과에서 NK 세포 단독으로 처리를 해도 면역치료 효과가 나오는 것을 확인했고 cytokine IL2의 효과는 일회 투여로는 효과가 낮게 나타났다. 수지상 세포

와 NK 세포를 혼합하여 배양 했을 경우 두가지 세포를 동시에 면역치료로 사용하는 것 보다는 각각 단독으로 처리하는 것이 효과가 크게 나타나는 것으로 관찰되었다, 또한 혼합 배양을 하지 않고 처리한 세포들의 면역치료 정도가 더 높게나타났다. 이러한 결과는 세포간의 접촉도 중요하지만 면역치료 과정에서 서로간에 간섭이 일어날 수 있다는 의미도 내포하고 있다. 하지만 figure 1.에서 분화를 유도시킨 NK 세포들은 이러한 현상이 감소되는 양상을 보이고 있다. 분화된 NK 세포는 면역치료에 효과적이고 실험 동물 체내에서의 수지상 세포와 서로 간섭을 일으켜 활성이 감소하는 것에 저항성 또는 반대 기전이 있을 것이란 예상을 할 수 있다.

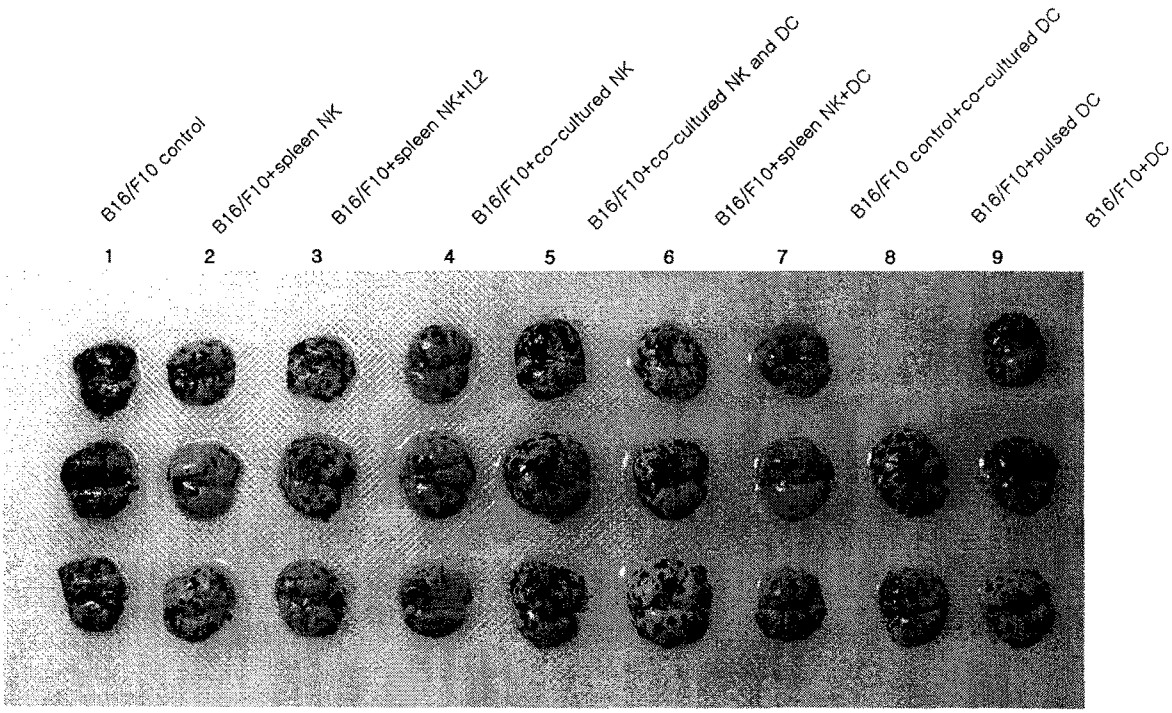


Fig.30. Immunotherapy by spleen NK cell and bone marrow derived dendritic cell

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	NK 세포 분화 기술 확립	C57BL/6 마우스의 골수세포로부터 MACS를 이용하여 96%순도의 Lin^- $c\text{-}kit^+$인 조혈줄기세포(HSC)를 분리하여, 6일 동안 배양한 후, FITC 표지된 CD122항체와 magnetic bead가 붙은 anti-FITC 항체를 이용하여 MACS로 순도 92%이상의 $CD122^+$인 NK전구체 세포를 얻었고, IL-15 20 ng/ml의 존재 하에서 6일간 더 배양한 후 MACS를 이용하여 $NK1.1^+$인 mNK세포를 분리하였다. 인간의 재대혈로부터 같은 방법으로 pNK와 mNK를 분화시켜, 결론적으로 **마우스와 인간의 NK 분화기술 (2건)을 확립하였다.**	100
2	NK 세포 분화 관련 유전자 동정	(1) Differential display PCR 법에 의한 NK세포 분화관련 유전자의 동정. NK세포 분화단계별로 얻은 세포로부터 total RNA를 분리하고 RT-PCR을 수행하여 pNK와 mNK 세포에서 특이적으로 발현량이 차이나는 band로부터 DNA를 추출하여 PCR로 reamplify하여 각각 차이나는 clone을 **100여개 이상** 확보하였다. (2) SAGE를 이용한 NK세포 분화 관련 유전자의 대량 발굴 NK세포 분화과정에서 분화단계별 (HSC, pNK, mNK-OP9, mNK + OP9)로 4군의 독 립적인 SAGE library를 제작하였다. 전체적으로 4개의 SAGE library로부터 총 170,464개의 tag, 59,657개의 unique transcript, **35,385개의 gene**들이 동정하였다. (3) NK세포 분화과정 중 stage-specific하게 발현되는 유전자의 분석. HSC에서는 15개의 유전자, pNK세포에서는 31개의 유전자, mNK세포부터는 27개의 분화 유전자들을 분화 단계별로 동정하였다. 결론적으로 **단계별 특이 분화 유전자를 73종 확보하였다 (10종 목표).**	100
3	NK 분화유도 유전자의 기능 규명	(1)VDUP1: VDUP-1 knockout mice를 이용한 VDUP-1 기능연구. VDUP-1 gene knock out mouse를 만들어 Wild type 과 VDUP-1 deficient mouse를 phenoytyping하여 비교한 결과, VDUP-1 deficient mouse의 spleen, bonemarrow, lung, lymph node에서 mature NK (CD3- NK 1.1 +) population이 감소되어있고, VDUP-1 deficient mice에서 spenocyte의 cytolytic activity가 WT에비해서 현저하게 감소 되어있음을 확인하였다. (2)AXL: AXL receptor tyrosine kinase 의 기능 연구 pNK 세포에서 특이적으로 발현하는 여러 유전자들 중에서 AXL receptor tyrosine kinase가 NK 세포의 분화 및 활성에 미치는 영향을 분석하였다. AXL 항체의 처리에 의해 NK 세포로의 분화가 약 2배가량 증가하였다. (3)Osteopotin: NK를 분리후에 NK maturation을 유도하는 IL-15을 처리하여 opn의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. OPN이 pNK의 분화도를 증가시킴을 확인하였다. 또한, OPN에 대한 neutralizing antibody를 같이 처리하였을때 분화도가 감소하는것으로 보아, OPN 특이적 현상임을 검증하였다 (4) Cathepsin: HSC로부터 NK세포로 in vitro 분화과정중에 cathepsin inhibitor를 처리하여 NK 분화가 감소되었고, NK 활성을 감소하였음을 알 수 있었다. (5) Leptin Leptin R 가 결핍된 마우스에서 NK 분화가 저해되어있는 현상을 알았고 더불어 CD122 분화유전자의 발현도 감소가 되어있어고, NK 활성도 감소됨을 검증하였다. 이상 결론적으로 **5종의 분화유전자의 기능을 검증 (2종 목표)**하였다.	100
4	분화 유전자를 이용한 NK 분화 최적화 기술개발	분화유전자(AXL, LPL, OPN)들을 처리해 분화시킨 NK가 분화도가 증가되었고 NK 활성도 증가됨을 알수 있었다. 분화된 NK세포의 in vivo 항암효과를 측정하기 위해, B16/F10 흑색종암 동물을 이용하여 NK 항암기능을 검정하였다. 분화된 NK 세포를 투여한 결과 흑색종 암의 억제됨을 알수 있었다. 결론적으로 **3가지 이상의 분화유전자를 이용해 (1종목표) NK 분화도를 증가시킬수 있었고 동물암모델에서도 항암 활성이 증가함을 관찰하였다.**	95

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 생쥐의 NK 분화 시스템 확립 및 분화관련 유전자들의 발굴로 NK분화 메카니즘 규명
2. NK 분화 관련 유전자들을 이용하여 NK의 분화 및 기능 조절
3. NK 분화 조절을 통한 NK 의 증식 및 항암 효과증진
4. 조혈모세포로부터의 NK 분화 유도로 개개인이나 암의 특성에 따른 맞춤 세포치료법 시도

(1) 분화 단백질 개발
(2) 암등 난치성 치료 기술 개발
(3) 분화유도 기술 개발
(4) 줄기세포 자가재생산 기술 개발
(5) 기업화를 통한 산업화 유도

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

조혈줄기세포의 정제를 위해서는 세포 표면의 분자 발현에 의해 homogeneous cell population을 정제하는 것이 일반적인 방법인데 human의 경우 CD34+ 세포를, mouse의 경우는 Lineage marker- (Lin-), stem cell antigen 1 (Sca-1+),(Science, 1988, 241-58-62) c-kit+ 세포를 (PNAS 89: 1502-6, 1992) FACS sorting 이나 MACS를 이용한 magnetic separation으로 분리한다. 최근에는 배아줄기세포주로부터 조혈 모세포를 형성시켰다고 보고됨 (Science 1995, 265:1098-1101, J. I. 2002, 168: 4980-4989).

SAGE를 수행한 결과 얻은 Vitamin D3 upregulating protein 1 (VDUP-1)은 HL-60 cell에서 Vitamin D3에 의해 증가되는 유전자로 처음 알려졌다 (Biochem. Biophys. Acta 1994, 1219: 26-32). 최근에는 VDUP-1이 Trx와 반응하여 Trx의 기능을 억제하고, 다른 인자들과 Trx의작용도 저해한다고 보고 되었다 (J. Biol. Chem. 1999, 274 : 21645- 21650, J. Immunol. 2000, 164: 6287-6295). 따라서 VDUP-1은 세포내의 산화 환원반응을 조절하는 Trx에 negative regulator로 작용하여 oxidative stress에 세포를 보다 민감하게 한다고 할 수 있다. 또한 VDUP-1 anti sense DNA가 murine melanoma cell에서 melanin synthesis나 tumorigenesis를 조절하며 (Immunology Letters 2003, 86 : 235-247), 암세포의 세포주기를 억제하여 항암효과를 나타내고 실제로 암 조직에서 VDUP-1의 발현이 정상조직에 비해 감소되어있다고 알려져 있다.

1,25-dihydroxyvitamin D3 자체는 cytotoxic NK cell의 생성을 저해하고 (J Cell Biochem. 1992, 49(1):26-31), human natural killer cell과 lymphokine-activated killer의 cell cytotoxicity 와 differentiation을 억제하며 (Scand J Immunol. 1989, 30(2):199-208), vitamin D(3) treatment에 의해 DC differentiation이 억제 (FEBS Lett. 2003, 553(3):413-8) 된다는 보고되었다. 반면, 1,25(OH)(2)-vitamin D(3) 이 protein kinase pathway를 통해 natural killer cell을 활성화시킨다는 보고도 있다 (Exp Mol Pathol. 1999;67(2):63-74). Thioredoxin reductase 1의 overexpression이 NF-kappa B activation을 조절하고 (J Cell Physiol. 2004;198(1):22-30), thioredoxin에의해 NF-kappaB의 DNA binding activity가 증가하고 (J Biol Chem. 2001, 276(7):4662-70), 최근에는 IkappaBalpha 와 IkappaBepsilon의 combined deficiency에서 NK세포의 현저한 결손을 보여 NFkappa B pathway가 NK 세포 분화에 결정적인 역할을 한다고 보고되어 (Blood 2004 103 (12) :4573-4580), VDUP-1에 의한 NK세포분화조절에 NF kappa B pathway가 관련될 것이라는 것을 시사하고 있다. Vitamin D3와 NF kappa B에 관해서도 여러 보고들이 있는데, human fibroblast에서는 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3에 의해 nuclear factor-kappaB의 DNA binding을 감소되었고 (FEBS Lett. 1998;436(3):329-34), NB4 leukemia cell의 monocytic differentiation에는 VD3가 IkappaBalpha의 phosphorylation을 촉진하여 NFkappaB의 nuclear translocation을 유도하였다 (Exp Cell Res. 2002 ;272(2):176-84). 또한 NF-kappa B activity의 억제가 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)에 의해 유도되는 leukaemia HL-60 cell의 monocyte로의 분화를 증가시켰다는 보고도 있다.

또 다른 예로서, NK에 특이적으로 발현되는osteopontin (OPN)은 여러 가지의

암세포에서 발현되고 분비되는 당단백질로서, 상피세포 (Epithelium)의 형질전환 지표로 처음 알려진 이후, 골기질의 주요 성분으로 알려지면서 연구가 활발히 진행되었고, 여러 cytokine의 생산을 조절하는 등 면역 체계에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (*Science***287** (2000), pp. 860 - 864. *Science***294** (2001), pp. 1731 - 1735.). OPN은 골세포 뿐만 아니라 상피세포, 혈관 내피세포등과, macropahge, T cell, B cell, dendritic cell, NK cell등의 면역세포에서도 발현이 되고 있다. OPN은 세포의 이동과 cell-mediated immunity를 조절함으로써 cytokine의 역할을 수행하므로, OPN 자체를 cytokine으로 분류하기도한다. 특히, 최근 stromal cell에 의해 활성화된 monocyte의 OPN에 의해 CD34+ HSC의 Notch-1 발현이 감소됨이 알려졌다 (Blood, vol 103, 4496-4502). Notch-1은 HSC의 분화를 억제함으로써 self-renewal에 영향을 준다. 또한 notch signal을 억제하면 thymocyte의 NK 분화를 유도한다 (Eur J Immunol. 34(5):1405-13).

OPN의 수용체로는 CD44와 integrin receptor가 알려져있는데 CD44는 NK 세포에서 interferon gamma 의 생성을 유도함으로써 NK 활성화에 관여하고 (J Interferon Cytokine Res. 2004 May 24(5):301-309), IL-2에 의해 활성화 된 NK에서 OPN의 발현이 증가됨이 알려져 있다 (J Leukoc Biol. 1994 Mar;55(3):398-400). 이로 미루어 볼 때 OPN과 CD44의 상호작용에 의해 NK의 활성이 조절됨을 예상할 수 있다. 반면 현재까지 OPN이 NK 분화에 관련이 있다는 보고는 되어있지 않다. 따라서 본 연구에서는 OPN이 NK 분화 또는 활성화에 미치는 영향과 그 조절기작을 연구하고, 이를 암치료에 임상적으로 적용함을 목적으로 한다.

제 7 장 참고문헌

Science 1998, 279:1528-1530

Science 1999, 284:534-537

Nature Med 2000, 6:1229-1234

Nature Cell Biology 2001, 3:778-784

Nature 2000, 404: 193-197

Cell 1997. 91:667-672

J. Immunol. 1995, 154:1653-1663).

J.I. 2001. 31: 1900-1909

Science 1993, 262:1059-1061

J. Exp. Med 1997, 185:499-505

Proc.Natl.Sci.USA 1995, 92:377-381

Blood 1997, 89: 4005

J. Immunol. 2000, 165: 91

J .Immunol. 2000, 30: 2074-2082

J.I. 2001. 31: 1900-1909

Nature Immunol. 2002, 3: 523

Science, 1988, 241-58-62

PNAS 89: 1502-6, 1992

Science 1995, 265:1098-1101

J. I. 2002, 168: 4980-4989

Science, 1988, 241-58-62

PNAS 89: 1502-6, 1992

Science 1995, 265:1098-1101

J. I. 2002, 168: 4980-4989

Biochem. Biophys. Acta 1994, 1219: 26-32

J. Biol. Chem. 1999, 274: 21645- 21650

J. Immunol. 2000, 164: 6287-6295

Immunology Letters 2003, 86 : 235-247

J Cell Biochem. 1992, 49(1):26-31

Scand J Immunol. 1989, 30(2):199-208

FEBS Lett. 2003, 553(3):413-8

Exp Mol Pathol. 1999;67(2):63-74

J Cell Physiol. 2004;198(1):22-30

J Biol Chem. 2001, 276(7):4662-70

Blood 2004 103 (12) :4573-4580

FEBS Lett. 1998;436(3):329-34

Exp Cell Res. 2002, 272(2):176-84
Science 2000, 287: 860 - 864
Science 2001, 294: 1731 - 1735
Blood, 103: 4496-4502
Eur J Immunol. 34(5):1405-13
J Interferon Cytokine Res. 2004 ,24(5):301-309
J Leukoc Biol. 1994, 55(3):398-400