

개의 단핵구로부터의 수지상 세포 배양

이기호, 김미형, 고은주*

제주특별자치도 제주시 아라1동 제주대학교 690-756, 수의학과 수의약리학실

Generation of Canine Dendritic Cells from Blood Mononuclear Cells

Ki-Ho Lee, Mi-Hyoung Kim, Eun-Ju Ko*

Pharmacology lab, Department of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

ABSTRACT

Dendritic cells(DCs) are the potent antigen-presenting cells that play a critical roles in immune responses. Although there are many studies about DCs originated from human and mice, very small number of studies about canine DCs were performed. Since dog is the most popular pet and has some similar immunological characters to human, the studies about canine DCs should be recognized as an important topic. This study demonstrated the culture method to generate canine DCs from the monocytes originated from bone marrow and peripheral blood based on several previous studies. In brief, the identification of canine DCs using markers, the functional tests and the application of canine DCs were treated in this study.

Key words : Canine, Dendritic cells, PBMCs, Bone Marrow

개 수지상세포 이용의 의의

면역학적 관점에서 사람의 질병을 연구하는데 있어서 개는 다른 동물에 비하여 더 큰 의미가 있는 모델이 될 수 있다. 수지상 세포(dendritic cell)는 최근에 활발히 진행되고 있는 연구 과제이다. 지금 각 연구들은 말초혈액유래의 단핵구(Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMCs)로부터 수지상세포를 in vitro에서 생성하여 생성물의 구조적, 기능적, 초미세 구조적 성질을 밝히는 연구를 많이 수행하고 있다.

사람에게 영향을 주는 면역학적 질환을 연구하는데 있어서 개는 아직까지 널리 연구된 동물이 아니었으며 그 대신에 설치류(rodent)에게 행해진 연구는 지금까지 면역학적, 계통발생학적, 치료적 방법으로 많은 도움을 주어왔다. 하지만 몇 가지 이유로 인하여 더 큰 동물 모델로서 개가 흥미를 끌게 되었다. 개는 설치류보다 사람에게 가깝고, 장기간의 실험평가를 하게 해준다. 게다가, 대부분의 임상학적인 관점에서의 개의 질병들은 면역질환과 전염성 질환에 있어서 사람의 질

* Corresponding author : Eun-Ju Ko, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Ara 1 dong, Jeju 690-756, Jeju, Republic of Korea(Email : ssamzie226@hotmail.com)

병과 상당한 유사성을 보여 준다고 한다. 예를 들어, 이미 알려진 바와 같이 개의 아토피는 사람의 알러지성 질환을 연구하기 위해 상당히 적합한 모델 동물이다. 개의 자가 면역성 질환의 면역학적 메커니즘은 사람의 그것의 세포, 분자 단위의 비정상성과 상당히 닮아 있기 때문이다. 그리고 인수 공통 기생충 질환에 있어서도 사람에게서 뿐만 아니라 개도 임상적, 면역학적 반응을 나타내는 등 그 연구대상으로서의 유용성을 나타내준다.

현재 수지상세포는 많은 동물에서 발견되고 있고 in vivo와 in vitro 상에서 뛰어난 항원 전달 능력을 보여주며, 적응면역과 면역관용에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

그러나 개의 수지상세포(dendritic cell)에 대한 면역학적 분야는 아직 다른 동물이나 사람에 비하여 충분히 연구되지 못한 실정이다.

지금까지 수지상세포의 연구는 사람과 설치류에 있어서 종양이나 바이러스 항원에서 유래된 펩타이드에 대한 CD4+와 CD8+ 림프구의 인식과 항원특이적 림프구의 생성을 위해 성공적으로 이용되어 왔다.

다시 말해 수지상세포는 설치류를 대상으로 몇 가지 사람의 자가면역성, 바이러스성 질환을 예방하기 위해 연구대상으로 이용되어 왔는데, 만약 개에서 in vitro 상태로 자기의 기능을 제대로 발휘할 수 있는 수지상세포를 얻는다면 이보다도 사람의 면역학적 연구를 위해서 아주 유용한 재료가 될 수 있을 것이다.

개의 혈액에서 수지상세포의 채취

지금까지 연구 상황을 보면 개의 수지상세포는 마취 하에서 상완골(Humerus)의 골수(Bone Marrow)에서 골수 전구세포로부터 추출(aspiration)하여 얻었는데, 이는 일상적으로 이용되기에는 상당히 침습적인 방법이라고 할 수 있었다(2000; Hägglund 등, 2003; Weber 등, 2006; Isotani 등). 따라서 골수 천자를 하지 않고 말초부위에서 혈액을 채취하여 수지상세포를 배양하는 방법이 개발되었다(2002; Catchpole 등, 2003;

Yoshida 등, 2005; Ibsch 등, 2006; Bonnefont-Rebeix 등). 주로 경정맥(Jugular vein)과 상완 정맥(Cephalic vein)에서 정맥 천자(Venous puncture)를 실시하여 말초혈액유래의 단핵구를 채취하였다. 그 후, in vitro 상태에서 항체 특이적인 T cell의 자극제를 자기유래(autologous) 단핵구와 함께 두어서 수지상세포를 발생시키는 방법을 고안하게 되었다.

수지상세포 배양 시에 사용된 사이토카인의 종류를 기준으로 크게 네 가지 범주로 나눌 수 있는데

첫째, 골수세포 천자를 시행한 실험에선(2000; Hägglund 등, 2003; Weber 등, 2006), 각각 human Granulocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF), hFlt3, Human recombinant Tumor Necrosis Factor α 그리고 human recombinant GM-CSF, human recombinant IL-4, human recombinant IL-1 β , Human recombinant Tumor Necrosis Factor α 를 사용하였으며

둘째, 말초혈액(PBMC)을 천자하여 IL-4와 GM-CSF를 사이토카인으로 배양 시에 사용한 실험이 있다(2005; Ibsch 등, 2006; Bonnefont-Rebeix 등, 2002; Catchpole 등). Bonnefont-Rebeix의 실험에서는 그 외에 human이나 Canine TNF α 를 첨가해보고 후 자극제로 Con A, PHA, LPS 등을 시도해 보았으며 Catchpole 등은 IL-4와 GM-CSF 외에 human Flt3-ligand를 첨가하여 보았다.

셋째, 말초혈액유래의 단핵구를 채취하여 Phytohaemagglutinin-P(PHA)를 배양 시에 사이토카인으로 사용한 실험이 있다(2003; Yoshida 등).

마지막으로 최근에 말초혈액유래의 단핵구에 순수 사이토카인을 사용하지 않고 고정 CD3상태에서의 T 세포가 배양된 배지를 이용하여 수지상세포를 발생시켰다(2006; Wijewardana 등).

배양한 수지상세포의 형태

대부분의 수지상세포는 골수 전구세포에서 유래

되는 단핵구(monocyte) 계열의 골수 수지상세포(myeloid dendritic cell)이다. 수지상세포(dendritic cell)는 림프기관, 피부와 소화기, 호흡기 등의 상피조직과 대부분의 내부 기관에 존재한다. 이들은 항원의 포획과 단백질 항원에 대한 T림프구의 반응을 유발하는데 중요한 역할을 하며 형태학적으로 표면에 가시와 같은 돌기로 확인할 수 있다.

골수세포와 PBMC로부터 배양이 진행됨에 따라 수지상 세포로 발전해 가는 과정을 현미경으로 형태관찰을 하였다.

대부분의 실험에서 단핵구의 배양이 진행되어 성숙됨에 따라 돌기(cytoplasmic process)가 생김을 공통적으로 보고하고 있다.

Yoshida 등의 실험에선 형태 관찰을 용이하게 하기 위하여 Diff-Quick, alpha-naphtylbutyrate 그리고 Hemacolor 염색법을 사용하여 말초혈액 유래의 단핵구에 비하여 다각형의 염기성, 방추형태의 세포질을 가지며 긴 돌기를 가지고, 핵은 난원형이나 둥근 형태로 한 개 혹은 두 개를 갖는다고 기술하고 있다.

Ibisch 등의 실험에선 전자현미경을 사용하여 형태를 관찰했는데, 배양 1주일 후 전형적인 수지상 세포를 얻을 수 있었으며 전자 현미경상 전형적인 세포 돌기와 분명한 라이소좀(lysosome)을 관찰할 수 있었다. 또한 풍부한 골지체(Golgi apparatus)와 ER(endoplasmic reticulum)도 또한 수지상세포임을 확인시켜주었음을 보고하였다. 특이한 사항으로 개의 수지상세포에서는 PMS(Periodic MicroStructure)를 갖는 다양한 크기의 진한 과립(dense granule)이 발견 되었는데 이 논문은 이 구조를 개의 분화된 단핵구의 발달과정에서 단핵구 계열의 세포임을 확인할 수 있는 marker로서의 가능성을 제시하고 있다.

확립된 수지상세포의 Marker

실험 시 배양된 수지상 세포의 표면에서는 고유한 분자들이 발현된다. 발현되는 분자들은 marker로서 수지상세포를 다른 세포와 분별하는 기준이 되기도 한다. 뿐만 아니라 전자현미경적

구조상 다른 세포와 다른 특이한 구조적 특징이 있다면 marker로 삼을 수도 있다. 연구자들은 실험에서 이러한 marker를 확인 검증 하고 또 새로운 marker를 찾는데 노력을 기울였다.

많은 실험에서 배양 후 또는 전에 얻어진 단핵구의 세포 표면에 존재하는 항체를 분석하기 위하여 유세포분석을 행하였다. 유세포분석은 일반적으로 다른 종류의 세포를 확인하고 분류하는 기법으로 레이저 광선을 이용해서 발산되는 형광을 측정한다.

배양된 수지상세포를 확인하기 위하여 각 실험들은 세포 표면의 각기 다른 분자들을 marker로 사용하였다. Catchpole 등은 MHC class II와 CD1a 그리고 CD11c를 marker로 사용하였는데 이는 이미 다른 동물 종에서 수지상세포의 marker로서 사용된 적이 있었다.

Weber 등은 immunohistochemical staining을 통해 수지상세포 표면에 강력한 MHC class II와 CD1a의 발현을 알 수 있었으며 유세포분석으로 CD14는 발현되지 않음을 확인하였다.

한편, Yoshida 등은 canine DC의 표면에 CD8, CD11 그리고 MHC class II를 발현하며 약하게 CD4도 발현하고 있다고 보고하였다.

Yoshida 등의 실험에선 유세포분석을 통하여 CD14와 함께 CD11c와 MHC class II를 발현하고 있음을 확인하였는데 그밖에 CD14는 발현하나 MHC class II는 발현하지 않는 macrophage 그리고 개의 과립구에 해당하는 세포들이 CD11은 발현하지만 CD14나 MHC class II는 발현하지 않음을 확인하였다.

Bonnefont-Rebeix 등은 MHC class II와 CD32 외에 동시 자극 인자 CD86이 최초로 개의 단핵구 유래 수지상세포의 표면에서 발현되며 새로운 marker로서 쓰일 수 있음을 보여주었고 또 그 CD86 발현은 주로 IL-4에 의한 것임을 알 수 있었다.

순수 사이토카인을 배양 시에 사용하지 않고 T림프구를 배양한 배지에서 수지상 세포를 배양시킨 Wijewardana 등은 MHC class II와 CD1a가 표면에서 발현됨을 보고하였다.

수지상세포의 기능 평가

혼합배양법(Mixed Lymphocyte Reaction; MLR)은 생성된 수지상세포의 항원전달기능을 가늠할 수 있는 척도로서 사용되는 실험으로 한 개체의 단핵구와 다른 개체의 림프구를 배양함으로써 반응이 일어나는데, 결과 분석을 단순화하기 위하여 공여자의 단핵구를 약물이나 방사선으로 전 처리하여 자극자로만 작용하게 하고 다른 전 처리되지 않은 림프구는 증식할 수 있어서 반응세포로 기능하게 된다. MLR을 통해 배양으로 얻어진 수지상세포가 항원 제시기능을 제대로 하는지 검사되었다.

Weber 등의 실험에선 배양된 개의 수지상세포에 의한 동종 T 림프구 자극시험을 행했는데 대조군은 같은 개체의 말초혈액유래의 단핵구에 의한 동종 T 림프구 자극 시험이었다. 시험 결과 수지상세포가 말초단핵구보다 100배 이상의 강력한 동종 T 림프구 자극능력이 있음을 보여 줬다.

Ibisch 등은 자극자로서 개의 수지상세포와 배양 시 부착력이 없는 세포(림프구) 그리고 부착력이 있는 말초혈액 유래의 단핵구를 각각 조사(20Gy) 시키고 관계없는 다른 개의 말초혈액 림프구를 반응세포로 사용하였다. 그 결과 IL-4와 canine GM-CSF가 모두 있는 상태에서 일주일의 생성기간을 거친 개의 수지상세포가 가장 효율적인 동종 림프구의 자극자임을 보여 주었다.

Bonnefont-Rebeix 등은 배양해서 얻어진 개의 수지상 세포를 조사(30Gy) 하여 자극자로서 사용하고 동종 PBMC를 반응세포로 사용하여 실험하였는데 위의 Ibisch 등의 실험과 유사하게 canine GM-CSF와 canine IL-4가 모두 있는 조건에서 배양한 것이 두 가지중 한 가지만 있는 상태에서 배양한 것에 비해서 강한 증식 반응이 나타남을 발견하였고 자극세포/반응세포 비율이 1:100인 경우가 가장 강한 림프구 증식을 가져옴을 보여 주었다.

순수 사이토카인 없이 위의 실험들과 다른 배양 조건을 가지고 개의 수지상 세포를 배양시킨 Wijewardana 등의 실험에서도 혼합배양을 통하여 그 능력이 검증되었는데 T 림프구를 배양시킨 배지에서 배양 12일 만에 반응시킨 경우가 가장

뛰어난 동종 T 림프구 자극능을 보여 주었고 동시에 IL-18, 인터페론-감마, TNF- α 도 동시에 발현하고 있음을 보여주었다.

수지상세포의 기능이라고 할 수 있는 포식, 항원 제시의 기능 중에서 포식기능을 알아보는 실험은 몇몇 실험자들이 행하였다. 포식기능은 특히 수지상 세포를 면역학적인 관점에서 백신으로의 활용 가능성을 생각할 때 상당히 중요한 기능이라고 할 수 있다.

Yoshida 등은 종양세포에 대한 포식능을 시험하였는데 배양 8일째에 개 수지상세포를 HEK-293 (human embryonic kidney cell)과 24시간 동안 동시배양하고 형광염색법(DiO and DiI 사용)을 이용하여 포식능을 유세포분석으로 조사한 결과 30%정도의 개 수지상세포가 HEK-293을 섭취하였음을 알 수 있었다. 또한 다른 개에도 실험하여 본 결과 비슷한 결과를 얻을 수 있었다.

Wijewardana 등은 mannose 수용체를 통한 dextran의 수지상세포 내로의 이동을 측정 했는데, T 림프구가 배양된 배지에서 배양함으로써 그 능력이 감퇴됨을 알 수 있었고, 배양 12일째에는 오직 10%정도의 단핵구들만이 dextran을 흡수하였음을 관찰할 수 있었다. 이러한 수지상세포의 성숙에 따른 탐식기능의 감소는 이미 보고된 바 있다.

수지상세포의 응용 가능성

Lopez 등의 실험과 같이, 설치류를 통하여 행해졌던 수지상세포의 생성실험과 바이러스 감염 실험은, 생체 외에서 감염된 수지상세포가 생쥐에 주입하였을 때 interleukin-12를 분비하고 T helper 1 면역반응을 유발함을 세포독성 T cell, 감마 인터페론 그리고 IL-4의 체내 생성을 통하여 증명하였는데 이러한 유용한 결과를 인간에 적용하기 위하여 사람에게 좀 더 가까운 종인 개에로의 응용이 필요하게 되었고 이후 몇몇 연구자들은 이를 위하여 개에서의 수지상세포 생성시험에 착수하였다.

위에서 논의된 바와 같이 각각의 논문들은 전

반적으로 개의 골수 혹은 말초 혈액으로부터 단핵구를 얻어내어서 조금씩 다른 배양 조건이었지만 성공적으로 수지상세포를 배양함에 성공하였고, 그 기능도 정상적인 수지상세포에 비해서 부족함이 없는 것으로 보고하고 있다. 이러한 연구를 기반으로 꾸준한 연구가 지속 된다면 우리는 장차 개의 종양 치료분야에서 생검을 통하여 얻은 종양세포를 이용하여 수지상세포에 기반을 둔 면역요법을 사용할 수 있을 것이다.

지금까지 진행된 연구에 따르면 이미 개의 수지상세포가 mitomycin-C와 융합되었거나 방사선 조사되어 비활성화된 종양세포를 탐식하기에 이르렀다고 한다. 본문에 언급된 Yoshida 등의 연구에서도 개의 말초혈액 유래의 단핵구를 배양시킨 수지상세포가 종양세포를 탐식함을 보고하였다. 또한 Wijewardana 등은 순수 싸이토카인이 없는 상태에서도 실용적으로 높은 수율의 수지상세포를 얻을 수 있는 방법이 있음을 제시하였다. 상기 방법을 이용하여 종양세포를 수지상세포와 함께 배양시키면 그 종양에 특이적인 면역 반응을 나타내는 백신을 개발할 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 연구들이 기반이 되어 적게는 개의 질환 치료에 있어서 면역학적 치료법 개발의 초석이 되고 나아가서는 사람의 질병 연구에 있어서 전 임상적인 연구단계로 발전시킬 수 있어 인류의 불치병을 연구하는데도 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Hägglund H.G., McSweeney P.A., Mathioudakis G., Bruno B., Georges G.E., Gass M.J., Moore P., Sale G.E., Storb R., Nash R.A. 2000. Ex vivo expansion of canine dendritic cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *Transplantation*. 70(10):1437-1442
2. Catchpole B., Stell A.J., Dobson J.M. 2002. Generation of blood-derived dendritic cells in dogs with oral malignant melanoma. *J Comp Pathol*. 126(2-3):238-241
3. Weber M., Lange C., Günther W., Franz M., Kremmer E., Kolb H.J. 2003. Minor histocompatibility antigens on canine hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 170:5861-5868
4. Yoshida H., Momoi Y., Taga N., Ide K., Yamazoe K., Iwasaki T., Kudo T. 2003. Generation of canine dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *J Vet Med Sci*. 65(6):663-669
5. Ibsch C., Pradal G., Bach J.M., Lieubeau B. 2005. Functional canine dendritic cells can be generated in vitro from peripheral blood mononuclear cells and contain a cytoplasmic ultrastructure marker. *J Immunol Methods*. 298:175-182
6. Bonnefont-Rebeix C., de Carvalho C.M., Bernaud J., Chabanne L., Marchal T., Rigal D. 2006. CD86 molecule is a specific marker for canine monocyte-derived dendritic cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 109:167-176
7. Wijewardana V., Sugiura K., Oichi T., Fujimoto M., Akazawa T., Hatoya S., Inaba M., Ikehara S., Jayaweera T.S., Inaba T. 2006. Generation of canine dendritic cells from peripheral blood monocytes without using purified cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*. 114(1-2):37-48
8. Saalmüller A. 2006. New understanding of immunological mechanisms. *Vet Microbiol*. 117(1):32-38
9. López C.B., Fernandez-Sesma A., Czelusniak S.M., Schulman J.L., Moran T.M., 2000. A mouse model for immunization with ex vivo virus-infected dendritic cells. *Cell Immunol*. 106(2):107-115
10. Isotani M., Katsuma K., Tamura K., Yamada M., Yagihara H., Azakami D., Ono K., Washizu T., Bonkobara M. 2006. Efficient generation of canine bone marrow-derived dendritic cells. *J Vet Med Sci*. 68(8):809-814

