



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

백신 adjuvant로서 fucoidan의  
*in vitro* 및 *in vivo* 효과

濟州大學校

獸醫學科

高 銀 珠

2011年 8月

백신 adjuvant로서 fucoidan의  
*in vitro* 및 *in vivo* 효과

指導教授 朱 洪 球

高 銀 珠

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2011年 8月

高銀珠의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

濟州大學校 大學院

2011年 8月

초록

# 백신 adjuvant로서 fucoidan의 *in vitro* 및 *in vivo* 효과

(지도교수: 주홍구)

고은주

제주대학교 대학원 수의학과

백신은 전염성 질병을 예방하는데 있어서 매우 중요한 역할을 담당하며 adjuvant는 백신의 효능을 높이는데 필수적이다. 많은 adjuvant들이 개발되어 왔지만 독성, 안정성, 생체 내 면역활성 등에서 많은 약점을 가지고 있다. Fucoidan은 갈조류로부터 추출된 sulfated polysaccharide로써 다양한 면역세포에 면역자극 효과를 가지고 있다. 본 연구에서는 fucoidan이 백신 adjuvant로서 효과가 있는지 알아보기 위해 *in vivo* 항원접종을 통한 동물실험과 *in vitro*에서 수지상세포에 fucoidan을 처리하여 그 효과를 알아보았다. 접종된 마우스의 혈청에서 ovalbumin 특이적인 immunoglobulin(Ig)G, IgG1, IgG2a의 항체가가 높아졌으며, 접종마우스의 비장세포에서는 세포의 proliferation과 IgG 생산 증가가 나타났다. 또한 비장세포의 interleukin(IL)-4와 interferon- $\gamma$  생산이 균형있게 나타나 fucoidan이 T helper 1과 T helper 2 면역반응을 모두 일으킬 수 있음을 확인했다. 그리고 fucoidan을 수지상세포에 처리하였을 때 대표적인 성숙표면마커인 major histocompatibility complex II와 CD86의 발현이 증가되었으며 IL-12와 tumor

necrosis factor- $\alpha$ 의 생산 또한 증가되었다. 즉, fucoidan은 Th1과 Th2 면역반응을 일으키며 항원제시세포인 수지상세포를 활성화시킴으로써 효과적인 백신 adjuvant가 될 수 있을 것으로 기대된다.

**Keywords:** fucoidan, adjuvant, vaccine, Th1 and Th2 immune responses

Abstract

*In vitro* and *in vivo* efficacy of  
fucoidan as a vaccine adjuvant

Supervised by professor Hong-Gu Joo

Eun-Ju Ko

College of Veterinary Medicine,

Graduate school,

Jeju National University

Vaccines play very important roles in protecting hosts from infectious disease and adjuvants are essential to increase the potency of vaccines. Although many adjuvants have developed for last 70 years, they have many weaknesses such as toxicity, poor stability and bioavailability. Fucoidan is a sulfated polysaccharide derived from brown algae and has immunostimulatory properties in various immune cells. In this study, we performed *in vivo* antigen(Ag)-specific immunization using mice and *in vitro* experiments using dendritic cells(DCs) to investigate whether

fucoidan can be used as a vaccine adjuvant. Ovalbumin(OVA) was used as the standard antigen for this experiment. The levels of OVA-specific immunoglobulin(Ig)G, IgG1 and IgG2a in immunized mice sera were dramatically enhanced by fucoidan. And the cell proliferation rate and OVA-specific IgG production of splenocytes of immunized mice were also increased by fucoidan. The production of interferon- $\gamma$  and interleukin-4, representative cytokines for T helper (Th)1 and Th2, of immunized splenocytes was increased by fucoidan with or without alum. This results indicate that fucoidan can upregulate both Th1 and Th2 immune responses. *In vitro* experiments demonstrated that fucoidan effectively increased the expression of surface markers for maturation and cytokine production of DCs. It is thus suggested based on these data that fucoidan can be an effective vaccine adjuvant to induce Th1 and Th2 immune responses and stimulate DCs.

**Keywords:** fucoidan, adjuvant, vaccine, Th1 and Th2 immune responses



목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료	및 방법	-----	3
III. 결	과	-----	7
IV. 고	찰	-----	15
V. 참	고 문 헌	-----	18



## I. 서론

백신은 질병을 예방하는데 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 백신은 체내 면역계의 메모리 기능을 이용하여 같은 병원체에 노출되었을 때 더 빠르게 반응할 수 있도록 한다. 이러한 백신은 백신항원과 adjuvant로 구성이 되는데 adjuvant는 백신의 효능을 높이고 적절한 면역 반응이 일어나도록 자극하는 역할을 한다.

지난 70년 간 aluminum compound인 alum은 대표적인 adjuvant로써 가장 널리 사용되어 왔다 [19]. Alum은 항원물질을 흡착하여 체내에서 오래 존재하도록 하고 항원을 탐식하는 항원제시세포를 활성화시키며 [5, 7, 16], 항원을 항원제시세포가 탐식하기 좋도록 수용성항원을 입자성 물질 형태로 변화시키는 역할을 해서 adjuvant로서 기능을 한다 [14]. 하지만 alum은 피하 또는 피내 접종시 접종부위에 육아종을 형성할 수 있으며 [3, 25], IgE 생산을 증가시켜 allergenicity를 갖는다. 또한 신경독성을 가지고 있으며 신장기능 저하 환자에서는 aluminum이 체내에 축적되어 강한 독성을 나타낼 수 있다 [1, 6, 20]. 그 뿐만 아니라 alum은 세포매개성 면역을 일으키는 능력이 약하고 T helper(Th) 1 면역반응을 거의 일으키지 못 한다 [19]. 이 때문에 결핵, 티푸스, 브루셀라와 같이 세포내에 침입하여 증식하는 병원성미생물에 대한 백신 개발 시 alum은 adjuvant로써 기능이 약하다는 한계를 가지고 있다.

최근에는 oil in water emulsion adjuvant와 alum에 흡착된 monophosphoryl lipid A(MPL) 등이 새롭게 승인되어 이용되고 있다 [19]. Oil in water emulsion adjuvant는 독감백신의 adjuvant로서 항원에 대한 면역반응을 일으키는데 효과적이지만 접종부위에 염증, 육아종, 또는 궤양을 일으키는 부작용이 있어서 예방용 백신에 사용하기에 적합하지 않다 [21]. 또한 MPL은 toll-like receptor agonist인 lipopolysaccharide의 lipid A를 변형시켜 독성을 줄인 것인데 [2], 이것은 단독으로 효과가 높지 않으며 alum에 흡착된 형태로 사용되고

있다 [19]. 따라서 기존 adjuvant의 단점을 극복할 수 있는 새로운 adjuvant 개발을 위한 많은 연구가 이루어져 왔으며 최근 주목 받고 있는 것이 천연물질에서 유래한 adjuvant의 개발이다. *Quillaja saponaria*의 껍질에서 추출된 사포닌 성분인 Quil A는 면역자극성복합체(immunostimulatory complexes)를 구성하는 성분으로 사용되며 Th1 면역반응과 세포독성 T 림프구를 활성화시켜 subunit 백신 또는 치료용 항암백신의 adjuvant로 적합하다 [24]. 하지만 접종 부위의 이질감 또는 육아종 유발과 전신적인 용혈을 일으킨다는 부작용을 가지고 있다 [8, 10, 11, 28]. *Actinidia eriantha*의 뿌리 [26], *Codonopsis pilosula*의 뿌리 [27] 등 여러 식물에서 추출된 수용성 polysaccharide에 대한 연구에서 세포성면역과 체액성면역, 그리고 Th1과 Th2 면역반응을 모두 유도하여 새로운 adjuvant로써 가능성이 있는 것이 밝혀졌다 [22]. 하지만 식물유래의 polysaccharide에 비해 상대적으로 경제적이고 대량생산이 가능한 해조류 유래 polysaccharide의 adjuvant 효과에 대한 연구는 매우 미흡하다.

Fucoidan은 갈조류에서 추출한 황산다당체로서 항종양효과 [17], 방사선 조사 시 골수세포 보호효과 [4]와 생존율 증가 [15] 등의 효과가 밝혀져 많은 주목을 받고 있는 물질이다. 그 뿐만 아니라 비장세포 [13], 대식세포 [29], 자연살해세포 [18], 수지상세포 [12]와 같은 다양한 면역세포에 대해 면역조절기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. Fucoidan은 비장세포에 작용하여 세포생존율을 증가시키고 면역반응성을 증진시킨다. 대식세포에서는 fucoidan이 염증성 cytokine인 tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 와 interleukin(IL)-1 생산을 유도시키며 자연살해세포에서는 세포독성 기능을 증진시키는 것이 밝혀졌다. 또한 수지상세포의 성숙에 관여하여 항원제시능을 포함한 면역능력을 증가시킨다.

따라서 본 연구에서는 ovalbumin(OVA)을 표준항원으로 사용한 마우스 실험을 통해 fucoidan이 백신 adjuvant로서 효과가 있는 지를 확인하고, 그 자세한 작용기전 연구를 위해 대표적인 항원제시세포인 수지상세포에 대한 fucoidan의 효과를 알아보았다.

## II. 재료 및 방법

### 실험동물 및 시약

모든 실험에 7-12 주령의 Balb/c와 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 시행되었으며 제주대학교 동물실험윤리지침을 준수하였다. OVA, *Fucus vesiculosus*에서 유래한 fucoidan과 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 모두 Sigma사에서 구입한 후 sterile phosphate-buffered saline(PBS)에 녹여 사용하였으며 Imject® Alum(alum)은 ThermoScientific사에서 구입하여 사용하였다.

### *In vivo* immunization experiments

7에서 12주령의 마우스를 다섯 개의 실험군(이하 군)으로 나누어 실험을 진행하였다. 각 그룹은 PBS, OVA(20  $\mu$ g), OVA + alum(1.6 mg), OVA + fucoidan(100 mg/kg), OVA + alum + fucoidan을 복강내접종 하였으며 alum이 OVA를 흡착할 수 있도록 접종 전 30분 간 흡착시간을 두었다. 접종 2주 후 접종마우스의 혈청과 비장세포를 채취하여 실험을 실시하였다.

### 세포의 준비 및 배양

골수세포는 C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골에서 얻어낸 후 저삼투압의 ammonium chloride potassium lysis buffer를 이용하여 골수세포 내의 적혈구를 용혈시켜 제거하였다. 이 골수세포에 10 ng/ml의 mouse granulocyte macrophage-colony stimulating factor를 처리하고 2일마다 배지를 갈아주며 6-10일간 배양하여 수지상세포를 얻어 실험에 사용하였다. 배양한 수지상세포를 회수하여  $5 \times 10^5$  cells/ml로 96-well 또는 6-well culture plates에 넣고 OVA 1  $\mu$ g/ml, alum 500  $\mu$ g/ml, fucoidan 50  $\mu$ g/ml을 처리한 후 2일 간 배양하고 분석하였다.

접종 마우스의 비장세포를 준비한 후 배양하는 실험은 이미 확립된 방법에 따라 실시했다 [9]. 간략히 설명하면, 마우스의 비장을 떼어내 물리적으로 분쇄시켜 세포를 얻고, 적혈구를 제거하였다. 그 후 5% fetal bovine serum(FBS)과 L-glutamine, penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI1640 배지에 세포를 풀어 T75 플라스크에 넣고 1시간동안 배양하여 대식세포와 같은 부착세포가 플라스크의 바닥에 부착되도록 하였다. 이 후 떠 있는 세포를 회수한 뒤 40  $\mu\text{m}$  cell strainer로 결합조직 등을 걸러내고 10% FBS와 L-glutamine, penicillin/streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acids, 2-mercaptoethanol이 첨가된 RPMI1640 배지를 이용해 96-well culture plate에  $4 \times 10^5$  cells/200 $\mu\text{l}$ /well로 비장세포를 넣은 후 OVA 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하거나 처리하지 않고 4일 간 배양하여 분석실험을 실시하였다. 모든 세포배양 시 온도는 37 $^{\circ}\text{C}$ , CO<sub>2</sub>의 농도는 5%를 유지하도록 하였다.

#### OVA 특이적인 항체가의 측정

접종된 마우스의 혈청과 세포배양액의 OVA-specific immunoglobulin(Ig)G, IgG1, IgG2a 수준을 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 이용하여 측정하였다. OVA를 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 희석시켜 Microtiter plates wells(NUNC사)에 넣어 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 코팅시켰다. 그 후 5% FBS를 포함한 PBS를 각 well에 넣어 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간동안 배양하여 blocking하였다. PBST(PBS containing 0.05% Tween20)로 세척한 후 0.5% FBS를 포함한 PBS로 희석시킨 혈청과 세포배양액을 well 당 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 배양하였다. 다시 PBST로 세척한 후 horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG, IgG1 and IgG2a를 0.5% FBS를 포함한 PBS에 8000배 희석시켜 well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 세척단계 후에 tetramethyl benzidine용액을 각 well에 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 어두운 곳에서 30분간 발색시키고 stop solution으로 enzyme reaction을 중단시킨 후 microplate reader(Molecular devices사)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### ELISA를 이용한 cytokine의 측정

접종한 마우스의 비장세포를 각 군별로 96-well culture plates에 넣은 후 OVA 1  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하거나 처리하지 않고 4일 간 배양하였다. 그 후 세포배양액을 걷어내서 IL-4와 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )의 생산량을 ELISA kit(Invitrogen사)를 이용해 측정하였다. 수지상세포에 OVA 1  $\mu\text{g/ml}$ , alum 500  $\mu\text{g/ml}$ , fucoidan 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 2일 간 배양한 후 세포배양액을 걷어 IL-12와 TNF- $\alpha$ 의 생산량을 ELISA kit(Invitrogen사)를 이용해 측정하였다.

### 비장세포의 세포증식을 측정

접종마우스의 비장세포를 배양한 후 MTT assay를 실시하였다. 배양한 세포에 MTT(10 mg/ml)용액을 각 well에 10  $\mu\text{l}$ 씩 처리하여 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 10% sodium dodecyl sulfate용액을 well 당 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 2시간동안 37°C에서 배양하였다. 그 후 microplate reader(Molecular devices사)를 이용해 흡광도(570 - 650 nm)를 측정하였다.

### 유세포분석

OVA, alum, fucoidan과 함께 배양된 수지상세포를 회수하여 5% FBS와 0.1% sodium azide가 포함된 PBS로 세척한 후 anti-mouse CD16/32(Fc blocker)를 처리하여 Fc receptor를 blocking하였다. 그 후 biotin-labeled anti-major histocompatibility complex(MHC) II와 anti-CD86 monoclonal antibody를 1차 항체로 처리하고, 2차 항체로 fluorescein isothiocyanate(FITC)-labeled streptavidin(BD Biosciences사)을 처리하고 1% paraformaldehyde로 고정시켰다. 염색된 세포를 FACSCalibur<sup>TM</sup> 과 CellQuest<sup>TM</sup>(BecktonDickinson, Franklin Lakes, NJ)을 이용하여 유세포분석을 실시하였다.

### 유의성분석

모든 data는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었으며 InStat software(Graphpad, San Diego, CA)를 이용하여 student t test를 통해 분석하였다. 0.05미만의  $p$  value를 유의성이 있다고 판정하였으며 \*, \*\*, \*\*\*는 각각 control그룹과 비교하

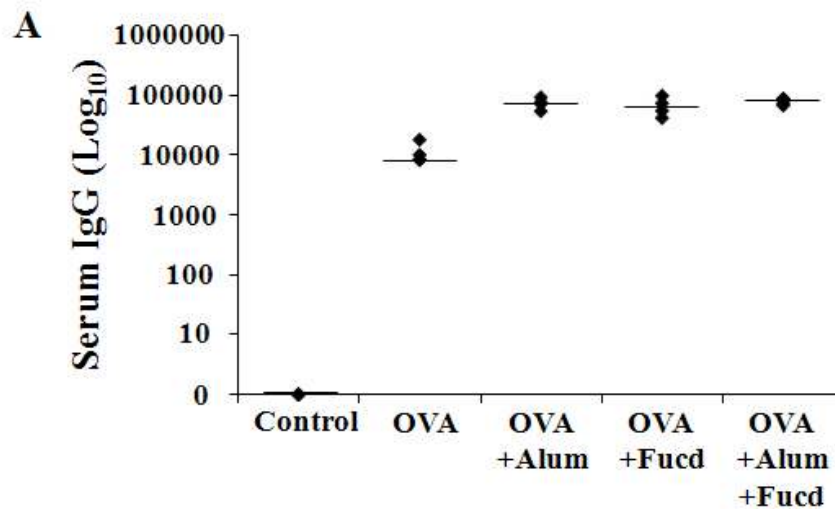
였을 때  $p < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ 을 의미하고, #, ##, ###은 각각 OVA그룹과 비교하였을 때  $p < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ 을 의미한다.

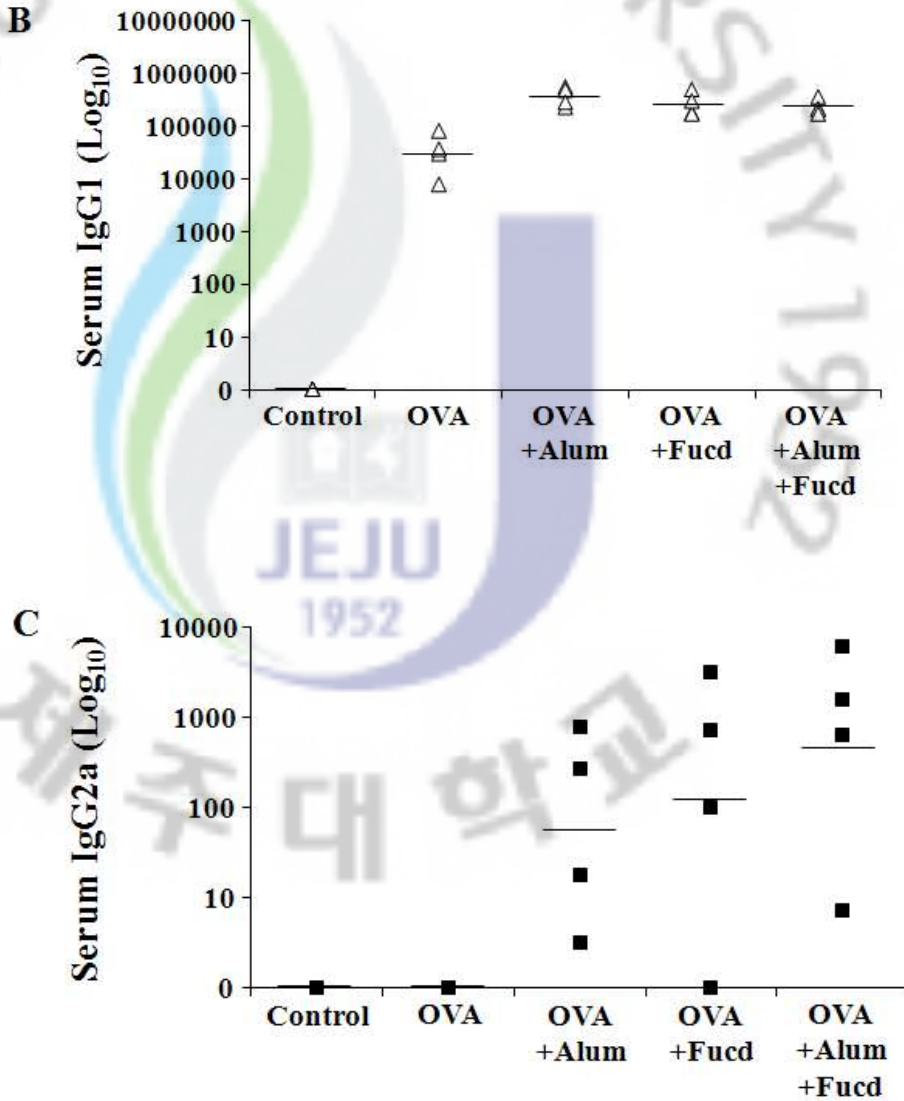


### III. 결과

#### 마우스 혈청에서 OVA 특이적인 IgG, IgG1, IgG2a 항체가 측정

OVA 특이적인 항체의 생성을 알아보기 위해 ELISA를 실시하였다. 접종마우스의 혈청을 접종 2주 후에 채취하여 10배 계단 희석한 후 흡광도가 0.1이 되는 혈청 농도를 구하여 그래프로 나타내었다(Fig. 1). Total IgG의 경우 OVA + alum, OVA + fucoidan, OVA + alum + fucoidan군 모두에서 높은 항체가를 나타내었으나 OVA 단독 접종시에는 항체가가 adjuvant와 함께 접종한 그룹에 비해 약 10배 낮게 나타났다(Fig. 1A). IgG1의 경우도 total IgG와 마찬가지로 OVA + alum, OVA + fucoidan, OVA + alum + fucoidan군에서 모두 비슷하게 높은 항체가를 나타냈으나(Fig. 1B), IgG2a는 fucoidan을 접종한 군에서 OVA 단독 또는 OVA + alum군보다 더 높은 항체가를 나타내었다 (Fig. 1C). 또한 OVA + fucoidan 보다 OVA + alum + fucoidan 군에서 상승효과로 IgG2a의 항체가가 더욱 높게 나타났다.





**Fig. 1.** The level of IgG(A), IgG1(B), and IgG2a(C) in immunized mice sera. Mice were injected with OVA, alum and/or fucoidan intraperitoneally. The sera were collected 2 weeks after the immunization and then analyzed.



### *In vitro* OVA 자극에 의한 면역된 비장세포의 분열능력 측정

OVA에 대한 비장세포의 기억능력을 알아보기 위해 접종마우스의 비장세포를 채취하여 *in vitro*에서 OVA를 처리하거나 처리하지 않았을 때의 proliferation을 MTT assay를 이용하여 측정하였다(Fig. 2). OVA를 처리하지 않았을 때에는 모든 군의 비장세포는 proliferation을 나타내지 않았으나 OVA를 처리하였을 경우 *in vivo*에서 노출되었던 OVA에 대한 antigen memory recall에 의해 proliferation이 나타났다. 이 때 OVA + alum, OVA + fucoidan, OVA + alum + fucoidan 군에서 모두 유의성 있는 높은 proliferation이 나타났으나 이 중 OVA + fucoidan 군의 proliferation이 가장 높게 나타났다.

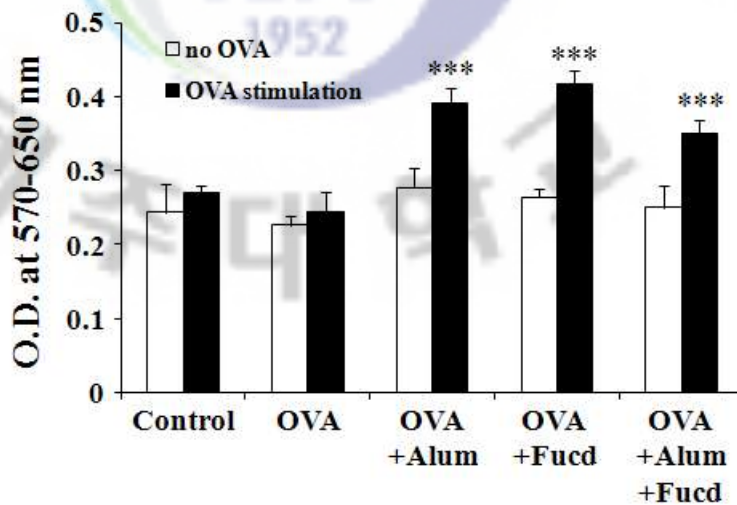
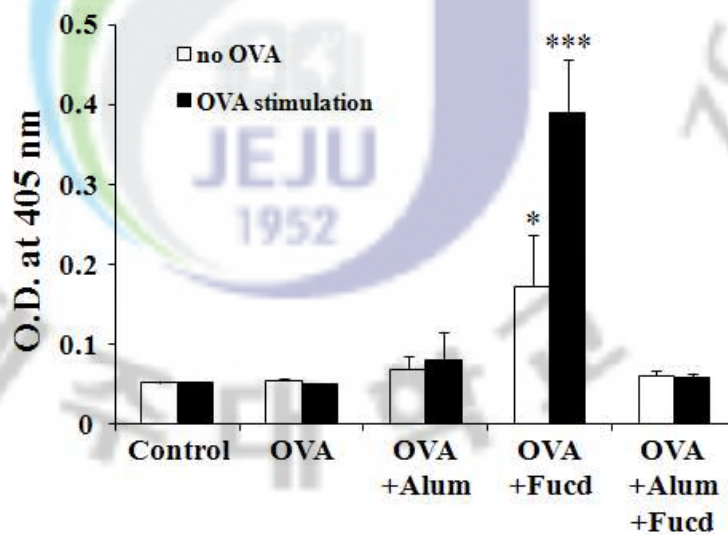


Fig. 2. Splenocytes proliferation by *in vitro* OVA stimulation. Splenocytes from immunized mice were seeded at  $4 \times 10^5$  cells/ml in 96-well culture plates and cultured with or without OVA  $1 \mu\text{g/ml}$ . 4 days later, MTT assay was performed. All values are represented as mean  $\pm$  SD. \*\*\* indicates  $p < 0.001$  compared to control.

*In vitro* OVA 자극에 의한 면역된 비장세포의 IgG 생산

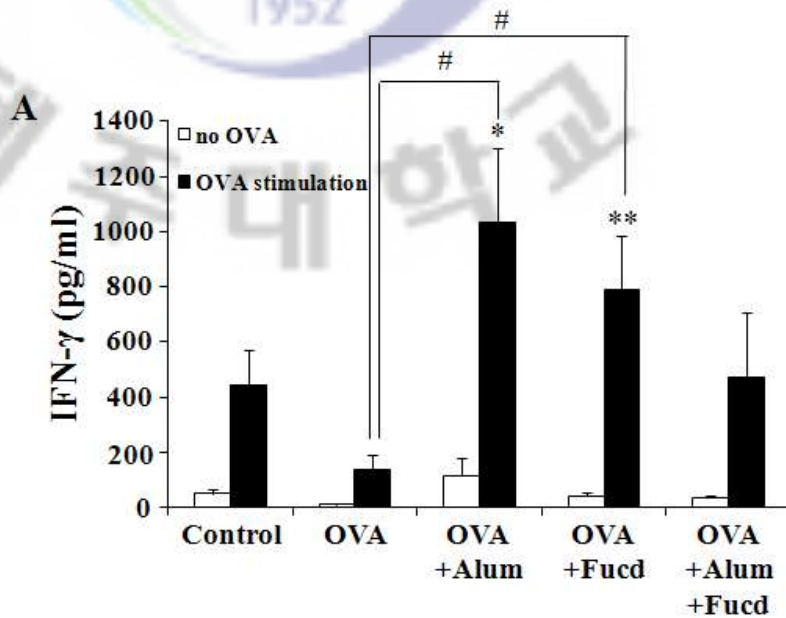
Fig. 2와 같이 비장세포를 배양한 뒤 세포배양액의 total IgG level을 ELISA법을 이용하여 측정하고 흡광도로 나타내었다(Fig. 3). OVA자극을 하지 않은 경우에도 OVA + fucoidan군에서의 IgG 생산이 가장 높게 나타났으며 OVA stimulation을 하였을 경우에도 OVA + fucoidan군에서 IgG 생산이 더욱 증가 되는 것을 알 수 있다.

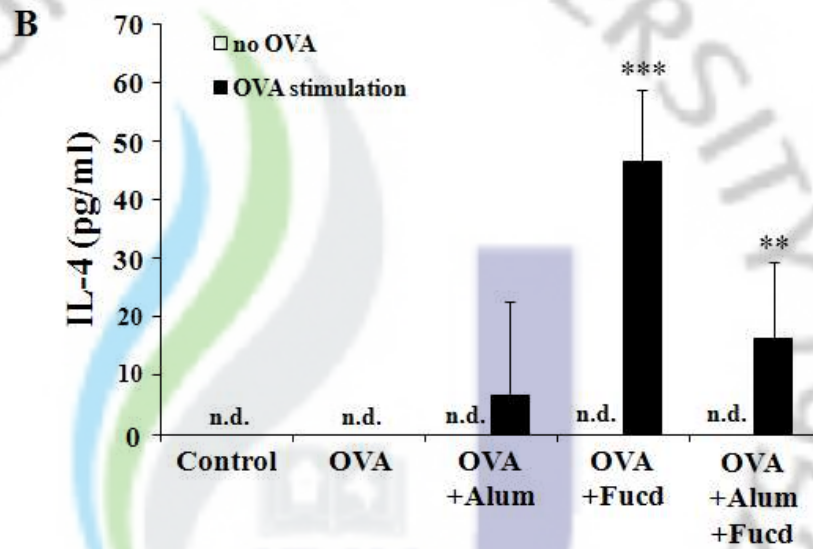


**Fig. 3.** IgG production of immunized splenocytes upon OVA stimulation. Splenocytes were setup in 96-well culture plates and treated with OVA as described Fig. 2. All values are represented as mean  $\pm$  SD. \*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ ,  $0.001$  respectively compared with control group.

### OVA 자극에 의한 면역된 비장세포의 cytokine 생산

Th1과 Th2 면역반응의 방향을 알아보기 위해 비장세포 배양액의 IFN- $\gamma$ 와 IL-4 생산량을 ELISA를 이용해 측정하고 그래프로 나타내었다(Fig. 4). IFN- $\gamma$ 는 Th1, IL-4는 Th2 면역반응을 나타내는 대표적인 cytokine이다. IFN- $\gamma$  (A)와 IL-4(B) 모두 OVA 자극이 없을 경우에는 모든 군에서 생산되지 않았으나 *in vitro* OVA 자극 시 OVA + alum, OVA + fucoidan, OVA + alum + fucoidan 군의 비장세포에서 생산이 증가되는 것을 확인 할 수 있으며 이 때 OVA + fucoidan에서 두 가지 cytokine 생산이 높게 나타나서 Th1과 Th2 면역반응을 모두 유도시키는 것을 알 수 있다.

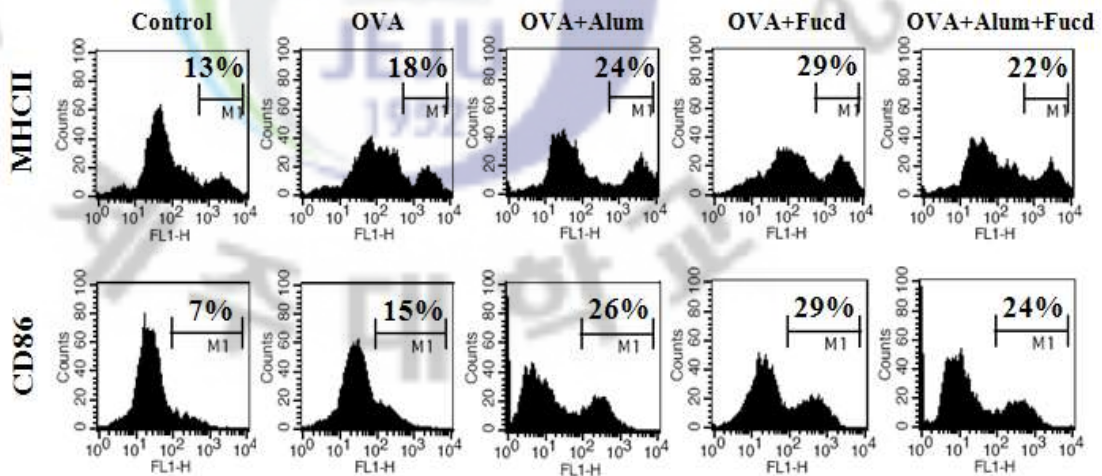




**Fig. 4.** IFN- $\gamma$  (A) and IL-4(B) production of immunized splenocytes. Splenocytes were setup in 96-well culture plates and treated OVA as described Fig. 2. All values are represented as mean  $\pm$ SD. \*, \*\*, \*\*\* indicate  $p < 0.05$ , 0.01, 0.001 respectively compared with control group and # indicates  $p < 0.05$  compared with OVA group.

### 수지상세포의 면역관련 표면인자 발현 변화

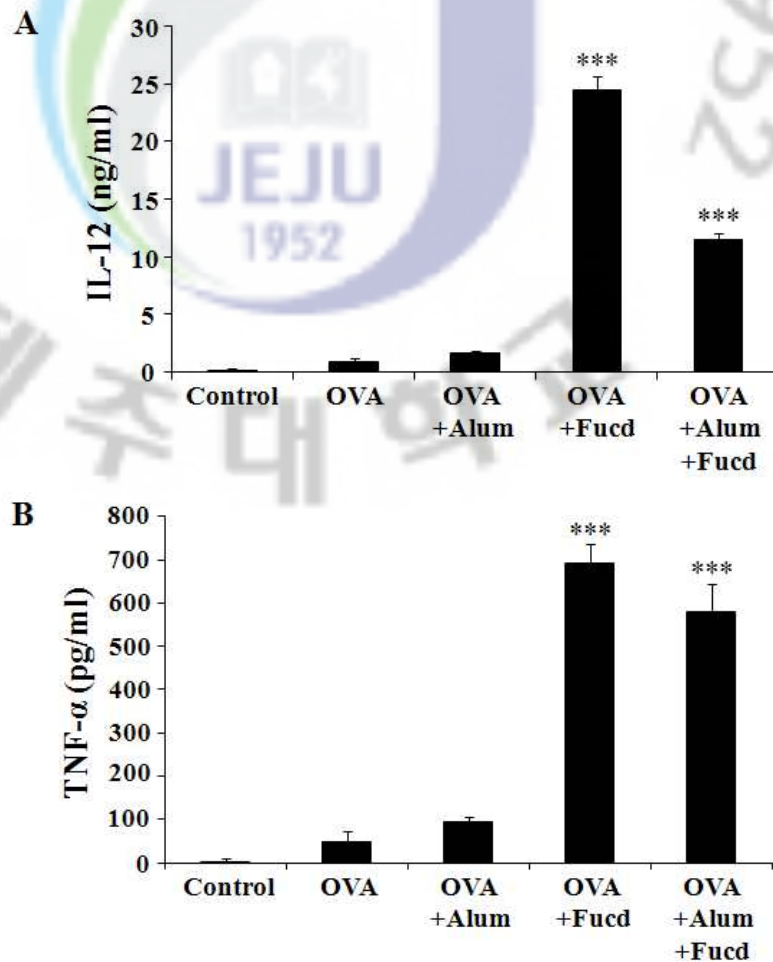
마우스 골수세포로부터 배양된 수지상세포에 OVA, alum, fucoidan을 처리하여 2일 간 배양한 뒤 세포를 회수해 면역형광염색을 실시한 후 유세포분석을 하였다(Fig. 5). Histogram의 M1은 MHC II와 CD86 고발현세포를 나타내며 수는 M1에 속하는 세포의 비율을 나타낸다. OVA에 의해 MHC II와 CD86의 발현이 모두 증가되었으며 그 증가 정도는 OVA + fucoidan 군에서 가장 높게 나타났다. 반면 OVA + alum + fucoidan군은 오히려 약간 감소하는 경향을 나타냈다.



**Fig. 5.** Upregulated expression of immune related-surface markers on DCs treated with fucoidan. DCs were seeded  $5 \times 10^5$  cells/ml in 6-well culture plates and cultured for 2 days with OVA, alum and fucoidan. And then the treated DCs were stained with antibodies specific for MHC II and CD86 and analyzed using by flow cytometry. The number of histograms indicates the percentages of high expressed cells. The representative data of three separate experiments were presented.

### 수지상세포의 cytokine 생산

수지상세포의 cytokine 생산 변화를 알아보기 위해 ELISA법을 이용하여 수지상 세포 배양액의 IL-12와 TNF- $\alpha$ 의 생산량을 측정하였다(Fig. 6). IL-12(A)와 TNF- $\alpha$  (B) 모두 fucoidan 처리군에서 증가되었는데, 이 때 OVA + alum + fucoidan군보다 OVA + fucoidan군에서의 cytokine 생산이 더 높은 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 6.** The increased production of IL-12(A) and TNF- $\alpha$  (B) from DCs. DCs were setup and treated as described in Fig. 5. All values are represented as mean  $\pm$  SD. \*\*\* indicates  $p < 0.001$  compared with control group.

#### IV. 고찰

현재까지 개발된 adjuvant는 대부분 화학물질 또는 병원성미생물 유래로 독성과 안정성, 면역유도 효과 등에서 약점을 가지고 있다. 따라서 독성이 낮아 신체에 해가 없으며 안정적인 면역반응을 균형있게 일으킬 수 있는 adjuvant의 개발이 필요하다. 따라서 fucoidan은 천연물질 유래로 독성이 적으면서도 면역증진 효과가 크다는 점에서 큰 장점을 가지며 새로운 백신용 adjuvant로서 높은 가능성을 갖는다.

OVA를 표준항원으로 이용하여 fucoidan을 단독 또는 alum과 함께 마우스에 접종하였다. Fucoidan 접종군의 혈청에서 IgG의 증가는 fucoidan이 체내의 B cell activation을 증가시킨다는 것을 의미한다. 즉, OVA-immunized mice의 체액성면역을 효과적으로 증가시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 또한 IgG1의 항체는 큰 변화가 없었으나 IgG2a의 경우 fucoidan 처리군에서 증가가 나타났다. 이는 fucoidan이 IgG isotype의 변화에 영향을 줄 수 있음을 나타내며 그에 따라 Th1 면역반응을 Th2 면역반응과 함께 일으킬 수 있다는 것을 보여준다.

또한 체내의 면역계는 한 번 노출된 항원(면역원)에 대한 정보를 기억해두었다가 같은 항원에 다시 노출되었을 때 더 빨리 반응할 수 있도록 한다. Fig. 2와 fig. 3에서 볼 수 있듯이 fucoidan 처리군에서는 *in vitro*에서 OVA에 다시 노출되었을 때 높은 proliferation과 IgG 생산을 나타내었다. 즉, fucoidan이 비장세포의 면역기억능을 향상시켜 *in vitro*에서의 antigen recall의 증가가 나타난 것이다.

Th1 면역반응은 세포매개성 면역을 일으켜 intracellular pathogen인 바이러스나 특정 박테리아에 대한 숙주보호작용을 한다. 그리고 Th1 면역반응은 IFN- $\gamma$ 와 IgG2a 생산이 대표적으로 나타난다. 그에 비해 Th2 면역반응은 B cell의

proliferation과 differentiation을 통해 체액성 면역을 조절하며 대부분의 박테리아에 대한 생체보호작용을 하는 것으로 알려져 있으며 IL-4와 IgG1 생산이 대표적인 특징으로 나타난다 [26]. Fucoidan의 Th1과 Th2 면역반응에 대한 효과를 알아보기 위한 실험을 진행하여 fucoidan이 IgG1 뿐만 아니라 IgG2a의 생산도 증가시키며, IL-4와 IFN- $\gamma$ 를 균형 있게 생산하는 사실을 확인하였다. 즉, fucoidan은 Th1과 Th2 면역반응을 모두 일으켜 체액성면역과 세포매개성면역이 균형 있게 일어나도록 한다.

Fucoidan의 세포에 대한 효과를 알아보기 위해 *in vivo* 실험뿐만 아니라 *in vitro* 실험을 진행하였다. 이 때 세포로는 강력한 항원제시세포인 수지상세포를 선택하였는데 수지상세포는 항원을 처리하여 림프구에 항원성펩타이드 등에 대한 정보를 제공하는 면역중심세포이다. 수지상세포에 대한 fucoidan의 효과는 이미 밝혀져, 수지상세포의 성숙을 유도하며 면역자극을 일으킨다고 알려져 있다 [12]. 하지만 이 연구에서는 수지상세포에 fucoidan 뿐만 아니라 표준항원인 OVA와 adjuvant인 alum도 함께 처리하여 항원이 존재하는 상황에서 fucoidan의 효과를 알아보려고 하였다. 수지상세포에 OVA, alum, fucoidan을 각각 처리한 후 2일 간 배양하고 수지상세포의 대표적인 성숙 표면마커인 MHC II와 CD86의 발현 변화를 알아보았다. Fucoidan 처리를 통해 MHC II와 CD86의 발현이 증가되는 것을 확인하였으며 세포매개성 면역반응의 대표적 cytokine인 IL-12와 자연면역의 대표적 cytokine인 TNF- $\alpha$  모두 fucoidan에 의해 증가된 것을 확인하였다.

Fucoidan의 adjuvant로서의 효능을 입증하고 실제 임상에 적용하기 위해서는 표준항원이 아닌 실제 백신에 쓰이는 병원성항원에 적용하여 fucoidan의 효과를 알아보아야 할 것이다. 또한 마우스가 아닌 다른 동물모델을 이용한 실험을 진행하여 동물 종에 따른 독성, 효과의 차이 등이 존재하는지 확인해야 한다. 그리고 실제로 fucoidan이 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 어떤 수용체를 통해 이러한 adjuvant 및 면역효과를 나타내는 지 밝혀진 바가 없어 자세한 작용기전 연구가 필요하다. 또한 백신투여경로에 따라 효능이 다르게 나타날 수도 있으므로 그와



관련된 약동학적인 연구가 필요하다.

백신 adjuvant로 최근 주목을 받으며 연구되고 있는 천연물질 유래의 polysaccharide 물질이 다수 존재함에도, fucoidan은 백신 adjuvant로 연구된 최초의 갈조류 유래의 polysaccharide이다. 실험결과를 종합했을 때, fucoidan은 체내의 B cell을 활성화시켜 항원특이적인 면역글로불린 생산을 증진시키고 Th1과 Th2 면역반응을 모두 일으킬 수 있으며 비장세포의 memory recall을 향상시키는 것을 알 수 있다. 또한 fucoidan은 다른 식물유래의 천연물질에 비해 대량생산이 가능하며 독성이 적어 더욱 안전하면서도 경제적인 백신adjuvant로서의 개발 가능성이 있다.

## V. 참고문헌

1. Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today*. 1993, 14(6), 281–284.
2. Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, Persing D. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther*. 2004, 4(7), 1129–1138.
3. Butler NR, Voyce MA, Burland WL, Hilton ML. Advantages of aluminium hydroxide adsorbed combined diphtheria, tetanus, and pertussis vaccines for the immunization of infants. *Br Med J*. 1969, 1(5645), 663–666.
4. Byon YY, Kim MH, Yoo ES, Hwang KK, Jee Y, Shin T, Joo HG. Radioprotective effects of fucoidan on bone marrow cells: improvement of the cell survival and immunoreactivity. *J Vet Sci*. 2008, 9(4), 359–365.
5. Goto N, Akama K. Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid. *Microbiol Immunol*. 1982, 26(12), 1121–1132.
6. Goto N, Kato H, Maeyama J, Eto K, Yoshihara S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine*. 1993, 11(9), 914–918.

7. Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, Yoshihara S. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine*. 1997, 15(12-13), 1364-1371.
8. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK. Adjuvants – a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*. 1993, 11(3), 293-306.
9. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2001, 69(4), 555-564.
10. Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J Immunol*. 1991, 146(2), 431-437.
11. Kensil CR, Wu JY, Soltysik S. Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. *Pharm Biotechnol*. 1995, 6, 525-541.
12. Kim MH, Joo HG. Immunostimulator effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunol Lett*. 2008, 115(2), 138-143.
13. Ko EJ, Joo HG. Immunostimulatory effects of fucoidan on mouse splenocytes. *Lab Anim Res*. 2009, 25(3), 195-200.
14. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action

of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 2009, 21(1), 23–29.

15. Lee J, Kim J, Moon C, Kim SH, Hyun JW, Park JW, Shin T. Radioprotective effects of fucoidan in mice treated with total body irradiation, *Phytother Res.* 2008, 22(12), 1677–1681.

16. Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol.* 1985, 61(1), 143–151.

17. Maruyama H, Tamauchi H, Hashimoto M, Nakano T. Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *In Vivo*, 2003, 17(3), 245–249.

18. Maruyama H, Tamauchi H, Iizuka M, Nakano T. The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls. *Planta Med.* 2006, 72(15), 1415–1417.

19. Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2010, 22(3), 411–416.

20. Petrovsky N. Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine.* 2006, 24(S2), 26–29.

21. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol Cell Biol.* 2004, 82(5), 488–496.

22. Ragupathi G, Yeung KS, Leung PC, Lee M, Lau CB, Vickers A, Hood C, Deng G, Cheung NK, Cassileth B, Livingston P. Evaluation of widely consumed botanicals as immunological adjuvants. *Vaccine*. 2008, 26(37), 4860–4865.
23. Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, Singh M, O'Hagan DT, Pétrilli V, Tschopp J, O'Neill LA, Lavelle EC. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci*. 2009, 106(3), 870–875.
24. Skene CD, Sutton P. Saponin–adjuvanted particulate vaccines for clinical use. *Methods*. 2006, 40(1), 53–59.
25. Straw BE, MacLachlan NJ, Corbett WT, Carter PB, Schey HM. Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Can J Comp Med*. 1985, 49(2), 149–151.
26. Sun HX, Wang H, Xu HS, Ni Y. Novel polysaccharide adjuvant from the roots of *Actinidia eriantha* with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine*. 2009, 27(30), 3894–3991.
27. Sun YX. Immunological adjuvant effect of a water–soluble polysaccharide, CPP, from the roots of *Codonopsis pilosula* on the immune responses to ovalbumin in mice. *Chem Biodivers*. 2009, 6(6), 890–896.
28. Waite DC, Jacobson EW, Ennis FA, Edelman R, White B, Kammer R, Anderson C, Kensil CR. Three double–blind, randomized trials evaluating

the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21. *Vaccine*. 2001, 19(28-29), 3957-3967.

29. Yang JW, Yoon SY, Oh SJ, Kim SK, Kang KW. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 346(1), 345-350.