

The Role of CpG DNA in Immunostimulation and Therapeutic Application

이 경 미

바이오세인트(주) 환경생명공학연구소

1. Introduction

현재 Cancer immunotherapy, gene therapy, antisense therapy, vaccination 분야의 연구 결과들에 따르면 CpG로 알려진 단순한 5'-cytosine-guanosine-3'로 구성된 염기서열이 면역세포의 활성화에 큰 영향을 주는 것으로 밝혀져 주목을 받고 있다. 이 서열을 포함하는 DNA는 사람을 포함한 포유동물에게는 흔하지 않지만 bacteria에서는 자주 발견되며, 더욱이 사람의 CpG는 항상 methylation 되어 있는 반면 bacteria의 CpG는 methylation 되어 있지 않기 때문에 사람의 면역체계가 이를 'danger signal'로 인식하여 면역체계를 활성화시킨다. CpG motif를 포함하는 oligodeoxynucleotide(ODN)은 생체내의 면역반응을 T helper 1(Th1)쪽으로 높게 유도하므로 알레르기 같은 Th2 성향의 질환이나 암과 감염성 질병에 대하여 백신 보조제나 치료제로 이용되고 있다. Cancer immunotherapy나 vaccination에서는 이들 CpG DNA가 면역반응을 자극하여 상당한 효과를 거두고 있는 반면, 많은 경우의 gene therapy에서는 전달되는 유전자가 면역체계를 활성화 시켜 오히려 역효과를 유발할 수도 있어 이에 대한 대처방법도 개발되고 있다. 이에 최근의 연구 결과들을 바탕으로 지금까지 알려진 CpG motif의 면역반응에서의 효과와 역할 및 gene therapy에 대한 적용에 대하여 검토 하고자 한다.

2. Importance of CpG motif in immunostimulation

19세기 말 Coley에 의해 bacterial lysate의 추출액을 cancer 환자에게 주사한 결과 좋은 효과를 얻었는데 이러한 immunostimulation과 anti-tumor의 효과를 나타내는 것이 genomic bacterial DNA 자체 때문이라는 것을 알게 되었다. 그 후 80년 뒤, 1984년 Tokunaga 그룹이 Bacillus Calmette-Guerin(BCG) 추출액에서 anti-tumor의 성분을 분리해냄으로써 bacterial DNA만으로도 immunostimulation과 anti-tumor activity에 효과를 준다는 결과를 얻었다. 1990년대 초, 그러한

면역증진 효과는 BCG내에 GACGTC, AGCGCT 또는 AACGTT같이 6개의 palindrome sequence를 가지고, 염기서열 중 5'-CG-3', 즉 CpG dinucleotide가 한 개 이상 포함된 염기서열을 가질 때 나타나는 것으로 측정되었다. 그 후 synthetic ODN을 이용한 많은 연구 끝에 면역활성이 높게 나타나는 구조가 5'-purine-purine-CpG-pyrimidine-pyrimidine-3'(5'-Pu-Pu-CpG-Pyr-Pyr-3')으로 밝혀졌다. 이러한 CpG DNA는 면역체계에서 macrophages, dendritic cell, NK cell 등을 활성화시키고 B cell에도 영향을 주는 것으로 관찰되었다.

서론에서도 언급한 바와 같이 재미있는 사실은 포유동물의 면역체계는 bacterial DNA에 의해서만 그 활성이 유도된다는 것이다. CpG는 종에 따라 구조적인 차이를 가져 포유동물과 bacteria의 CpG 양은 약 1:16의 큰 차이를 가지며 빈도도 1:64로 측정되었다. 결과적으로 포유동물의 DNA는 CpG suppression 현상을 나타내고, CpG가 methylation되거나 imprinting이 되어 면역증진을 유발할 수 없게 된다. 이러한 명백한 차이들로 인하여 포유동물의 면역체계는 bacterial DNA를 lipopolysaccharide(LPS)와 마찬가지로 'danger signal'로 인식하여 면역증진의 효과를 나타내게 되는 것이다. 따라서 CpG는 유전자 치료나 백신의 개발에 중요한 영향을 줄 수 있을 것이다. 유전자 치료법에서는 전달되는 유전자가 면역체계를 활성화시키지 않도록 해야 하므로 가능한 CpG를 최소로 해야 하지만, 백신의 경우는 반대로 CpG를 최대로 이용할 수 있다.

3. Immune recognition of CpG motif

3-1. The CpG motif as a ligand for pattern recognition receptors

CpG motif는 B cell과 NK cell에 대한 면역증진의 효과가 크며 macrophage와 dendritic cell에도 직접적인 효과를 주어 염증반응에 관련된 cytokine들을 분비하는 것으로 밝혀졌다. 그렇다면 어떻게 면역체계에 대하여 자극효과를 주는 것일까? 척추동물의 DNA는 앞에서 언급한 바와 같이 CpG의 빈도가

현저하게 낮고 cytosine의 80%가 methylation되 있는 반면, bacterial DNA나 ODN은 methylation되지 않고 CpG의 양도 척추동물에 비해 20배나 된다. 실험적으로 CpG motif중 cytosine을 methycytosine으로 바꾸면 면역증진의 효과는 사라지며 CpG methylase로 bacterial DNA를 methylation시키면 그 구조가 척추동물의 DNA와 같게되어 역시 면역반응을 자극시키지 못하는 것으로 밝혀졌다. 결국 methylated되지 않은 bacterial DNA 내에 CpG motif가 면역세포들을 활성화시키며 DNA백신의 보조제로도 높은 효율을 나타낸다. CpG motif는 'danger signal'로 인식되 선천성 면역반응에서 면역세포들에 존재하는 pattern recognition receptor(PRR)의 ligand로 작용하여 이들 receptor가 활성을 가지게 되면 IL-1이나 TNF- α 에 의해 감염반응이 시작되고, T cell의 co-stimulation반응도 일어나며 IL-10과 IL-12같은 사이토카인을 방출하게 된다고 알려졌다.

3-2. Stimulation of cells of innate immune system

CpG DNA는 선천성 면역에 관여하는 dendritic cell, macrophage나 monocyte들에게 직접적인 자극을 주어 수 시간 내에 IL-12, TNF- α , IL-6, IFN- γ 같은 Th1 면역반응의 경향을 띄는 사이토카인들을 분비하게 한다. 이런 사이토카인에 의해 자극된 NK cell은 간접적으로 활성을 나타내어 IFN- γ 의 분비를 촉진시킨다. 아울러 활성화된 NK cell은 외부에서 침입한 세포나 감염세포에 대해 lytic activity나 antibody dependent cellular cytotoxicity(ADCC)의 활성도 증진시킨다. 또한 CpG DNA는 B cell을 직접 자극하여 IL-6나 IL-10같은 사이토카인들을 분비하고 co-stimulatory molecule이나 MHC class II의 발현을 증가시키지만, T cell에는 간접적인 자극을 주어 antigen presenting cell(APC)의 활성을 증진시키고 항원에 특이적인 Th1 세포들과 cytotoxic T lymphocyte(CTL)들을 분비한다(Fig. 1).

CpG DNA를 백신의 보조제로 사용하여 생쥐에서는 상당히

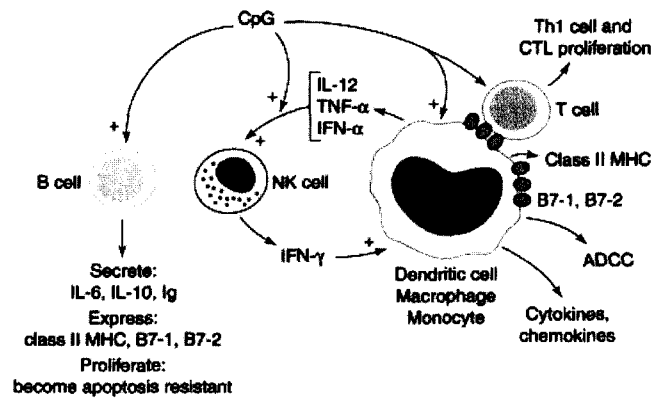


Fig. 1. Immune stimulatory effects of CpG DNA.

높은 효과를 보인 반면 사람에서는 그렇지 못했다. 또한 연구 초기에 일부 학자들은 ODN이 사람의 면역체계에는 염기서열과 관계없이 자극을 준다고 결론을 내렸었다. 이는 최근에 CpG motif의 약간의 차이로 밝혀졌는데, 사람은 GTCGTT이고 생쥐에서는 GACGTT의 염기서열 일 때 가장 높은 면역증진의 효과가 측정되었다.

3-3. Signalling pathways activated by CpG DNA

CpG DNA 역시 선천성 면역에 대한 유도체로 기존에 알려진 LPS나 peptidoglycan 또는 bacteria의 세포벽 성분들과 같은 면역효과를 나타낸다. 일반적으로 선천성 면역은 면역세포의 표면에 분포하고 있는 PRR이 외부의 미생물들을 인식함으로써 면역반응이 시작된다. DNA와 결합하는 세포표면의 단백질들이 보고되어 있지만 CpG DNA는 특정한 cell surface protein과 매개하지 않고 endocytosis를 통하여 세포 안으로 유입되는 것으로 보고되었다. 즉 CpG DNA는 cell surface protein보다는 intracellular receptor를 매개하여 작용을 하게 되는 것이다. 일단 세포 안으로 들어온 CpG ODN은 antisense DNA와 마찬가지로 endosomal acidification을 통하여 세포질 내로 이동하게 된다. CpG DNA의 활성화에 endosome의 acidification이 중요하다는 것은 chloroquine으로 endosome의 pH를 높여 주었을 때 CpG DNA의 활성이 없어지는 것으로 입증된 바 있다.

그렇다면 어떤 경로를 통하여 bacterial DNA의 CpG motif가 유전자 발현을 조절하는 것일까? CpG DNA도 LPS와 마찬가지로 세포내의 receptor에 결합하여 세포질에서 핵까지 기존에 알려진 stress-kinase pathway와 NF- κ B activation pathway를 경유하여 최종적으로 transcription factor를 활성화시키는 것으로 밝혀졌다. CpG DNA는 여러 종류의 유전자의 transcription수준을 높여주는 것으로 측정되어 CpG DNA의 주요 target은 세포질 내의 transcriptional factor라고 가정할 수 있다. CpG 염기서열에 특이적으로 결합하는 target protein은 알려져 있지 않는데, 최근의 연구결과 TLR(Toll-like receptor) 9가 외부에서 들어오는 CpG DNA를 인식하여 세포 내로 이동한다고 보고되었다. CpG DNA와 LPS는 같은 Toll family receptor system과 작용하여 이동되는 것으로 추측되었던 것이 입증되어, bacterial lipoprotein(BLP)과 peptidoglycan(PG)은 같은 TLR중 TLR2와 LPS는 TLR4와 각각 반응하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이어 세포막 부근에 존재하는 adaptor 단백질인 MyD88 (myeloid differentiation marker 88)을 통하여 IL-1R-associated kinase(IRAK)와 TRAF6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)등이 활성화 되고 궁극적으로 I κ B kinase complex나 c-Jun N-terminal kinase(JNK)를 활성화 시키는 TLR-IL-1 receptor(IL-1R) pathway를 경유한다는 것이 밝혀졌다(Fig. 2, 3).

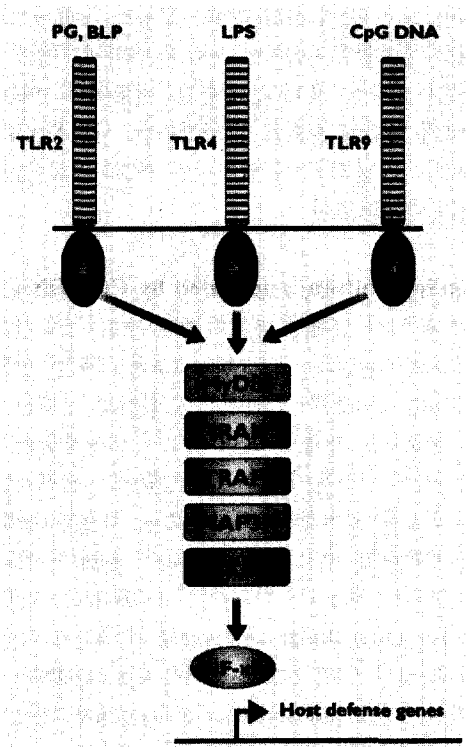


Fig. 2. Recognition of bacterial DNAs.

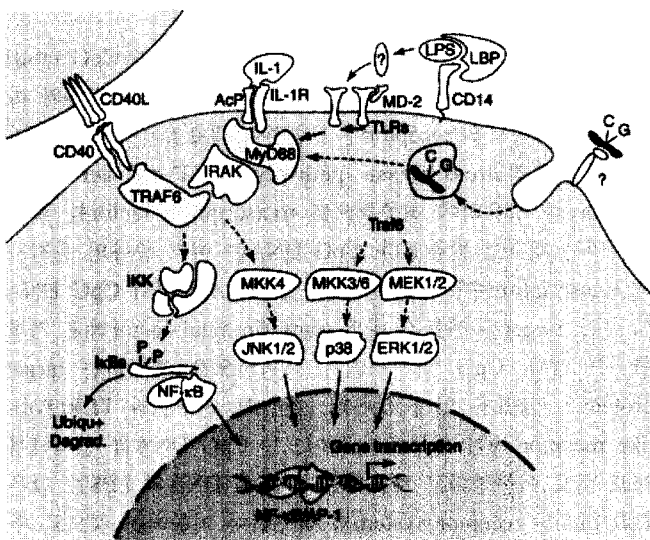


Fig. 3. Toll-like receptor(TLR)-IL-1R signaling pathway.

한편, Raz 등은 innate cell이 CpG DNA를 인식하기 위해서는 DNA-dependent protein kinase(DNA-PK)가 요구되는 것을 밝혔고, 아울러 CpG DNA에 의해 세포질내의 DNA-PK가 활성을 가져 I κ B kinase β 를 직접 인산화를 시키므로써 MyD88을 경유하지 않는 양상을 측정하였다.

4. Therapeutic application of CpG DNA

4-1. Induction of innate immune activation

앞에서도 언급한 바와 같이 CpG DNA는 ‘danger signal’로 인식되어 innate immune defense를 유발하여 외부에서 침입한 bacteria를 포함한 pathogen들에 대응하여 그들의 초기증식을 제어하게 된다. 그러한 방어 기작은 parasite인 *Leishmania*와 intracellular bacteria인 *Listeria monocytogenes*에서 관찰되었고, malaria sporozites에 CpG DNA로 전처리했을 때 탁월한 효과를 나타냈다. 또한 여러 종류의 virus에 대한 초기 감염도 예방할 수 있는 것으로 관찰되었다. 생쥐 실험에서의 이러한 성공적인 결과들은 사람에게 적용가능성을 시사한다. 그 예로 CpG DNA가 외과수술 후 감염된 환자나 화학치료요법을 받거나 골수이식을 받아 감염에 대한 위험성이 높은 환자들에게 이용될 수 있을 것이다.

4-2. CpG DNA as a vaccine adjuvant

CpG DNA는 항원에 특이적인 면역반응을 크게 증가시킬 수 있어 이를 이용하여 백신의 보조제로의 사용이 활발히 진행되고 있다. 현재 hen egg lysozyme, ovalbumin, tumor antigen이나 B형 간염과 influenza같은 감염성 질환의 백신 보조제로 이용되고 있다. 놀랍게도 탁월한 효과로 널리 사용되고 있는 Freund’s complete 보조제보다 더 강력한 Th1 면역반응을 유도시킬 뿐만 아니라 다른 백신 보조제들 보다 빠른 항체의 생성을 유도하는 동시에 기존의 protein 백신이 유도할 수 없었던 높은 CTL의 활성화까지 측정되었다. 이러한 CpG DNA의 백신 보조제로의 효과는 생쥐에서만 관찰된 것이 아니라 primate에서도 나타났다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 1999년 캐나다의 Toronto대학에서는 CpG DNA를 B형 간염의 백신인 Engerix BTM의 보조제로 사용하여 임상실험에 들어갔다.

4-3. CpG DNA for allergy immunotherapy

알레르기 질환은 비정상적인 Th2 면역반응의 발생으로 시작되며, Th2 반응은 IL-4나 IL-5같은 사이토카인의 분비와 면역글로블린 E의 형성에 연관되어 있다. CpG DNA에 의해 유도되는 면역반응의 가장 큰 특징은 Th1 반응을 강하게 유도하여 상대적으로 Th2 반응을 억제하는 것으로 이 점을 이용하여 알레르기에 대한 면역치료제로 사용하게 되었다. CpG DNA가 생쥐의 천식을 일으키게 하는 plumonary inflammation을 억제하고 Th2 반응과 연관되는 사이토카인들과 면역글로블린 E의 생성을 현저하게 감소시키는 것이 관찰되었다. 이는 기존의 면역치료법들보다 효과도 높고 예방과 치료의 기능을 모두 갖고 있어, 천식이나 다른 종류의 알레르기 질환에 대한 새로운 방법으로 기대하고 있다.

4-4. Anticancer applications

CpG DNA는 tumor백신의 보조제로 쓰일 뿐만 아니라 직접, 간접적으로 다양한 tumor에 대해 면역반응을 나타낸다. CpG DNA가 NK cell의 활성을 높여 tumor의 면역치료를 하게 되는데, C57/BL6 생쥐에 발생한 melanoma를 CpG DNA를 주 단위로 투여한 결과 성공적으로 치료하였다. 또 다른 방법은 tumor항원에 대한 단일항체를 이용하는 방법으로 오랫동안 연구 되어왔으며, 임상실험 결과 Rituxin과 Herceptin 두 종류의 단일항체가 미국 FDA의 승인을 받았다. 그 기작은 tumor cell의 표면에 단일항체를 결합시켜 NK cell같은 면역 세포들로 하여금 선택적으로 공격하여 파괴하도록 하는 것이다. C3H생쥐에게 치사량의 B cell lymphoma 38C13을 주입하여 수 일 동안 tumor가 형성되게 한 뒤, 적정량의 CpG DNA를 투여하고 24시간이 경과하면 표준량의 단일항체를 주입했는데 70-80%의 생존율이 측정되었다. 이는 CpG DNA가 NK cell을 활성화시켜 단일항체를 이용한 면역치료의 효율성을 극대화시킬 수 있다는 것을 입증하여, 앞으로 사람의 다양한 tumor에 대한 면역치료에 단일항체를 이용할 수 있는 가능성을 시사한다.

4-5. Gene therapy

CpG DNA는 ODN 자체의 형태로 이용될 수도 있고 plasmid DNA vector안에 삽입하여 사용할 수 있다. 특히 *in vivo* 상태에서 CpG DNA는 생체내의 여러 종류의 nuclease의 공격을 받게 되므로 phosphorothionate backbone의 구조를 갖도록 CpG DNA를 합성하여 사용하고 있다. DNA백신에 의해 유도되는 면역반응의 특징은 host 세포 내에서 항원이 생산되어 CTL 반응을 일으키는 것과 Th1의 면역반응을 강하게 유도하는 것이다. 이러한 면역반응은 plasmid vector속에 있는 CpG motif에 의존적이고 강한 면역증진의 효과를 갖고 있는 CpG motif를 plasmid vector안에 삽입했을 때 더 높은 면역반응이 관찰되었다. 그러나 면역증진의 활성을 방해하는 CpG-N (neutralizing CpG) 염기서열이 adenovirus Ad2와 Ad5에서 발견되었고, plasmid DNA vector에서 CpG-N motif를 삭제하였을 때 면역반응은 더욱 증가하는 것이 보고되었다. 결과적으로 CpG-S(stimulatory CpG) motif와 CpG-N motif의 적절한 비율에 따라 전체 면역증진의 효율이 결정되므로 이점을 고려하여 새로운 vector를 개발해야 할 것이다.

5. Potential side effects

연구 초기에는 CpG DNA가 systemic lupus erythematosus (SLE)같은 자가면역질환을 유발할 것이라 생각했었으나, 최근 생쥐실험의 결과에 따르면 CpG DNA에 의해 SLE는 발생되지도 않았고 심지어 심한 자가면역증세를 완화시키는 것으로

관찰되었다. 단지 자가면역을 일으킬 수 있는 경우는 CpG DNA가 self antigen의 molecular mimics에 대한 보조제나, tolerance가 불완전한 상태의 self antigen에 대한 보조제로 쓰였을 경우 뿐 이었다. CpG DNA를 피하 주사해도 국소적인 감염반응은 일어나지 않았지만 관절에 주사하면 일시적인 관절염을 유발하였다. 그러나 염색체의 변형현상이나 genotoxicity를 분석한 preclinical 연구결과에서는 아무런 독성도 측정되지 않았다. 또한 nuclease에 영향을 받지 않는 phosphorothionate ODN이 임상실험에서도 그 안정성이 입증되, 앞으로 질병치료에 대한 전망이 밝다. 실제로 CpG ODN은 1999년 중반부터 B형 간염의 백신인 Engerix B™의 보조제로 임상실험에 쓰이고 있다.

6. Conclusion

면역치료 요법의 초기에는 bacteria 자체의 추출물을 사용하였으며, 그 자체가 지니는 독성에도 불구하고 현재까지도 일부 환자들에게 적용되고 있다. 이후 recombinant cytokine을 이용한 방법이 등장하여 독성도 적고 치료효과가 높아 각광을 받아 왔으나 실제 몇몇 경우에만 성공을 거두고 있고 처음 기대에 미치지 못하는 실정이다. CpG DNA의 출현으로 면역치료 분야는 다시 bacteria의 추출물로 면역반응을 자극시켜 많은 cytokine이나 chemokine을 생성하는 전통적인 방법으로 돌아서게 하였고 기존의 recombinant cytokine이나 chemokine을 이용하는 것보다 훨씬 더 효과적이고 독성도 약한 것으로 밝혀졌다. 현재 CpG DNA는 여러 가지 질환에 대하여 Th 1의 면역반응을 강력히 유발시키는 경향을 가져 강력한 백신의 보조제로 쓰이고 있고, 암과 알레르기 질환에 대한 치료제로도 이용되고 있다. 실제적으로 많은 양을 생산하기가 손쉬워 경제적인 측면에서도 그 가치가 높고, 경구투여나 점액질 투여 등의 다양한 경로를 통해 주입시킬 수 있다. 현재 임상실험에서도 CpG DNA는 상대적으로 안전하고 효율도 높아 앞으로 몇 년 뒤에는 새로운 immune modulating compound로 각광을 받을 것이다.

7. References

1. H. Wagner, Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv. Immunol.* **73**: 329-368. 1999.
2. J. N. Kline, T. R. Businga, T. J. Waldschmidt, J. V. Weinstock, and A. M. Kreig, Modulation of airway inflammation by CpG oligonucleotides in a murine model of asthma. *J. Immunol.* **160**: 2555-2559. 1998.
3. A. M. Kreig, The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 35-43. 2000.
4. G. B. Lipford, K. Heeg, and H. Wagner, Bacterial DNA

- as immune cell activator. *Trends Microbiol.* **6**: 496-500. 1998.
5. A. K. Kreig, A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. Koretzky, and D. Klinman, CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**: 546-549. 1995.
 6. G. Hartmann, and A. M. Kreig, Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cell. *J. Immunol.* **164**: 944-952. 2000.
 7. G. Hartmann, G. J. Weiner, and A. M. Kreig, CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 9305-9310. 1999.
 8. R. K. Scheule, The role of CpG motifs in immunomodulation and gene therapy. *Adv. Drug Del. Rev.* **44**: 119-134. 2000.
 9. A. M. Kreig, Mechanim and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *Biochem. Biophys. Acta* **93321**: 1-10. 1999.
 10. G. B. Lipford, T. Sprawasser, M. Bauer, S. Zimmermann, E. S. Koch, K. Heeg, and H. Wager, Immunostimulatory DNA: sequence dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur. J. Immunol.* **27**: 3420-3426. 1997.
 11. Z. Moldoveanu, L. Love-Homan, W. Q. Huang, and A. M. Kreig, CpG DNA, a novel adjuvant for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Trends Immunolo.* **16**: 1216-1224. 1998.
 12. M. Roman, E. Martin-Orozco, J. S. Goodman, M. D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R. S. Kornbluth, D. D. Richman, D. A. Carson, and E. Raz, Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nature Med.* **3**: 849-854. 1997.
 13. A. A. Horner, A. Ronaghy, P. M. Cheng, M. D. Nguyen, H. J. Cho, D. Broide, and E. Raz, Immunostimulatory DNA ia a potent mucosal adjuvant. *Cell Immunol.* **190**: 77-82. 1998.
 14. S. Sur, J. S. Wild, B. K. Choudhury, N. Sur, R. Alam, and D. M. Klinmann, Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **162**: 6284-6293. 1999.
 15. A. M. Kreig, T. Wu, R. Weeratna, S. M. Efler, L. Love-Homan, L. Zhang, L. Yang, A. K. Yi, D. Short, and H. Davis, Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12631-12636. 1998.
 16. L. Manzel, and D. E. Macfarlane, Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligonucleotide. *Antisense Nucl. Acid Drug Devl.* **9**: 459-464. 1999.
 17. R. S. Chu, D. Askew, E. H. Noss, A. Tobian, A. M. Krieg, and C. V. harding, CpG oligonucleotides downregulate macrophge class II MHC antigen processing. *J. Immunol.* **163**: 1188-1194. 1999.
 18. G. Hartmann, and A. M. Krieg, CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activaion in human monocytes. *Gene Ther.* **6**: 893-903. 1999.
 19. O. Akbari, N. Panjwani, S. Garcia, R. Tascon, D. Lowrie, and B. Stockinger, DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J. Exp. Med.* **189**: 169-177. 1999.
 20. R. Medzhitov, CpG DNA: security code for host defense. *Nature Immunol.* **2**: 15-16. 2001.
 21. T. Kaisho, and S. Akira, Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.* **22**: 78-83. 2001.
 22. W. Hermann, Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity.* **14**: 499-502, 2001.
 23. W. M. Chu, X. Gong, Z. W. Li, K. Takabayashi, H. H. Chen, A. Lois, D. J. Chen, G. C. Li, M. Karin, and E. Raz, DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell* **103**: 909-918, 2000.