

원발성 폐선암환자의 말초혈액에서 분리한 CD1c+ 골수성 수지상 세포에서의 CD40, CD86 및 HLA-DR의 발현

강문철* · 강창현** · 김영태** · 김주현**

Expression of CD40, CD86, and HLA-DR in CD1c+ Myeloid Dendritic Cells Isolated from Peripheral Blood in Primary Adenocarcinoma of Lung

Moon Chul Kang, M.D.*, Chang-Hyun Kang, M.D., Ph.D.**, Young Tae Kim, M.D., Ph.D.**, Joo-Hyun Kim, M.D., Ph.D.**

Background: There have been several reports using animal experiments that CD1-restricted T-cells have a key role in tumor immunity. To address this issue, we studied the expression of markers for CD1c+ myeloid dendritic cells (DCs) isolated from peripheral blood in the clinical setting. **Material and Method:** A total of 24 patients with radiologically suspected or histologically confirmed lung cancer who underwent pulmonary resection were enrolled in this study. The patients were divided according to histology findings into three groups: primary adenocarcinoma of lung (PACL), primary squamous cell carcinoma of lung (PSqCL) and benign lung disease (BLD). We obtained 20 mL of peripheral venous blood from patients using heparin-coated syringes. Using flow-cytometry after labeling with monoclonal antibodies, data acquisition and analysis were done. **Result:** The ratio of CD1c+CD19- dendritic cells to CD1c+ dendritic cells were not significantly different between the three groups. CD40 (p=0.171), CD86 (p=0.037) and HLA-DR (p=0.036) were less expressed in the PACL than the BLD group. Expression of CD40 (p=0.319), CD86 (p=0.036) and HLA-DR (p=0.085) were less expressed in the PACL than the PSqCL group, but the differences were only significant for CD86. Expression of co-stimulatory markers was not different between the PSqCL and BLD groups. Expression of markers for activated DCs were dramatically lower in the PACL group than in groups with other histology (CD40 (p=0.005), CD86 (p=0.013) HLA-DR (p=0.004)). **Conclusion:** These results suggest the possibility that CD1c+ myeloid DCs participate in control of the tumor immunity system and that low expression of markers results in lack of an immune response triggered by dendritic cells in adenocarcinoma of the lung.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2010;43:499-505)

- Key words:**
1. Immunology
 2. Adenocarcinoma
 3. Lung neoplasm
 4. Dendritic cells
 5. Antigens

*분당서울대학교병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Bundang Hospital

**서울대학교병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital

†이 논문은 서울대학교병원 일반연구비 지원에 의해 작성되었음.

논문접수일 : 2010년 4월 23일, 논문수정일 : 2010년 6월 19일, 심사통과일 : 2010년 6월 24일

책임저자 : 강창현 (110-744) 서울시 종로구 대학로 101, 서울대학교병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-3010, (Fax) 02-764-3664, E-mail: chkang@snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

수지상 세포는 항원을 포획하고 T-세포 매개의 면역반응을 개시하는 기능이 특화된 백혈구로서 항원을 포획하면 미성숙단계에서 상주하던 장소에서 림프나 혈액을 통해 성숙세포로 분화하는 장소인 이차 림프계 기관으로 이동한다. 수지상 세포의 이런 기능으로 인해 수지상 세포는 면역반응을 개시하는 면역계의 전초 기능을 하는 조절계의 한 구성요소로서 인식되고 있다.

수지상 세포는 면역반응에서의 서로 다른 분포와 특정 기능에 따라 여러 부분군으로 나눌 수 있다. 인간의 수지상 세포는 *in vitro*에서 골수, 제대혈 및 성인의 혈액 중에 존재하는 CD34 전구세포 또는 혈액의 단핵구에서 생성된다. 인간의 혈액 내에는 형질세포성(plasmacytoid)과 골수성의 두 그룹의 수지상 세포가 존재하며, 형태학적으로 골수성 수지상 세포는 CD3, CD14, CD19, CD56 등의 계통적 표지자의 발현이 없고, CD11c의 발현율이 높으며, 형질세포성 수지상 세포는 BDCA-2와 BDCA-4가 발현되는 특징이 있다. 사람의 면역체계에서는 형질세포 계통에서 분화된 형질세포성 수지상 세포는 T-helper 2 (Th2) 반응을 초래하고 골수성 수지상 세포는 주로 T-helper 1 (Th1) 면역반응을 유도하는 것으로 밝혀져 있다. 또한, 수지상 세포는 면역학적인 센서로서 면역반응을 개시할 뿐만 아니라 종양면역(tumor immunity)을 유발함에 있어 매우 중요한 역할을 한다.

수지상 세포에 의하여 유발되는 면역반응의 결과가 특정한 수지상 세포에 의한 항원의 제시나 수지상 세포에 의하여 유발되는 특정한 자극 신호에 의한 것인지 아니면 수지상 세포의 면역표지자의 발현률에 따른 성숙 정도에 따라서 결정되는 것인지에 대하여서는 아직 이견이 있다.

이에 대한 연구로, 최근 동물을 이용한 암모델이나 암 환자의 수지상 세포의 기능결함이 표지자의 미발현에 기인한다는 보고가 늘고 있으며, 이는 생체 내의 면역체계가 종양의 발달과 생장을 제어하지 못하는 종양의 면역회피현상의 한 기전으로 판단되고 있다[1,2].

표지자중 하나인 CD1 molecule은 주조직적합복합체(Major histocompatibility complex, MHC) 분자와 매우 유사한 구조를 가진 당단백질로 T-세포에 지질 항원을 제시하는데 특화된 기능을 갖고 있다고 알려져 있으며, CD1-restricted T 세포는 동물모델실험에서 항암면역에 있어서 매우 중요한 역할을 하며 특히, 항암 세포독성 및 IFN- γ 의 생성을 유도하여 암의 전이를 막고 종양 거부를 항진시킨다고 보고되고 있다[3-6].

본 연구에서는 원발성 폐선암환자의 말초혈액에 존재하는 CD1c+ 골수성 수지상 세포의 수 및 수지상 세포에서의 동시자극 표지자 중 주요 표지자인 CD40, CD86 및 HLA-DR의 발현 양상을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 연구대상

영상의학적으로 원발성 폐암이 의심되거나 조직학적으로 폐암으로 확진되어 외과적 폐절제 또는 생검을 시행한 총 24명을 대상으로 하였다. 24명의 절제 조직의 조직진단은 각각 원발성 폐선암 15명, 원발성 편평상피세포 폐암 4명, 만성 육아종성 염증 2명, 과오종 1명, 흉막하 섬유화(subpleural fibrosis) 1명, 비정형 샘종 증식증(atypical adenomatous hyperplasia) 1명이었다. 이 환자들을 원발성 폐선암 환자군(PACL)과 원발성 편평상피세포폐암군(PSqCL) 및 양성폐질환군(BLD)군의 3개 군으로 나누고 각각의 군에서의 공동표지자의 발현에 차이를 보이는 지를 분석하였다.

2) 항체와 시약

PE-, FITC-, Quantum Red-conjugated anti-HLA-DR, CD19 등의 항체는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서, FITC-conjugated anti-CD86 및 anti-CD40는 PharMingen (San Diego, CA)에서 구입하였다.

3) 세포의 분리

20 mL의 말초 혈액을 헤파린 코팅 주사기를 이용하여 수혈 직전에 채취하였으며, 채취 후 즉시 원심분리하여 Hank's balanced salt solution (HBSS)과 1 : 1로 혼합하여 Ficoll-Paque (Ficoll-Paque Plus; 1.077 g/mL; Pharmacia)를 이용한 농도 구획법으로 단핵구층을 분리하였다. 분리된 단핵구층에 4°C의 단일 클론 항체인 anti-CD1c, anti-CD19, anti-CD40, anti-CD86 및 anti-HLA-DR을 표현형의 분석을 위해 각각 또는 함께 처리하였다. 먼저 비골수성 수지상 세포의 표지자인 anti-CD19를 CD1c+ 세포에 반응시켜 CD1c+ 세포 중 CD19- 세포만을 선택하고 이를 CD1c+ 골수성 수지상 세포로 그 수를 측정하였다. 다음 각각 anti-CD40, anti-CD86 및 anti-HLA-DR를 반응시켜 그 세포 수를 측정하였다.

4) 유체 세포 측정

PE-, FITC-, Quantum Red- 등과 결합된 항체들로 표지된 세포들을 4°C에서 30분간 20 mM phosphate buffered saline

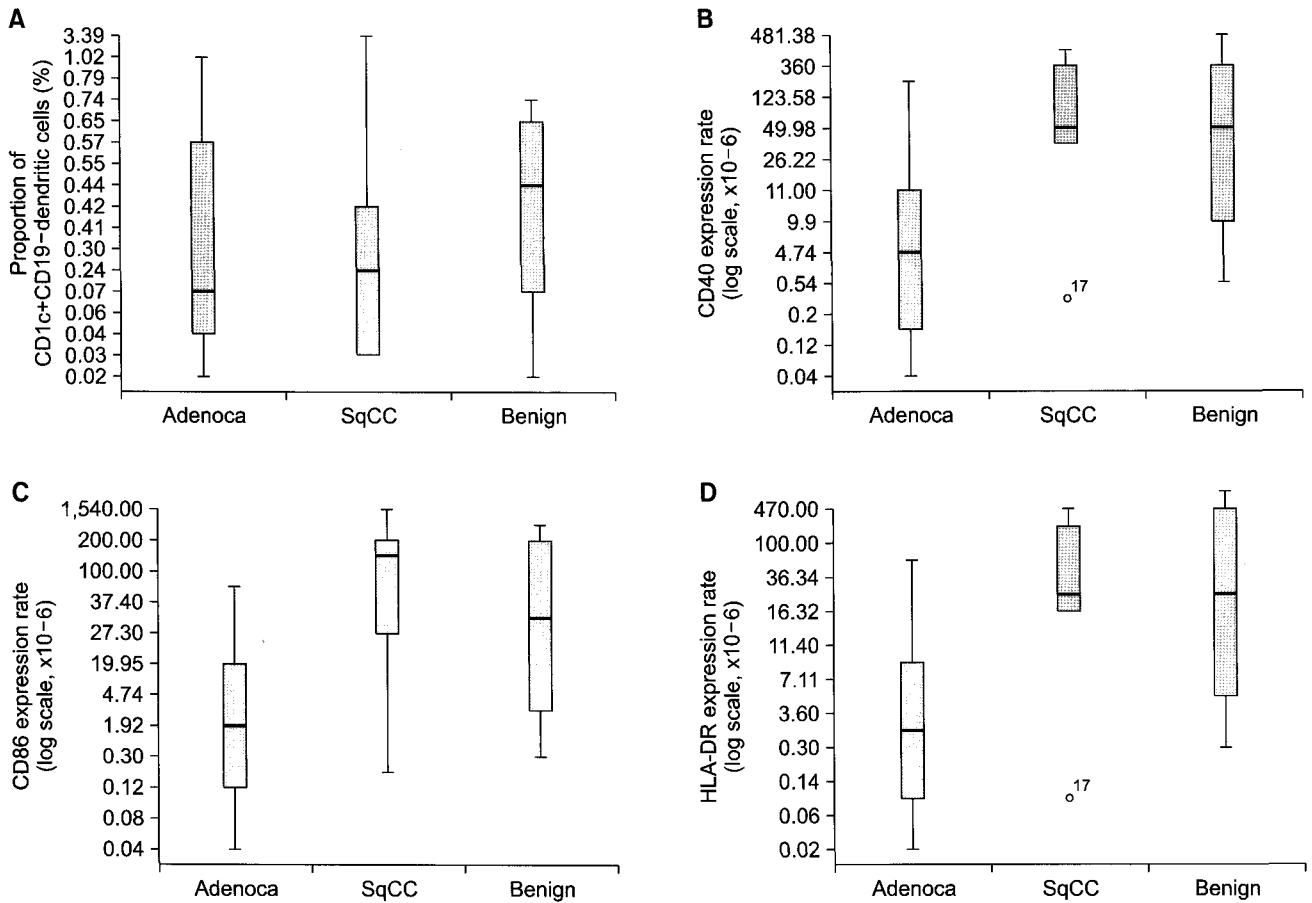


Fig. 1. The box plot for the expression rate of each co-stimulatory marker according to its histology. (A) Fraction of the CD1c+D19-dendritic cells to the CD1c+ dendritic cells (%). (B) Expression rate of CD40 in the CD1c+D19-dendritic cells. (C) Expression rate of CD86 in the CD1c+D19-dendritic cells. (D) Expression rate of HLA-DR in the CD1c+D19-dendritic cells.

(pH 7.4, PBS)에 보존 후 Facsclibur flow cytometer (Becton Dickson, Mountain View, CA)를 이용하여 각 세포 수를 측정하였다.

5) 통계방법

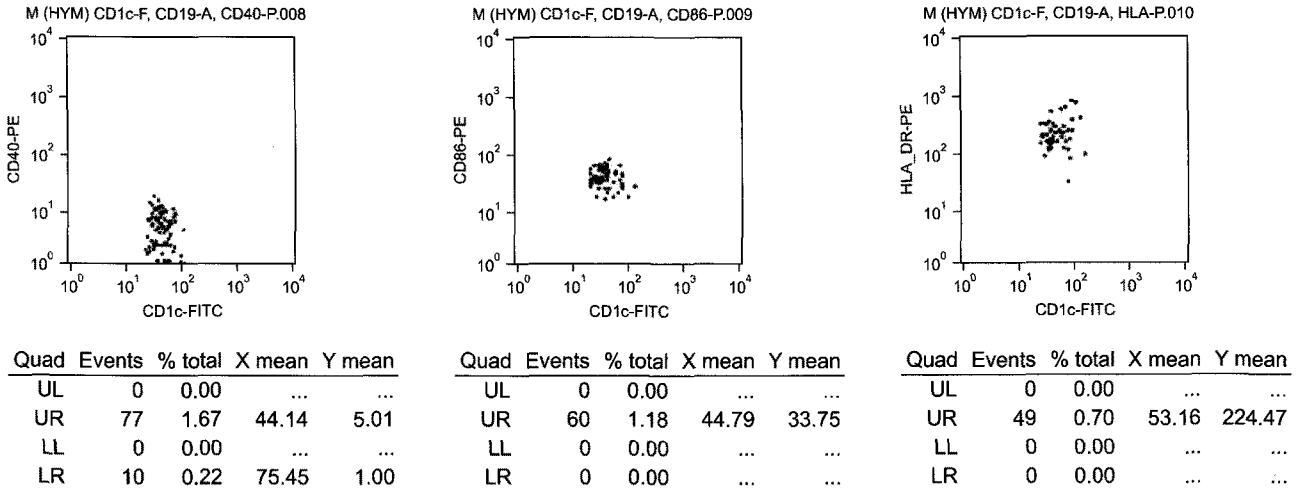
통계분석은 standard non-parametric test (Mann-Whitney U-test)를 이용하였으며, 통계적 유의성은 p-value < 0.05를 기준으로 하였다. 이를 위하여 통계 소프트웨어는 SPSS (version 12.1 for windows, Chicago, IL)를 이용하였다.

결 과

Fig. 1은 CD1c+ 골수성 수지상 세포의 분율과 주요 표지자인 CD40, CD86 및 HLA-DR의 발현율을 각 그룹별로 보여주고 있다. 골수성 수지상 세포(CD1c+CD19-)의

CD1c+ 수지상세포에 대한 분율은 PAQL, PSqCL 및 BLD 군 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 공동자극표지자의 발현은 PAQL군과 BLD군에서는 CD40의 발현이 p-value=0.171, CD86의 발현이 p-value=0.037과 HLA-DR의 발현이 p-value=0.036로 PAQL군에서 감소한 것을 통계학적으로 확인할 수 있었다. PAQL군과 PSqCL군 간에는 CD40의 발현이 p-value=0.319, CD86의 발현이 p-value=0.036과 HLA-DR의 발현이 p-value=0.085로 PAQL군에서 공동표지자의 발현이 감소한 양상이나 통계적 유의성은 CD86의 발현 외에는 없었다. PSqCL군과 BLD군간에는 공동표지자의 발현에 통계적 차이는 없었다. 또한, 유체세포 측정 결과에서도 원발성 폐선암 환자(Case 2)는 양성폐질환 환자(Case 1)에서보다 CD1c+ 골수성 수지상 세포의 주요 공동자극표지자(CD40, CD86 및 HLA-DR)의 발현이 확연히 감소한 양상을 보였다(Fig. 2). 이 결과를 토대로

Case 1. Chronic granulomatous inflammation



Case 2. Adenocarcinoma, stage Ia

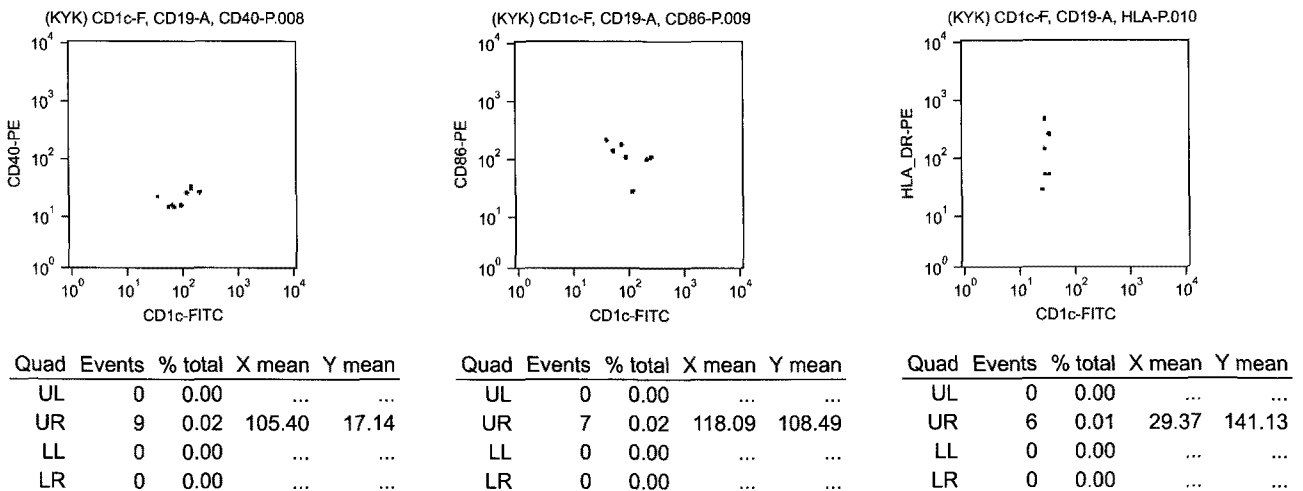


Fig. 2. Example for the expression of co-stimulatory markers according to the histology.

PACL군과 비선암군으로 나누어 분석하면 CD1c+ 수지상 세포에서의 CD1c+CD19- 골수성 수지상 세포의 분율은 p-value=0.579로 통계적 차이가 없었으나, CD40 (p-value=0.005), CD86 (p-value=0.013)와 HLA-DR (p-value=0.004)로 비선암군에 비해 PACL군에서 공동표지자의 발현이 감소한 것을 통계학적으로 확인할 수 있었다(Fig. 3).

고찰

현재 수지상 세포는 표현형과 개체발생학에 따라서 다양한 아형들의 특성이 규명되고 있다[7-10]. 대부분의 조

직에서 수지상 세포는 미성숙 상태로 존재하며 T 세포 활성을 유도하지 못한다. 이 경우 수지상 세포에는 보조자극인자가 거의 발현되지 않고 있지만 미성숙 수지상 세포는 세포표면에 항원 포획에 필요한 다양한 수용체 분자들을 다량 발현하고 있어 매우 효과적으로 항원을 포획함으로써 면역의 초기단계를 담당한다. 또한, 다른 항원제시세포와는 달리 MHC 발현량이 높아 극소량의 항원도 효과적으로 제시하여 T 세포 활성을 유도할 수 있다. 그 외에도 미성숙 수지상 세포는 외부 항원에 감작되면 이를 Th1와 Th2 세포에 교차 항원제시를 할 수 있어 바이러스 감염뿐 아니라 죽은 미생물이나 사멸된 세포에 대해서도 세

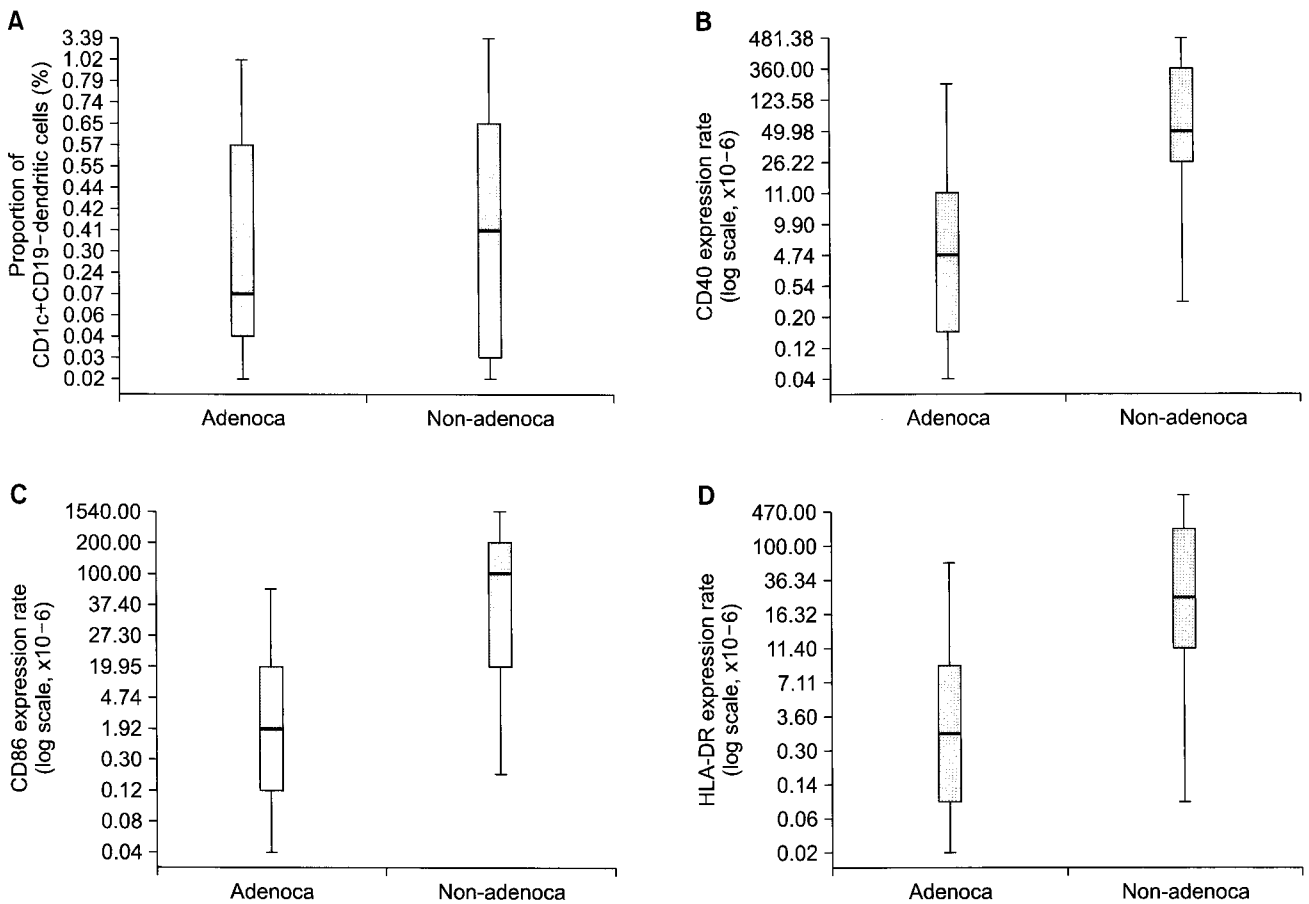


Fig. 3. The box plot for the expression rate of each co-stimulatory marker according as its histology is adenocarcinoma or not. (A) Fraction of the CD1c+D19- dendritic cells to the CD1c+ dendritic cells (%) p-value=0.579. (B) Expression rate of CD40 in the CD1c+D19- dendritic cells p-value=0.005. (C) Expression rate of CD86 in the CD1c+D19- dendritic cells. p-value=0.013. (D) Expression rate of HLA-DR in the CD1c+D19- dendritic cells. p-value=0.004.

포독성 T-림프구(Cytotoxic T-lymphocyte, CTL)를 효과적으로 유도할 수 있다[11].

미성숙 수지상 세포는 항원에 감작된 후에는 성숙화 단계를 거치면서 모양과 활성이 급격히 변하여 항원포획에 필요한 분자들은 사라지고 대신 T세포 활성화유도에 필요한 보조 자극인자나 T세포와의 반응에 필요한 분자들의 발현이 현저히 증가된 성숙 수지상 세포가 된다. 또한 성숙화 단계의 수지상 세포는 임파절로의 이동에 필요한 화학주개성 수용체를 발현하고 이를 통해 부근의 임파절이나 비장으로 이동하여 세포성 면역을 유도한다. 이들은 항원을 포획한 후 1~2일 사이에 보조자극인자들의 발현이 현저히 증가되면서 임파절에서 항원 특이 T세포를 활성화시킨다[12,13].

그러나, 수지상 세포에 의하여 유발되는 면역반응의 결

과가 특정한 수지상 세포에 의한 항원의 제시나 수지상 세포에 의하여 유발되는 특정한 자극 신호에 의한 것인지 아니면 수지상 세포가 성숙된 정도에 따라서 결정되는 것인지에 대하여서는 아직 확실하다고 할 수는 없다. 최근 많은 연구가 이루어 지면서 수지상 세포가 항원을 제시하는 능력이 세포의 성숙도로 표현되는 표지자의 발현 여부에 따라 결정된다는 이론이 힘을 얻고 있다. 그리고, 미성숙 수지상 세포는 오히려 T 세포의 불활성화(abortive T-cell activation)를 초래해서 면역관용을 유발할 가능성에 대한 보고도 늘고 있다[14-16].

Almand 등의 연구에 의하면 유방암, 두경부암 및 폐암 환자의 경우 혈중 및 국소임파절 내의 성숙 수지상 세포의 현저한 감소가 있었으며 그 원인으로 미숙 골수성 수지상 세포의 축적에 원인이 있다고 하였다. 특히, 이러한

미숙 골수성 수지상 세포의 축적 정도는 암의 병기와 직접적 연관성이 있음을 보고하였다[17].

본 연구에서 저자들은 골수성 수지상 세포의 주요 표지자인 HLA-DR, CD40 및 CD86을 이용하였다. 이들 표지자 중 CD40과 CD86은 수지상 세포의 기능적 성숙 정도와 활성화 정도를 반영하는 주요 지표이다. 이 연구에서는 원발성 편평상피세포 폐암환자군과 양성폐질환 환자군의 수가 각각 4명과 5명으로 그 수가 적어서 다른 연구에서와 달리 원발성 편평상피세포 폐암환자군에서 주요 표지자의 발현이 감소 양상이 없는 것으로 나타난 것으로 결과를 보였을 가능성도 있다. 다만, 원발성 폐선암군에서는 다른 조직형을 갖는 폐질환에서와는 달리 주요 표지자인 CD40, CD86 및 HLA-DR의 발현은 확실히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 종합하면, 이 연구에서 저자들은 CD1c+ 골수성 수지상 세포에서의 주요 표지자인 CD40, CD86 및 HLA-DR의 발현율은 원발성 폐선암 그룹에서 비-선암 그룹에 비해 발현율이 감소한다는 것을 확인할 수 있었으며, 대상환자의 수가 적음에도 통계적으로 매우 높은 유의성을 보였다. 이는 수지상 세포에 의하여 유발되는 면역반응의 결과가 표지자의 발현으로 표현되는 수지상 세포의 성숙 정도에 따라서 결정된다는 가설에 부합되는 결과이다.

결론

CD1c+ 골수성 수지상 세포에서의 주요 표지자인 CD40, CD86 및 HLA-DR의 발현율은 원발성 폐선암 그룹에서 비-선암 그룹에 비해 발현율이 현저히 낮다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 CD1c+ 골수성 수지상 세포에서 이들 주요 표지자의 낮은 발현이 원발성 폐선암에서 면역회피기전의 하나일 수 있는 가능성 및 수지상 세포에 의하여 유발되는 면역반응의 결과가 수지상 세포의 성숙 정도에 따라서 결정된다는 가능성을 제시한 것이라 할 수 있겠다. 원발성 편평상피세포암에서의 표지자의 발현에 대해서 결론을 내리기 위해서는 더 많은 수의 환자를 대상으로 추가적인 연구가 필요하겠다.

참고 문헌

1. Thurnher M, Radmayar C, Ramoner R, et al. *Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells.* Int J Cancer 1996;68:1-7.

2. Chauv P, Favre N, Martin M, Martin F. *Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats.* Int J Cancer 1997;72:619-24.

3. Cui J, Shin T, Kawano T, et al. *Requirement for V α 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumours.* Science 1997;278:1623-6.

4. Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. *Alpha-galactosylceramide: potential immunomodulatory activity and future application.* Curr Med Chem 2004;11:241-52.

5. Nakagawa R, Nagafune I, Tazunoki Y, et al. *Mechanisms of the antimetastatic effect in the liver and of the hepatocyte injury induced by α -galactosylceramide in mice.* J Immunol 2001;166:6578-84.

6. Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. *The anti-tumour activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent.* J Immunol 2000;165:2665-70.

7. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol 2000;18:767-811.

8. Shortman K, Liu YJ. *Mouse and human dendritic cell subtypes.* Nat Rev Immunol 2002;2:151-61.

9. Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, et al. *Visualizing dendritic cell networks in vivo.* Nat Immunol 2004;5:1243-50.

10. McLellan AD, Kapp M, Eggert A, et al. *Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression.* Blood 2002;99:2084-93.

11. David WO, Sylvia A, Nina B. *Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer.* Blood 2004;104:2235-46.

12. Satthaporn S, Eremin O. *Dendritic cells (I): biological functions.* J R Coll Surg Edinb 2001;46:9-19.

13. Satthaporn S, Eremin O. *Dendritic cells (II): Role and therapeutic implications in cancer.* J R Coll Surg Edinb 2001;46:159-67.

14. Sallusto F, Lanzavecchia A. *The instructive role of dendritic cells on T-cell responses.* Arthritis Res 2002;4(suppl 3):S127-32.

15. Dhodapkar M, Steinman R, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells.* J Exp Med 2001;193:233-8.

16. Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk A. *Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells.* Trends Immunol 2001;22:394-400.

17. Almand B, Resser JR, Lindman B, et al. *Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer.* Clin Cancer Res 2001;6:1755-66.

=국문 초록=

배경: CD1-restricted T 세포는 동물모델실험에서 항암면역에 있어서 매우 중요한 역할을 한다는 보고가 있다. 이를 임상에서 확인하기 위해 원발성 폐선암환자의 말초혈액에 존재하는 CD1c+ 골수성 수지상 세포의 수 및 수지상 세포에서의 동시자극 표지자 중 주요 표지자인 CD40, CD86 및 HLA-DR의 발현 양상을 확인하고자 하였다. 대상 및 방법: 영상의학적으로 원발성 폐암이 의심되거나 조직학적으로 폐암으로 확진되어 외과적 폐절제 또는 생검을 시행한 총 24명의 환자를 원발성 폐선암 환자군(Primary adenocarcinoma of lung, PACL)과 원발성 편평상피세포폐암군(Primary squamous cell carcinoma of lung, PSqCL) 및 양성폐질환군(Benign lung disease, BLD)군으로 나누고, 말초혈액 20 mL을 채취하여 수지상 세포를 분리하고 단일클론 항체를 이용하여 CD1c+ 골수성 세포의 수 및 수지상 세포에서의 동시자극 표지자 중 주요 표지자들의 발현정도를 유체세포측정기를 이용하여 확인하고 두 군 간의 통계적 차이 유무를 확인하였다. 결과: CD1c+ 골수성 수지상 세포(CD1c+CD19-)의 수는 PACL, PSqCL 및 BLD군 모두 그 차이가 모두 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 공동자극표지자의 발현은 PACL군과 BLD군에서는 CD40의 발현이 p-value=0.171, CD86의 발현이 p-value=0.037과 HLA-DR의 발현이 p-value=0.036로 PACL군에서 감소한 것을 통계학적으로 확인할 수 있었다. PACL군과 PSqCL군 간에는 CD40의 발현이 p-value=0.319, CD86의 발현이 p-value=0.036과 HLA-DR의 발현이 p-value=0.085로 PACL군에서 공동표지자의 발현이 감소한 양상이나 통계적 유의성은 CD86의 발현 외에는 없었다. PSqCL군과 BLD군간에는 공동표지자의 발현에 통계적 차이는 없었다. PACL군과 비선암군간에는 CD40의 발현이 p-value=0.005, CD86의 발현이 p-value=0.013와 HLA-DR의 발현이 p-value=0.004로 PACL군에서 공동표지자의 발현이 감소한 것을 통계학적으로 확인할 수 있었다. 결론: CD1c+ 골수성 수지상 세포에서 원발성 폐선암 환자에서 주요 표지자의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 원발성 폐선암 환자에서 주요 표지자의 발현의 감소가 면역회피기전의 하나일 수 있는 가능성 및 수지상 세포에 의하여 유발되는 면역반응은 수지상 세포의 표지자의 발현 정도에 의해 결정된다는 가능성을 제시한다.

- 중심 단어 : 1. 면역학
2. 선암
3. 폐암
4. 수지상 세포
5. 항원