

항바이러스 효능을 가진 자연살해세포 치료제 플랫폼 개발

김동수¹⁾ · 윤형석²⁾ · 이진희¹⁾ · 연다영¹⁾ · 유치호²⁾ · 구세훈²⁾ · 송영조²⁾ ·
김정은²⁾ · 이승호²⁾ · 이용한²⁾ · 허경행²⁾ · 강정화^{*,1)}

¹⁾ ㈜이뮤니스바이오 기업부설연구소

²⁾ 국방과학연구소 Chem-Bio 기술센터

Development of a Platform for Natural Killer Cell Therapy with Antiviral Efficacy

Dongsoo Kim¹⁾ · Hyeongseok Yun²⁾ · Jinhui Lee¹⁾ · Dayoung Yeon¹⁾ · Chi Ho Yu²⁾ ·
Se Hum Gu²⁾ · Young-Jo Song²⁾ · Jung-Eun Kim²⁾ · Seung-Ho Lee²⁾ · Yong Han Lee²⁾ ·
Gyeong Haeng Hur²⁾ · Junghwa Kang^{*,1)}

¹⁾ *Research & Development, IMMUNISBIO Co., Ltd., Republic of Korea*

²⁾ *Agency for Defense Development, Republic of Korea*

(Received 15 October 2023 / Revised 26 November 2023 / Accepted 10 January 2024)

Abstract

Various vaccines were rapidly developed during the COVID-19 pandemic to prevent and treat infections but global infections continue, and concerns about new mutations and infectious diseases persist. Thus, active research focuses on developing, producing, and supplying vaccines and treatments for various infectious diseases and potential pandemics.

Natural killer(NK) cells, as innate immune cells, can recognize and eliminate abnormal cells like virus-infected and cancer cells. Hence, their development as anticancer and antiviral treatments is rapidly advancing. In this study, optimal short-term culture conditions were identified for allogeneic NK cells by simplifying the culture process through the isolation of NK cells(referred to as NKi cells) and eliminating CD3+ cells(referred to as CD3-cells). NK cells demonstrated reduced viral titer in injection of NK cells into SARS-CoV-2 infected ACE-tg mice increased survival.

The study's findings could form the basis for an antiviral treatment platform that swiftly responds to new viral disease pandemics.

Key Words : Natural Killer Cell(자연살해세포), Cell Therapy(세포치료제), SARS-CoV-2(코로나바이러스), COVID-19(코로나-19), Antiviral Drug(항바이러스제)

* Corresponding author, E-mail: kjunghwa@immunisbio.com

Copyright © The Korea Institute of Military Science and Technology

1. 서론

코로나 바이러스는 다양한 동물을 감염시키고 인간에게 경증에서 중증의 호흡기 감염질환을 유발하는 것으로 알려져 있다^[1]. 2002년과 2012년에 흔한 감염병을 일으키는 고병원성 코로나바이러스인 중증급성 호흡기증후군(SARS-CoV-2)과 중등호흡기증후군(MERS-CoV-2)이 사람에게 치명적인 호흡기 질환을 일으켜 신종 코로나바이러스를 21세기의 새로운 공중보건 문제로 부각되었다^[1]. 2019년 말, SARS-CoV-2로 명명된 신종 코로나바이러스가 중국 우한시에서 출현하여 이례적인 바이러스성 폐렴이 발생하였다^[1,2]. 코로나바이러스 2019(COVID-19)로 알려진 신종 코로나바이러스 질병은 높은 감염력으로 인해 전 세계적으로 빠르게 퍼졌다^[3].

자연살해세포(NK세포)는 본래 바이러스 또는 종양 세포에 자연적인 세포독성을 가지는 큰 과립 림프구로 설명되었다^[4,5]. NK세포는 나중에 비정상 세포에 대한 세포독성과 사이토카인 생성을 통한 다른 면역 세포의 활성을 증가시키는 능력을 모두 가진 별도의 림프구 계통으로 인식되었다^[4,6]. 진화 과정에서 표적 세포에 대한 세포독성을 획득하는 것은 세포 용해 과정을 제어하면서 정상 조직 손상을 방지하는 고도로 정교하고 강력한 메커니즘의 개발과 관련이 있다^[4,7]. 이와 관련하여 NK세포가 표적세포를 다른 건강한 ‘자기(self)’ 세포와 구별할 수 있도록 하는 메커니즘을 확인하는데 상당한 진전이 있었다^[4,8]. NK세포에 대한 연구는 NK세포 표면에 존재하는 다양한 활성화 및 억제 수용체와 관련이 있으며, 이러한 수용체에 해당하는 리간드의 결합이 NK세포의 활성을 조절하는 한 메커니즘으로 알려져 있다^[4,9]. 따라서 이웃 세포와의 상호 작용에서 길항경로의 통합은 NK세포의 활성화를 조절하는 동적 평형을 지배하고, NK세포는 활성화되어 표적세포의 사멸 여부를 결정 한다^[4].

NK세포 기능은 여러 암호화된 수용체에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다^[10,11]. 바이러스 감염 시, 숙주 세포는 감염에 의해 유도된 자체 암호화 분자의 상향 조절 및/또는 세포독성 수용체(ex, NKp30, NKp44 및 NKp46), C형 lectin 유사 수용체(ex, NKG2D 및 NKp80) 및 공동활성화 수용체(ex, DNAM-1 및 CD2)와 같은 활성화 NK세포 수용체에 결합해 수반되는 세포 스트레스 반응을 포함하는 다양한 메커니즘을 통해 NK세포 매개 인식에 민감해질 수 있다^[10]. 또한 억제 수용

체에 대한 MHC class I ligand의 하향조절은 표적세포 민감성 증가에 기여한다^[10]. NK세포는 또한 CD16 매개 항체 의존성 세포독성(ADCC)을 통해 바이러스에 감염된 세포를 제거할 수도 있다^[10]. 마지막으로, NK세포의 활성화는 인터루킨 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 type I 인터페론을 포함하는 사이토카인들에 의해 조절된다^[10]. 하지만 이러한 조절은 바이러스 감염 세포 또는 활성화된 항원 제시 세포에 의해 생성될 수 있는 사이토카인에 국한되지 않을 수 있다^[10,12]. 이러한 많은 사이토카인은 단독으로 또는 조합하여 NK세포 생존, 증식, 세포독성 및 인터페론 감마(IFN- γ) 생산을 포함하는 사이토카인 생성을 촉진한다^[13]. 이러한 메커니즘을 통해 NK세포는 바이러스 감염 세포를 감지하고 즉각적으로 제거할 수 있다^[10].

NK세포의 ex-vivo 배양을 위해 림프구의 분리는 주로 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리를 사용하여 림프구를 분리하고^[14], 분리된 세포에서 IL-2와 같은 세포 증식에 관여하는 사이토카인과 함께 지지세포(feeder cell)와 공동배양 하는 방법이 사용된다^[10,15,16]. 임상적으로 사용하기 위한 NK세포 배양은 고순도, 저불순도를 보장해야 하지만 지지세포와의 공동 배양 등의 과정에서 효과적인 사이토카인 선별 및 불순물 제거가 어렵다는 점이 NK세포 배양의 난관이다. 따라서 위와 같은 이유로 NK세포를 이용한 세포치료제의 개발이 어렵고, 배양 방법의 표준화가 필요한 실정이다^[17,18].

본 연구에서는 말초혈액에서 분리된 말초혈액단핵 세포로부터 NK세포를 분리하고, 배양 방법을 표준화하여 임상적으로 적용(세포수: >1억)이 가능할^[19] 정도의 대용량으로 배양이 가능한 항바이러스 NK세포 배양공정 플랫폼을 확립하고, 배양된 NK세포의 SARS-CoV-2 바이러스에 대한 항바이러스 효능을 확인하여 임상에 적용 가능한 항바이러스 세포치료제 후보군 개발의 기틀을 마련하고자 하였다.

2. Material and methods

2.1 Materials

A549 및 VERO E6 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배양배지는 Gibco(Billings, MT, USA)에서 구입하였다. Fetal Bovine

Serum(FBS)은 Hyclone(Logan, UT USA)에서 구입하였고, NK세포 배양배지인 KBM502는 KojinBio(Sakado, Japan)에서 구입하였다. EasySep™ Human NK Cell Isolation Kit, Human CD3 Positive Selection Kit II 및 The Big EasySep™ magnet은 STEMCELL Technologies (Seoul, Korea)에서 구입하였다. Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Poly-L-lysine solution과 Bovine Serum Albumin은 Sigma-Aldrich(Seoul, Korea)에서 구입하였다. Paraformaldehyde(4 %)는 T&I(Zhangjiakou, China)에서, 0.4 % Trypan Blue Stain은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. CD3, CD56, CD107a, NKG2D 및 CD57 항체는 Invitrogen (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. CD16, NKG2C, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, DNAM-1, 2B4, FAS-L 및 TRAIL 항체는 BioLegend(SanDiego, CA, USA)에서 구입하였다. NKsol™은 IMMUNISBIO Co., Ltd(Incheon, Korea)에서 제공 받았다. SARS-CoV-2 delta variant는 질병관리본부(Cheongju, Korea)에서 배포되어 biosafety level 3 실험실에서 보관하였다. 인간 말초 혈액(PB) 샘플의 검사는 가톨릭관동대학교 국제성모병원 임상연구심의위원회(IRB committee)의 승인을 받아 수행되었다.

2.2 Methods

2.2.1 NK cell preparation

건강한 기증자로부터 얻은 말초 혈액(PB)에서 분리된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)는 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리를 사용하여 분리하였다. 분리된 PBMC를 각각 EasySep™ Human NK Cell Isolation Kit 및 EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit II를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 NK세포(NKi 세포) 및 CD3+ depletion 세포(CD3-)를 분리하였다. 요약하여, Big Easy EasySep™ 자석을 사용하여 분리된 PB를 해당 kit의 selected cocktail concentrations로 반응시키고 RapidSpheres™로 처리하여 세포를 분리하였다. 분리한 세포를 제조업체의 지침에 따라 KBM502 배지에 증식 및 활성화 시약인 NKsol™으로 처리하여 배양하였다. 분리 배양된 NKi 및 CD3-세포(20×10^6 cells)에 0일(D0)부터 6일(D6)까지 3일마다 20 μ L의 NKsol™을 처리하여 배양하였다.

2.2.2 Expansion kinetics assesment

각 NKi세포와 CD3-세포의 총 세포 수는 Trypan Blue

Stain을 사용하여 0일(D0), 3일(D3), 5일(D5), 8일(D8) 및 16일(D16)에 측정되었다. 전체 셀 수의 변화는 각 포인트의 세포 수를 D0 세포 수로 나누어 fold expansion으로 표현하였다.

2.2.3 Flow cytometry

NKi 및 CD3-세포는 CD3, CD56, CD16, CD107a, NKG2D, NKG2C, NKG2A, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80, DNAM-1, 2B4, FAS-L, CD57 및 TRAIL 항체를 사용하여 분석하였다. 유세포 분석은 CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, CA)를 사용하여 수행하였다. 데이터는 CytoExpert 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

2.2.4 Antiviral effect of natural killer cells using the TCID₅₀ assay

NK세포의 항바이러스 효과를 확인하기 위해 VERO E6 세포를 100 % confluence로 배양하고 1×10^4 PFU/mL로 SARS-CoV-2 delta variant를 N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone(TPCK)-trypsin과 함께 처리하여 2 시간 동안 배양하였다. Fresh medium으로 교체 후, NK세포 후보군의 공배양에 따른 virus titer 변화를 확인하기 위해 VERO E6세포 단독 군(control)과 VERO E6를 표적세포로 하는 이펙터세포인 NK세포 후보군을 1:1, 1:5의 세포 수 비율로 공배양 하였다. 공배양으로 부터 획득한 배양액을 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 supernatant를 획득하여 TCID₅₀ assay에 사용하였다. 앞서 얻은 viral supernatant는 96 well plate에 100 % confluency로 배양된 VERO E6에 적용하고, viral titer는 cytopathic effect(CPE)를 관찰하여 분석하였다. 전체 실험 과정은 biosafety level 3 laboratory에서 수행하였다.

2.2.5 in vivo experiment hACE transgenic (hACE-tg) mouse model

모든 동물실험은 국립연구협의회 실험동물 관리 및 사용지침(IACUC, Korea, ADD-IACUC-22-15)에 따라 수행하였다.

모든 마우스는 Jackson 연구소에서 구입하여 21~23 °C의 온도에서 12시간 밤낮 주기로 물과 음식에 접근할 수 있는 ABL3 환경에서 유지되어 사육되었다.

hACE-tg 마우스(B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J)는 1×10^7 cells/head로 PBMC 대조군, NKi, CD3-세포를 주입하고

1시간 후 SARS-CoV-2 delta variant 1,700 PFU/head를 intranasally(i.n.)로 감염시켰다. Weight change와 survival은 2주 동안 측정되었다. 마우스의 총 마리 수는 그룹당 9마리를 사용하였다. 모든 마우스는 저용량 SARS-CoV-2 감염에서 생존율이 낮은 수컷이었다. 미국 수의학 협회 지침에 따라 모든 생존 동물을 10 % CRR에서 CO₂로 안락사 하였다.

2.2.6 Statistical analysis

모든 데이터는 평균±SD로 표시하였다. 일부 평균값은 Dunnett's test를 사용하여 단방향 또는 양방향 분산 분석(ANOVA)으로 비교하였다. 통계적 유의성을 나타내기 위해 0.05 미만의 P-value를 취하였다.

3. Results

3.1 Natural Killer cell sources were determined through isolation methods, and natural killer cell therapeutic candidates were identified through culture

NK세포 배양을 위해 Ficoll-Hypaque 밀도구배 원심분리를 이용하여 건강한 공여자의 PB에서 림프구를 분리하였다. 이후, 추가적으로 순수 NK세포 후보군을 선별하고 다양한 사이토카인을 포함하는 배지로 활성화 및/또는 증식 NK세포를 얻어 최종 후보군을 배양한다. 일반적으로 알려진 NK세포 배양은 feeder 세포의 공배양이나 다단계의 분별 방법 복잡한 공정을 사용하고 있다. 본 연구에서는 간단한 배양 플랫폼 방법을 사용하여 NK세포를 배양하는 단순한 방법을 구축하고자 하였다(Fig 1A).

Ficoll-Hypaque 밀도구배 원심분리로 얻은 림프구를 NK cell-negative selection kit와 CD3 cell positive-selection kit를 이용하여 순수한 NK세포를 배양할 후보 세포들을 분리하였다. NK cell-negative selection kit를 이용하여 분리된 NK세포는 배양 전·후 CD56+NK세포의 비율이 33.7 %에서 94.2 %로 증가했으며 대부분의 CD3+세포와 CD3-CD56-세포가 제거되어 순도가 크게 증가하였다. 대부분의 CD3+세포는 CD3+cell positive selection kit에 의해서 제거되었다(Fig. 1B). NK cell-negative selection에 의해 분리된 세포는 약 2 %의 수율을 보였고, CD3+depletion을 통해 얻은 세포는 약 50 %의 수율을 보였다(Fig. 1C). 이렇게 분리된 각 NK세포

후보군을 NK세포 활성화/증식 시약인 NKsolTM으로 처리하여 배양한 결과 NKi세포와 CD3-세포 모두 CD56+NK세포로 유지 및 분화되는 것을 확인하였다(Fig 1B). NKi 및 CD3-세포 모두 배양 후 16일(D16)에서 상당히 증가한 세포증식을 보였다. 특히 Ni세포의 수는 D0에서 10×10⁶ 세포였으며 D16에서 2,703.3×10⁶ 세포로 270배 증가하였다(Fig. 1D). 따라서 이 결과를 통해 NK세포 배양을 위한 후보군을 선정하고 간단한 배양과정을 확립하였다.

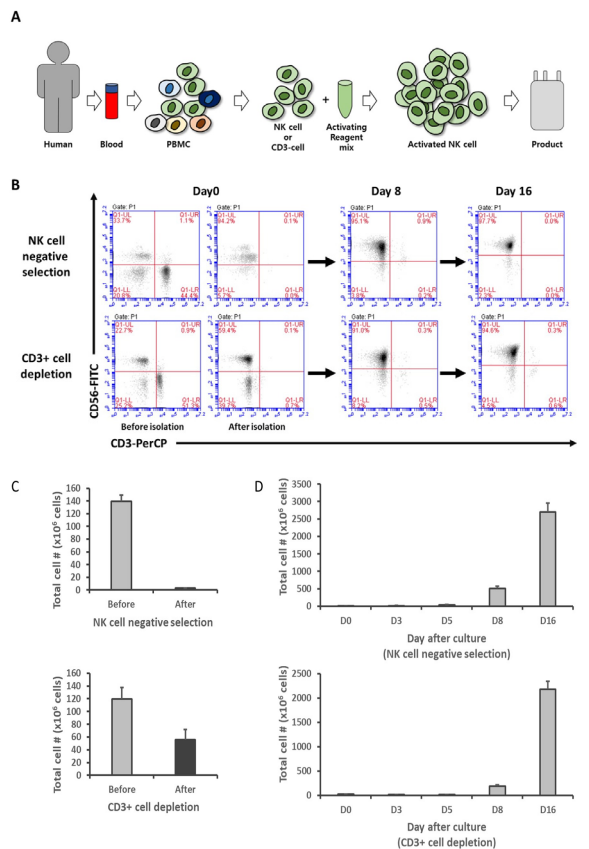


Fig. 1. Natural killer cells were obtained through various isolation methods, and natural killer cell therapeutic candidates were identified through culture

A. The schema of NK cell culture, B. Flow cytometry results of various isolation methods for NK cell culture, C. Yield of various NK cell isolation methods. D. Total number of NK cell-negative selected cells and CD3+ depleted cells cultured with NKsolTM

3.2 Antiviral-related receptor expression

comparison of cultured NK cells after NK cell selection and CD3+cell depletion

선천 면역 세포인 NK세포는 급성 SARS-CoV-2감염에 대한 초기 반응자로서 혈액에서 폐로 순환하는 NK세포를 모집하는 것으로 알려져 있다. 이러한 NK세포의 이동은 다양한 케모카인을 통한 화학유인(chemoattraction)에 의해 일어난다. NK세포는 다양한 활성화/억제 수용체를 통해 비정상 세포를 살상하는 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

SARS-CoV-2에 감염된 세포는 HLA-E 발현이 증가하며 NKG2C와 같은 수용체에 의해 NK세포를 활성화한다^[10]. SARS-CoV-2 peptide는 또한 NKG2D 수용체와 결합하여 NK세포의 활성을 증가시키는 것으로 보고되어 있다^[20]. NKG2D에 의해 활성화된 NK세포를 증폭시킬 수 있는 DNAX 보조 분자(DNAM-1), 2B4를 포함한 여러 활성화 공동 수용체가 발현되고 있으며, 바이러스 제거가 느린 환자의 NK세포는 DNAM-1의 발현과 공동 억제 수용체 TIGIT의 발현이 감소되어 있다는 연구 결과가 있다^[21]. 또한, NK세포는 항체 의존성 세포 독성을 유도하는 Fc- γ 수용체 IIIA인 CD16과 항체 흡소닌화 표적 세포에 결합하여 활성화된다. 특히, CD16은 다른 수용체를 통한 추가적인 활성화 없이 스스로 NK세포를 활성화할 수 있는 유일한 수용체이다^[22].

NK세포는 MHC 독립적인 매커니즘을 통해 바이러스 단백질 항원을 인식하고 NCR 계열 수용체(NKp30, NKp44, NKp46)는 바이러스의 글리칸 구조와 항원을 인식하여 비정상 세포의 사멸을 유도하여 바이러스에 감염된 세포를 제거할 수 있다^[23]. 또한, 표적 세포의 세포 용해를 매개하는 Fas 리간드(FasL)와 종양 괴사인자 관련 세포사멸 유도 리간드(TRAIL)를 포함한 여러 세포의 리간드를 발현하여 바이러스에 감염되어 사멸 수용체를 발현하는 감염된 세포의 사멸을 유도한다^[24].

CD57은 증식 능력이 좋지 않은 노화된 세포 상태를 나타낼 수 있는 지표로 사용되고 있으며, NK세포의 기능적 반응을 형성하는 주요 수용체인 NKG2A의 발현과 반비례한다고 보고되었다^[25].

NKi 및 CD3-세포의 항바이러스 관련 수용체를 유세포분석기로 분석하였다. 분석 결과 항바이러스 효과를 나타내는 것으로 알려진 수용체의 발현이 PBMC(대조군)에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인하였다

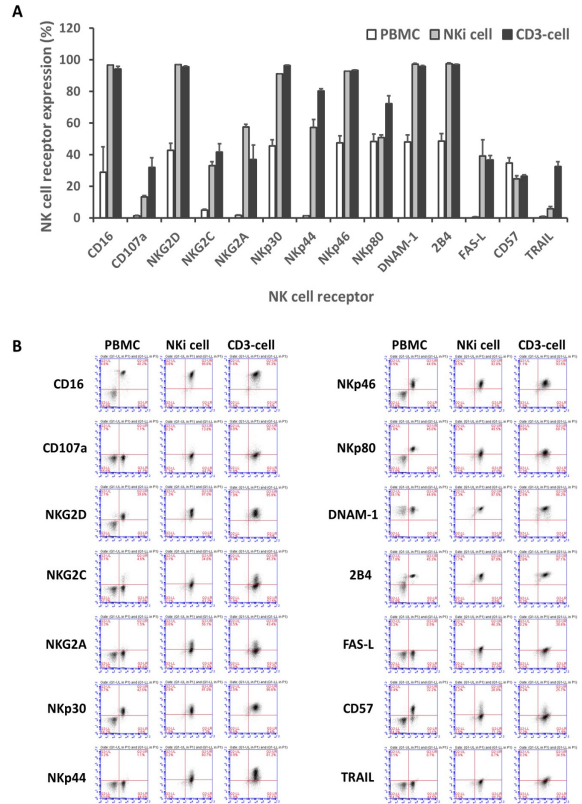


Fig. 2. Comparison of antiviral receptor expression in NKi and CD3-cells.

Figures A and B. NKi and CD3-cells gated on CD56-FITC-positive cells and reached with PE-conjugated antibody corresponding to each receptor and PE-positive cells were analyzed by flowcytometry.

(Fig 2A, B). NKi 및 CD3-세포보다 PBMC에서의 높은 CD57 발현은 동일한 배양 기간에서 비교해 볼 때 노화가 더 진행되었음을 나타낸다. 이러한 결과는 NKi 및 CD3-세포가 항바이러스 기능을 가질 수 있음을 시사한다.

따라서 이들 세포의 항바이러스 효능을 SARS-CoV-2에 감염된 세포와 마우스 모델을 통해 확인하였다.

3.3 Antiviral effect of natural killer cell candidate

NKi 및 CD3-세포의 항바이러스 효과를 확인하기 위해 TCID₅₀ 분석을 수행하였다. VERO E6세포는 SARS-CoV-2 바이러스의 표적인 angiotension-converting enzyme 2(ACE2)를 발현하는 것으로 알려져 있다^[26].

100 % confluence로 배양된 VERO E6세포는 1×10^4 PFU/mL의 SARS-CoV-2로 감염시켰다. NKi 및 CD3-세포는 이펙터세포(E)로 표적세포(T)인 SARS-CoV-2에 감염된 VERO E6와 함께 E:T 비율이 1:1, 5:1이 되도록 공배양 시켰다. 공배양 후 획득한 viral supernatant는 새로운 VERO E6 세포에 재감염시키고, virus titer 차이를 TCID₅₀ 분석을 통해 확인하였다. Virus titer는 NKi 및 CD3-세포를 공동 배양함으로써 크게 감소한 것을 확인하였다. NKi세포의 경우 logTCID₅₀ 값이 대조군에 비해 E:T 비율 1:1과 5:1에서 각각 7.60에서 6.67, 5.90으로 감소하였다. 즉, SARS-CoV-2 virus titer는 NKi세포에 의해 E:T비율 5:1에서 약 60배 감소한 수치를 보였다. 또한 CD3-세포의 경우 logTCID₅₀ 값이 E:T 비율 1:1과 5:1에서 각각 7.60에서 6.66, 6.84로 감소하였다. 즉, SARS-CoV-2 virus titer는 CD3-세포에 의해 약 10배 감소한 수치를 보였다(Fig. 3A).

NKi세포와 CD3-세포의 in vivo 항바이러스 효과는 SARS-CoV-2 바이러스 delta variant에 감염된 hACE-transgenic(ACE-tg) 마우스 모델을 사용하여 PBMC(대조군) 그룹과 비교하여 확인하였다. 이 실험에서는 SARS-CoV-2에 감염된 ACE-tg 마우스에서 NK세포 후보물질과 PBMC를 1회 투여하고 체중 변화와 생존율을 2주 동안 기록하였다(Fig. 3B). NKi 및 CD3-세포군 모두 마우스의 체중은 PBMC군과 유의미한 차이가 없었지만, 생존율은 PBMC군에 비해 두 후보군 모두에서 유의하게 증가하였다. SARS-CoV-2 바이러스 감염 8일 후 죽은 개체가 처음 관찰되었으며, 대조군 PBMC 그룹의 최종 생존율 11 %에 비해서 NKi 및 CD3-세포 그룹은 44 %로 생존율이 높았다(Fig. 3C). 이를 통해 SARS-CoV-2 감염 마우스의 생존율이 NK세포 1회 투여만으로도 크게 증가함을 확인하였다.

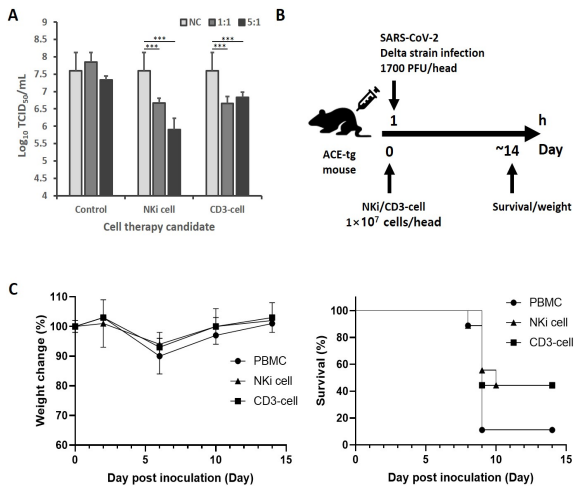


Fig. 3. Anti-viral effect of natural killer cell candidates
 A. Viral titers were analyzed in supernatant obtained by co-culture of control, NKi and CD3- cells with SARS-CoV-2 infected VERO E6 cells using the TCID₅₀ assay. B. To confirm the SARS-CoV-2 in vivo treatment effect of NK cell candidates, ACE-tg mice were infected with the virus and survival was observed for two weeks. C. Weight changes and survival were observed following the infusion of NK cell candidates into ACE-tg mice infected with SARS-CoV-2. Control, PBMCs; NKi cells, selected NK cells; CD3-cells, CD3 depleted cells. ***p<0.001.

4. 결론

COVID-19 확산으로 자기 면역이 중요하게 인식되면서 체내에 존재하는 면역 세포가 재조명을 받고 있다. 특별한 치료 약 없이도 면역력으로 이겨낸 경우를 살펴보면, 면역 시스템이 정상적으로 작동하면 경증 내지는 무증상으로 완치될 수 있기 때문이다. 면역세포는 종양이나 바이러스에 감염된 비정상 세포를 죽이는 역할을 하며, 사이토카인으로 체내 면역력을 올려주거나 다양한 장기와 조직에서 기능하는 세포이다. 특히 면역세포 중 NK세포는 타고난 면역반응의 근간으로 몸의 면역계에서 방어 1선을 담당하고 있는 세포로 종양세포나 바이러스 감염 세포 등 비정상 세포를 즉각적으로 인식해 제거한다^[10,27].

따라서 본 연구에서는 NK cell-negative selection과 CD3 cell-positive selection을 이용하여 NK세포 배양 후보군을 선정하고 증식/활성화 시켜 세포증식, 항바이러스 수용체 발현을 분석하고 SARS-CoV-2 감염에 대한 항바이러스 효능을 in vitro 그리고 in vivo에서 확인하여 항바이러스 세포치료제 후보군의 유효성을 확인하였다.

세포 입양면역 치료에서는 NK세포를 효율적으로 증식시켜 대량으로 배양하는 것이 중요하다. 건강한 공여자로부터 얻은 혈액으로부터 NK세포와 CD3-세포를 획득하였고, 증식과 활성화 물질인 NKsoil™을 처리하여 NK세포를 배양하였다. 이를 통해 NKi 및 CD3-

포를 이용하여 매우 순수한 NK세포를 대량으로 증식시킬 수 있음을 확인하였다(Fig. 1)

NK세포는 활성화/억제 수용체의 다양한 리간드 상호작용을 통해 비정상 세포를 살상하는 능력을 가지고 있다. SARS-CoV-2에 감염된 세포는 HLA-E의 발현이 증가하여 NK세포의 NKG2C를 활성화시킬 수 있다^[10]. 또한 SARS-CoV-2 peptide는 NK세포의 NKG2D 수용체에 결합하여 NK세포의 활성을 증가시킨다는 것이 알려져 있다^[20]. 바이러스 제거가 느린 환자에서 NK세포의 DNAM-1 감소와 TIGIT 발현이 증가하여 있는 것이 보고된 바 있다^[21]. NK세포는 또한 MHC 독립적인 메커니즘으로 바이러스 항원을 인식할 수 있고 NCR 계열 수용체(NKp30, NKp44, NKp46)에 의해 바이러스 클리칸 구조 및 항원을 인식하여 바이러스 감염 세포를 제거할 수 있다^[23]. 증식 및 활성화된 NK세포와 CD3-세포는 PBMC와 비교하여 항바이러스와 관련된 활성화 수용체의 상당한 증가를 보였다. 따라서 이 결과는 NK세포와 CD3-세포가 항바이러스 효능을 가질 수 있음을 보여준다.

바이러스 titer의 변화는 SARS-CoV-2 감염세포와 NK세포치료제 후보군인 NK세포와 CD3-세포의 공배양을 통해 감소를 확인하였다. NK세포 후보군은 SARS-CoV-2 바이러스가 감염된 VERO E6 세포를 살상하여 바이러스 titer가 크게 감소하였다. NK세포의 경우 60배 낮은 바이러스 titer가 감소하였고, CD3-세포의 경우 약 10배 낮은 바이러스 titer 감소를 보였다(Fig. 3A). in vivo에서 NK세포 후보군의 바이러스 제거 효과를 확인하기 위해 SARS-CoV-2에 감염된 ACE-tg 마우스 모델을 사용하여 생존율을 확인하였다. SARS-CoV-2에 감염된 ACE-tg 마우스에 NK 및 CD3-세포를 단회 투여한 결과 체중의 변화 없이 대조군보다 더 높은 생존율을 보였다(Fig. 3C). 이 결과는 NK세포의 단회 투여로 SARS-CoV-2 감염에 대한 생존율을 높일 수 있음을 확인한 것이다. 하지만 추가적으로 항바이러스 효능을 높이기 위해서는 다중투여 또는 용량 증감을 통해 효율적인 NK세포의 용법을 확립해야 할 필요가 있다.

본 연구에서 우리는 몇 가지 NK세포의 선별 방법을 통해 NK세포의 기원을 선정하여 증식 및 활성화를 통해 대량의 NK세포를 배양할 수 있는 후보군을 확립하였다. NKsolTM으로 배양한 NK세포 후보군인 NK세포와 CD3-세포는 높은 순도로 상당히 증가한 활성화 수용체의 발현을 보였다. in vitro/in vivo 결과 SARS-CoV-2 감염 세포를 살상하여 바이러스가 재생

산되지 않도록 억제하여 바이러스 titer가 크게 감소하였고 SARS-CoV-2에 감염된 마우스의 생존율을 크게 증가시켰다.

요약하여, 이 본 연구에서는 항바이러스 NK세포치료제의 다양한 후보군의 배양 공정을 확립하고 SARS-CoV-2 바이러스 감염병에 대한 항바이러스제로의 가능성을 확인하였다.

후 기

과제창출과 R&D 수행을 제안하고 도와주신 국방과 학연구소에 감사드립니다. 또한, 이 작업은 (주)이뮤니스바이오와 국방과학연구소에서 공동으로 수행하였음을 알려드립니다.

References

- [1] Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L, "Characteristics of SARS-COV-2 and COVID-19," Nat Rev Microbiol., United Kingdom, pp. 141-154, 2021.
- [2] She J, Jiang J, Ye L, Hu L, Bai C, Song Y, "2019 novel coronavirus of pneumonia in Wuhan, China: Emerging attack and management strategies," Clin Transl Med., United States, p. 19, 2020.
- [3] Mohan BS, Vinod N, "Covid-19: An insight into SARS-cov2 pandemic originated at Wuhan City in Hubei Province of China," J Infect Dis Epidemiol., United States, p. 146, 2020.
- [4] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S, "Functions of Natural Killer Cells," Nat Immunol., United Kingdom, pp. 503-10, 2008.
- [5] Lee AJ, Kim SG, Jeon CH, Suh HS, Yoon GS, Seo AN, "A case of natural killer cell leukemia misdiagnosed as tuberculous lymphadenopathy," Korean J Lab Med., Korea, pp. 194-198, 2009.
- [6] Anguille S, Van Acker HH, Van den Bergh J, Willems Y, Goossens H, Van Tendeloo VF, Smits EL, Berneman ZN, Lion E, "Interleukin-15 Dendritic Cells Harness NK Cell Cytotoxic Effector Function in a Contact- and IL-15-Dependent Manner," PLoS One., United States, e0123340, 2015.

- [7] Carrillo-Bustamante P, Keşmir C, de Boer RJ, “The evolution of natural killer cell receptors,” *Immunogenetics*, Germany, pp. 3-18, 2016.
- [8] Kapur R, Evans DL, Harris DT, “An evolutionary conserved target cell antigen along with MHC class I molecules influences susceptibility to murine NK cell lysis,” *Dev Comp Immunol.*, United Kingdom, pp. 347-55, 1995.
- [9] Kumar S, “Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors,” *Immunology.*, United Kingdom, pp. 383-393, 2018.
- [10] Björkström NK, Strunz B, Ljunggren HG, “Natural killer cells in antiviral immunity,” *Nat Rev Immunol.*, United Kingdom, pp. 112-123, 2022.
- [11] Orr MT, Lanier LL, “Natural killer cell education and tolerance,” *Cell.*, United States, pp. 847-856, 2010.
- [12] Zwirner NW, Ziblat A, “Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27,” *Front Immunol.*, Switzerland, 8:25, 2017.
- [13] Mah AY, Cooper MA, “Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- γ Production,” *Crit Rev Immunol.*, United States, pp. 131-147, 2016.
- [14] Somanchi SS, Senyukov VV, Denman CJ, Lee DA, “Expansion, purification, and functional assessment of human peripheral blood NK cells,” *J Vis Exp.*, United States, p. 2540, 2011.
- [15] Nakazawa T, Morimoto T, Maeoka R, Matsuda R, Nakamura M, Nishimura F, Yamada S, Nakagawa I, Park YS, Nakase H, Tsujimura T, “Establishment of an efficient ex vivo expansion strategy for human natural killer cells stimulated by defined cytokine cocktail and antibodies against natural killer cell activating receptors,” *Regen Ther.*, Japan, pp. 185-191, 2022.
- [16] Tanaka Y, Nakazawa T, Nakamura M, Nishimura F, Matsuda R, Omoto K, Shida Y, Murakami T, Nakagawa I, Motoyama Y, Morita H, Tsujimura T, Nakase H, “Ex vivo-expanded highly purified natural killer cells in combination with temozolomide induce antitumor effects in human glioblastoma cells in vitro,” *PLoS One.*, United States, e0212455, 2019.
- [17] Min B, Choi H, Her JH, Jung MY, Kim H-J, Jung M-young, et al., “Optimization of large-scale expansion and cryopreservation of human natural killer cells for anti-tumor therapy,” *Immune Network*, South Korea, e31, 2018.
- [18] Bae DS, Lee JK, “Development of NK cell expansion methods using feeder cells from human myelogenous leukemia cell line,” *Blood Res.*, South Korea, pp. 154-61, 2014.
- [19] Zafarani A, Razizadeh MH, Pashangzadeh S, Amirzarga MRr, Taghavi-Farahabadi M, Mahmoudi M, “Natural killer cells in COVID-19: from infection, to vaccination and therapy,” *Future Virol.*, England, 2023.
- [20] Kim H, Byun JE, Yoon SR, Koohy H, Jung H, Choi I, “SARS-CoV-2 peptides bind to NKG2D and increase NK cell activity,” *Cell Immunol.*, United States, 104454, 2022.
- [21] Di Vito C, Calcaterra F, Coianiz N, Terzoli S, Voza A, Mikulak J, Della Bella S, Mavilio D, “Natural Killer Cells in SARS-CoV-2 Infection: Pathophysiology and Therapeutic Implications,” *Front Immunol.*, Switzerland, 888248, 2022.
- [22] Capuano C, Pighi C, Battella S, De Federicis D, Galandrini R, Palmieri G, Harnessing Cd16-Mediated Nk Cell Functions to Enhance Therapeutic Efficacy of Tumor-Targeting Mabs. *Cancers(Basel)*, Switzerland, 2021.
- [23] Pituch-Noworolska AM, “NK cells in SARS-CoV-2 infection,” *Cent Eur J Immunol.*, Poland, pp. 95-101, 2022.
- [24] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al., Identification and Characterization of a New Member of the Tnf Family That Induces Apoptosis. *Immunity*, United States, pp. 673-682, 1995.
- [25] Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Bjorklund AT, Tullberg MF, Michaelsson J, Rottenberg ME, Guzman CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ, Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from

- NK-cell education. *Blood*, United States, pp. 3853-3864, 2010.
- [26] Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS, "Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target," *Intensive Care Med.*, United States, pp. 586-590, 2020.
- [27] Deng X, Terunuma H, Nieda M, "Exploring the Utility of NK Cells in COVID-19," *Biomedicines.*, Switzerland, 1002, 2022.