

위암 환자의 말초혈액 조혈모세포로부터 수지상세포로의 분화 유도

최지연, 이대희*, 정현기**, 조성래***

일신기독병원 소아과, 고신대학교 의학부 약리학교실*, 소아과학교실**, 흉부외과학교실***

Generation of Mature Dendritic Cells from Peripheral Blood Stem Cells in Patient with Stomach Cancer

Ji Youn Choi, Dae-Heui Lee*, Hyun Kee Chung**, Sung Rae Cho***

Department of Pediatrics, Ilsin Christian Hospital, Busan, Korea

*Department of Pharmacology, **Department of Pediatrics,

***Department of Cardiothoracic Surgery,

Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background Throughout the body, Dendritic Cells (DCs) capture the antigens, migrate to draining lymphoid organs and mature to present the processed antigens to naive T cells to generate the effector cytotoxic T cells (CTLs) or helper T cells. The granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) cooperate in vitro generation of DCs from Peripheral Blood Stem Cells (PBSCs). Interleukin-4 (IL-4) is an another important factor in promoting DCs outgrowth and expression of CD1a with costimulatory molecules and in blocking monocytic differentiation. The aim of this study was induction of differentiation and maturation of dendritic cells from PBSCs in patient with stomach cancer. **Methods** The CD34+ PBSCs were obtained from the patients with stomach cancer and divided the samples into 6 groups. Flt-3 Ligand (FL) (F group), GM-CSF (G group), IL-4 (I group), TNF- α (T group), GM-CSF and IL-4 (GI group), FL, GM-CSF, IL-4 and TNF- α (FGIT group) were added to X-VIVO culturing media. The cells were cultured for 2 weeks, then, examined the morphology of and functions the cells with phase contrast and fluorescence microscopes. **Results** The generated cells with FL, GM-CSF, IL-4 and TNF- α showed typical morphology of DCs including multiple dendrites and profuse cytoplasm. The cells stained positively with CD1a, CD83 and CD86. FL, GM-CSF, IL-4 and TNF- α . **Conclusion** Large quantities of mature DCs from PBSCs in a patient with stomach cancer was possible using FL, GM-CSF, IL-4 and TNF- α . Further studies are needed with various types of diseases and culture environments.

Key words Dendritic Cells(DCs), Peripheral blood stem cells(PBSCs), Stomach cancer.

서론

수지상세포는 가장 강력한 항원제시 세포로서 1차

적인 세포성 면역반응을 유발할 수 있는 유일한 세포이며 골수에서 기원해서 미성숙한 형태로 혈류를 거쳐 체내 모든 기관에 이동해 간다.¹⁾ 수지상세포는 각 조직에서 주변의 항원을 채집해서 림프기관으로 가서 T 림프구에 항원을 제시한다.²⁾ 미성숙한 수지상세포는 CD40, CD54, CD86 등의 부신호(accessory signals) 전

교신저자 : 최 지 연
TEL : 051-630-0501 · FAX : 051-634-3349
E-mail : oxy0204freechal.com

달에 필요한 cluster determinant(CD)가 표현되지 않아서 T세포를 활성화시키지는 못하지만 면역 반응을 유발하기 위해 꼭 필요한 항원을 포획하기 위하여 이들 미분화 수지상세포는 첫째, 탐식작용을 할 수 있고³⁾ 둘째, macropinocytosis를 할 수 있으며⁴⁾ 셋째, C형 lectin 수용체와 유사한 macrophage mannose 수용체,⁴⁾ DEC-205 그리고 Fc γ Fc ϵ 수용체⁵⁾ 등의 adsorptive endocytosis를 매개하는 수용체들이 세포막에 잘 발현되어 있어서 다른 항원제시세포들이 micromolarity 농도의 항원에 반응하는데 비하여 이들 미분화 수지상세포들은 nanomolarity 또는 picomolarity 농도의 항원에 대하여 반응할 수 있다.⁴⁾

수지상세포의 분화와 성장에는 여러 cytokines가 관여한다. 특히 c-Kit ligand와 Flt-3 ligand는 stromal cell 표면에 있는 transmembrane protein으로서 tyrosine kinase 수용체와 결합해서 미성숙한 수지상세포를 지지해준다.⁶⁾ 생쥐에게 Flt-3 ligand를 투여하면 in vivo 상태에서 수지상세포의 기능을 가진 세포의 증식이 촉진된다. 활성 상태의 T세포나 다른 세포들의 산물인 GM-CSF나 IL-3 또한 수지상세포의 분화를 촉진하며 M-CSF는 전구세포를 대식세포로 분화시키는데 반해서 TNF와 CD40L은 골수구로의 분화 경로를 차단해서 수지상세포로의 성숙을 촉진한다.⁷⁾

임상병리학자들은 오래 전부터 anti-100 protein 항체를 사용하여 종양조직과 그 주변부에 DC가 침윤해 있는 것을 알고 있었다.⁸⁾ Ambe 등은 121명의 결장직장암 환자에게서 종양조직에 DC 존재여부와 예후에 대한 상관성을 연구한 결과 5년 생존율이 S-100 DC가 많이 존재하는 경우 70.5%이고 S-100 DC가 거의 없는 경우 33.3%로서 통계적 유의성이 있다고 보고했다.⁹⁾ Tsujitani 등은 174명의 위암 환자에서 DC 침윤 정도를 관찰한 결과 유사한 결론에 도달했다.¹⁰⁾

그러나 종양조직과 그 주변부에 DC가 존재하는 것 그 자체만으로 반드시 종양이 제거되는 것은 아니다. 종양이 발달하는 것은 종양의 항원성이 결핍되어 있거나 종양에 대한 면역 반응이 비효율적이기 때문일 것이다. 결장직장암에서 종양은 면역조절(immunomodulatory) 또는 면역회피(immuno-evasive)¹¹⁾ 특성을 가지고 있어서 DC의 발달과 성숙 그리고 종양으로의 동원을 억제하

는 것 같다. 또한 결장직장암 세포가 분비하는 IL-10, TGF- β 그리고 vascular endothelial growth factor¹²⁾는 DC의 성숙을 방해한다. Troy 등은 종양조직 내로 DC의 적극적인 동원이 이루어지지 않고 종양조직에 침윤해 있는 DC조차도 활성형으로 되지 않는다고 보고했다.¹³⁾ 이와 유사하게 결장암 조직에 침윤해 있는 DC는 costimulatory markers인 CD80과 CD86이 거의 발현되지 않는다.¹⁴⁾ 게다가 최근의 연구 결과에 의하면 종양 환자의 성숙한 DC에서 항원제시 기능에 결함이 있다는 보고가 있는데 이러한 종양에 의해 유도된 항원제시 기능의 장애는 체외에서 전구세포를 DC로 유도분화 시킨 DC를 사용한 항암요법에 의해 치료될 수 있을 것이다.

이러한 목적은 CD34⁺ 세포를 사용하는 경우는 GM-CSF와 TNF- α 를 사용하여, 그리고 말초혈의 단핵구를 사용하는 경우는 GM-CSF와 IL-4를 사용하여 달성할 수 있다.^{15,16)} 또한 이들 유도된 DC는 TNF- α , CD40L, Flt-3 ligand나 세균의 LPS를 사용하여 성숙시킬 수 있다.¹⁶⁾ 한편 중성구와 CD19+pro-B 세포들¹⁷⁾을 GM-CSF, IL-4 그리고 TNF- α 를 사용하여 DC 표현형과 기능을 가진 세포로 유도시킬 수 있다.

본 연구에서는 Flt3-ligand, GM-CSF(CSF2), IL-4 그리고 TNF- α 를 사용하여 위암 환자의 말초혈액 조혈모세포로부터 수지상세포의 분화를 유도하고자 하며 이들 cytokines와 성장인자(growth factor)가 고가이므로 가능한 최소한의 cytokines이나 성장인자의 조합과 투여량을 사용하여 수지상세포의 분화 유도를 시도하였다.

재료 및 방법

1) 시약 및 기기

Histopaque-1077, trypsin-EDTA, PKH67-GL fluorescence cell linker kits는 Sigma사(St. Louis, Mo. USA), X-Vivo 20 media는 BioWhittaker사(Walkersville, MD, USA), mouse human-anti CD1a, CD3, CD4, CD8, CD56, CD83, CD86 항체는 Serotec사(Raleigh, NC USA), propidium iodide는 Pharmingen사(Hamburg,

FRG), Flt3-ligand(FL), GM-CSF(CSF2), IL-4 그리고 TNF- α 는 R&D systems사(Minneapolis, MN, USA), plastic tissue culture flasks는 Corning사(Corning, NY, USA) 제품을 사용하였고 그외 모든 시약은 특급을 사용하였다. 그 외 tube, pipette, tips, petridish 등과 같은 Plastic 제품들은 멸균된 일회용품을 사용하였고, 증류수와 재활용 초자기구들은 121°C에서 20분 동안 고압 증기 멸균하여 사용하였다.

2) 말초혈액 조혈모세포의 가동화(mobilization) 및 채집

입양면역요법에 대해 환자와 보호자에게 충분히 설명하고 서면으로 동의를 받은 후 38세 남자로서 위암 진단 후 항암화학요법을 5회 받은 환자에게 5 μ g/kg/day의 용량으로 G-CSF를 3 일 동안 투여한 후 말초혈액 조혈모세포의 수를 측정하고 체중 1 kg당 3.3×10^6 의 말초혈액 조혈모세포를 anticoagulant citrate dextrose formula A (ACD-A)와 Baxter사(Deerfield, IL, USA)의 blood cell separator(CS-3000 Plus)를 사용하여 채집했다.

3) 말초혈액 조혈모세포의 분리

채집된 말초혈액 조혈모세포가 농축된 환자의 말초혈액 10 mL을 X-Vivo 20 배양액 10 mL로 희석한 후 Histopaque-1077 20 mL이 담긴 50 mL 튜브에 조심스럽게 얹은 후 1,800 rpm에서 20분간 원심분리하여 계면층의 단핵구를 파스퇴르 피펫으로 분리하였다. 얻어진 조혈모세포 분획에 Phosphate buffered saline 을 섞어 25 mL로 만들고 혈구계로 세포수를 계산한 후 1,200 rpm에서 2분간 원심분리하여 세척한 후 상층액을 제거했다.

4) 세포 배양

먼저 사람의 말초혈액 조혈모세포(peripheral blood stem cells)에 대한 1차 배양을 세포가 증식기에 도달할 때까지 세포를 배양용 플라스크(T-25cm²)를 사용하여 5%의 CO₂와 95%의 공기가 공급되는 37°C의 배양기에서 X-Vivo 20 배지를 사용하여 배양했다.

5) 수지상세포의 분화 유도

1차 배양이 끝난 말초혈 조혈모세포에 대해서 1.5 x 10⁶/mL의 농도로 배양용 플라스크(T-75cm²)에 분주하고 각각 최종 농도 50 ng/mL의 Flt3-ligand, 50 ng/mL의 GM-CSF(CSF2)와 25 ng/mL의 IL-4 그리고 10 ng/mL의 TNF- α 가 포함된 X-Vivo 20 배지에서 5%의 CO₂와 95%의 공기가 공급되는 37°C의 배양기를 사용하여 12일간 배양해서 수지상세포로 유도 분화시켰다.

결과

1. 수지상세포의 분화 유도

말초혈액 조혈모세포(Fig. 1)를 cytokines이 혼합된 X-Vivo 20 배지에서 5%의 CO₂와 95%의 공기가 공급되는 37°C의 배양기를 사용하여 3일간 배양했을 때 커다란 세포체에 방추상으로 수상 돌기가 세포 표면으로부터 나타나기 시작하였으며(Fig. 2) 6일간 배양했을

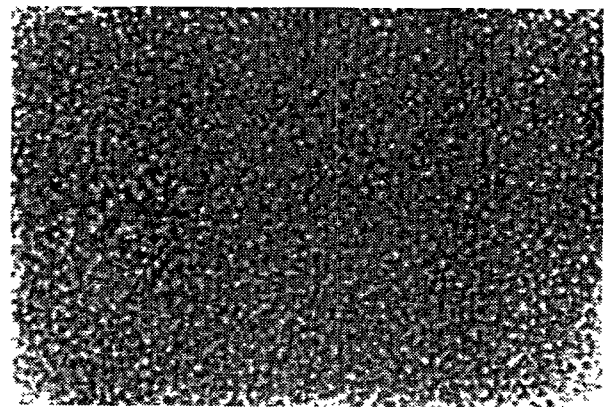


Fig. 1. Characteristic phase contrast morphology of freshly isolated peripheral blood stem cells showing a homogenous population of equally sized, round cells. Original magnification $\times 200$.

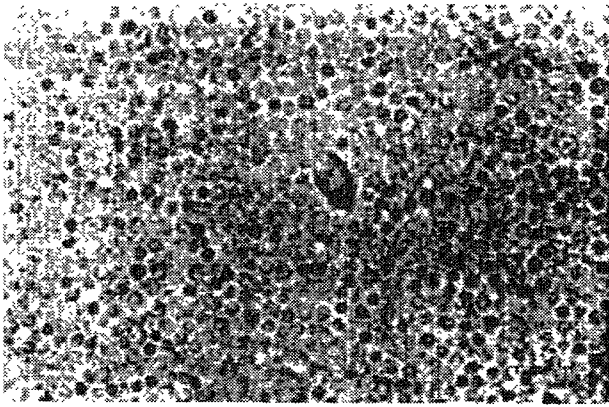


Fig. 2. After 3 days of culture with medium containing GM-CSF plus IL-4 plus TNF- α plus Flt3-ligand, cells appeared spindle-shape. Original magnification $\times 200$.

때 현저하게 긴 수상 돌기를 가진 수지상세포로 분화되었으며(Fig. 3) 12 일간 배양했을 때 배양용 플라스크(T-75cm²) 바닥은 분화된 수지상세포로 덮혔으며 크기가 크고 다수의 긴 세포질 돌기를 가진 전형적인 수지상세포들을 다수 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이들 분화된 세포의 수는 1.4×10^8 개 었다.

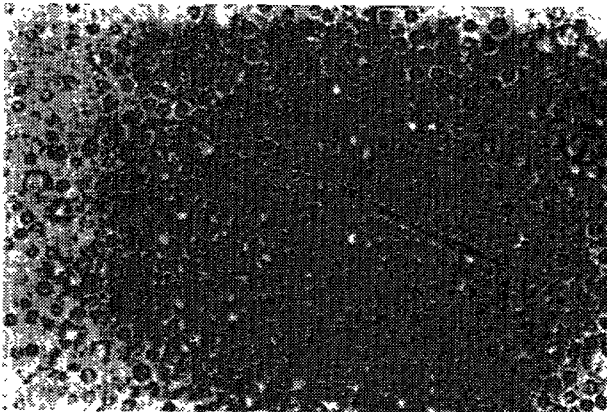


Fig. 3. After 6 days of culture with medium containing GM-CSF plus IL-4 plus TNF- α plus Flt3-ligand, cells with large-cell bodies and long dendritic projections were prominent. Original magnification $\times 200$.



Fig. 4. After 12 days of culture with medium containing GM-CSF plus IL-4 plus TNF- α plus Flt3-ligand, cells show wide spread cytoplasmic projections. Original magnification $\times 400$.

고찰

DCs의 숫자가 작고 분리하기가 까다로워 DCs 연구에 큰 장애요인이 되어 왔으나 최근 in vitro 상에서 여러 가지 방법을 통해 다른 면역세포나 조혈모세포를 DCs로 분화시키는 방법이 개발되었다. CD34⁺ stem cell 중 극히 일부가 DCs로 분화하여 in vivo 상의 거의 모든 조직에 미성숙된 형태의 non-dividing cell로 존재하여, 이러한 DCs의 분화 및 증식에 여러 cytokine들이 관여한다는 것이 밝혀졌다. 또한 c-Kit ligand나 Flt-3 ligand는 stromal cell의 막 단백질로 tyrosine kinase receptor와 결합된 채 DCs 전구세포를 지지하고 있다.¹⁸⁾ 그러므로 in vivo상에서 이러한 Flt-3 ligand를 투여하면 다량의 활성화된 DCs 성장을 유도할 수 있다.¹⁹⁾ GM-CSF와 IL-3 처리 시에도 DCs로의 분화가 촉진되는 것으로 알려졌다.^{20,21)} 그러나 M-CSF 처리시는 전구세포가 거대세포(macrophage)로 분화된다. TNF와 CD40L는 과립세포(granulocyte)의 분화경로를 차단하고 DCs의 최종 성숙단계를 촉진하는 것으로 알려져 있다.²²⁾

CD34를 발현하는 조혈모세포 중 DCs로 분화하는 세포는 각각 다른 분화경로를 따라 피하의 Langerhans cells (LC)와 진피 혈액 및 내부 조직에 위치하는 DCs로 달리 분화된다.²³⁾ 기능상의 차이 중 하나로 체내의 DCs는 직접 naive B cell을 활성화시켜 항체생산을 유

도할 수 있다. 한편 LC의 전구세포는 CLA (E-selectin의 ligand이며 skin LC의 homing molecule)를 발현하며 monocyte marker인 CD14은 발현하지 않는다. 이와는 달리 DCs의 전구세포는 CLA는 발현하지 않고 CD14을 발현하며 이 때문에 이 전구세포를 GM-CSF와 TNF- α 대신 M-CSF로 처리하면 macrophage로 분화된다.^{23,24)} DCs 중 일부는 또한 immune tolerance에도 관여하는 것으로 알려졌다.²⁵⁾ 그리고 이러한 DCs는 T cell과 동일한 전구세포에서 분화되는 것으로 밝혀졌다.²⁶⁾ IL-3만을 처리할 경우 myeloid marker (CD11b, CD13, CD33 등)가 결여된 lymphoid DCs만의 분화가 촉진된다.²¹⁾ 사람의 경우 특별한 lymphoid DCs 전구세포가 있을 것으로 추측되며 이 경우 DCs는 CD4를 발현하고 CD11c는 발현하지 않으며 항체를 만드는 plasma cell처럼 보이지만 IL-3와 CD40L 처리시 DCs로 분화된다.²⁷⁾

DCs로 분화되는 여러 경로 중 단구나 대식세포로의 분화과정과 밀접한 연관이 있는 하나의 경로에 최근 들어 매우 관심이 집중되고 있다. 이형의 DC는 CD34+ 전구세포가 GM-CSF와 TNF- α 를 조합한 cytokines를 사용하여 유도 분화시킬 때 CD1이 발현되지 않는 상태에서 CD14와 c-fms(M-CSF 수용체)가 일시적으로 발현되는 단계가 있다. 이 단계의 CD14+CD1-의 세포는 두 가지의 잠재력을 가지고 있는데 M-CSF로 유도하면 대식세포로 분화되고 GM-CSF와 TNF- α 로 유도하면 DC로 분화된다.²⁸⁾

이와 유사한 능력을 좀더 분화된 단계의 단구나 대식세포 그리고 말초혈의 단구도 가지고 있다는 것이 최근에 밝혀졌는데 GM-CSF와 IL-4²⁹⁾ 또는 GM-CSF와 IL-13³⁰⁾을 조합한 cytokines를 사용하여 분화시킬 때 DC 표현형으로 유도되고 GM-CSF와 TNF- α 를 조합한 cytokines를 사용하여 IL-4가 존재하지 않는 배지에서 유도시킬 때 대식세포 표현형^{29,31)}으로 분화된다. 그러므로 단구는 이 두 분화과정 중 주로 염증반응과 관련된 탐식 기능을 가진 대식세포나 부분적인 탐식 기능과 전문적인 항원제시세포 중 어느 쪽으로든지 진행될 수 있다.

DCs와는 달리 단구나 대식세포는 중성구와 밀접한 관련성이 있다. 단일 세포 분지계 집락(single cell

colony)을 사용한 연구의 결과에 의하면 단구나 대식세포가 하나의 같은 양쪽으로서의 분화능이 있는 전구세포(CFU-GM)가 최종적으로 비가역적으로 단구(CFU-M)로 분화해 가거나 또는 과립구(CFU-G) 계열로 분화해 간다는 보고가 있었다.³²⁾ 중성구로의 분화를 명확하게 형태학적으로 인식할 수 있는 것은 전골수구(promyelocyte)의 단계이다. 이 단계의 세포는 이미 반고형의 배지에서는 성장능에 장애가 있으나 특별한 분화유도제를 사용하는 경우 과립구나 단구 어느 쪽으로든지 분화유도가 가능하다. 중성구로의 분화단계의 후기에 있는 세포들(골수구(myelocyte), 후골수구(metamyelocytes), band cells 그리고 최종적인 다핵백혈구)은 세포질에 특정한 중성 과립(specific neutrophilic granules)이 존재하고 세포 표면에 특정 과립의 표지인 lactoferrin(LF)을 가지며 이러한 LF+인 세포들은 비가역적으로 다핵 백혈구로만 분화되는 것으로 알려져 있다.³³⁾

결론

위암 환자의 말초 혈액에서 분리된 조혈모세포를 FL, GM-CSF, IL-4, TNF- α 가 첨가된 배지에서 배양하여 다량의 수지상세포로 분화·성숙시킬 수 있었다. 향후 체외 배양법이 더욱 발전되면 보다 효율적으로 세포를 사용한 면역 치료가 가능할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Steinman RM : The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann Rev Immunol* 9:271, 1991
2. Hart DM : Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245, 1997
3. Inaba K, Inaba M, Naito M, Steinman RM : Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including *Bacillus Calmette-Guerin* organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178:479-488, 1993
4. Sallusto F, Lanzavecchia A : Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate

- antigen to the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182:389-400, 1995
5. Sallusto F, Lanzavecchia A : Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 179:1109-1118, 1994
6. Young JW, Szabolcs P, Moore MAS : Identification of dendritic cell colony-forming units among normal CD4 sup + bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 182:1111-1120, 1995
7. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J : GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261, 1992
8. Becker Y : Anticancer role of dendritic cells (DCs) in human and experimental cancers - a review. *Anticancer Res* 12:511-20, 1992
9. Ambe K, Mori M, Enjoji M : S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. *Cancer* 63:496-503, 1989
10. Tsujitani S, Furukawa T, Tamada R, Okamura T, Yasumoto K, Sugimachi K : Langerhans cells and prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 59:501-5, 1987
11. Todryk SM, Chong H, Vile RG, Pandha H, Lemoine NR : Cancer immunotherapy by gene transfer tip the balance against colorectal cancer. *Gut* 43:445-9, 1998
12. Avery A, Paraskeva C, Hall P, Flanders KC, Sporn M, Moorghen M : TGF- β expression in the human colon: differential immunostaining along crypt epithelium. *Br J Cancer* 68:137-9, 1993
13. Troy A, Davidson P, Atkinson C, Hart D : Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer *J Urol* 160:214-19, 1998
14. Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, Martin M : Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest* 74:975-83, 1996
15. Schuler G, Steinman RM : Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 186:1183-7, 1997
16. Morse MA, Zhou LJ, Tedder TF, Lysterly HK, Smith C : Generation of dendritic cells in vitro from peripheral blood mononuclear cells with granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor- α for use in cancer immunotherapy. *Ann Surg* 226:6-16, 1997
17. Bjorck P, Kincade PW : CD19+ pro-B cells can give rise to dendritic cells in vitro. *J Immunol* 161:5795-9, 1998
18. Young JW, Szabolcs p, Moore MAS : Identification of dendritic cell colony-forming units among normal CD4+bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony stimulating factor and tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 182:1111-1120, 1995
19. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, Mckenna HJ : Dramatic inclose in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 and ligand-treated mice; Multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 184:1953-1962, 1996
20. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM : Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176:1693-1702, 1992
21. Saunders D, Lucas K, Ismaili f, Wu L, Maraskovsky E, Dunn A, Shopman K : Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, *J Exp Med* 184:2185-2196, 1996
22. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J : Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180:1263-1272, 1994
23. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, De zutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J : CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF/TNF α *J Exp Med* 184:695-706, 1996
24. Szabolcs p, Avigan D, Gezelter S, Ciocon DH, Moore MA, Steinman RM, Young JW : Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-CFU intermediate, *Blood* 87:4520-4530, 1996
25. Suss G, Shortman KA : The subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand induced apoptosis. *J Exp Med* 183:1789-1796, 1996
26. Ardavin C, Wu L, Li C, Shortman K : Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362 :761-763, 1993
27. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ : The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with IL-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185:1101-1111, 1997
28. Caux, C., B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jacquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt, J. Banchereau : CD34+ hematopoietic progenitors from human cord

- blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF plus TNF[alpha]. J Exp Med 184:695-706, 1996
29. Sallusto F, Lanzavecchia A : Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor [alpha]. J Exp Med 179:1109-1118, 1994
 30. Piemonti L, Bernasconi S, Luini W, Trobonjaca Z, Minty A, Allavena P, Mantovani A : IL-13 supports differentiation of dendritic cells from circulating precursors in concert with GM-CSF. Eur Cytokine Netw 6:245-252, 1995
 31. Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stockl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Knapp W : Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. J Immunol 157:3850-3859, 1996
 32. Metcalf, D : The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in hemopoietic cells. Nature 339:27-30, 1989
 33. Bainton DF, Ulliyot JL, Farquhar MG : The development of neutrophil polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. J Exp Med 134:907-934, 1971