

간암 환자의 수지상세포 배양 및 면역치료

전경희, 이대희*, 이충한**, 박재선***

아가페신당의원, 고신대학교 의학부 약리학교실*,
일반외과학 교실**, 소아과학교실***

Dendritic Cells as Adjuvants Therapy for Hepatocellular Carcinoma

Kyoung Hi Jeon, Dae Heui Lee*, Chung Han Lee**, Jae Sun Park***

Agape Shindang Medical Clinic, Seoul, Korea

*Department of Pharmacology, **Department of General Surgery,

***Department of Pediatrics Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background/Objective Human tumours including those of the gastrointestinal tract express a number of specific antigens that can be recognized by T cells, thus providing potential targets for cancer immunotherapy. Dendritic cells (DCs) are rare leucocytes that are uniquely potent in their ability to capture, process and present antigens to T cells, and so selectively migrate through tissues to reach lymph nodes and spleen where initiation of immune responses takes place. Studies in murine tumour models have shown clearly that DCs are capable of presenting tumour antigens to initiate tumour-specific cytotoxic T cell responses, and DCs vaccination can induce anti-tumour activity against both primary tumours and pre-established tumour metastases. These findings together with the ability to culture sufficient numbers of DCs from human bone marrow or blood progenitors have prompted the current major interest in their potential use in human tumour vaccination. Vaccine production involves harvesting autologous DCs from cultured peripheral blood mononuclear cells in the presence of a cocktail of cytokines, ex vivo exposure of the DCs to tumour antigens and return of pulsed DCs to the patient to induce tumour immunity. **Methods** CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSCs) were obtained from the patients with hepatocellular carcinoma. Peripheral blood CD34⁺ HSCs were cultured in the X-VIVO 20 media supplemented with Flt-3 Ligand (FL), GM-CSF, IL-4, and TNF- α for 2 weeks, then, examined the morphology and functions of the cells. **Results** The generated cells had a classic morphology of DCs. When DCs were injected into the same patient, an augmentation of cytotoxic T lymphocytes (CTL) activity was observed. Concomitantly, an increase in natural killer (NK) cell activity was also detected in the patient. **Conclusion** Ex vivo differentiation and maturation of DCs from peripheral blood of patient with hepatocellular carcinoma and reinfusion of the DCs without any side effect was possible. DC-based cancer immunotherapy has the potential to become an important treatment option for cancer patients in the foreseeable future.

Key words: Cancer immunotherapy, Dendritic cells (DCs), CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSCs), Hepatocellular carcinoma

서론

간암이나 위암을 비롯한 소화기 종양은 동양에서 가장 흔하고 또한 치명적인 악성 종양에 속한다.¹⁾ 지난 50년 동안 광범위한 노력에도 불구하고 외과적

수술 항암 화학요법 방사선 치료에 의한 소화기 종양 환자의 생존율은 별로 개선되지 못했다.²⁾ 그리고 치료된 환자의 약 50%는 다시 재발되거나 전이되어서 대부분 사망했다.^{2,3)} 그러므로 이러한 종양환자에 대한 새롭고 효과적인 전신치료법을 개발해야 할 필요성이 절실하다. 일부에서 화학치료제나 세포독성약물에 기대를 걸고는 있지만 수년 내에 효과적인 면역치료법이 개발되리라는 낙관적인 견해가 보다 평

교신저자 : 이 대 희
TEL: 051-990-6493 • FAX: 051-241-5458
E-mail: dhlee@ns.kosinmed.or.kr

배해 있다.

종양 치료에 있어서 종양에 대한 면역반응을 증강시키려는 노력은 지난 수년간 계속되어 왔지만 지금까지 효과적인 수단은 개발되지 못했다. 인체의 면역반응에 대한 종양의 회피는 암배아성 항원(carcinoembryonic antigen, CEA)과 같은 종양 항원이 발현된 세포를 죽일 수 있는 세포독성 T 세포가 항원을 인식하는 단계에서 주로 일어난다.⁴⁻⁷⁾ 또한 CD4 helper T cell 이 분비하는 cytokines는 종양이 있는 병소에서 세포독성 T 세포뿐만 아니라 자연살해세포, 항원제시세포, 그리고 다른 염증 세포들이 활성화되는데 필요하다.⁴⁻⁷⁾

이전까지 환자의 종양에 대해 면역반응을 증강시키기 위해 사용된 전략은 주로 BCG(Bacille Calmette-Guerin) 같은 비특이적 방법이나 lymphokine-activated killer cells 같은 수동면역을 유도하는 방법들이었으며 그 효과는 미미했다.⁴⁾ 이에 비해 수지상세포를 사용해서 능동면역을 증강시키는 치료법은 훨씬 효율적이다.^{4-6, 8-11)} 수지상세포는 독특한 성장(stellate)의 형태 때문에 붙여진 이름으로서 생체 내에서 가장 강력한 항원제시세포로 알려져 있는 희귀한 백혈구이다.¹²⁾ 수지상세포는 항원 특이 T 세포에게 항원을 제시할 뿐만 아니라 휴지기의 T 세포를 세포주기에 들어가게 해서 증식하고 분화시켜서 면역효과기 세포들의 수를 팽창시키는데 필요한 강력한 costimulatory signal을 발생한다.¹³⁾ 게다가 수지상세포가 직접 자연살해세포의 기능을 유도한다는 보고¹⁴⁾에 의하면 이 세포는 선천성 면역과 후천성 면역의 상호관계를 조절하는 기능도 있는 것으로 생각된다.

1973년 Steiman과 Inaba에 의해 항원제시 세포로서 수지상세포의 중요성¹⁵⁾이 밝혀지게 되었다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 그러나 불과 10년 전까지만 해도 인체 내에서 너무 세포 수가 적고 특정한 세포표면 표지자가 밝혀져 있지 않아서 수지상세포의 생물학이나 면역학에 대한 연구를 할 수 없었다. 골수의 전구세포로부터 기원하는 수지상세포는 뇌를 제외한 거의 모든 조직에 산재하며 말초 단핵구중 1% 미만에 해당한다.¹⁹⁾ 수지상세포의 계통은 그들이 상주하는 해부학적인 구획에 따라 4 가지 단계로 구분할 수 있다. 전구세포는 골수와 혈액에, 미성숙 수지상세포는 말초의 림프조직이 아닌 곳에, 성숙단계 과정의 이동중인 수지상세포는 유입성 림프액과 혈액에, 그리고 성숙한 수지

상세포는 2차 림프조직에 존재한다.²⁰⁾ 전구세포는 골수에서 기원하여 혈액으로 들어가서 비림프조직에 산재하면서 미성숙 수지상세포로 분화해 간다. 불활성 입자²¹⁾뿐만 아니라 cytokines, 염증 매개물, 세균, 그리고 세균이 생성한 lipopolysaccharides(LPS)¹²⁾ 등은 전구세포를 림프조직이 아닌 곳으로 끌어온다. 미성숙 수지상세포는 소화관을 포함한 많은 기관의 상피와 간질조직에 존재한다. 이들 미성숙 수지상세포는 항원의 포획과 처리, 주조직적합체의 생산, 그리고 주조직적합체-외부 펩타이드의 결합을 생성할 수 있는 능력이 있으나 T세포를 활성화시키는 기능은 거의 없다. 염증성cytokine인 IL-1, TNF- α , CD40 ligand, 세균 그리고 LPS 등은 수지상세포의 성숙과 비림프성 조직으로부터 유입성 림프액이나 혈액으로의 이동을 촉진한다.^{12,22)} 2차 림프조직으로 이동해온 수지상세포는 MHC class I/II, leukocyte function associated-3 antigen(LFA-3), CD54, CD40, CD80 그리고 CD86 같은 세포표면항원과 costimulatory molecules의 발현 또는 발현의 증가와 두 종류의 CC chemokine 수용체, CCR1과 CCR5의 발현 감소로 1차 T 세포의 면역 반응을 유발할 수 있는 능력을 가지게 된다.²³⁾

성숙단계에서 수지상세포는 IFN- α 와 IL-12를 생성하고 다른 macrophage inflammatory protein (MIP)-1 γ , IL-1, IL-6 그리고 IL-15들과 함께 1차적인 면역반응을 유발한다.¹⁰⁾ 성숙한 수지상세포는 T 세포를 활성화시키는 능력을 갖는 대신에 항원을 포획해서 처리하는 능력을 상실한다.

이 연구는 세포 면역 치료의 근간이 되는 수지상세포를, 간암환자의 말초혈액 조혈모세포로부터 체외 배양법으로 분화 유도가 가능한지 확인하고, 환자에게 재주입하여 향후 임상 적용에 참고하고자 한다.

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 systems 사 (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 재혈용 초자기구들은 121℃에서 20분 동안 고압증기 멸균하여 사용하였다.

2. 말초혈액 조혈모세포의 가동화(mobilization) 및 채집

입양면역요법에 대해 환자와 보호자에게 충분히 설명하고 서면으로 동의를 받은 후 62세 남자로서 간 우엽에 산재성 간세포암 진단 후 경동맥 혈관 색전술을 1회 받은 환자에게 5 $\mu\text{g/kg/day}$ 의 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. 세포 배양

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

4. 수지상세포의 분화 유도

1 차 배양이 끝난 말초혈 조혈모세포에 대해서 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ 의 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℃의 배양기를 사용하여 10 일간 배양해서 수지상세포로

유도 분화시켰다.

5. 수지상세포의 재주입 및 임상 평가

분화된 수지상세포를 kg당 1×10^7 개를 생리 식염수와 X-VIVO 20 배지에 현탁시켜서 중 전완 정맥(median antebrachial vein)으로 주입했다. 재 주입하고 4주가 경과한 후 CD3, CD4, CD8, CD4:CD8 비, CD56(NK), 그리고 자연 살세포의 활성을 측정하여 면역 치료를 하기 이전의 측정치와 비교하였으며 면역 치료 기간 동안 부작용이나 치료과정에 있어서의 문제점과 치료 결과에 대한 임상 평가를 실행하였다.

결과

1. 수지상세포의 분화 유도

환자에서 분리한 단핵구와 CD34⁺ 말초혈 조혈모세포(Fig. 1)를 cytokines이 혼합된 X-VIVO 20 배지에서 5%의 CO₂와 95%의 공기가 공급되는 37℃의 배양기를 사용하여 3 일간 배양했을 때 방추상으로 수상 돌기가 세포 표면으로부터 나타나기 시작하였으며(Fig. 2) 10 일간 배양했을 때 여러 개의 긴 수상 돌기를 가진 수지상세포로 분화되었으며(Fig. 3) 배양용 플라스크(T-75cm²) 바닥은 분화된 수지상세포로 덮였다(Fig. 4). 이들 분화된 수지상세포의 수는 8×10^7 개 였다.

2. 수지상세포의 재주입 및 임상 평가

분화된 수지상세포를 kg당 1×10^7 개를 생리 식염수와 X-VIVO 20 배지에 현탁시켜서 중 전완 정맥(median antebrachial vein)으로 주입했다. 수지상세포를 주입한 후 고열, 구토 등의 전신 증상이나 혈청 albumin, GOT, GPT, BUN, creatinine 등의 검사 결과에 이상 소견은 없었고, 수지상세포를 정주로 재주입하고 4주가 경과했을 때 CD3, CD4, CD8, CD4:CD8 비, CD56(NK), 그리고 자연 살세포의 활성을 측정하여 면역 치료를 하기 이전의 측정치와 비교한 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 보는 것처럼 치료 전에 비해 CD3와 CD8의 비율이 증가하였고 자연살세포의 활성이 증가된 것을 관찰할 수 있었다.

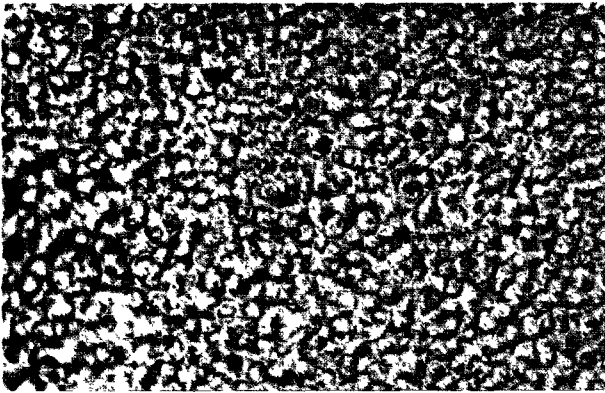


Fig. 1. Phase contrast morphology of freshly isolated peripheral blood stem cells showing a homogenous population of equally sized, round cells. Original magnification $\times 400$.

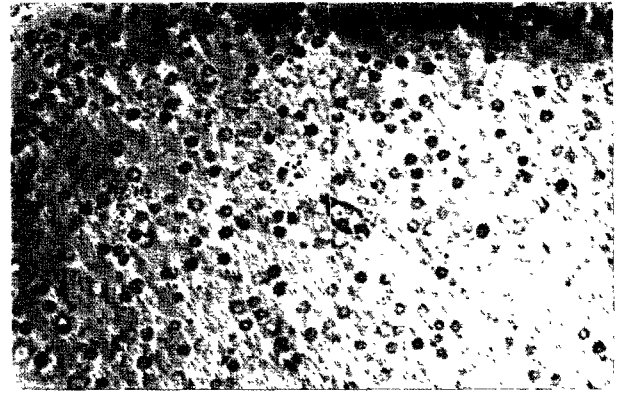


Fig. 2. After 3 days of culture with medium containing GM-CSF plus IL-4 plus TNF- α plus Flt3-ligand, showing a spindle-shape cell in the center. Original magnification $\times 200$.



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 visible. Original magnification $\times 200$.

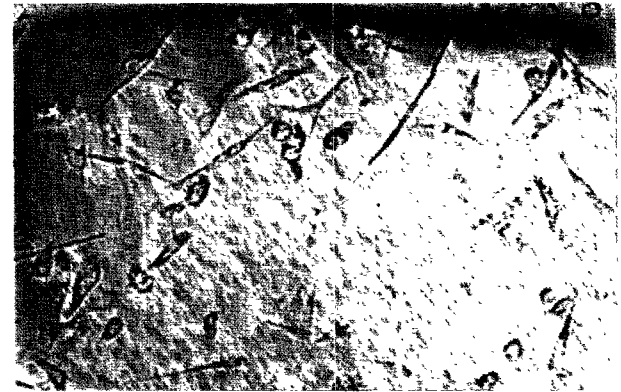


Fig. 4. After 12 days of culture with medium containing GM-CSF plus IL-4 plus TNF- α plus Flt3-ligand, many cells with long cytoplasmic projections were visible. Original magnification $\times 200$.

Table 1. Relative fractions of T and NK cells and NK activity in peripheral blood before and after dendritic cell therapy

	Before treatment	After treatment
CD3(%)	43.5	49.0
CD4(%)	28.2	27.7
CD8(%)	16.2	22.0
CD4 : CD8	1.74 : 1	1.26 : 1
CD56(%)	14.8	12.4
Activity of NK cells(%)	15.7	28.9

고찰

DCs의 배양과 분화 유도의 궁극적인 목적은 성숙

한 골수성 수지상세포를 생산하는 것이며^{13,24)} 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.^{9,10,25)} 또한 이들 유도된 DCs는 TNF- α , CD40L, Flt-3 ligand나 세균의 LPS를 사용하여 성숙시킬 수 있다.²⁵⁾ 한편 중성구²⁶⁾와 CD19⁻ pro-B 세포들²⁷⁾을 GM-CSF, IL-4 그리고 TNF- α 를 사용하여 DCs 표현형과 기능을 가진 세포로 유도시킬 수 있다. 그러므로 본 연구에서 사용한 Flt3-ligand, GM-CSF(CSF2), IL-4 그리고 TNF- α 를 사용한 분화 유도는 말초 혈구세포를 사용하는 경우 CD34⁺ 세

포, 단핵구 그리고 중성구 모두에 대해서 수지상세포로의 분화유도가 가능하다는 장점이 있다. 또한 분화된 수지상세포를 중 전완 정맥으로 주입한 이후 계속적인 관찰 결과 특별한 부작용이나 치료과정에 있어서의 문제점은 없었다. 그러므로 앞으로 인체의 생리학적이고 면역학적인 항암치료 기전이 매우 합리적으로 응용될 수 있을 것으로 전망된다. 제 I/II 상임상실험 결과에 의하면 종양세포를 배양해서 얻은 상층액이 CD34⁺ 세포에서 유도된 DCs의 분화를 억제한다는 보고가 있지만 암 환자들로부터 채집한 전구세포를 분화유도 시켜 얻은 DCs의 면역학적 기능의 장애는 없다고 보고되어 있다.²⁸⁾

DCs로의 유도분화용 세포로서 말초혈단핵구를 사용할 것인지 CD34⁺ 세포를 사용할 것인가에 대해서는 좀 더 연구되어야 한다. 그러나 최근의 연구에 의하면 말초혈단핵구와 CD34⁺ 세포로부터 유도된 DCs에 있어서 형태학, 표현형, 항원의 포획과 제시 기능에 있어서 차이는 없다고 보고되어 있다. 그러나 대부분의 말초혈단핵구(PBMC) 기원의 골수성 DCs가 CD34⁺ 세포 기원의 DCs보다 더 성숙한 단계로 분화되는 것으로 알려져 있다.²⁹⁾ 한편 Mortarini 등³⁰⁾은 종양항원 특이 CTL 전구세포 수가 적은 환자에 있어서 CD34⁺ 세포 기원의 DCs가 특정 T 세포를 활성화시키는 기능이 보다 강력하고 그래서 CD34⁺ 세포를 선호한다고 보고했다.

DCs가 종양을 제거하도록 유도하기 위해서 DCs에 노출시킬 종양항원을 선택하는 것은 DC-based cancer immunotherapy 분야에서 계속 연구되어야 할 부분이다. 종양항원을 부가한 DCs의 안전성과 항암 치료의 효능을 평가할 목적으로 시도된 여러 임상 실험이 최근에 완료되었고 더 광범위한 임상실험이 현재 진행 중이다.^{5, 31,32)} 흑색종의 면역 치료가 이 부분에서 선두 주자인데³³⁾ 그것은 아마도 흑색종과 관련된 종양항원이 잘 밝혀져 있고 조직 생검이 용이하기 때문일 것이다. 흥미롭게도 tumor lysate-pulsed DCs를 종양항원이 밝혀지지 않은 환자에게 백신으로 사용한 경우에도 비록 환자의 수가 적기는 하지만 치료 결과는 성공적이었다. 이 연구 결과는 종양 특이 항원이 밝혀지지 않은 결장직장암에 대해서도 수지상세포를 이용 가능함을 시사한다. B-cell lymphoma,³²⁾ 신세포암,⁵⁾ 전립선암³⁴⁾ 그리고 결장직장암 환자³¹⁾에 대한 제 1, 2상 임상시험 결과에 따르면 DCs 백신은

안전하며 거의 부작용이 없었다. 시험 초기에 제기되었던 비특이 자가면역 반응의 부작용은 더 이상 문제가 되지 않고 집중 결과 항원 특이적인 T 세포 반응이 유도되었다.^{5,31-34)}

DC-based cancer immunotherapy의 가장 고무적인 측면은 지금까지의 종양항원에 대한 면역 관용에 따른 문제점을 해결할 수 있다는 것이다. 그러므로 가까운 장래에 DCs-based cancer immunotherapy가 종양환자를 치료하는 중요한 수단이 되리라고 낙관한다. 제 1/2상 시험이 완료되는 대로 초기 암 환자들을 대상으로 연구가 계속될 것이며 이 환자들은 면역 기능이 더 강화되고 면역계의 종양에 대한 부담이 감소되어서 완치로 나아갈 수 있을 것이다. 그리고 현재의 수지상세포 생물학에 대한 지식의 발전에 힘 입어 현재의 vaccine protocol은 더욱 더 세련되고 효율적인 형태로 발전될 것이다. 또한 소화기암에 대한 DCs 백신의 잠재력은 새로운 종양항원의 동정으로 세포독성 T세포(cytotoxic T lymphocytes) 반응을 유도하는 방향으로 진전될 것이다.

결론

간암 환자의 말초 혈구세포를 Flt3-ligand, GM-CSF (CSF2), IL-4 그리고 TNF- α 를 사용하여 수지상세포로 분화 유도할 수 있었고 환자에게 재주입한 이후 특별한 부작용이나 치료과정에 있어서의 문제점은 없었고 T세포 수의 비율과 자연살세포의 활성이 다소 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 그러므로 수지상세포를 사용한 면역요법은 기본적으로 매우 안전하며 미세 잔존암에 대한 새로운 치료법이 될 수 있을 것으로 전망된다.

참고 문헌

1. McArdle CS, Hole D, Hansell D, Blumgart LH, Wood CB: Prospective study of colorectal cancer in the west of Scotland: 10-year follow-up. *Br J Surg* 77:280-282, 1990
2. Dwerryhouse SJ, Morris DL: Non-cytotoxic control of colorectal cancer. *J R Coll Surg Edinb* 42:147-153, 1997
3. Jourdan JL, Cannan R, Stubbs R: Hepatic resection for metastases in colorectal carcinoma. *NZ Med J* 112:91-93,

- 1999
4. Pardoll DM: Cancer vaccines. *Nat Med* 4:525-531, 1998
5. Ockert D, Schmitz M, Hampl M, Rieber EP: Advances in cancer immunotherapy. *Immunol Today* 20:63-65, 1999
6. Nestle FO, Burg G, Dummer R: New perspectives on immunobiology and immunotherapy of melanoma. *Immunol Today* 20:5-7, 1999
7. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B: Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Today* 18:267-268, 1997
8. Steinman RM: Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol* 24:859-862, 1996
9. Schuler G, Steinman RM: Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 186:1183-1187, 1997
10. Lotze MT: Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. *Ann Surg* 226:1-5, 1997
11. Colaco C: DCs-based cancer immunotherapy: the sequel. *Immunol Today* 20:197-198, 1999
12. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252, 1998
13. Bottomly K: Immunology - T cells and dendritic cells get intimate. *Science* 283:1124-1125, 1999
14. Fernandez NC, Lozier A, Flament C: Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 5:405-11, 1999
15. Steinman RM, Cohn ZA: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137:1142-1162, 1973
16. Steinman RM, Witmer MD: Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5132-5136, 1978
17. Inaba K, Granelli-Piperno A, Steinman RM: Dendritic cells induce T lymphocytes to release B cell-stimulating factors by an interleukin 2-dependent mechanism. *J Exp Med* 158:2040-2057, 1983
18. Inaba K, Steinman RM, Van Voorhis WC, Muramatsu S: Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6041-6045, 1983
19. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNJ: Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 93:728-736, 1999
20. Austyn JM: New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 183:1287-1292, 1996
21. Matsuno K, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y: A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: Their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 183:1865-1878, 1996
22. Rescigno M, Citterio S, Thery C: Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5229-5234, 1998
23. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G: Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: A model for their trafficking properties. *J Immunol* 161:1083-1086, 1998
24. Russoan MC, Soumelis V, Kadowaki N: Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183-1186, 1999
25. 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-alpha for use in cancer immunotherapy. *Ann Surg* 226:6-16, 1997
26. Oehler L, Majdic O, Pickl WF: Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J Exp Med* 187:1019-1028, 1998
27. Björck P, Kincade PW: CD19⁺ pro-B cells can give rise to dendritic cells in vitro. *J Immunol* 161:5795-5799, 1998
28. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC: Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34⁺ progenitors by tumor cells: Role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92:4778-4791, 1998
29. Herbst B, Kohler G, Mackensen A, Veelken H, Mertelsmann R, Lindemann A: CD34⁺ peripheral blood progenitor cell and monocyte derived dendritic cells: a comparative analysis. *Br J Haematol* 99:490-499, 1997
30. Mortarini R, Anichini A, Di Nicola M: Autologous dendritic cells derived from CD34⁺ progenitors and from monocytes are not functionally equivalent antigen-presenting cells in the induction of Melan-A/Mart-127-35-specific CTLs from peripheral blood lymphocytes of melanoma patients with low frequency of CTL precursors. *Cancer Res* 57:5534-5541, 1997
31. Rains N, Cannan R, Chen W, Stubbs R: Development of a dendritic cell (DC) based vaccine for patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 48:347-351, 2001
32. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2:52-58, 1996

33. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. Nat Med 4 : 328-332, 1998
34. Murphy GP, Tjoa BA, Simmons SJ: Phase II prostate cancer vaccine trial: report of a study involving 37 patients with disease recurrence following primary treatment. Prostate 39 : 54-59, 1999