

관해된 급성 골수성 백혈병 환자의 말초 혈액 단핵구로부터 수지상 세포 분화 유도 및 자가 T 림프구 활성화 유도

김양수

고신대학교 의과대학 내과학교실

Immunomodulation of dendritic cells cultured from the peripheral blood mononuclear cells of AML patients in complete remission and activation of the autologous T lymphocyte

Yang-Soo Kim

Department of Internal Medicine, Kosin University College of Medicine Busan, Korea

Abstract

Background and purposes Evidences for the expression of immunogenicity of AML blast cells are supported by graft versus leukemic reaction, the effect of donor lymphocyte transfusion and in vitro studies with cytotoxic T cell. Dendritic cells (DCs) are important antigen presenting cells in the development of antileukemic T cell cytotoxic responses. The purpose of this study was to analyze the immunophenotype of dendritic cells cultured from peripheral blood mononuclear cells of AML patients in complete remission and to evaluate whether this immunomodulated DC evoked cytotoxic T cells are capable to kill the leukemic blast or not. **Methods** Peripheral blood was obtained from 6 patients of AML in complete remission and 2 healthy controls(HC). Dendritic cell were established from monocyte by culturing in the presence of GM-CSF, Flt-3 ligand, TNF- α , and IL-4 for 8 days. At day 8, cell number was counted and expression of surface marker typical for DCs was analyzed morphologically. The immunophenotypic feature of DCs such as CD1a, CD83, and CD86 was analyzed by flow cytometry. Thereafter in same day, day 8, DCs were incubated with lysate of leukemic blast and cultured with autologous lymphocyte, because DCs were potent stimulators in an allogenic mixed lymphocyte reaction(MLR). Cytotoxicity against autologous blast cells was measured by PKH67 assay. **Results** After 8 days of culture, cells from all 8 samples exhibited morphological and immunophenotypic features of DCs including expression of CD1a, CD83, and CD86. There was no difference in expression of surface marker by DC from AML patients and healthy control. Of 6 samples, 2 were analyzed as an effective stimulator in the autologous MLR and induced antileukemic cytotoxicity. At an effector: target -ratio of over 10: 1 (and 20: 1) lymphocyte from two patients stimulated with DC pulsed with blast lysates killed about 40-80 % of autologous blast. **Conclusion** Dendritic cell can be generated in AML patients especially during hematopoietic regeneration following chemotherapy. This study indicated that dendritic cells with enhanced antigenicity can be generated from mononuclear cell of AML in CR, that these cells can effectively prime autologous cytotoxic T cell in vitro, and that they may be used as potential vaccines in the immunotherapy or therapeutic strategy for minimal residual disease of AML.

Key words . Acute myelogenous leukemia, Adoptive immunotherapy, Dendritic cells (DCs), Complete remission, Autologous T cell activation, Minimal residual disease

서 론

급성골수성 백혈병에서 골수이식은 공여자의 면역세포가 이식편대숙주병 (graft versus host disease:GVHD)을 유발하는 한편 이식편대백혈병(graft versus leukemic:GVL) 효과를 초래하여 재발의 빈도를 낮춘다.¹⁾ 급성 백혈병 세포가 면역계와 관계 있다는 가장 뚜렷한 증거는 이식편대 백혈병 효과이며, 만성 골수성 백혈병에서 골수이식 후 재발한 환자에서 공여자의 림프구 주입 (donor lymphocyte infusion: DLI)을 할 경우에는 관해를 재유도 할 수 있는 이론적인 근거도 세포독성 T 세포에 의한 면역반응에서 기인한다.²⁻⁴⁾ 급성 골수성 백혈병에서 면역조절(immunomodulation)에 대한 연구는 1970년대 DLI 뿐만 아니라 interleukin-2(IL-2)에 의해 cytokine을 유리시켜 면역활성화를 유도하는 방법 등이 있었다. 최근에는 줄기세포의 생물학적 특성에 대한 연구로 혈액 종양의 병태 생리를 밝힐 뿐만 아니라 수지상 세포를 이용한 연구들이 진행되고 있다.^{5,6)}

면역계는 악성질환의 병인론에도 중요한 역할을 하지만 미세잔존병의 퇴치와 재발에도 중요한 역할을 한다. 면역계가 종양세포의 제거에 실패하는 원인으로 종양세포가 종양항원의 불충분한 표현으로 면역계의 인식을 피하는 기전이 제시되고 있다.^{7,8)}

수지상 세포는 강력한 항원표지세포로 면역조절에 있어서 T 세포반응을 활성화시키며 표면에 주조직적합복합체(major histocompatibility complex: MHC) class I 뿐만 아니라 class II 분자도 다량 발현한다.^{9,10)} 이 세포는 세포매개성 면역을 유도함에 있어 순수한 감작이 안된 T 림프구(naïve T lymphocyte)에 항원을 전달하여 항원 특이 효과기(effector) T 세포를 증식시킨다. 그러므로 암환자에서 암에 대한 특이면역을 유도하는 매개체로 사용 가능하며, 이러한 수지상 세포는 원시 조혈 모세포(primitive hematopoietic stem cell)에서 분화를 유도할 수 있다.¹¹⁾ 또한 수지상 세포는 여러 cytokine의 존재하에 말초 혈액의 단핵구에서도 분화유도가 가능하다는 것이 밝혀졌다.¹²⁻¹⁵⁾

간암¹⁶⁾이나 췌장암¹⁷⁾의 원발 병소를 절제하고 난 후 무증상(subclinical) 상태로 미세전이(micrometastasis)된 종양세포의 제거를 위하여, 또는 골수이식 후 Epstein-Barr

virus와 관련된 질환을 억제하기 위하여¹⁸⁾ 입양면역요법이 시도되고 있다. 이러한 입양면역요법은 고형 종양(solid tumor)의 경우 종양에 침윤한 림프구(tumor infiltrating lymphocytes)나 세포독성 T-림프구 또는 수지상 세포 등의 효과기 면역세포를 환자로부터 채취하거나 채취한 세포를 체외에서 증식 또는 유전자 조작하여 다시 환자에게 재도입하는 것이 어려운 반면, 백혈병 환자의 경우 말초혈에서 백혈구 분반술(leukapheresis)에 의해 쉽게 미분화 혈구세포인 백혈병 세포를 얻을 수 있고 체외에서 이들 세포에 대해 유전자 조작을 하거나 분화유도 후에 다시 자가 이식하는 것이 비교적 용이하다는 장점이 있다. 최근 연구에 의하면 백혈병 세포주 및 신선한 백혈병 아세포(leukemic blast)로부터 여러 분화단계를 거쳐 수지상 세포를 분화유도 할 수 있다고 하였다.^{19,20)} Choudhury 등은 자가 급성골수성 백혈병 아세포를 수지상 세포로 분화시켜 백혈병 특이 세포독성 T세포(cytotoxic T cell)를 실험관 내에서 활성화시킬 수 있었고²¹⁾, Harrison 등²²⁾은 백혈병성 수지상 세포(leukemic dendritic cell)가 세포독성 T 세포를 증식시켜 백혈병 세포를 효과적으로 분해 하는데 기여 함을 보였다.

지금까지의 급성 골수성 백혈병에서의 수지상 세포 분화유도에 대한 연구들은 백혈병 아세포 자체를 수지상 세포로 분화시켜 백혈병세포에 대한 특이한 항원을 표현하여 자가 T 세포의 백혈병 특이 세포독성을 보여주었다. 이러한 연구결과를 고려할 때 수지상 세포는 강한 면역자극세포로 미세잔존 세포를 효과적으로 제거해 장기생존 및 완치에 도달할 수 있는 입양면역치료(adoptive immunotherapy)로서의 역할을 기대 할 수 있다.

본 연구의 목적은 급성 골수성 백혈병 치료 후 완전관해된 환자의 말초혈액 단핵구에서 수지상 세포를 분화유도 시키고 수지상세포의 표현형을 분석하고 이렇게 분화된 수지상 세포가 자가 세포독성 T 세포를 활성화시켜 백혈병 아세포를 분해할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2000년 8월부터 20001년 8월까지 고신대학교 복음병

관해된 급성 골수성 백혈병 환자의 말초 혈액 단핵구로부터 수지상 세포 분화 유도 및 자가 T 림프구 활성화 유도

원에 입원하여 급성 골수성 백혈병으로 진단되어 치료 후 완전 관해된 환자 중 6명에서 말초 혈액을 채집하였다. 모든 환자에서 관해요법 전에 골수 세포를 얻어 냉동 보관하였다. 2명의 정상 건강인에게서 말초 혈액을 각각 채집하였다.

2. 실험방법

1) 말초혈액으로부터 단핵구의 분리

6명의 완전 관해된 급성 백혈병 환자와 2명의 건강한 성인으로부터 각각 말초혈액 40 ml를 heparinized tube에 채취하여 6시간 이내에 Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077, Sigma, USA)로 처리하였다. 처리된 혈액은 50 mL 튜브에 넣은 후 1,800 rpm에서 20분간 원심분리하여 계면층의 단핵구를 파스퇴르 피펫으로 분리하였다. 얻어진 단핵구 분획에 phosphate buffered saline 을 섞어 25 mL로 만들고 혈구계로 세포수를 계산한 후 1,200 rpm에서 2분간 원심분리하여 세척한 후 상층액을 제거했다.

2) 수지상 세포 배양

분리한 말초 혈액 단핵구는 각각 4개로 나누어 RPMI 1640 (GIBCO, FRG)배지가 들어있는 배양용 플라스크 (Corning Inc, Corning NY, T-75mm²)에 옮겼다. 1% 자가 혈청을 첨가한 후 5%CO₂와 95%의 공기가 공급되는 37 °C의 배양기에서 배양하였다. 이 중 2개의 플라스크에는 수지상 세포 분화유도제로 granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF, LG chemical) 100ng/ml, Flt3 Ligand(R&D system, Minneapolis, MN, USA) 100ng/ml, Interleukin-4(IL-4, R&D system, Mineapolis, MN, USA) 50ng/ml, tumor necrosis factor(TNF) alpha((R&D system, Minneapolis, MN, USA) 20 ng/ml로 맞춰 배양하였다. 배양액은 매 3-4일마다 교환하였고 그때마다 같은 농도가 되도록 cytokine을 첨가하여 8일 동안 배양하였다. 나머지 2개의 플라스크는 cytokine을 섞지 않고 X-Vivo 20 배지(BioWhittaker, MD, USA)를 사용하여 배양했다.

3) 배양된 수지상 세포 형태 및 수량 측정

배양도중 2일째부터 매일 위상차 현미경을 이용하여 세포크기의 변화 및 집락형성 등을 관찰하였다. 8일 동안 배양하였으며 배양 8일째 자동 혈구측정기를 이용하여 세포수를 측정하였다. 분리해 낸 세포를 Wright-Giemsa 염색을 하여 관찰하였고 세포가 크고 세포질 내에

과립이나 공포가 없는 풍부한 회색의 세포질을 갖고 장형의 세포질 돌기가 형성된 것을 성숙 수지상 세포로 간주하였다(Fig. 1). 8일간 배양한 세포를 trypsin-EDTA (Sigma, St. Louis, Mo. USA)를 처리하여 분리 수거한 후 혈구측정기로 수지상 세포수를 측정하였다.

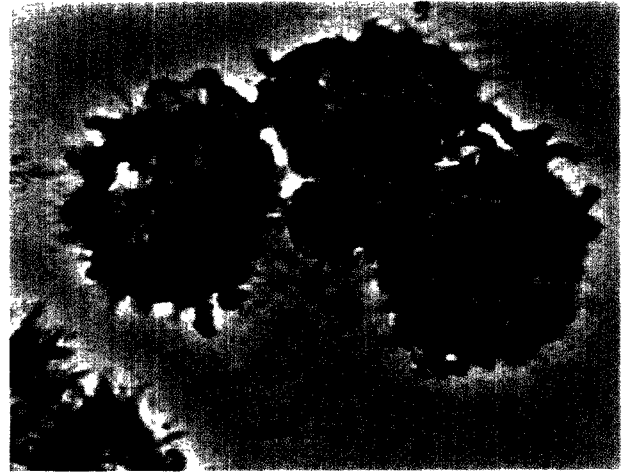


Fig 1. May-Grünwald-Giemsa stain analysis showed that the cell size was increased with copious gray cytoplasm and development of cytoplasmic process(original magnification × 1000)

4) T 림프구 배양

각각의 말초혈액 림프구는 10% fetal bovine serum이 포함된 X-Vivo 20배지에서 배양하였으며 수지상 세포와 혼합배양을 유도하기 전에 CD3, CD7(Serotec, USA)단클론항체를 이용하여 세포의 면역표현형을 flowcytometry로 확인하였다. CD3에 92-97%의 세포가 양성이었으며 CD7에 95-98%가 양성이었다.

5) Flowcytometry를 이용한 수지상세포의 표현형

8일간 배양된 수지상 세포의 표현형을 조사하기 위하여 배양된 세포를 1% bovine serum albumin(BSA; Sigma, USA)이 포함된 인산완충액(PBS)으로 2회 세척하고, fluorescein isothiocyanate(FITC)형광물질이 부착된 특이 항체를 첨가하여 4°C에서 30분간 방치하였다. 형광 염색된 세포를 2회 세척한 후 1% paraformaldehyde(sigma, USA)가 포함된 인산 완충액으로 고정시킨 다음 Cell quest version 3.1 FACScan flowcytometer(Becton Dickinson)에 주입하여 분석 하였다. 단클론 항체는 CD83-FITC,

CD86-FITC, 그리고 CD1a-FITC (Serotec, Raleigh, NC USA)를 이용하였다. 이때 전방 및 측부에 흩어진 세포와 세포 파편(cell debris)과 응집(clump)은 제외시켜 분석하였다.

6) 자가 T 세포 활성화 및 아세포 분해산물(blast lysate) 감작

아세포 분해산물(blast lysate)은 진단 당시 골수 또는 말초 혈액 중 단핵구층을 분리하여 냉동보관하였던 세포를 상온에서 해동한 후 다시 -189°C 심냉동고를 이용하여 냉동과 해동을 2시간 간격으로 5회 반복하여 사용하였다. 8일동안 배양된 수지상세포는 백혈병 아세포 분해산물과 함께 혼합배양을 하였으며 배양 3일째 자가 T 림프구를 첨가하고, T 세포를 활성화시키기 위해서 1000 IU/mL 의 IL-2(proleukin, Chiron, USA)를 추가하여 8일간 혼합 배양하였다. 같은 sample에서 일부는 아세포 분해산물을 혼합하지 않고 수지상 세포와 자가 T 림프구와 IL-2만 넣고 배양하였으며, 첫 번째 정상대조군(IC1)에서는 수지상 세포 없이 IL-2와 T 림프구만 넣고 배양하였고 두 번째 정상대조군(IC2)에서는 수지상 세포와 IL-2, T 림프구를 함께 배양하였다.

7) T 림프구의 세포살해능 측정

환자 1의 백혈병 아세포를 분해하고자하는 표적세포로 사용하였다. 2×10^6 세포를 PKH67-GIT(Sigma, USA)으로 1시간동안 표지(labeling)한 후 3회 세척하였다. 표적세포의 수를 측정하였으며 수지상 세포로 자극시킨 림프구와 표적아세포를 함께 배양하였는데 이때 효과기 림프구와 표적 세포 비율(E: T ratio)을 20:1, 10:1, 5:1, 1:1로 하여 3시간 동안 배양 후 표적세포 살해 효과를 분석하였다. 죽은 세포 표식자(dead cell indicator)로 propidiumiodide를 사용하여 flowcytometry 이용하여 분석하였다. 세포살해능은 전체표적세포에 대한 죽은 세포 비율로 측정하였다. 이 때 죽은 세포는 방치후 자발적으로 분해된 세포를 뺀 나머지 세포로 비율을 구하였다.

결 과

1) 대상환자의 백혈병 분류 및 임상양상

6명의 급성 골수성 백혈병 환자는 남자 3명, 여자 3명

이었다. 환자의 연령은 24세에서 67세였으며 FAB 분류상 M2가 3명으로 가장 많았으며 염색체 검사는 1명의 환자에서 t(8;21)을 보였고 (patient 1) 그 외는 모두 정상 조건이었다. 5명의 환자는 마지막 항암화학요법 치료 후 50일 이내였고 가장 짧은 경우는 27일째 되는 환자였다(patients 2). 1예는 항암화학요법 치료로부터 채혈 할 때까지 기간이 가장 길었던 경우로 345일째였다 (patient 3).

Table 1. Clinical characteristics and cytogenetics of AML patients in complete remission.

Patient No	Sex/Age	FAB	Cytogenetics	Interval #	Disease status##
1	F/46	M2	46, XX t(8;21)	29day	1st remission
2	M/52	M1	46, XY	27day	1st remission
3	M/24	M1	46, XY	345day	2nd remission
4	M/49	M2	46, XY	38day	1st remission
5	F/26	M2	46, XX	47day	2nd remission
6	F/67	M5	46, XX	31day	1st remission

Interval from last chemotherapy to collecting the sample

Current status of disease

2) 환자의 말초혈액분석과 수지상 세포 배양 결과

각 sample의 혈액 채집당시의 자동분석기로 측정한 말초혈액 백혈구 수 및 단핵구 수와 8일째 수지상 세포의 수량 분석 및 단클론 항체를 이용한 표현형분석 결과는 table 2와 같았다. 가장 수거율(yield)이 좋았던 환자는 2번째 환자로 급성 골수성 백혈병을 진단하여 관해 치료 후 첫 번째 공고 치료 후 회복기에 있었던 환자였으며 수지상 세포 분화가 좋았고 수지상 세포 3.7×10^6 을 얻었다. 세 번째 환자는 관해 및 공고 치료후 1년 동안 외래 추적하는 환자이며 수지상 세포가 0.7×10^6 로 수거율이 가장 좋지 않았다. 두 명의 건강 대조군의 수지상 세포 수량은 각각 2.1×10^6 과 2.3×10^6 이었다.

2) 수지상 세포 모양 관찰

8일동안 배양하여 유도된 수지상 세포는 Giemsa 염색상 전형적인 돌기를 가진 세포질이 풍부한 세포로 관찰되었다. 배양하는 동안에 위상차 현미경을 통하여 세포의 형태를 관찰하였는데 세포는 배양 3-4일째부터 세포의 크기가 커지며 돌기가 생성되기 시작하였다. 각각의 배양 플라스크를 매일 사진 촬영을 하여 돌기생성 및 세

관해된 급성 골수성 백혈병 환자의 말초 혈액 단핵구로부터 수지상 세포 분화 유도 및 자가 T 림프구 활성화 유도

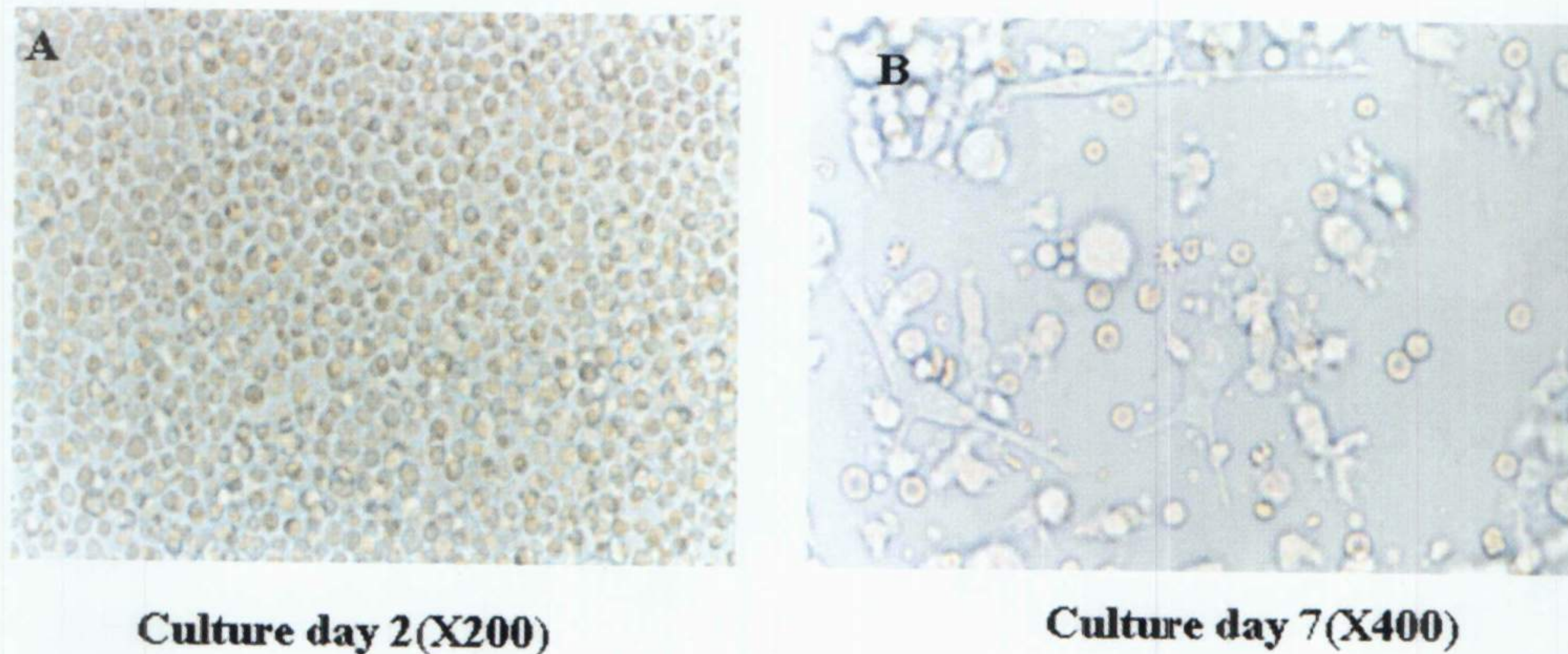


Fig 2. Morphology of freshly isolated and cultured PBMNC of AML patients in CR with best yield of dendritic cells(patient 2). Phase contrast micrographs of freshly isolated PBMNC on day 2 (A;100×original magnification). A typical dendritic cell developing from PBMNC after 7day culture with GM-CSF, IL-4, Flt3-L, and TNFα(B;400×original magnification)

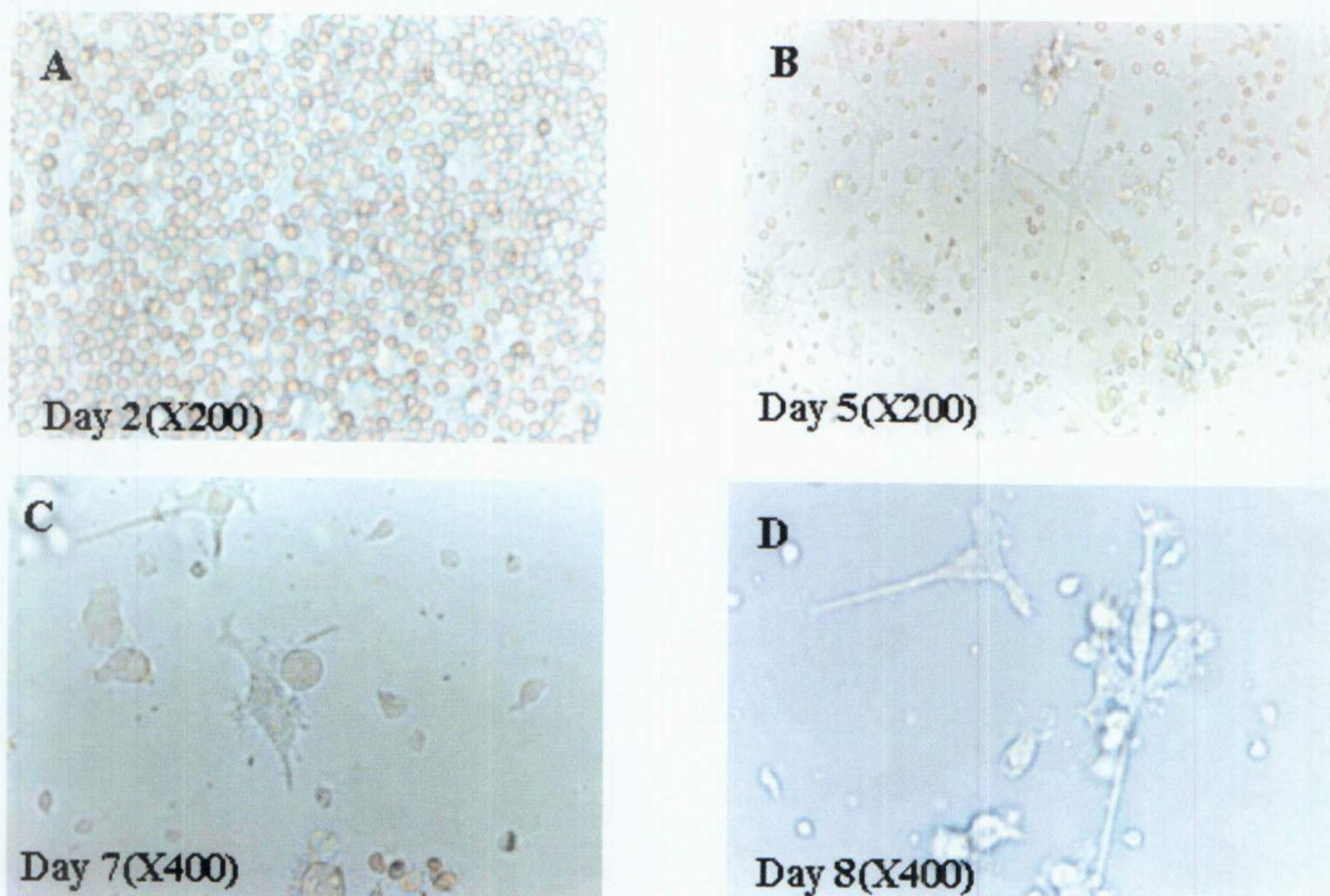


Fig 3. Morphology of freshly isolated and cultured PBMNC from patient 1. Phase contrast micrographs of freshly isolated PBMNC during the course of culture. Cells culture for 2 days(A; 200×original magnification); Cells cultured for 5 days(B; 100×original magnification); cells cultured for 7day(C; 400×original magnification); cell cultured 8day(D;400×original magnification) in Flt3-L, GM-CSF, IL-4, and TNFα

포질의 변화 등을 사진으로 얻었다. 환자(Patient)에서 배양된 단핵구는 크고 세포핵이 엷상으로 변하며 세포질 주위로 가늘고 움직이는 모양의 돌기를 관찰 할 수

있었다(Fig. 2). 그 외의 모든 배양플라스크에서 같은 결과를 관찰하였다(Fig. 3).

건강대조군의 세포 배양에서도 수지상 세포가 환자의

세포와 동일한 모양으로 관찰되었다.

3) 배양된 수지상 세포의 표현형

수지상 세포의 가장 특이 표현형인 CD83에 대한 양성율은 16%-35% 였으며 CD86 에 대한 양성율은 24%-52%, CD1a는 11%-62%로 나타났다. 건강한 대조군 두 명에서는 CD38 25-35%, CD86 25-27%, CD1a 11-13%의 양성율을 보였다. 수지상 세포 수거율이 가장 좋았던 두 번째 환자의 CD 83 양성율이 가장 높았으며, 건강대조군에서도 비슷한 양성률을 보였다. 항암화학요법 치료가 세 번째 환자에서의 CD 83 양성률은 16%로 가장 낮았고 반면에 CD 1a 양성률은 가장 높았다(Table 2, Fig. 5, Fig. 6). FITC 단클론 항체로 염색한 수지상 세포는 형광 현미경 관찰로도 잘 확인할 수 있었다(Figure 5).

Table 2. Result of dendritic cells culture and Flowcytometric analysis

Patient/ control	Total WBC (/ul)	Monocyte (/ul)	No of DC (x 10 ³ /ml)	CD83 (%)	CD86 (%)	CD1a (%)
1	5200	747	1.6	20	35	16
2	7200	1450	3.7	35	24	22
3	3200	275	0.7	16	52	62
4	4700	1200	2.3	31	26	27
5	3500	370	1.4	20	47	51
6	8900	540	2.0	27	32	19
7*	6300	370	2.1	26	27	11
8**	5800	425	2.3	35	25	13

7*: healthy control 1

8**: healthy control 2

A Patient 2

control

CD83

CD 86

CD 1a

B Patient 4



C Control 1

control

CD83

CD 86

CD 1a



control

CD83

CD 86

CD 1a

Fig 4. Immunophenotype of cultured cells. Cells were labeled with fluorescent monoclonal antibodies to CD83, CD86, and CD1a and analyzed by flowcytometry. Results obtained with the cells cultured for 8 days from patients 1(A), patient 4(B), and from healthy control 1(C).

관해된 급성 골수성 백혈병 환자의 말초 혈액 단핵구로 부터 수지상 세포 분화 유도 및 자가 T 림프구 활성화 유도

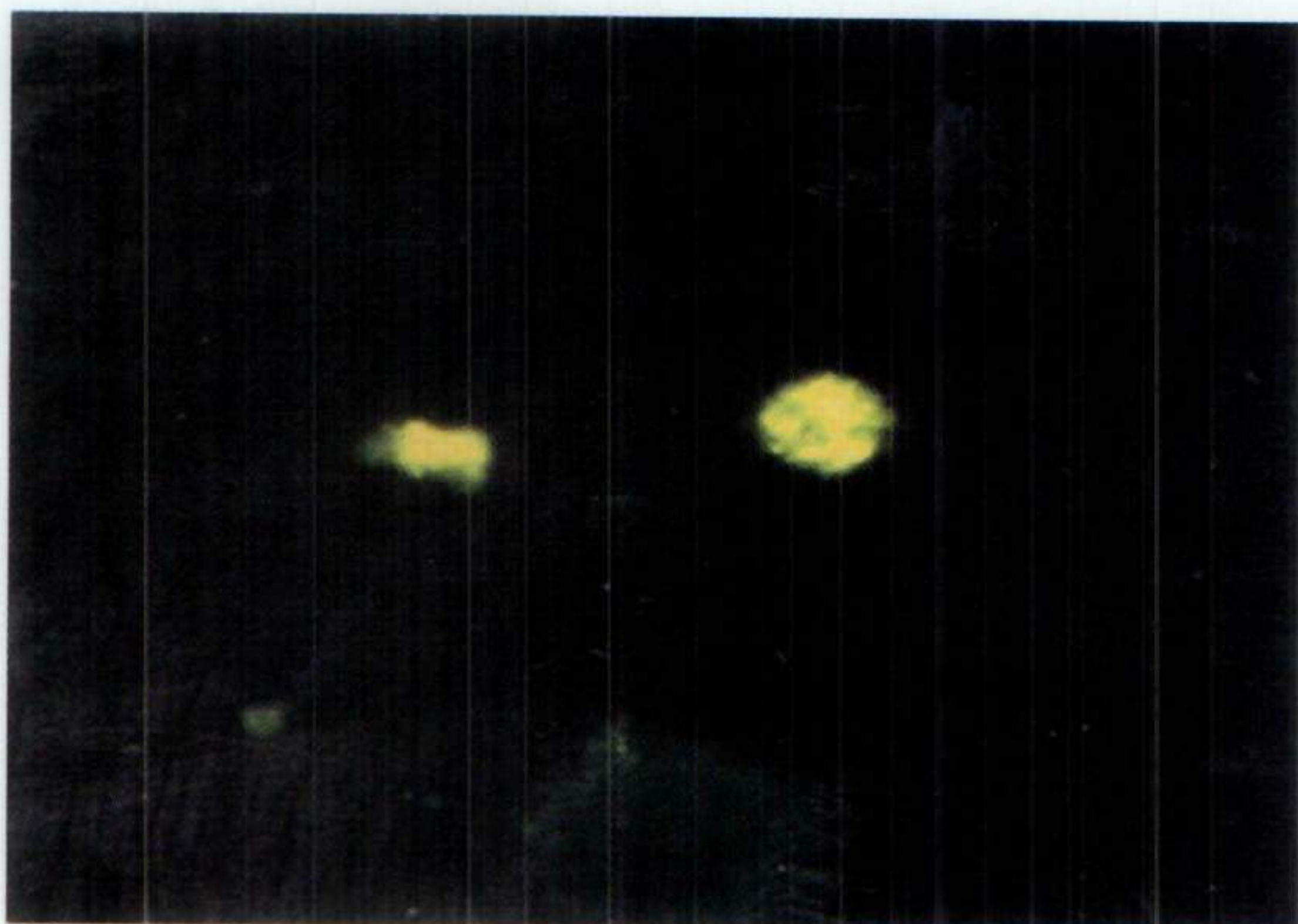
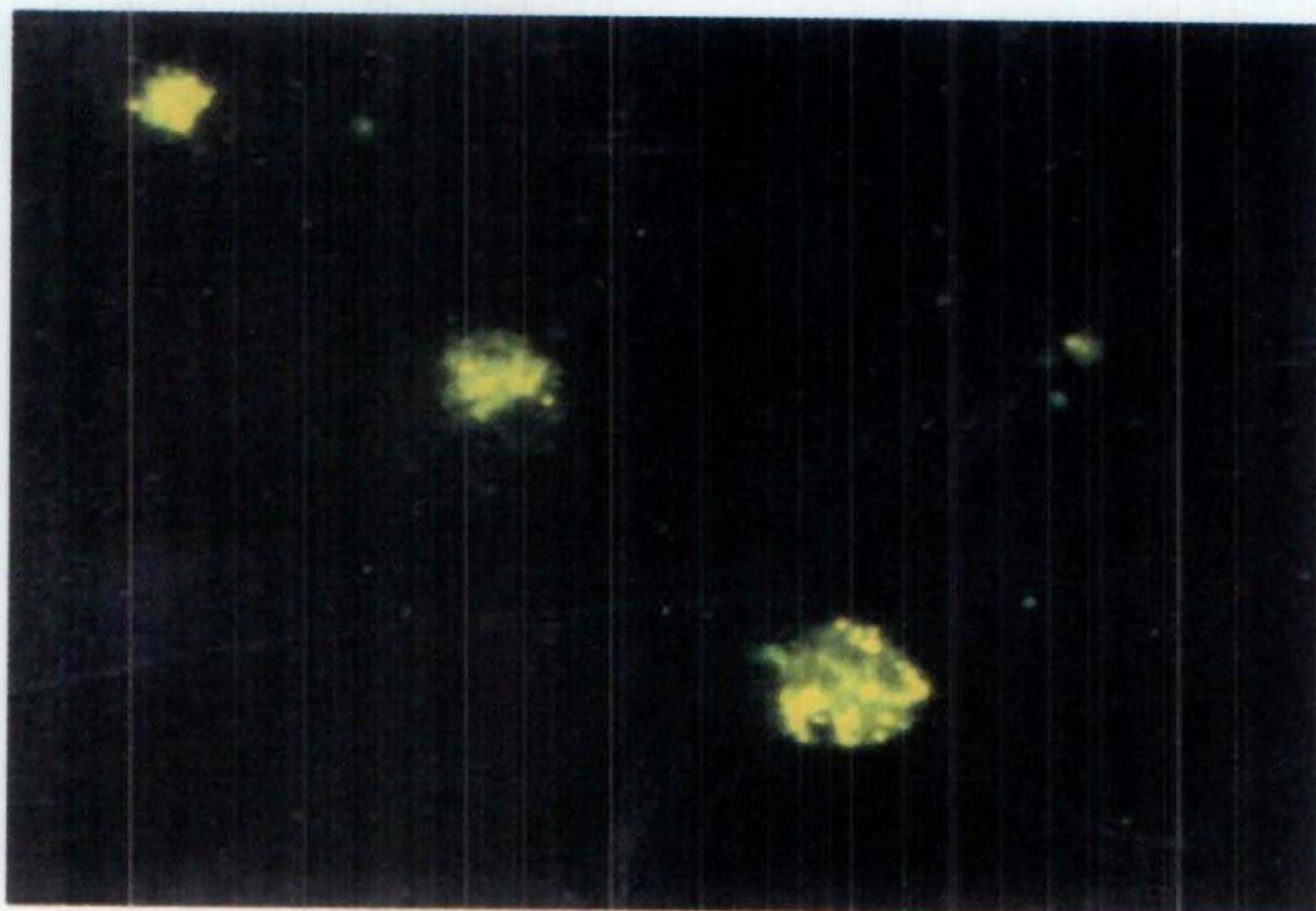
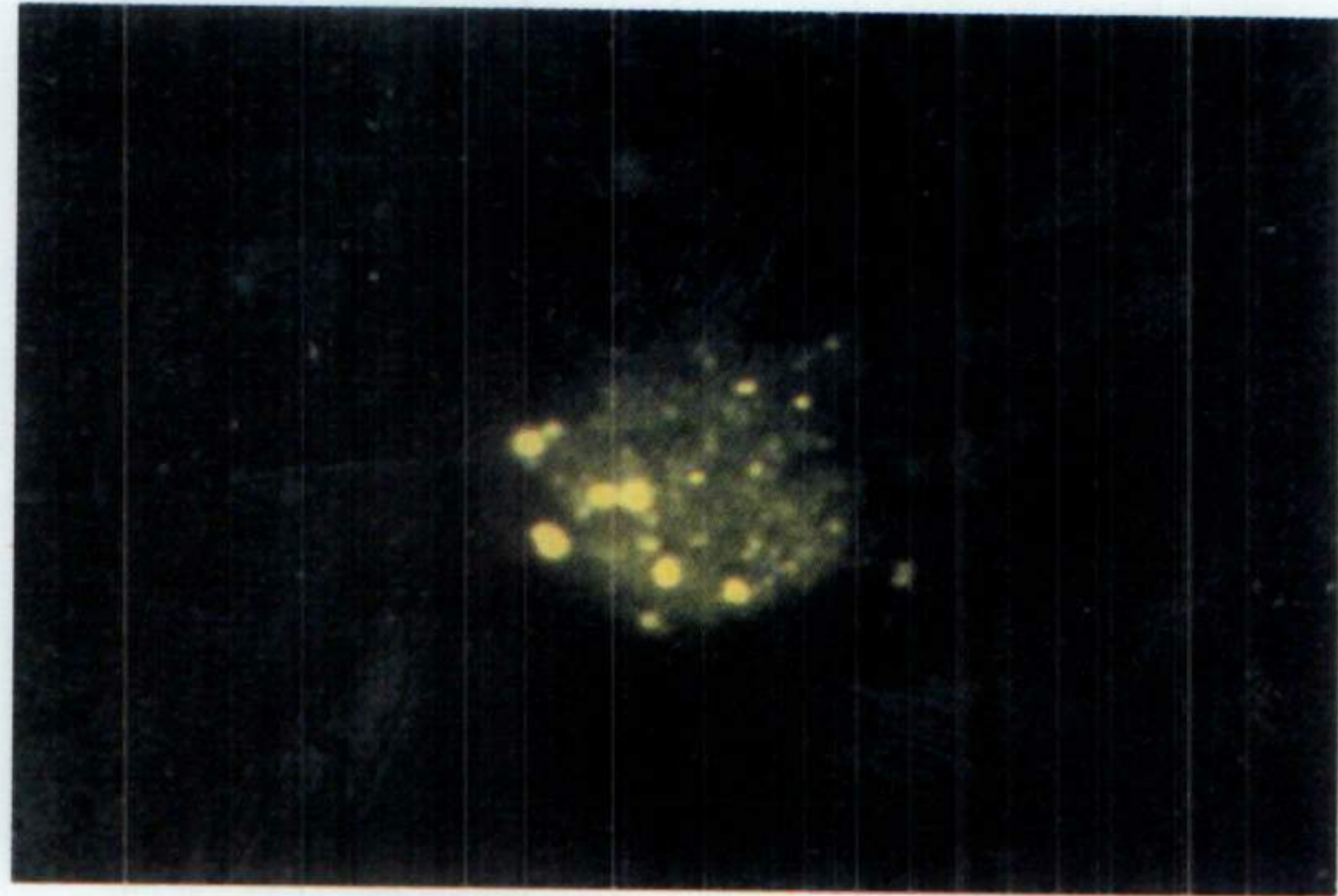


Fig 5. Fluorescence micrograph of cultured dendritic cell showing intense staining of monoclonal antibody to specific cell surface immunophenotype. Dendritic cells show positive FITC stain. A : CD83, B: CD86, C: CD1a

4) 수지상 세포에 의한 활성화 T 세포의 백혈병 아세포 살해능

2명의 환자와 2명의 정상대조군에서 수지상 세포로 자극한 T세포의 백혈병아세포 살해능을 관찰하였다. 첫 번째 환자에서 자가 백혈병 아세포 분해산물로 감작시킨 수지상 세포로 자극한 T 세포의 표적 백혈병아세

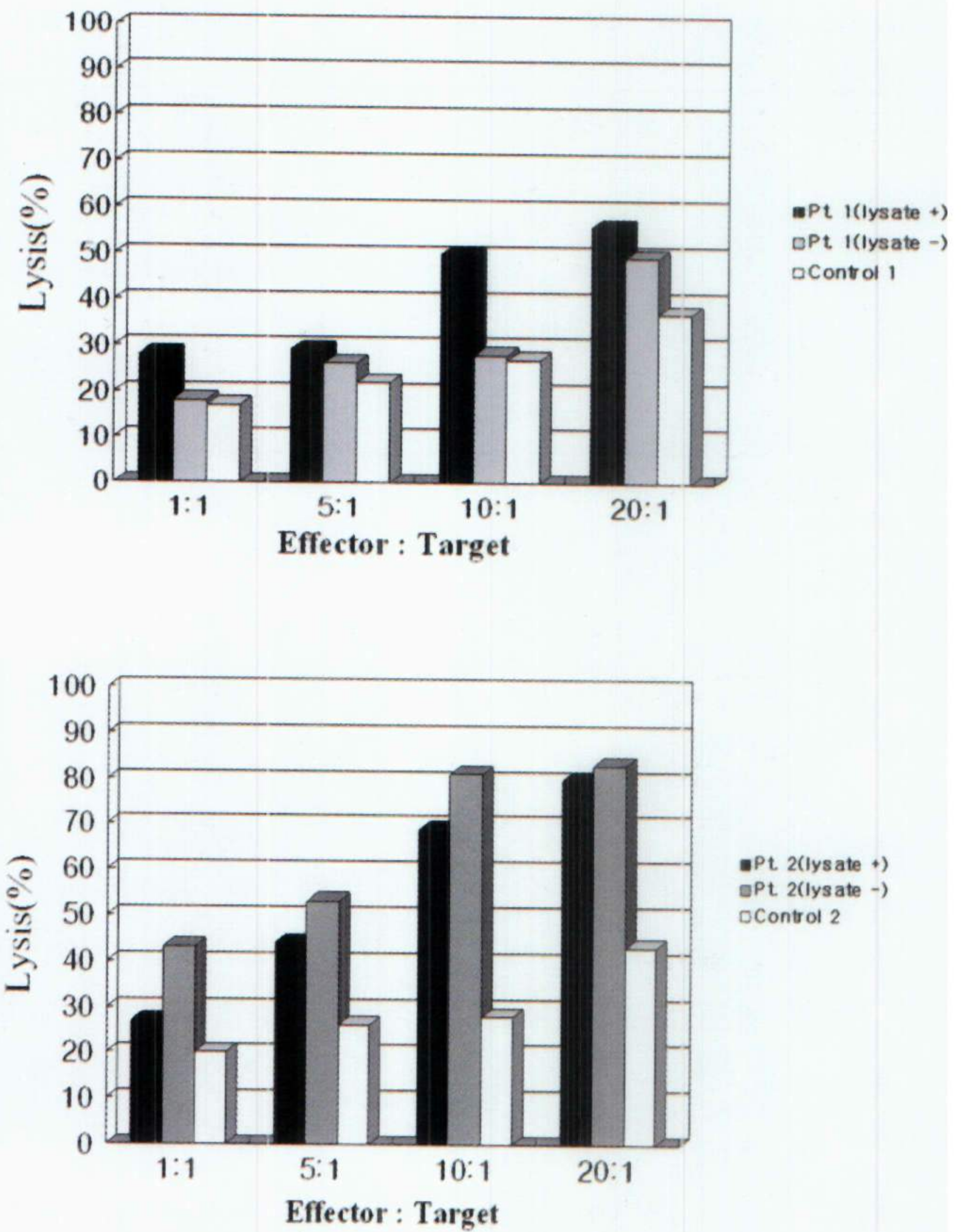


Fig 6. Percent lysis of blast cells by Lymphocyte stimulated with dendritic cells.

A: lysis of blast cell by lymphocytes stimulated with dendritic cells pulsed with lysate B: lysis of allogenic blast cells.

포 살해능은 E:T ratio 10: 1, 20: 1에서 각각 50%, 56%였다. 이환자에서 분해산물로 감작시키지 않은 수지상 세포로만 자극한 T 세포의 백혈병 아세포 살해능은 같은 비율에서 각각 28%, 49%였다. 정상 대조군(HC1)의 T 세포 살해능은 같은 비율에서 각각 27%, 37%를 보였다.

수지상세포 수량이 가장 좋았던 두 번째 환자에서는 동종 백혈병 아세포 분해산물로 감작시킨 수지상 세포로 자극한 T 세포의 백혈병 아세포 살해능은 E:T ratio 10:1, 20:1 비율에서 각각 69%, 80%였으며, 이환자에서 분해산물로 감작없이 수지상 세포로만 자극한 T 세포의 살해능은 같은 비율에서 80%, 83%를 보여 백혈병분해산물 감작에 관계없이 T 세포 살해능이 증가하였다(Table 3, Fig. 6). 전체적으로 수지상 세포로 자극한 T 세포의 백혈병 아세포의 살해능은 E :T ratio 10: 1 이상일 때 증가함을 보여 주었다.

Table 3. Percent lysis of target blast by activated T lymphocyte Lysis (%)

Effector:	Patient 1		HC1*	Patient 2		HC2**
Target	Lysate(+)	Lysate(-)	Lysate(+)		Lysate(-)	
1 : 1	28	18	17	27	43	20
5 : 1	29	26	22	45	53	26
10 : 1	50	28	27	69	81	28
20 : 1	56	49	37	80	83	43

* HC1: healthy control 1

** HC2: healthy control 2

고찰

급성 골수성 백혈병은 단일 클론에서 유래된 미성숙 조혈세포의 과잉증식으로 인해 발생하는 질환이다. 골수구계 분화과정의 어느 한 시기에 분화가 정지되어 그 단계의 세포가 계속적으로 증식되어 발생하는 악성혈액 질환으로 분화·성숙되지 못하고 자기재생이 계속된다^{33,34)}. 이러한 증식은 급성 골수성 백혈병 내에서도 다양한 단계에서 일어나 개인마다 clone의 이형을 나타낸다. 백혈병 환자의 골수에는 정상 다기능조혈 모세포(pluripotent hematopoietic stem cell)와 백혈병 모세포가 공존한다. 성공적인 백혈병 치료 후에 골수는 정상적인 조혈 세포로 다시 재구성된다. 그러나 대부분의 경우에 관해는 일시적이다. 따라서 백혈병환자의 치료 목표는 가능한 장기간 관해를 유지하는 것이다^{25,26)}. 인간에서 백혈병에 대한 방어면역체계가 존재한다는 것이 여러 연구 결과들에 의하여 제기되었으며 그 예로 백혈병 환자에서 동종골수 이식치료 개념도 기존의 고용량 항암화학요법이 중점적인 역할을 한다는 것에서 최근에는 공여자의 면역 세포가 백혈병 세포를 제거하는 개념으로 이해되고 있다^{5,6)}. 또한 여기에는 자가 면역 반응의 역할도 있다. 수지상 세포는 가장 강력한 항원 표지 세포로서 일차적인 세포성 면역반응을 유발할 수 있는 유일한 세포이며 골수에서 기원해서 미성숙한 형태로 혈류를 거쳐 체내 모든 기관에 이동해 간다²⁷⁾. 수지상 세포는 각 조직에서 주변의 항원을 채집해서 림프기관으로 가서 T 림프구에 항원을 제시한다^{8,28,29)}. 미성숙한 수지상세포는 CD40, CD54, CD86 등의 부신호(accessory signals) 전

달에 필요한 cluster determinant (CD)가 표현되지 않아서 T세포를 활성화시키지는 못하지만 면역 반응을 유발하기 위해 꼭 필요한 항원을 포획하기 위하여 이들 미성숙 수지상 세포는 탐식작용과 대음세포작용(macropinocytosis)을 할 수 있으며 흡착세포내이입(adsorptive endocytosis)을 매개하는 수용체들이 세포막에 잘 발현되어 있어서 다른 항원 표지세포들보다 훨씬 적은 농도의 항원에 대하여 반응할 수 있다^{30,32)}. 또한 대식세포의 경우 탐식된 항원은 라이소좀에서 아미노산 상태로까지 분해되어 소량의 MHC-peptide 결합체를 세포 표면에 발현하는데 비해서 수지상세포는 탐식된 항원의 분해를 최소로 하여 충분한 양의 MHC-peptide 결합체를 세포 표면에 발현시켜 수 일간 안정한 상태로 유지시킬 수 있다^{9,10,33)}. 수지상 세포가 성숙해 감에 따라 면역반응이 유발되는데 이러한 성숙 과정은 여러 요소에 의해서 조절된다. 특히 세균이나 염증 반응 산물, 세균의 세포벽 성분인 다당류, IL-1, GM-CSF (CSF2), TNF- α 등은 모두 수지상 세포의 성숙을 촉진한다³⁴⁾. 여러 연구결과에 의하면 수지상 세포는 GM-CSF와 TNF- α 와 같은 cytokine이 있는 환경에서 골수 또는 말초혈액으로부터 배양이 가능하고 단핵구와는 동일한 조상세포(progenitor cell)로부터 유래함을 보고하였다^{15,28,34)}.

본 연구에서는 6명의 관해된 급성 골수성 백혈병 환자와 2명의 건강 대조군의 말초 혈액의 단핵구로부터 cytokine을 사용하여 형태학적으로, 면역표현형에 양성인 수지상 세포를 배양하는데 성공하였다. 수지상 세포의 수량이 가장 높았던 환자는 두 번째 환자로 FAB M1 급성 골수성 백혈병 환자로 1차 관해유도 요법으로 관해 성공하고 1차 공고요법을 받은 후 27 병일째 되는 환자로 골수세포의 조혈작용이 재생기에 있었던 것으로 생각되며 말초혈액의 단핵구가 채집된 표본에서 가장 많았다. 반면 세 번째 환자에서는 가장 수량이 적었는데, 이 환자인 경우는 재발 후 재관해유도를 하였던 환자로 항암화학요법 345일째로 왜래 추적 중에 혈액표본을 채집하였다. 이 같은 현상은 Shui등의 연구에서도³⁵⁾ 관찰되었는데 항암화학요법치료 2개월이 지난 경우에는 수지상 세포 배양이 수적인 감소를 보였다. 본 연구에서처럼 조혈세포 재생기에 수지상 세포 수량이 좋은 것은 이 시기에 단핵구 형성을 증가시키는 내인성 성장인자가

높거나 재생기의 골수에 수지상세포 전구세포의 생성이 증가된 것으로 여겨진다. 세 번째 환자인 경우 마지막 항암화학요법을 수개월 전에 시행하였고 재발로 인한 반복 항암화학요법으로 골수의 환경 및 cytokine등이 변화로 수지상 세포 배양결과가 수량이 적게 나타났을 것이라 추측할 수는 있었지만 이에 대하여 임상적으로 뒷받침 할 수 있는 보고는 없어 아직까지 화학요법기간과의 관계에 대하여는 불분명하다.

골수 세포나 말초 혈액의 단핵구를 이용한 수지상 세포의 분화에는 GM-CSF, IL-4, TNF α , Flt-3 ligand(FL), CD40L 등의 cytokine이 필요하며 여러 조합으로 배양에 이용한다^{12-15,36,37)}. 본 연구에서 사용한 수지상 세포 분화 유도 cytokine은 GM-CSF, IL-4, Flt-3 ligand, TNF- α 를 사용하였다. GM-CSF는 골수계와 대식세포계의 조상세포에 반응하는 것과 같이 골수계로부터 유래한 수지상 세포에 보편적으로 반응하며 분화를 촉진한다^{15,38)} IL-4는 골수단핵계 조상세포로부터 골수 세포나 대식세포로의 분화를 억제한다³⁸⁾. 특히 Flt-3 ligand 는 tyrosine kinase 수용체와 결합해서 미성숙한 수지상 세포를 지지해준다.³⁹⁾ 생쥐에게 Flt-3 ligand를 투여하면 in vivo 상태에서 수지상 세포의 기능을 가진 세포의 증식이 촉진되며⁴⁰⁾ GM-CSF와 같이 사용 할 경우 상승작용이 있어 CD 34 양성 세포를 수지상 세포로 다량으로 분화시킨다⁴¹⁻⁴³. Flt-3 ligand를 투여할 경우 백혈병 아세포를 수지상 세포로 분화시키는데 우수하며 그 기능과 형태에 뚜렷한 차이를 보이며 CD83 표현을 증가시킨다^{35,44)}. 본 연구에서 백혈병 아세포를 직접 수지상 세포로 분화시키지는 않았지만 Flt-3 ligand를 첨가하여 환자와 정상 대조군의 말초혈액에서 수지상 세포를 얻었다. 본 연구에서는 다른 연구자들이 수지상 세포 배양에 사용했던 cytokine의 양보다 적은 용량을 사용하여 충분한 수지상 세포를 유도할 수 있었던 것은 cytokine 조합이 적절했던 것으로 생각된다.

수지상 세포 배양시 TNF- α 의 첨가는 정상 말초혈액의 단핵구가 항원을 포획하여 MHC와 부분자(accessory molecule)들을 상향 조절하게 하며, T 세포의 자극효과를 극대화시키는 성숙 수지상 세포의 기능을 갖게 한다. 즉 TNF- α 존재 하에 배양된 수지상 세포는 CD83항원 같은 성숙 수지상 세포의 표현형을 강하게 표현한다^{38,45)}.

본 연구에서 배양된 수지상 세포의 표현형은 정도의 차이는 있었지만 성숙 수지상 세포에서 양성인 CD83 표현형과 CD86, CD1a에 모두 양성 반응을 나타내었다.

수지상 세포의 표현형 중 CD 80/CD86의 역할은 T 림프구에 효과적인 항원전달과 자극을 담당한다. 많은 종양환자에게서 종양 항원에 특이적인 T세포 반응이 좀처럼 유발되지 않는데 이것은 아마도 종양세포에 대해서 수지상 세포가 반응하지 못하기 때문일 것이다. 대장암이나 기저세포피부암에 침윤되어 있는 수지상 세포는 CD80과 CD86을 표현하지 못해서 T세포에 대한 자극 활성이 감소된다⁴⁶⁻⁴⁹⁾.

급성 골수성 백혈병 아세포가 in vivo에서 T 림프구에 인식되지 않은 주된 이유중의 하나는 백혈병 아세포의 70%는 T 세포 활성화에 2차적으로 신호전달에 필요한 항원분자인 CD80, CD86, CD40을 표현하지 않기 때문이다⁵⁰⁻⁵²⁾. 즉 이런 분자들이 존재하지 않을 경우에는 T 세포의 anergy가 발생한다⁵³⁾. 따라서 백혈병 아세포가 T 림프구를 자극하기 위해서는 이런 분자들의 결손을 교정하여야 한다. 아세포 분해산물을 첨가하더라도 상기 세포표면 항원이 음성일 경우 T 세포의 세포독성은 약하게 된다⁶⁾. 동종 혼합림프구 반응(Mixed lymphocytic reaction: MLR)에서 단핵구나 B 세포 같은 다른 항원표지세포에 비해 수지상 세포가 월등하게 높은 것은 이미 여러 연구에서 밝혀졌고 작은 양의 수지상 세포에도 동종 T 세포증식과 활성화시킬 수 있다⁴⁷⁾.

백혈병 세포를 수지상 세포로 유도 분화시키는 경우, 수지상 세포의 특성상 종래에 자신이 가지고 있던 백혈병과 관련된 항원을 대량 세포 표면에 발현시켜서 환자의 체내에 자가 이식하는 경우 많은 T 세포에게 항원을 제시함으로써 대개 한 개의 수지상 세포가 100-3,000 개의 T 세포를 활성화시키고²⁸⁾ 이들 각각의 T 세포가 자가증식촉진(autocrine growth stimulation)형태로 분지계 팽창(clonal expansion)⁷⁾이 유발되는 경우 매우 치료 효과가 강력한 항백혈병성 T 세포의 반응(antileukemic T-cell responses)을 유도할 수 있을 것이며 실제 만성 골수구성 백혈병(CML)과 급성 골수구성 백혈병(AML) 환자의 말초혈 백혈병 아세포로부터 GM-CSF, IL-4, TNF- α 를 사용하여 유도된 수지상 세포가 항백혈병성 T 세포의 증식(antileukemic T-cell proliferation)을 촉진하고 이

들 T 세포의 세포독성을 강화시킨다는 보고도 있다⁵⁴⁾. 본 연구에서는 2명의 환자와 2명의 건강대조군에서 수지상 세포에 의한 T 세포 반응을 유도하여 백혈병 아세포에 대한 T 세포독성을 관찰 하였다.

본 연구의 결과에서도 수지상 세포로 자가 T 세포를 자극한 경우 자가 또는 동종 백혈병 세포에 대한 T 세포 독성을 관찰 할 수 있었다. 그러나 건강 대조군에서는 IL-2 로 활성화 시켰을 때보다 수지상 세포로 자극하였을 때 T 세포 독성에는 차이를 보여주지 않았다. 본 연구에서는 백혈병 아세포를 수지상 세포로 분화시킨 것이 아니라 말초 정상 단핵구로부터 수지상 세포로 분화시켰기 때문에 특정 백혈병에 대한 항원을 제시 할 수 없을 것으로 여겨졌기 때문에 진단 초기에 얻어진 자가 백혈병 아세포 분해산물을 첨가하여 추가 배양함으로써 백혈병의 특이 항원을 표현 할 수 있도록 하였다. 정상 말초 혈액의 단핵구로부터 수지상 세포를 유도하여 백혈병 세포가 갖는 고유 특이 항원에 대하여 얼마나 반응할 것인지에 대하여 논 할 수는 없다. 본 연구에서는 자가 백혈병 아세포 분해산물로 감작시킨 수지상 세포로 T 세포를 자극할 경우 표적 백혈병 아세포에 대한 T 세포 독성이 감작 시키지 않은 경우 보다 다소 높게 나타났다. 그러나 본 연구결과에서는 가장 수지상 세포 수거율이 좋았던 두 번째 환자의 경우 백혈병 아세포의 감작 여부와 관계없이 T 세포의 백혈병 아세포에 대한 독성이 증가함을 보였다. 첫 번째 환자와는 달리 두 번째 환자에서는 다른 환자의 동종백혈병 아세포 분해산물로 감작시킨 후 동종 백혈병 아세포를 표적세포로 하여 T 세포 살해능을 관찰하였다. 그 결과 백혈병 분해산물로 감작시킨 경우가 감작시키지 않은 경우보다 표적 아세포에 대한 T 세포독성은 증가하지 않았다. 그러나 두 번째 환자의 경우 전체적인 T 세포 독성은 높은 결과를 보여 주었는데 그것은 수지상 세포의 수량이 많은 결과와 관련 될 가능성이 있다. 현재까지는 급성 골수성 백혈병에 특이한 항원은 밝혀지지 않았다. 그럼에도 불구하고 몇몇 고형암에서 종양세포 분해산물(tumor lysate)을 이용하여 수지상 세포를 감작시키거나⁵⁴⁻⁵⁸⁾ 종양세포의 c-DNA library를 전달시킨 수지상 세포를 이용하여 악성 종양의 면역요법으로 이용된 것처럼 아세포 분해산물의 이용은 급성 골수성 백혈병에도 유용한 방법의 하나로

여겨진다^{59,61,62)}. 본 연구에서처럼 자가 또는 동종 종양항원 및 종양단백을 유도할 목적으로 종양 분해산물과 혼합 배양시켜 수지상 세포의 종양 특이 항원을 인식시키는 기능을 강화시킨 연구들이 흑색종 및 전립선암에서 시도되었으며^{55,56)} 그 외 비호지킨 림프종 및 다발성골수종 등의 악성 혈액 질환에서도 이용되었다^{57,58)}. Brugger 등은⁶³⁾ 유방암과 난소암 환자에서 고용량 항암화학요법 후 자가조혈모세포를 실시하고 추후 재발의 원인이 될 수 있는 미세잔존병을 제거하기 위해 HRR-2/neu 단백항원으로 자극한 수지상 세포를 특이 T 세포독성을 자극하는 in-vivo 연구를시행하여 고형종양에서의 면역 치료의 가능성을 제시하였다⁵⁹⁾.

Choudhury 등은 만성 골수성 백혈병의 모세포에서 GM-CSF, IL-4, TNF 등의 cytokine을 이용하여 수지상 세포를 분화시키는데 성공하였다. 만성 골수성 백혈병 세포로부터 분화 유도된 수지상 세포에 의해 bcr-able 항원을 효과적으로 표현하며 T세포를 활성화시키는 특이 항원으로 작용함을 보였고 따라서 백혈병세포에 대응할 수 있는 세포독성 T 세포를 유도하였다⁵³⁾. 만성 백혈병 세포에서 백혈병 자체를 수지상 세포로 분화시킨 후 표적세포에 대한 T 세포 반응은 interleukin-2로만 활성화시킨 것에 비하여 약 4-6배 가량의 세포 독성을 보여주었다. 또한 이들은 급성 골수성 백혈병환자의 백혈병 아세포를 수지상 세포로 분화유도하고 이 세포가 자가 T 림프구를 자극함을 보였다²¹⁾. 이렇게 분화된 수지상 세포는 MHC class I 항원과 class II 항원을 표현할 뿐만 아니라 B7-2 분자 및 ICAM-I 분자를 표현함을 알았다. 급성 골수성 백혈병 모세포에서 유도된 수지상 세포와 같이 배양한 자가 림프구는 자가 백혈병세포를 효과적으로 분해하는 기능이 있음을 보여 주었다. Harrison 등의 연구에서는²²⁾ 급성 골수성 백혈병에서는 백혈병 세포로 분화 유도된 수지상 세포로 T 세포독성을 활성화시킬 때 17표본 중 11 표본에서 항백혈병 세포독성이 관찰되었고 대부분에서 지속적인 자가 항 백혈병 세포 독성을 유지함을 보였다. 이들의 연구결과에서 사람의 급성 골수성 백혈병세포에서 수지상 세포를 유도 배양하면 수지상세포 표현형과 기능을 나타내며 백혈병 세포 모두가 수지상 세포로 분화되지 않는 것은 백혈병의 발생기원인 clone이 다양하기 때문이라고 설명한다. 즉 수

수지상 세포의 개체발생은 CD 34 양성세포 또는 단핵구 계열일 경우에 가능하다고 하며 사실상 수지상 세포의 표현형은 정상 단핵구의 표현형에서 유래한다는 사실이다⁶⁰⁾.

정상적인 세포 분화와 더불어 악성세포의 분화에도 다양한 단계와 각각의 단계에 cytokine이 관여함이 알려졌다. 각각의 다른 cytokine 이 단독 또는 협력하여 공통의 조상으로부터 유래된 다기능 모세포를 중간 단계의 모세포로 분화시키고 결국 마지막 단계의 세포로 운명 지워진다. 급성 골수성 백혈병에서 수지상 세포의 또 다른 역할로는 Kolb and Holler에 의한 공여자 림프구 재주입시 일어나는 현상에서도 알 수 있다⁶¹⁾. 더우기 수지상 세포는 공여자와 숙주 chimera의 관용유도에 상관없이 중요한 효과기 세포로 작용하여 모세포를 이용하여 치료하는 여러 방법에 중요한 영향을 미칠 수 있을 것으로 여겨진다. 1990년대부터 시작된 유전자를 사용한 치료법(gene therapy)에 의해서 유전자가 약리학적인 제제(pharmacologic agent)로 사용하게 되었다면 이제는 수지상 세포를 이용한 입양 면역요법의 대두로 세포 자체가 악성 질환을 치료하는데 사용 할 수 있는 가능성을 보여 준다⁶²⁾. 본 연구에서는 복합항암요법 후 골수 조혈 기능이 회복되는 시기에 말초혈액으로부터 여러 종류의 cytokine을 사용하여 비교적 용이하게 수지상 세포를 얻을 수 있었으며, 이 세포는 항원표지 능력과 관련된 분자표현형을 가지고 또한 백혈병 아세포에 대한 T 세포 독성을 보여 주었다. 결론적으로 이와 같은 연구결과를 배경으로 급성 골수성 백혈병 환자를 복합항암요법으로 관해를 유도한 후 미세잔존병을 제거하기 위한 방법으로 수지상 세포를 이용할 수 있으며 수지상 세포 치료는 장기관해를 유도할 수 있는 입양면역으로서의 역할을 할 가능성을 보였다.

결론

완전 관해된 급성 골수성 백혈병 환자의 말초 혈액내 단핵구를 분리하여 GM-CSF, Flt3-ligand, TNF alpha, IL-4 의 존재 하에 수지상 세포 분화를 유도 할 수 있었다. 이들 세포는 수지상 세포에 특이성이 높은 면역 표

식자로 알려진 CD83에는 19-35%에서 양성이었으며, CD86은 24%-52%, CD1a은 26-62%에서 양성을 보였다. 건강대조군에서 배양된 수지상 세포도 CD83, CD1a, CD86 면역표식자검사 양성이었다. 수지상 세포로 자극한 효과기 T세포가 고농도(effector : target 10: 1이상)일 때 증가된 표적 백혈병 아세포 살해능을 보였다. 또한 수지상 세포 수가 많은 경우 효과기 T세포의 백혈병 아세포 살해능이 클 가능성을 보였다.

급성골수성 백혈병의 고식적 항암치료 후 미세잔존세포는 수지상 세포를 이용해 제거할 수 있다는 가능성을 제시하였다.

참고문헌

1. Antin JH. Graft-versus leukemia: no longer an epiphenomenon. Blood 82: 2273-2277, 1993
2. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Glukman E, Hoffmann RG, JacobsenSJ: Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase Increased risk for relapse associated T cell depletion. Ann Intern Med 108: 806-814, 1995
3. Kolb HJ, Mittermueller J, Clemm C, Holler E, Ledderrose G, Brehm G, Heim M, Wilms W Donor leukocyte transfusion for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood 76: 2462-2465, 1990
4. Van Rhee F, Kolb HJ. Donor leukocyte transfusion for leukemic relapse : Curr Opin Immunol 2: 423-426, 1995
5. Margolin KA, Negrin RS, Wong KK, Chatterjee S, Wright C, Forman SJ. Cellular immunotherapy and autologous transplantation for hematologic malignancy. Immunol Rev 157: 231-240, 1997
6. Kolb HJ, Holler E: Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte Transfusion. Curr Opin Oncol 9:139-145 1997
7. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cell and control of immunity. Nature 392: 245-252, 1998
8. Knight SC, Hunt R, Dore C, Medawar PB. Influence of dendritic cell in tumor growth Proc Natl Acad Sci USA 82: 4495-4497, 1985
9. Svensson M, Stockinger B, Wick MJ: Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. J Immunol 158: 4229-4236, 1997
10. Pierre P, Turley SJ, Gatti E, Hull M, Meltzer J, Mirza A, Inaba K, Steiman RM, Mellman I: Developmental

- regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388: 787-792, 1997
11. VanVoorhis WC, Valinsky J, Hoffman E, Luban J, Hair LC, Steinman RM. Relative Efficacy of human monocyte and dendritic cell as accessory cell for T cell replication. *J Exp Med* 184: 456-472, 1996
12. Santiago-Schwarz F, Belilos E, Diamond B, Carson SE: TNF in combination with GM-CSF enhance the differentiation of neonatal cord blood stem cell into dendritic cells and macrophages. *J Leukocyte Biol* 52: 274-281, 1992
13. Siena S, Di Nicola M, Bregni M, Mortarini R, Anichini A, Lombardi L, Ravagnani F, Parmiani G, Gianni AM: Massive ex vivo generation of functional dendritic cell from mobilized CD 34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Exp Hematol* 23: 1463-1471, 1995
14. Kasinrerck W, Baumruker T, Maj O, Knapp W, Stockinger H: CD 1 molecule expression on human monocytes induced by GM-CSF. *J Immunol* 150: 579-584, 1993
15. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J: GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261, 1992
16. Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Sakamoto M, Hirohashi S, Ohashi Y, Kakizoe T: Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomised trial *Lancet* 356: 802-807, 2000
17. Kobari M, Egawa S, Shibuya K, Sunamura M, Saitoh K, Matsuno S: Effect of intraportal adoptive immunotherapy on liver metastases after resection of pancreatic cancer. *Br J Surg* 87: 43-48, 2000
18. Steven N: The potential of adoptive transfer of immunity for reducing post transplant Epstein-Barr virus-associated disease. *Curr Opin Infect Dis* 12: 585-591, 1999
19. Charbonnier A, Gaugler B, Sainty D, Lafage-Pochitaloff M, Olive D. Human acute myeloblastic leukemia cells differentiate in vitro into mature dendritic cells and induce the differentiation of cytotoxic T cells against autologous leukemias. *Eur J Immunol.* 29:2567-2578, 1999
20. Narita M, Takahashi M, Liu A, Nikkuni K, Furukawa T, Toba K, Koyama S, Takai K, Sanada M, Aizawa Y. Leukemia blast-induced T-cell anergy demonstrated by leukemia-derived dendritic cells in acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 29:709-719, 2001
21. Choudhury A, Liang JC, Thomas EK, Flores-Romo L, Xie QS, Agusala K, Sutaria S, Sinha I, Champlin RE, Claxton DF: Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses. *Blood* 93: 780-786, 1999
22. Harrison BD, Adams JA, Briggs M, Brereton ML, Yin JA. :Stimulation of autologous proliferative and cytotoxic T-cell responses by "leukemic dendritic cells" derived from blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 97: 2764-2771, 2001
23. Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK: Principles of internal medicine, 15th ed New York Macgrow-Hill, Inc., 709-711, 2001
24. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A.: Acute myeloid leukemia . *N Eng J Med* 341: 1051-1062, 1999
25. Buchner T. Hiddemann W. Wormann B. Schellong G :Acute leukemia VIII, prognostic factor and treatment stratagies. Springer- Verlag 457-460,2001
26. Bloomfield CD et al : Frequency of prolonged remission duration following high dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 58: 4173-4179, 1998
28. Hart DNJ: Dendritic cells : Unique leukocyte populations Which control the primary immune response. *Blood* 90: 3245-3287, 1997
27. Steinman RM: The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann Rev Immunol* 9: 271-296, 1991
29. Moll H, Fuchs, Blank C, Rollinghoff M: Langerhans cells transport Leishmania major from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 23: 1595-1601, 1993
30. 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
31. Reis E, Sousa C, Stahl PD, Austyn JM: Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 178: 509-519, 1993
32. Sallusto F, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macrophinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC class II compartment. Down regulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182: 389-400, 1995
33. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J. Lanzavecchia A: Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388: 782-787, 1997
34. 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
35. Woiciehowsky A, Regn S, Kolb HJ, Roskrow M. Leukemic dendritic cells generated in the presence of FLT3 ligand have the capacity to stimulate an autologous leukemia-specific cytotoxic T cell response from patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*.15 : 246-255, 2001
36. Jacobsen SE, C Okkenhaug, J Myklebust, OP Veiby, SD Lyman: The FLT3 ligand potently and directly stimu-

- lates the growth and expansion of primitive murine bone marrow progenitor cells in vitro: synergistic interactions with interleukin (IL) 11, IL-12, and other hematopoietic growth factors. *J Exp Med* 181: 1357-1363, 1995
37. Pawlowska AB, Hashino S, McKenna H, Weigel BJ, Taylor PA, Blazar BR. In vitro tumor-pulsed or in vivo Flt3 ligand-generated dendritic cells provide protection against acute myelogenous leukemia in nontransplanted or syngeneic bone marrow-transplanted mice. *Blood*. 97: 1474-82, 2001
38. Bea YS : Special lecture of dendritic cell : Korean journal of BRM, Vol 9, No.1, 1-18 1999. Lyman SD, L James, L Johnson, K Brasel, P de Vries, SS Escobar, H Downey, RR Splett, MP Beckmann, HJ McKenna: Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 83: 2795-2801, 1994
39. Hannum C, J Culpepper, D Campbell, T McClanahan, S Zurawski, JF Bazan, R Kastelein, . Hudak, J Wagner, J Mattson: Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 368: 643-648, 1994.
40. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG Nadler LM. The critical role of CD28 signaling in the prevention of human T-cell anergy *Res Immunol* 146: 140-149 1995. Hirano N, Takahashi T, Takahashi T, Ohtake S, Hirashima K, Emu N, Saito K, Hirano M, Shinohara K, Takeuchi M, Taketazu F, Tsunoda S, Ogura M, Expression of costimulatory molecules in human leukemias. *Leukemia*. 10: 1168-1176, 1996
41. McKenna HJ, P de Vries, K Brasel, SD Lyman, DE Williams. Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 86: 3413-3420, 1995
42. Broxmeyer HE, L Lu, S Cooper, L Ruggieri, ZH Li, and SD Lyman: Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp Hematol* 23: 1121-1129, 1995
43. Takahira H, SD Lyman, HE Broxmeyer: Flt3 ligand prolongs survival of CD34+ human umbilical cord blood myeloid progenitors in serum-depleted culture medium *Ann Hematol* 72: 131-135, 1996
44. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ: Dramatic increase 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
45. Broxmeyer HE. Interaction of colony stimulating factors, other modulating cytokines and hematopoietic progenitor cell. Laboratory and clinical studies. *Leukemia* 6: 38-40, 1992
46. Prickett TCR, Hart DNJ : Anti leucocyte comm-on(CD45) antibodies inhibit dendritic cell stimulation of CD4 and CD8 T lymphocyte proliferation. *Immunology* 69: 250-256, 1990
47. Kuntz-Crow M, Kunkel HG: Human dendritic cell: Major stimulatory of autologous and allogenic MLR. *Clin Exp Immunol* 49: 338-345, 1982
48. 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: 975-983, 1996
49. Santiago-Schwarz F, Coppock DL, Hinburg AA, Kern J: Identification of a malignant counterpart of the Monocyte-dendritic cell progenitor in acute myeloid leukemia. *Blood* 84: 3054-3062, 1994
50. Gribben JG, Guinan EC, Boussiotis VA, Ke XY, Linsley L, Sieff C, Gray GS, Freeman GJ, Nadler LM. Complete blockade of B7 family-mediated costimulation is necessary to induce human alloantigen-specific anergy: a method to ameliorate graft-versus-host disease and extend the donor pool. *Blood*. 87: 4887-4893, 1996
51. Costello RT, Mallet F, Santy D, Maraninchi D, Gastaut JA, Olive D. Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition.. *Eur J Immunol* 28: 90-103, 1998
52. Law CL, Wormann B, LeBien TW. Analysis of expression and function of CD40 on normal and leukemic human B cell precursor. *Leukemia* 4: 732-738, 1990
54. Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, Popat U, Claxton DF: Use of leukemic dendritic cell for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 89: 1133-1142, 1997
55. Tjoa B, Erickson S, Barren III R, Ragde H, Kenny G, Boynton A, Murphy G: In vitro propagated dendritic cells from prostate cancer immunotherapy . *prostate* 27: 63-69, 1995
56. Nestle FO, Alijagic S, Gillet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D: Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med* 4: 328-332, 1998
57. Reichardt VL, Okada CY, Liso A, Benike CJ, Stockerl-Goldstein KE, Engleman EG, Blume KG, Levy R. Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study. *Blood* 93: 2411-2419, 1999
58. Hsu FJ, Benike F, Fagnoni : Vaccination of patients with B cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med* 2 : 52-58, 1996
59. Brugger W, Brossart P, Scheduling S, Stuhler G, Heinrich K, Reichardt V, Grunebach F, Buhring HJ, Kanz L. Approaches to dendritic cell-based immunotherapy after

- peripheral blood stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 872: 363-371. 1999
60. Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, Kaplan G: Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med* 155:1172-1187, 1982
60. Eljaafari A, Farre A, Duperrier K, Even J, Vie H, Michallet M, Souillet G, Catherine Freidel A, Gebuhrer L, Rigal D. Generation of helper and cytotoxic CD4+T cell clones specific for the minor histocompatibility antigen H-Y, after in vitro priming of human T cells by HLA-identical monocyte-derived dendritic cells. *Transplantation* 71: 1449-1455, 2001
62. Oehler L, Berer A, Kollars M, Keil F, Konig M, Wac-lavicek M, Haas O, Knapp W, Lechner K, Geissler K. Culture requirements for induction of dendritic cell differentiation in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 79: 355-362, 2000
63. Brugger W, Schneider A, Schammann T, Dill P, Grun-ebach F, Buhring HJ, Kanz L, Brossart P. Dendritic cell-based vaccines in patients with hematological malignancies. *Ann N Y Acad Sci.* 938: 359-362, 2001