



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

마우스 비장세포의 증식과 생존율에  
대한 BCG-CWS의 면역자극 효과

濟州大學校

獸醫學科

李 濟 旭

2012年 2月

# 마우스 비장세포의 증식과 생존율에 대한 BCG-CWS의 면역자극 효과

指導教授 朱 洪 球

李 濟 旭

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2012年 2月

高銀珠의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長\_\_\_\_\_ (印)

委 員\_\_\_\_\_ (印)

委 員\_\_\_\_\_ (印)

濟州大學校 大學院

2012年 2月

초록

# 마우스 비장세포의 증식과 생존율에 대한 BCG-CWS의 면역자극 효과

(지도교수: 주홍구)

이제욱

제주대학교 대학원 수의학과

세균의 세포벽을 구성하는 cell-wall skeleton(CWS)은 면역을 자극하고 생체 내에서 분해가능한 입자성 adjuvant로서 암환자의 면역치료에 사용되어 왔다. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin의 CWS(BCG-CWS)는 백신에 사용되고 있는 adjuvant로, 강한 효능과 안전성 있다고 알려져 있다. BCG-CWS에 대한 많은 연구가 수행되고 있지만, 비장세포에 BCG-CWS가 미치는 영향에 대한 연구는 미비한 실정이다. 우리는 MTT assay와 trypan blue exclusion test를 통해 BCG-CWS가 비장세포의 분열능력과 생존율을 매우 강화시킨다는 것을 알아내었고, 현미경관찰에서도 분열능력을 입증해 주는 다수의 세포무리를 목격하였다. 비장의 어떠한 세포가 어떻게 증식되었는지 유세포분석을 통하여 BCG-CWS는 CD4<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> T 림프구가 아닌 CD19<sup>+</sup> B 림프구에서 분열능력을 상승시킨다는 것을 알 수 있었다. BCG-CWS는 bcl-2, bcl-xL과 같은 anti-apoptotic molecules을 대조군에 비해 많이 발현시켰으며, 세포의 활성을 높여주는 IL-2와 같은 사이토카인의 작용과 관련된 림프구 활성화 마커인 CD25, CD69를 표면발현을 굉장히 높였다. 또한 항원특이적인 면역반응에 대해서는 BCG-CWS를 처리하였을 때 항원특이적인 세포분열이 더욱 증가되고 interferon-gamma와 같은 T

helper 1 면역반응에 중요한 cytokine의 생산이 증가되었다. 따라서 BCG-CWS는 항원비특이적, 항원특이적인 림프구의 분열능력과 생존능력을 향상시키며 주요 사이토카인의 생산을 상승시킴으로써 백신 adjuvant가 될 수 있을 것으로 기대된다.

**Keywords:** BCG-CWS, adjuvant, vaccine, Spleen cell, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> lymphocyte immune responses.

## Abstract

# Immunostimulatory Effects of BCG–CWS on the Proliferation and Viability of Mouse Spleen Cells

Supervised by professor Hong–Gu Joo

Che–Wook Lee

College of Veterinary Medicine,  
Graduate school,  
Jeju National University

Mycobacterial cell–wall skeleton (CWS) is an immunoactive and biodegradable particulate adjuvant and has been used for immunotherapy in patients with cancer. The CWS of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin (BCG–CWS) was studied as a universal vaccine vehicle for antigen conjugation, to develop potentially effective and safe vaccine. Although a variety of biological activities of BCG–CWS have been studied, the effects of BCG–CWS on spleen cells are not fully elucidated. We investigated the effect of BCG–CWS on the viability and proliferation of spleen cells. Using MTT solution and trypan blue solution, we found that

BCG-CWS significantly enhanced viability and proliferation. Multiple clusters, indicating proliferation, were observed in BCG-CWS-treated spleen cells and surface marker staining assay revealed that BCG-CWS promoted proliferation from CD19<sup>+</sup> B lymphocyte rather than CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T lymphocyte. In addition, BCG-CWS up-regulated the expression of anti-apoptotic molecules such as bcl-2, bcl-xL. BCG-CWS increased the surface expression of CD25 and CD69 as well as production of IL-2 from spleen cells, suggesting increased activation. Also, BCG-CWS can induce antigen-specific cell proliferation and interferon-gamma production of spleen cells. Taken together, these results demonstrate that BCG-CWS increases the viability and proliferation of spleen cells via multiple mechanisms, valuable information for broadening the use of BCG-CWS in clinical and research settings. It is thus suggested based on these data that BCG-CWS can be an effective vaccine adjuvant to induce antigen-nonspecific and specific lymphocyte proliferation and viability and produced cytokines in the spleen cells.

**Keywords:** BCG-CWS, adjuvant, vaccine, Spleen cell, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> lymphocyte immune responses.

## 목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료	및 방법	-----	3
III. 결	과	-----	6
IV. 고	찰	-----	15
V. 참	고 문 헌	-----	19



## I. 서론

공중보건적이나 경제적인 관점에서 질병은 치료하는 것보다, 예방하는 것이 더 효율적이다. 질병예방의 목적으로 백신이 개발된 이래, 현재까지 백신은 질병을 예방하는데 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있다. 백신은 체내 면역계의 메모리 기능을 이용하여 같은 병원체에 감염되었을 때, 면역반응을 더 빠르고 강하게 상승시켜준다. 이러한 백신은 백신항원과 adjuvant를 주요 구성으로 하고 있는데, 백신항원은 목적하는 질병의 원인체에 대해 역할을 담당하며, adjuvant는 이러한 백신항원의 효능을 높이는 역할을 한다.

이러한 adjuvant로써 가장 널리 사용되고 있는 것은 지난 aluminum compound인 alum이다 [1]. Alum은 백신항원을 흡착하여 체내에서 존재하는 기간을 연장하고 항원을 항원제시세포가 탐식하기 좋도록 수용성항원을 입자성 물질 형태로 변화시키며 [2], 항원을 탐식하는 항원제시세포를 활성화시킨다 [3-5]. 하지만 alum은 세포매개성 면역을 일으키는 능력이 약하고 T helper(Th) 1 면역반응이 미비하다 [1]. 이 때문에 결핵, 티푸스, 브루셀라와 같이 세포내에 침입하여 증식하는 병원성 미생물에 대해 기능이 약한 단점을 가지고 있다. 또한 alum은 부작용으로 피하 또는 피내 접종 시 접종부위에 육아종을 형성할 수 있으며 [6, 7], IgE 생산을 증가시켜 allergenicity를 발생시킬 수 있다. 또한 신경독성을 가지고 있으며 신장기능 저하된 환자에서는 aluminum이 체내에 축적되면 독성으로 작용할 수 있다. [8-10].

이러한 문제점이 있음에도 가장 많이 사용되고 있는 이유는 현재까지 이러한 문제점을 안정적으로 보완되었다고 인정되는 adjuvant의 개발이 미흡하기 때문이다. 따라서 안전하고 안정적인 면역반응을 균형있게 일으킬 수 있는 adjuvant의 개발이 필요하며 현재까지 더 안전하고 효율적인 백신개발을 위한 연구가 많이 이루어지고 있다 [11, 12].

*Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin*(BCG)는 결핵환자에 백신으

로 안정적으로 사용되어왔다 [13-15]. 마이코박테리아의 세포벽은 항원제시 및 inflammatory cytokines을 높은 수준으로 발현시키는 강한 면역원성물질로, 면역 반응을 높은 수준으로 발현시킨다 [16, 17]. 그리하여 마이코박테리아는 세포독성 T 림프구와 자연살해세포의 활성화와 항체생산을 증가시키기 위한 adjuvant로 종종 사용되었다. 특히 BCG의 세포벽 구성물질인 cell wall skeleton(CWS)는 mycolic acid와 arabinogalactan 그리고 peptidoglycan complex가 공유결합으로 이루어진 강한 면역원성을 가진 구조물로, 강한 선천면역을 일으키기 위한 목적으로 Freund's adjuvant와 함께 사용되었다 [18-21]. BCG-CWS를 adjuvant로 사용하였을 때 효율적으로 항체생산을 유도하였고, 세포독성 T 림프구의 증식을 향상시켰고, 항종양효과를 나타내었다 [22, 23]. 이러한 BCG-CWS의 임상적 효능은 종양에 대한 면역치료물질로 많은 연구가 이루어지고 있다 [24, 25]. 또한 BCG-CWS는 수지상세포에 미생물과 결합할 수 있는 Toll-like receptor 2 (TLR2)와 Toll-like receptor 4 (TLR4)의 발현을 증가시켜 수지상세포를 활성화시키는 역할도 수행한다 [19, 26].

비장은 림프구와 몇몇 면역세포로 구성되어 있는 중요한 면역기관이다. 비장은 혈액에서 유래된 항원에 대한 면역반응을 하며, 노화된 세포 및 손상된 세포를 제거하는 역할도 수행한다. 비장은 적혈구를 저장하고 혈액에 존재하는 항원을 인식하는 적색질과 주로 림프구로 이루어져 면역반응의 주된 기능을 하는 백색질로 구성되어 있다. 신체내의 기관 중 비장은 면역에 관련된 주요한 기능을 수행하고 있음에도, BCG-CWS가 비장에 미치는 영향에 관한 연구는 미흡한 상태이다.

따라서 본 연구는 마우스의 비장세포에 BCG-CWS를 처리하여 비장세포의 분열 능력과 생존능력 그리고 면역활동과 관련된 주요 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 주는가에 대해 알아보고 비장세포가 특이면역화된 상태에서 BCG-CWS가 도움이 되는 역할을 하는지 확인하여 이를 바탕으로 adjuvant로서 BCG-CWS의 가능성을 가늠해 보기 위한 바탕이 되고자 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 실험동물 및 시약

모든 실험에 ORIENT BIO에서 구입하여 제주대학교 수의약리학실험실에서 유지된 7-12 주령의 Balb/c 마우스를 사용하였다. 동물실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 시행되었으며 제주대학교 동물실험윤리지침을 준수하였다. BCG-CWS는 충남대학교 의과대학에서 제공받아, sterile phosphate-buffered saline (PBS)에 녹여 사용하였다.

### 세포의 준비 및 배양

마우스의 비장세포를 준비한 후 배양하는 실험은 이미 확립된 방법에 따라 실시했다 [27]. 간략히 설명하면, 마우스의 비장을 떼어내 물리적으로 분쇄시켜 세포를 얻었다. 저삼투압용액인 ammonium chloride potassium (ACK) lysis buffer를 이용하여 적혈구를 용혈시켜 제거한 후 5% fetal bovine serum (FBS)과 L-glutamine, penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI1640 배지에 세포를 풀어 T75 플라스크에 넣고 1시간동안 배양하여 대식세포와 같은 부착세포가 플라스크의 바닥에 부착되도록 하였다. 이 후 떠 있는 세포를 회수한 뒤 40  $\mu$ m cell strainer로 결합조직 등을 걸러내고 10% FBS와 L-glutamine, penicillin/streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acids, 2-mercaptoethanol이 첨가된 RPMI1640 배지를 이용해 96-well 또는 6-well culture plate에  $2 \times 10^6$  cells/ml로 비장세포를 넣어 배양하였다. 모든 세포배양 시 온도는 37°C, CO<sub>2</sub>의 농도는 5%를 유지하도록 하였다.

### 비장세포의 분열능력과 생존능력의 측정

96 well culture plates에 비장세포를  $4 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l/well로 seeding 하고 BCG-CWS를 농도별로 처리하여 3일간 배양한 후 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) solution과 trypan blue exclusion test로 분열능력과 생존능력을 평가하였다. MTT assay를 위해서 배양한 세포에 10 mg/ml MTT solution를 10  $\mu$ l/well

로 처리하여 4시간동안 37°C에서 배양을 한 후, 다시 10% sodium dodecyl sulfate를 100  $\mu$ l/well를 처리하여 2시간 37°C에서 배양 후 microplate reader (Molecular devices, Sunnyvale, CA) 사용하여, 570 nm - 650 nm의 흡광도에서 MTT assay로 분열능력을 평가하였다. 또한 배양 세포의 생존율을 알아보기 위해 trypan blue solution (Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 세포염색하여, 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 셸다. 배양된 비장세포의 사진은 inverted microscope (Olympus Co., Tokyo, Japan)에서 digital camera (Cannon Inc., Tokyo, Japan)를 연결하여 촬영하였다.

### 유세포분석

6-well culture plates의 각 well에 BCG-CWS를 농도별로 처리하여 3일간 배양 후 유세포분석을 하였다. 세포염색법은 이미 확립된 방법에 따라 실시했다 [28, 29]. 비장세포는 biotin-labeled anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD25 antibody를 1차항체로 처리하고 2차항체로 phycoerythrin (PE)를 처리하였다. CD69에 대한 항체로는 PE-labeled anti-CD69 antibody를 이용하였다 (all from BD Biosciences, San Jose, CA). 염색된 세포는 FACS Calibur<sup>TM</sup> 과 Cell Quest<sup>TM</sup> (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)을 이용하여 유세포분석을 실시하였다.

### ELISA를 이용한 cytokine의 측정

비장세포의 분열능력과 생존능력의 평가에서 기술한 방법으로 3일간 비장세포를 배양한 후 세포배양액을 걷어내어 IL-2와 IL-4의 생산량을 CytoSet<sup>TM</sup> kit (Invitrogen)를 이용해 측정하였다. Lipopolyssacharide (LPS)와 Concanavaline A (ConA)를 positive control로 사용하였다.

### OVA 특이적인 비장세포의 분열능력 평가

마우스에 마리당 20  $\mu$ g의 OVA를 20  $\mu$ l의 alum과 함께 복강내 접종을 하였다. alum에 OVA를 흡착시키기 위해 흡착시간을 30분 동안 두었다. 2주 후 접종된 마우스의 비장세포를 채취하여 5  $\mu$ M carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)로 10분간 염색한 후 OVA 1  $\mu$ g/ml와 함께 또는 없이 배양하였다. 4일 후

CFSE에 염색된 비장세포를 수거하여 PBS로 두 번 세척 후 유세포분석을 하였다. 림프구의 분열능력을 알아보기 위해 MTT assay를 실시했으며, ELISA를 이용하여 세포배양액을 수거하여 IL-4와 Interferon (IFN)-gamma를 측정하였다.

### Western blot analysis

비장세포에서 apoptosis에 관련된 단백질이 어떤 수준으로 발현되는 지 알아보기 위해 Western blot analysis를 실시하였다 [27]. 간략히 설명하자면, BCG-CWS가 처리된 비장세포를  $2 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 배양한 후에 PBS로 세척하여 실험에 사용하였다. Protease inhibitor로서 aprotinin과 leupeptin이 첨가된 WB lysis buffer를 세포에 첨가하여 10분간 저온보관하여 세포를 lysis 시킨 후 4°C 12,000 rpm에 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액은 Bradford's method에 따라 단백질 정량을 하였고, 나머지 상층액은 WB sample용으로 2x sample buffer와 동량으로 섞어 5분간 끓여 western blot sample을 만들었다. 단백질 정량 결과에 따라 동일한 양의 단백질을 Loading하였으며, 12% SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)용 gel에 140V에서 90분간 전기영동한 후, 400 mA에서 120분간 nitrocellulose membrane (Sigma)에 transfer하였다. transfer된 membrane을 다시 5% skim milk 20 ml에 넣어 실온에서 1시간 동안 교반하면서 blocking하고 1차 항체로 mouse anti-Bcl-2와 mouse anti-Bcl-xL을 5% skim milk에 500배, mouse anti-beta-actin을 10000배 희석하여 하룻밤 동안 반응 시켰다. 2차 항체로 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP)를 1000배 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 이에 다시 0.1% Tween-20이 첨가된 TBST로 15분씩 3번 washing한 후 암실에서 현상하였다.

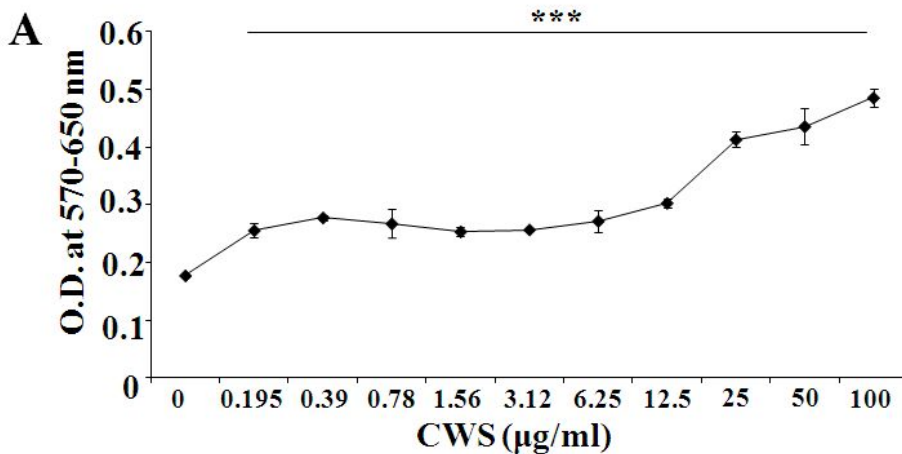
### 유의성분석

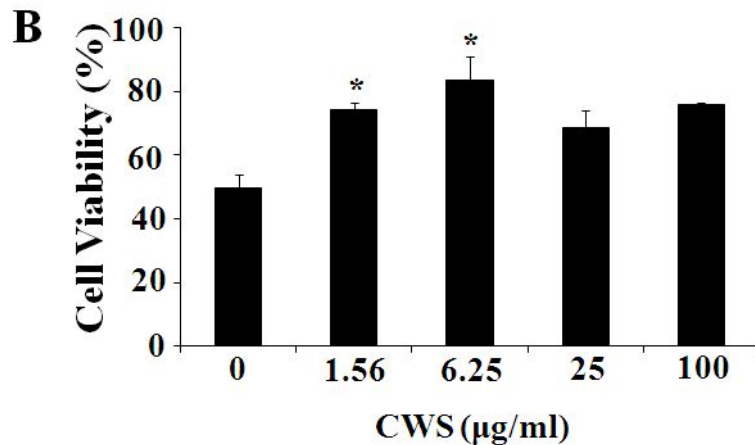
모든 data는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었으며 InStat software(Graphpad, San Diego, CA)를 이용하여 student t test를 통해 분석하였다. 0.05미만의 *p* value를 유의성이 있다고 판정하였다.

### III. 결과

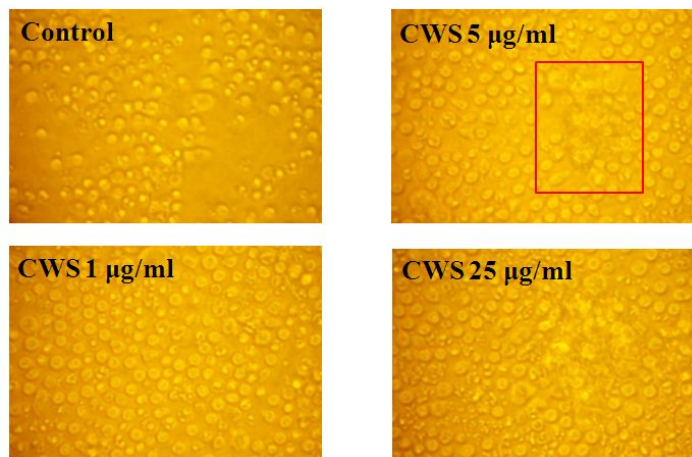
#### 비장세포의 분열능력과 생존율에 대한 BCG-CWS의 효과

비장세포의 분열능력과 생존율에 대한 BCG-CWS의 효과를 알아보기 위해, MTT assay와 trypan blue exclusion test를 사용하였다. 0-100  $\mu\text{g/ml}$ 의 BCG-CWS를 처리한 비장세포를 3일간 배양 후, 흡광도를 측정하였다. 이 결과, 3.12-100  $\mu\text{g/ml}$ 의 CWS를 처리한 비장세포의 증식율이 증가되었다(Fig. 1A). 비장세포의 생존율에 관한 CWS의 효과를 알아보기 위하여 trypan blue staining을 실시하였고, 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 높은 생존율을 보였다(Fig. 1B). 비장세포의 증식율에 대한 또 다른 증거를 확보하기 위하여 증식된 비장세포의 cluster를 inverted microscope로 확인하여 디지털카메라로 촬영을 하였다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 BCG-CWS가 T 림프구와 B 림프구를 포함한 비장세포에 면역원성으로 작용한다는 것을 말해준다. T 림프구와 B 림프구가 BCG-CWS에 대한 분열능력이 어떠한 지에 대해 세포표면염색을 하였고, CD19<sup>+</sup> B 림프구가 CD4<sup>+</sup> 그리고 CD8<sup>+</sup> T 림프구보다 더 높은 분열능력을 보인다는 것을 알게 되었다 (Fig. 3).



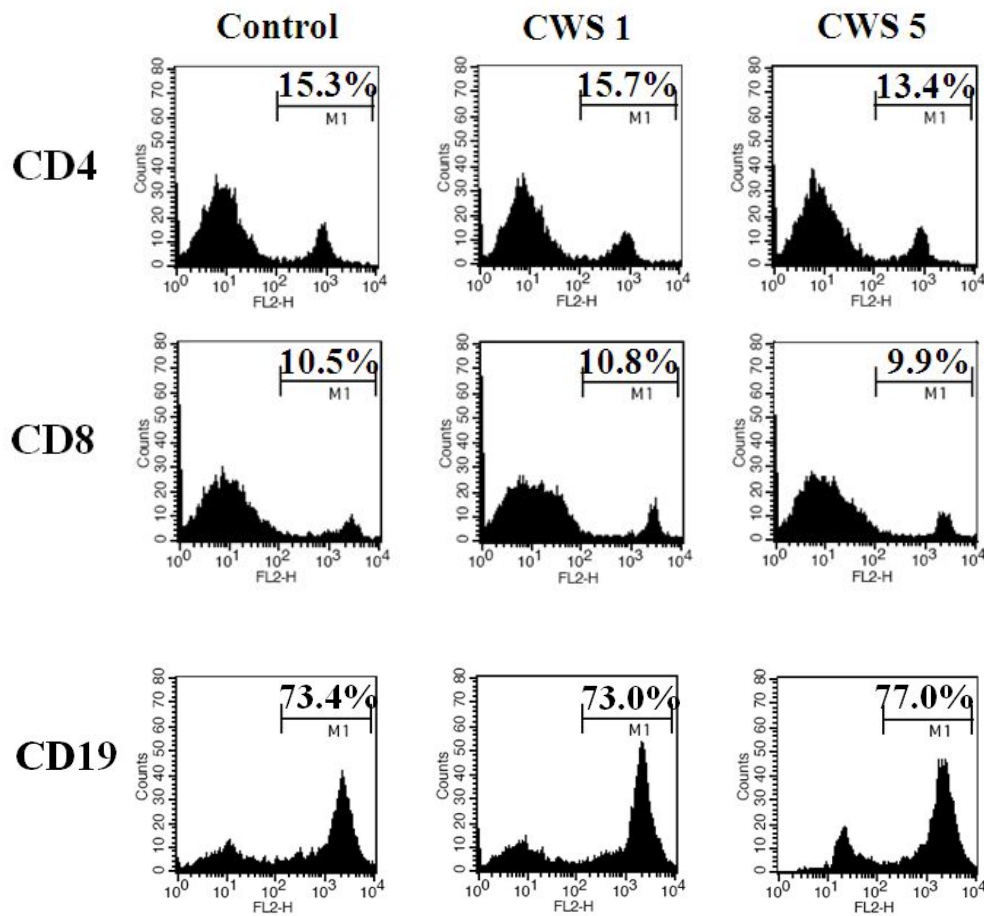


**Fig. 1.** Effect of BCG–CWS on the proliferation/viability of spleen cells. The spleen cells were cultured at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l/well in 96–well culture plates and treated with 0–100  $\mu$ g/ml BCG–CWS. After 3 days, (A) Proliferation assay using MTT solution, and (B) Trypan blue exclusion test were performed. Data are mean  $\pm$  SD from three or four individual wells.



**Fig. 2.** Proliferating clusters in BCG–CWS–treated spleen cells. Spleen cells were cultured as described in Fig. 1, and treated with medium alone, 1 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml or 25 $\mu$ g/ml CWS for 3 days. Cell morphology was observed using an inverted microscope and the image was obtained by a digital camera.



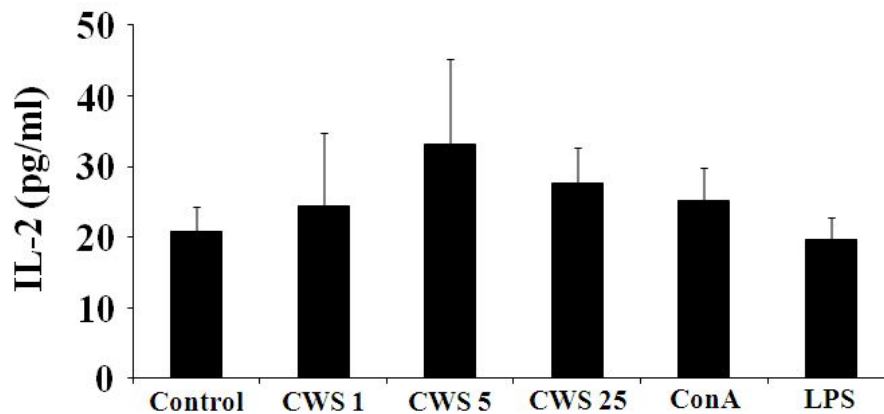


**Fig. 3.** Selective proliferation of CD19+ B lymphocytes by BCG–CWS treatment. Spleen cells were cultured at a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/5 ml/well in 6–well culture plates with medium alone or 1  $\mu\text{g/ml}$  or 5  $\mu\text{g/ml}$  BCG–CWS for 3 days. After harvesting, the cells were labeled with surface marker–specific antibodies. The numbers indicate the percentage of positive cells of a specific subset.



### BCG-CWS에 영향받은 비장세포의 사이토카인 생산량

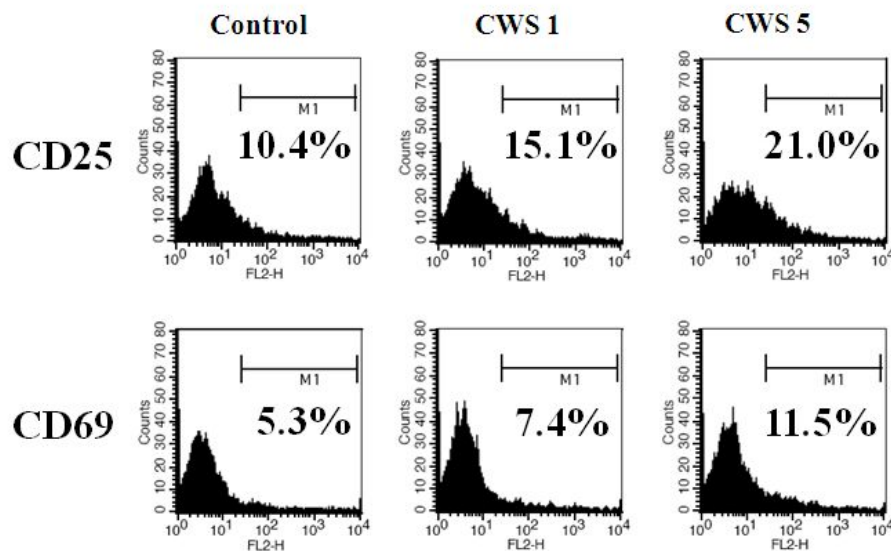
일반적인 면역반응에서 클론확장을 포함한 림프구의 증식이 아주 중요하다 [30, 31]. IL-2는 림프구 확장에 주요한 사이토카인이다. BCG-CWS가 림프구 성장에 관여하는 사이토카인의 생산에 관여하는 지 알아보기 위해, BCG-CWS가 처리된 비장세포의 세포배양액에서 IL-2와 IL-4를 측정하였다. IL-2의 생산량은 BCG-CWS의 농도와 비례하여 증가하였다(Fig. 4). 하지만 동일한 세포배양액에서 IL-4는 측정되지 않았다(data not shown). 이러한 결과로 CWS는 림프구의 IL-2 생산량을 증가시킨다고 볼 수 있다.



**Fig. 4.** Spleen cells were cultured as described in Fig. 1 and treated with the indicated concentrations of BCG-CWS. After 3 days of treatment, the supernatants were collected and IL-2 was quantified. Data are mean  $\pm$  SD from four individual wells.

### BCG-CWS에 의한 비장세포의 면역관련 표면인자 발현 변화

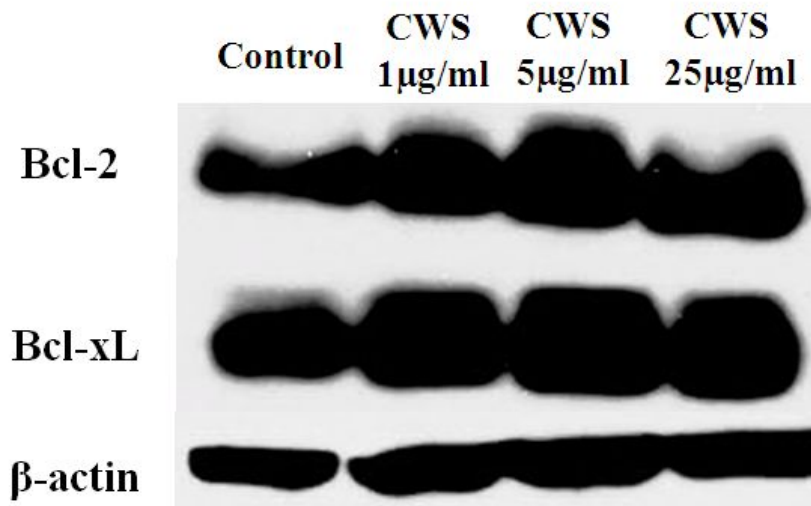
림프구의 활성화에 BCG-CWS의 영향을 알아보기 위하여, BCG-CWS가 처리된 비장세포에서의 CD25, CD69 표면인자의 발현을 평가해 보았다. CD25는 IL-2 수용체의 알파체인으로 림프구가 IL-2에 대해 더욱 민감하게 반응하도록 해주며 CD69는 림프구의 early-activation marker이다 [32]. 5  $\mu\text{g/ml}$ 의 BCG-CWS를 처리한 비장세포에서 양 표면인자의 발현이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 BCG-CWS는 IL-2와 같은 림프구의 활성을 증가시키는 사이토카인에 대해 민감하게 반응할 수 있도록 해당표면인자를 증가시켜준다.



**Fig. 5.** Enhanced expression of activation markers on spleen cells treated with BCG-CWS. Spleen cells were cultured as described in Fig. 3. Following BCG-CWS treatment, spleen cells were harvested and stained with CD25 and CD69, activation markers of lymphocyte. The number of histograms indicates the percentage of highly expressed cells.

### BCG-CWS에 의한 비장세포의 자연사관련분자 발현의 변화

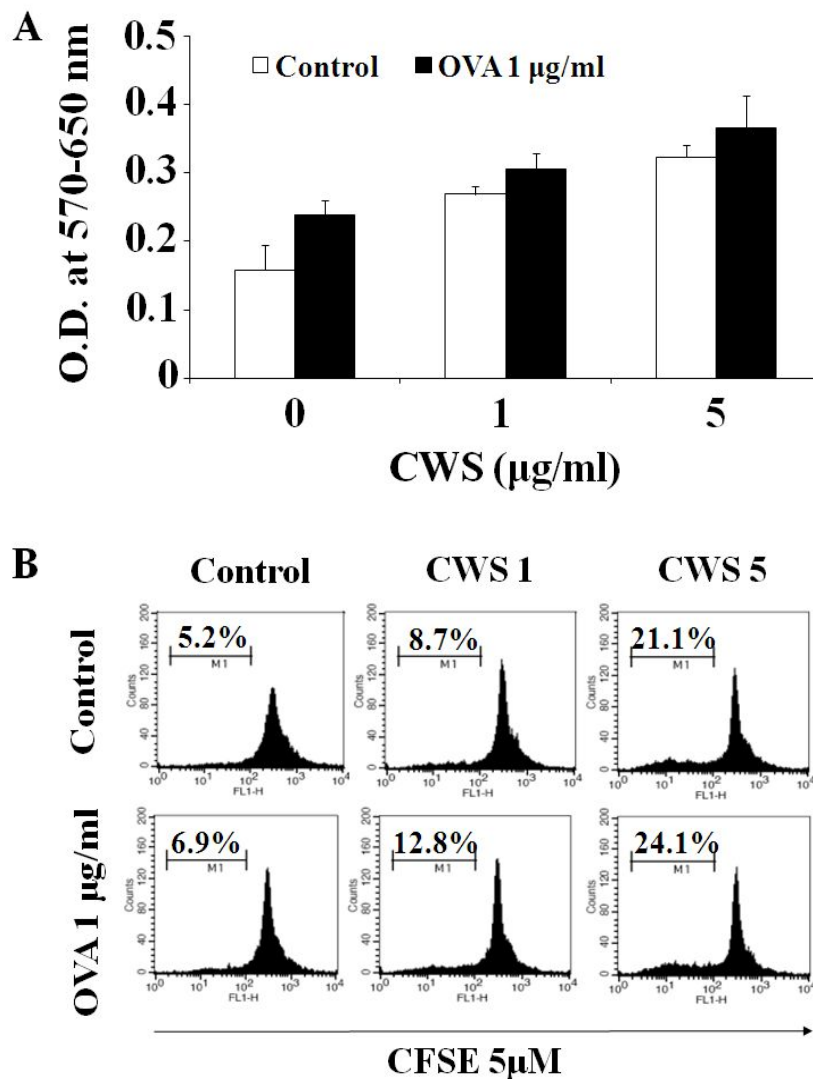
자연사를 포함한 세포사는 세포사관련분자에 의해 엄격하게 조절된다 [33]. Bcl-2와 bcl-xL는 세포의 미토콘드리아에서 생성되는 자연사를 방어해주는 분자로 알려져 있다 [34]. BCG-CWS가 비장세포의 자연사를 얼마나 방어하는 지 알아보기 위해 BCG-CWS가 처리된 비장세포에서 bcl-2와 bcl-xL의 생성정도를 western blot analysis를 통하여 알아보았다(Fig. 6). BCG-CWS는 bcl-2와 bcl-xL 양쪽 분자를 모두 증가시켰고 이는 비장세포의 세포사를 높은 수준에서 억제하고 있다는 것을 제시한다.



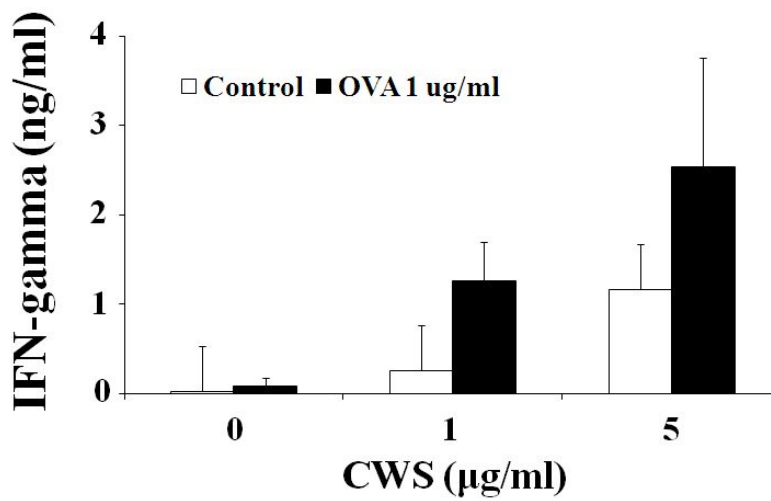
**Fig. 6.** Upregulated expression of the anti-apoptotic molecules bcl-2 and bcl-xL following BCG-CWS treatment. Spleen cells were setup as described in Fig. 3 and Western blot analysis was performed.

### OVA 자극에 의해 면역된 비장세포의 분열능력과 cytokine 생산

항원특이적 면역반응에 BCG-CWS의 효과를 알아보기 위해, 마우스 마리당 20  $\mu\text{g}$ 의 OVA와 20  $\mu\text{l}$ 의 alum를 복강주사하였다. 2주 후, 비장세포를 배양하여 CFSE로 염색하였고 OVA를 투여하지 않은 마우스와 투여한 마우스의 비장세포에 BCG-CWS를 처리하여 4일 동안 배양하였다. MTT assay를 통하여 비장세포의 분열능력을 측정하였다(Fig 7A). 면역된 비장세포는 CWS 농도에 따라 분열능력이 높아진 것으로 나타났다. BCG-CWS를 처리한 비장세포에 CFSE염색을 하여 유세포분석을 한 결과, OVA 자극에 의해 면역된 비장세포에서 BCG-CWS에 의해 분열능력이 증가한 것으로 나타났고(Fig. 7B), 이는 fig. 3에서 나타난 것 처럼 특히 CD19<sup>+</sup> B 림프구가 증가된 것으로 보인다. 하지만 세포매개성 면역반응에 관여하는 IFN- $\gamma$ 도 BCG-CWS의 농도에 비례하여 증가하였다(Fig. 8).



**Fig.7.** Proliferation of OVA-immunized spleen cells by BCG-CWS treatment (A) Proliferation assay using MTT solution, in which OVA-immunized spleen cells were treated with 0–5  $\mu\text{g/ml}$  BCG-CWS for 4 days. Data are mean  $\pm$  SD from four individual wells. (B) OVA-immunized spleen cells stained with CFSE were cultured in 96-well culture plates with medium alone, 1  $\mu\text{g/ml}$  or 5  $\mu\text{g/ml}$  BCG-CWS for 4 days. After harvesting, the cells were analyzed by flow cytometry. The numbers of histograms are percentage of proliferating cells.



**Fig.8.** Increased production of IFN-gamma by OVA-immunized spleen cells with BCG-CWS treatment. OVA-immunized spleen cells were cultured described in Fig. 7 and treated with or without the indicated concentrations of BCG-CWS. After 4 days of treatment, the supernatants were collected and IFN-gamma was quantified. Data are mean  $\pm$  SD from four individual wells.

## IV. 고찰

가장 많이 사용되고 있는 adjuvant인 alum을 포함하여, 현재까지 개발된 adjuvant는 독성과 안정성, 면역유도 효과 등에서 문제점을 가지고 있다. 따라서 안전하고 안정적인 면역반응을 균형있게 일으킬 수 있는 adjuvant의 개발이 필요하다. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin(BCG)는 결핵환자에 백신으로 안정적으로 사용되었으며 [13-15], BCG-CWS는 심한 부작용없이 치료적 목적으로 결핵환자와 암환자에 adjuvant로 사용되어 왔다 [35]. BCG-CWS는 항체 생산을 강하게 유도하며, 세포독성 T 림프구의 분열능력을 향상시키어, 암환자의 치료에 사용되었다 [22, 23]. 우리는 BCG-CWS에 반응한 비장의 림프구가 어떠한 반응을 보이는지와 사이토카인 생산의 양상 그리고 세포자연사에 대해 어떠한 효과를 보이는지 알아보기로 했다.

비장은 T 림프구, B 림프구를 포함해 자연살해세포, 대식구와 수지상세포등으로 구성되어 있으나, 실험에 쓰인 비장세포는 준비과정에서 대식세포와 같은 부착세포를 제거하여 대부분 림프구로 구성된 세포를 사용하였다. BCG-CWS는 비장세포의 분열능력과 생존능력을 향상시켰다. 우리는 BCG-CWS가 어떠한 림프구에 분열능력을 강화시키는지 확인해보기 위하여 BCG-CWS가 처리된 비장세포에 세포표면염색을 한 후 유세포분석을 하였더니, CD19<sup>+</sup> B 림프구가 분열능력이 크게 향상되었고 CD4<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> T 림프구는 분열능력향상이 미비하였다. BCG-CWS에 의해 자극된 비장세포에서 CD19<sup>+</sup> B 림프구가 특히 증가되는 것은 BCG-CWS가 체액성면역반응을 상승시켜주는 것으로 추측된다. 그러나 이러한 것이 BCG-CWS가 IgG의 Isotype을 생산하게 하여 상승하는 것인지, 또는 antigen-specific IgG의 생산을 증가시킨 것인지 확실하지는 않다. 이러한 의문점은 앞으로 계속 연구되어야 할 것이다.

림프구는 면역기능을 나타내는 작동세포로 여러 면역반응에 주요한 기능을 수행하기 위해서는 효과적인 면역반응을 나타내도록 반드시 충분한 분열증식을 해야 한다. IL-2는 면역세포의 증식과 분화를 촉진시키는 사이토카인이다. BCG-CWS는

IL-2 수용체의 알파체인인 CD25의 표면발현을 증가시키어 비장세포를 CD25를 통하여 IL-2에 민감하게 작용하도록 해준다. 우리는 BCG-CWS가 비장세포의 분열능력을 증가시키는 또 다른 기전을 확인해보기 위해 BCG-CWS가 처리된 비장세포에서 표면인자염색을 하여 CD25, CD69 표면인자의 발현을 평가해 보았다. fig. 5에서 알 수 있듯이 BCG-CWS는 비장세포의 림프구에서 CD25와 CD69의 발현을 증가시켰다. 또한 BCG-CWS는 배양된 비장세포에서 CD25의 배위자인 IL-2의 생산에 대해 알아본 결과로는 fig. 4에서 보았듯이 IL-2의 생산을 증가시켰다. 이러한 결과는 BCG-CWS가 IL-2 수용체의 알파체인인 CD25의 발현과 IL-2의 생산량을 증가시켜 비장세포가 CD25를 통하여 IL-2에 양적으로 반응력을 상승시키기 때문에, 결과적으로 BCG-CWS가 클론확장을 비롯한 림프구의 분열능력을 증가시키는 것으로 생각할 수 있다.

림프구의 분열증식이 면역반응에 중요하다는 뜻은 그만큼 작동세포로 작용할 수 있는 림프구가 양적으로 중요하다는 의미이기 때문에, 림프구의 생존력도 면역반응에 중요한 측면이 된다할 수 있다. 배양된 비장세포는 생존에 필요한 요인이나 성장요소들이 결핍되기 시작하면 자연사의 상태로 들어가기 때문에 우리는 BCG-CWS를 처리하거나 처리하지 않은 비장세포로 fig. 1과 fig. 2에서와 같이 생존능력을 비교, 평가할 수 있었다. 우리는 BCG-CWS가 림프구의 생존율을 어느 정도 상승시킨다는 결과를 알아내고 BCG-CWS가 어떻게 배양된 비장세포의 생존율을 증가시키는 지 확인하기 위하여, anti-apoptotic molecules인 bcl-2과 bcl-xL의 발현정도를 확인하기 위해 western blot analysis를 수행하였다. 그리하여 fig. 6에서 보듯이 bcl-2과 bcl-xL가 BCG-CWS에 의해 높게 발현된다는 것을 알아냈다. 따라서, BCG-CWS는 분열능력뿐만 아니라 생존율도 상승시켜 작동세포를 양적인 측면에서 효과적인 면역작용을 일으킬 수 있을 것이라 생각할 수 있다.

BCG-CWS의 adjuvant로서의 효능을 알아보기 위해서 표준항원인 OVA를 사용하여 항원특이면역반응을 알아보았다. OVA로 면역화 된 비장세포에 BCG-CWS를 처리하거나 처리하지 않고 배양하였다. Fig. 7에서 볼 수 있듯이 OVA로 면역화된 마우스의 비장세포에 BCG-CWS를 처리하지 않은 것보다, BCG-CWS를 처리한



것이 더 높은 분열능력을 나타내었다. 즉 면역화된 세포에서 BCG-CWS는 OVA 특이적인 면역반응을 향상시킬 수 있다는 것을 알 수 있다. 이러한 실험결과는 BCG-CWS가 adjuvant로서 사용될 때 비장세포의 면역기전을 더욱 활성화시킬 수 있을 것이라 예상해 볼 수 있다.

비록 BCG-CWS가 B 림프구의 분열능력을 향상시키고 T 림프구의 분열능력에 큰 영향을 주지는 못 하였지만, BCG-CWS는 암환자와 알러지환자의 치료와 세균백신의 adjuvant로 사용되었을 때에 Th-1 세포에 영향을 미치는 것으로 알려졌다 [24, 35, 36]. Interferon-gamma (IFN-gamma)는 T 림프구 및 자연살해세포에 의해 생산되는 사이토카인으로 선천면역반응과 세포매개 적응면역반응 모두에서 큰포식세포를 활성화하는 것을 주된 기능으로 가진다. 또한 많은 세포에서 항원제시를 조절하는 면역관계에서 중요한 역할을 하는 사이토카인이다 [37]. 우리는 BCG-CWS가 비장에 존재하는 T 림프구에 얼마나 영향을 주는 지 알아보기 위해, OVA로 면역화된 비장세포를 배양하여 BCG-CWS를 처리한 후, IFN-gamma의 생산을 알아보았다. Fig. 8에서와 같이 BCG-CWS는 농도에 비례하여 IFN-gamma의 생산량을 증가시켰고, OVA로 *in vitro*에서 재자극 받은 세포에서 그 생산량이 더욱 증가되어 나타났다. 이는 BCG-CWS가 비장세포에서는 T 림프구의 분열능력을 향상시키지는 못 했지만, 활성화를 향상시키는 면에서는 가능성을 나타낸 것이라 볼 수 있다. 또한 BCG-CWS에 의해 생성된 IFN-gamma 역시 여러 경로를 통하여 면역 활동을 자극시킬 것이다 [35, 38].

기존 백신 adjuvant의 단점들을 보완하기 위해, 여러 물질들이 연구되고 있는 가운데 BCG-CWS는 이러한 연구대상 물질 중에 하나이고, 이미 임상적으로 BCG는 결핵균에서는 백신으로서 사용되어 왔으며, BCG-CWS는 암치료에 adjuvant로서 사용되고 있다. 하지만, BCG-CWS에 대한 연구 중, 체내 주요 면역기관인 비장에서 어떠한 반응을 일으키는가에 대한 결과는 미비한 실정이었다. 실험결과를 종합했을 때, 비장세포에서 BCG-CWS는 명백히 B 림프구의 분열능력을 증가시켰으며, 림프구의 생존율을 향상시켰다. IL-2와 IFN-gamma와 같은 주요한 사이토카인의 생산능력을 향상시켰고 CD25와 CD69와 같은 면역활성에 관련된 표면인자의 발현을 높였다. 이러한 결과는 비장에서 BCG-CWS가 면역력을 강화시키고 체

액성면역반응뿐만 아니라 세포성면역반응에도 기여하는 효과가 있을 가능성을 보여 준다. 물론 기존 adjuvant가 가지는 단점을 어느 정도 효율적으로 보완하고 있는지와 항체생산능력이 평가되어야 할 것이고, 표준항원이 아닌 실제 병원성 항원과 함께 적용하는 실험 등이 앞으로 계속 되어야 adjuvant로서의 실용성을 증명할 수 있을 것이다.

## V. 참고문헌

1. Mbow ML De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2010, 22(3), 411–416.
2. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 2009, 21(1), 23–29.
3. Goto N, Akama K. Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum-adsorbed tetanus toxoid. *Microbiol Immunol.* 1982, 26(12), 1121–1132.
4. Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, Yoshihara S. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine.* 1997, 15(12–13), 1364–1371.
5. Mannhalter JW, Neychev HO, Zlabinger GJ, Ahmad R, Eibl MM. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin Exp Immunol.* 1985, 61(1), 143–151.
6. Butler NR, Voyce MA, Burland WL, Hilton ML. Advantages of aluminium hydroxide adsorbed combined diphtheria, tetanus, and pertussis vaccines for the immunization of infants. *Br Med J.* 1969, 1(5645), 663–666.
7. Straw BE, MacLachlan NJ, Corbett WT, Carter PB, Schey HM. Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Can J Comp Med.* 1985, 49(2), 149–151.

8. **Audibert FM, Lise LD.** Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today.* 1993, 14(6), 281–284.
9. **Goto N, Kato H, Maeyama J, Eto K, Yoshihara S.** Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine.* 1993, 11(9), 914–918.
10. **Petrovsky N.** Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine.* 2006, 24(S2), 26–29.
11. **Posnett DN, Engelhorn ME, Lin Y, Merghoub T, Duan F, Wolchok JD, Houghton AN.** Development of effective vaccines for old mice in a tumor model. *Vaccine.* 2009 Feb 11;27(7):1093–100.
12. **Linnebacher M, Maletzki C, Emmrich J, Kreikemeyer B.** Lysates of *S. pyogenes* serotype M49 induce pancreatic tumor growth delay by specific and unspecific antitumor immune responses. *J Immunother.* 2008 Oct;31(8):704–13.
13. **Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F.** Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA.* 1994 Mar 2;271(9):698–702.
14. **Fine PE.** The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev Infect Dis.* 1989 Mar–Apr;11 Suppl 2:S353–9.
15. **Trunz BB, Fine P, Dye C.** Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis

and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006 Apr 8;367(9517):1173-80.

16. **Sugrue MM, Tatton WG.** Mitochondrial membrane potential in aging cells. 2001 May-Aug;10(3-4):176-88.

17. **Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F.** CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*. 2005 Mar;26(3):136-40.

18. **Okamoto M, Sato M.** Toll-like receptor signaling in anti-cancer immunity. *J Med Invest*. 2003 Feb;50(1-2):9-24.

19. **Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T.** Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin : involvement of toll-like receptors. *Infect Immun*. 2000 Dec;68(12):6883-90.

20. **Brennan PJ, Nikaido H.** The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:29-63.

21. **Azuma I, Ribi EE, Meyer TJ, Zbar B.** Biologically active components from mycobacterial cell walls. I. Isolation and composition of cell wall skeleton and component P3. *J Natl Cancer Inst*. 1974 Jan;52(1):95-101.

22. **Rhoades ER, Geisel RE, Butcher BA, McDonough S, Russell DG.** Cell wall lipids from *Mycobacterium bovis* BCG are inflammatory when inoculated within a gel matrix: characterization of a new model of the granulomatous response to mycobacterial components. *Tuberculosis (Edinb)*. 2005 May;85(3):159-76.

23. Azuma I, Seya T. Development of immunoadjuvants for immunotherapy of cancer. *Int Immunopharmacol*. 2001 Jul;1(7):1249–59.
24. Yamamura Y, Azuma I, Taniyama T, Sugimura K, Hirao F, Tokuzen R, Okabe M, Nakahara W, Yasumoto K, Ohta M. Immunotherapy of cancer with cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis*–*Bacillus Calmette–Guerin* : experimental and clinical results. *Ann N Y Acad Sci*. 1976;277(00):209–27.
25. Ochiai T, Sato H, Hayashi R, Asano T, Sato H, Yamamura Y. Postoperative adjuvant immunotherapy of gastric cancer with BCG–cell wall skeleton. 3– to 6–year follow up of a randomized clinical trial. *Cancer Immunol Immunother*. 1983;14(3):167–71.
26. Uehori J, Matsumoto M, Tsuji S, Akazawa T, Takeuchi O, Akira S, Kawata T, Azuma I, Toyoshima K, Seya T. Simultaneous blocking of human Toll–like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guerin peptidoglycan. *Infect Immun*. 2003 Aug;71(8):4238–49.
27. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin–3, a beta–galactoside–binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2001 Apr;69(4):555–64.
28. Kim HJ, Kim MH, Byon YY, Park JW, Jee Y, Joo HG. Radioprotective effects of an acidic polysaccharide of *Panax ginseng* on bone marrow cells. 2007 Mar;8(1):39–44.

29. Byon YY, Kim MH, Yoo ES, Hwang KK, Jee Y, Shin T, Joo HG. Radioprotective effects of fucoidan on bone marrow cells: improvement of the cell survival and immunoreactivity. *2008 Dec;9(4):359–65.*
30. Rush JS, Hodgkin PD. B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation. *Eur J Immunol.* 2001 Apr;31(4):1150–9.
31. Quigley M, Martinez J, Huang X, Yang Y. A critical role for direct TLR2–MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. *Blood.* 2009 Mar 5;113(10):2256–64. Epub 2008 Oct 23
32. Sancho D, Gómez M, Sánchez–Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005 Mar;26(3):136–40.
33. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death : critical control points. 2004 Jan 23;116(2):205–19.
34. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 2009 Feb 15;122(Pt 4):437–41.
35. Begum NA, Ishii K, Kurita–Taniguchi M, Tanabe M, Kobayashi M, Moriwaki Y, Matsumoto M, Fukumori Y, Azuma I, Toyoshima K, Seya T. Mycobacterium bovis BCG cell wall–specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infect Immun.* 2004 Feb;72(2):937–48.
36. Morse MA, Lyerly HK, Clay TM, Abdel–Wahab O, Chui SY, Garst J,

Gollob J, Grossi PM, Kalady M, Mosca PJ, Onaitis M, Sampson JH, Seigler HF, Toloza EM, Tyler D, Vieweg J, Yang Y. Immunotherapy of surgical malignancies. *Curr Probl Surg*. 2004 Jan;41(1):15–132.

37. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):241–51.

38. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- $\gamma$  for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004 Dec;5(12):1260–5.