



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#)



약학석사학위논문

암 환경의 골수 외 골수성 전구
세포의 분화 조절에 대한 연구

Studies on the regulation of extramedullary
myeloid progenitor differentiation in the tumor
environment

2015년 2월

서울대학교 융합과학기술대학원
분자의학 및 바이오제약학과 면역학 전공
진관

암 환경의 골수 외 골수성 전구

세포의 분화 조절에 대한 연구

Studies on the regulation of extramedullary
myeloid progenitor differentiation in the
tumor environment

지도교수 강 창 율

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2014년 11월

서울대학교 융합과학기술대학원
분자의학 및 바이오제약학과 면역학 전공
진 관

진관의 석사학위논문을 인준함

2015년 1월

위 원 장 오 유택 (인)

부 위 원 장 강 창율 (인)

위 원 서 영준 (인)

국문초록

면역 치료 요법은 항암 면역 반응을 효율적으로 유도하며, 암세포 특이적으로 작용하여 부작용이 적기 때문에 새로운 치료법으로 주목받고 있으나, 암 환경에서 많은 골수성 세포들이 myeloid-derived suppressor cell(MDSC) 등의 면역 억제적 기능을 가진 세포들로 비정상적인 분화를 하기 때문에, 실제 치료 효과에 있어서는 한계를 보이고 있다. 이러한 이유로 암세포 주변의 면역 억제 환경을 감소시키려는 많은 연구가 진행되고 있으며, 본 연구실에서도 IL-2를 이용해 자연살해세포(Natural Killer cell, NK cell)의 MDSC로의 분화를 억제 할 수 있다는 연구 결과 등을 발표한 바 있다. 최근 연구 결과에서는 암 이식 마우스의 골수 외 환경, 특히 비장에서 증가하는 골수성 전구 세포가 MDSC의 축적 및 면역 억제 환경 조성에 관여한다는 것이 밝혀졌으며, 이를 바탕으로 본 연구진은 암 환경에서 골수성 전구 세포의 분화 조절에 대해 연구하여, 골수성 전구 세포의 분화 조절이 암의 면역 억제 환경을 극복 할 수 있는 새로운 표적이 될 수 있는지 검증하고자 하였다.

암 이식 마우스의 비장에서 분리한 골수성 전구 세포들을 GM-CSF의 존재 하에 여러 사이토카인과 함께 배양함으로써 골수성 전구 세포의 분화에 영향을 주는 인자들을 선별하였고, 그 결과 IFN- γ 와 IL-4에 의해 골수성 전구 세포가 항원 제시 세포(Antigen-presenting cell, APC)로 분화됨을 확인하였으며, Naive 마우스와 암 이식 마우스의

골수성 전구 세포의 분화 간에 유의적인 차이가 없는 것을 관찰할 수 있었다.

IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포가 발현하는 표면 분자들을 분석한 결과, M1 대식세포의 surface phenotype 과 유사함을 확인하였고, 이 세포의 면역 억제능을 분석한 결과 CD4 T 세포의 증식을 약하게 억제하는 것을 확인 할 수 있었다.

마지막으로, 분화한 항원 제시 세포가 CD4 T 세포의 활성화 및 분화에 미치는 영향을 분석하였고, 그 결과 IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포가 수지상 세포보다 약한 항원 제시 능력을 가지며, iTreg 으로의 분화를 촉진함을 확인하였다.

이를 통해 본 논문에서는 암 환경에서 증가한 골수 외 조직의 골수성 전구 세포로부터 분화한 항원 제시 세포의 면역학적 기능을 *in vitro* 수준에서 확인하였으며, 이는 추후 골수성 전구 세포의 분화를 이용한 암 면역 억제 극복 연구의 기초자료로 쓰일 수 있다고 생각된다

주요어 : 미분화 골수성 세포, 암 면역 억제 환경, 항원 제시 세포, 골수성 전구 세포, 과립구 대식 세포 콜로니 자극 인자, 인터페론 감마
학 번 : 2013-22738

목 차

국문초록.....	1
목 차.....	3
1. 서 론.....	4
2. 재료 및 방법.....	7
3. 결 과.....	11
4. 고 찰.....	18
5. 그 름.....	24
참고문헌.....	35
Abstract.....	41

1. 서 론

면역 치료 요법은 암환자에게 좋은 효과를 나타내고 있으며, 암세포 특이적으로 작용하여 부작용이 적으므로, 기존의 치료법을 보완할 수 있는 새로운 치료법으로 주목받고 있다. 그러나 면역 치료 요법은 항암 면역 반응을 효율적으로 유도함에도 불구하고, 실제 치료 효과에 있어서는 한계를 보이고 있다. 이는 암 환경에서 많은 myeloid cell 들이 기존의 정상적인 기능을 가진 세포로 분화하지 못하고, M2 macrophage, myeloid-derived suppressor cell(MDSC) 등의 면역 억제적 기능을 가진 세포들로 분화하여, 암세포 주변에 견고한 면역 억제 환경을 형성함으로써 암세포를 제거할 수 있는 면역 세포 및 항체 등이 그 효과를 충분히 발휘하지 못하기 때문이다.[1] 특히 암 환자의 경우 골수성 세포가 성숙한 면역 세포로 잘 분화하지 못하고 미분화 상태인 미분화 골수성 세포(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)로 많이 축적되어 있다. MDSC 는 Ly6C 와 Ly6G 분자의 발현 정도에 따라 크게 CD11b⁺ LY6G⁻ LY6C^{high} 한 monocytic(MO) MDSC 와 CD11b⁺ LY6 G⁺ LY6C^{low} 한 polymorphonuclear(PMN) MDSC 로 분류되며,[2] 항암 면역 효과를 나타내는 다양한 세포들(T 세포, B 세포, 자연 살해 세포, 수지상 세포)의 기능을 저해함으로써 면역 억제 환경을 더욱 악화시킨다. [3] 또한 MDSC 의 증가는 암 환자의 나쁜 예후와 관련 있다는 것이 밝혀진바 있다.[4] 따라서 암세포 주변에 견고히 형성되어 있는 면역 억제 환경을 감소시키는 면역 치료 요법은 암 치료에 있어서 중요한

방법 중 하나로, 많은 연구가 진행되고 있으며 본 연구실에서도 최근에 IL-2를 이용해 NK cell이 MDSC로 분화하는 것을 억제 할 수 있다는 연구 결과를 발표한 바 있다.[5, 6]

또한 최근 연구 결과에서 암이 진행됨에 따라 MDSC 뿐 만 아니라 골수성 전구 세포(myeloid progenitor cell)가 비장과 같은 골수 외 조직에서 크게 증가되며, 암 환경의 TAM(Tumor-associated macrophage)과 MDSC의 축적 및 면역 억제 환경 악화에 기여함이 보고 된 바 있다.[7,8] 이처럼 암 환경에서 증가하는 골수성 전구 세포들이 면역 억제 환경 형성에 관여함에도 불구하고, 아직 이 세포들의 비정상적인 분화에 영향을 미치는 인자들과 분화 경로를 규명하는 연구는 미진한 실정이다. 이에 본 연구진은 골수성 전구 세포의 분화 조절을 통해 MDSC로의 분화를 저해하여 MDSC 생성의 일부 경로를 차단 할 뿐 만 아니라, 골수성 전구 세포를 immunogenic 한 세포로 분화 유도함으로써, 이를 암 치료 모델로 활용하는 접근을 시도하였다.

본 연구에서는 *In vitro*에서 암 이식 마우스의 비장에서 분리한 골수성 전구 세포들을 여러 사이토카인과 함께 배양함으로써 골수성 전구 세포의 분화에 영향을 주는 인자들을 선별하였다. 그 결과, GM-CSF 단독 배양 조건에서는 골수성 전구 세포가 대부분 MDSC로 변하였으며, 이는 기존에 발표 된 논문의 결과와 일치한다.[9] 그런데 Th1, Th2 반응에 의해 유도되는 사이토카인인 IFN- γ 와 IL-4 가 첨가 될 경우 골수성 전구 세포가 MDSC가 아닌 다른 표면 인자, 특히 항원제시세포(Antigen-presenting cell, APC)의 마커로 알려진 I-A/I-

E(MHC class II)를 높게 발현하는 세포로의 분화가 촉진됨을 확인하였다. 또한 Naive 마우스와 암 이식 마우스에서 각각 분리한 골수성 전구 세포의 사이토카인에 의한 분화 간에 유의적인 차이가 없는 것을 관찰하였고, 사이토카인에 의해 분화한 항원 제시 세포의 표면 인자들을 분석함으로써, 기존에 밝혀진 다양한 골수성 세포들의 표면 인자와의 유사점과 차이점을 비교 할 수 있었다. 또한 골수성 전구 세포로부터 분화한 항원 제시 세포들이 CD4 T 세포의 증식에 미치는 영향을 비교하였고, 그 결과 GM-CSF/IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포가 GM-CSF에 의해 유도된 MDSC 보다는 약하지만 어느 정도 CD4 T 세포의 증식을 억제함을 확인하였다. 또한 GM-CSF/IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포의 항원 제시 기능은 GM-CSF/IL-4에 의해 유도된 수지상 세포에 비해 약하지만, iTreg의 분화는 더 잘 유도함을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 Mice and tumor model

6–8 주령의 암컷 BALB/C 마우스를 오리엔트 바이오에서 구매하였다. 암컷 DO11.10 마우스는 The Jackson Laboratory에서 구매하였다. 마우스는 서울대학교(Seoul, Korea) 약학대학의 동물실험시설에서 사육되었으며, 모든 실험은 서울대학교 동물실험위원회의 규정과 가이드라인에 따라 수행하였다.

4T1 마우스 유방암 세포주는 10% heat-inactivated FBS 와 1% penicillin-streptomycin ♂ 첨가된 RPMI-1640 배지에서 배양하였으며, 세포주는 동결 해지 후 4 주 이내로 경과된 것을 사용하였다.

2.2 FACS analysis and cell sorting

2×10^5 의 4T1 세포주를 Naive 암컷 BALB/C 마우스에 피하 주사를 시행하고, 10 일 경과 후 마우스를 CO₂로 안락사 한 뒤 비장을 분리하여 70um strainer 에 통과시켜 single cell suspension 을 얻었다. Red blood cell lysis 를 통해 적혈구를 제거한 후, anti-mouse CD3, CD19, CD49b, Ly6C, Ly6G – biotin antibody 와 anti-biotin magnetic bead(miltenyl biotec)를 이용하여 골수성 전구 세포의 비율을 증가시켰다. 그리고 anti-CD3, CD8 α , CD19, CD11b, CD11c, CD49b, CD127, Gr-1, Ter1

19 - FITC, anti- c-kit - PE antibody 로 staining 하여 FACS ARIA III(BD Bioscience)를 이용해 골수성 전구세포를 분리하였다. 이상에서 사용한 antibody 는 모두 Biolegend 에서 구매하였다.

2.3 In vitro cell culture

모든 세포 배양은 RPMI1640(Gibco), 10% FBS(Gibco), 2.5% HEPE S (Gibco), 1% penicillin/Streptomycin(Lonza), 1% MEM NEAA(Gibco), 1% sodium pyruvate(Gibco), 0.01% 2-Mercaptoethanol(Gibco)의 조성을 갖는 배지에서 행하였다. 위에서 설명한 방법으로 분리한 골수성 전구 세포 1×10^4 를 GM-CSF, GM-CSF/IFN- γ , GM-CSF/IL-4 의 사이토카인을 20ng/ml 의 농도로 첨가한 배지 조건 하에서 96 well flat bottom plate 에 4 일간 배양하였다.

2.4 In vitro CD4 T cell suppression assay

골수성 전구 세포를 GM-CSF, GM-CSF/IFN- γ , GM-CSF/IL-4 존재 하에 4 일간 배양한 후 분화한 MDSC 와 CD11c $^-$, MHCII $^+$ 세포, CD11c $^+$, MHCII $^+$ 세포를 sorting 하여 각 세포들이 CD 4 T 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. OVA 특이적인 CD4 T cell 을 지닌 DO11.10 total splenocytes 를 CFSE 를 이용하여 labeling 하고, 250ug/ml OVA protein 존재 하에 MDSC 또는 CD11c $^-$, MHCII $^+$ 세포

또는 CD11c⁺, MHCII⁺ 세포 5×10^4 와 1:1 비율로 4 일간 공동 배양하였다. 4 일 후 세포를 걷어 anti-DO11.10-PE, anti-CD4-APC antibody로 염색한 후 FACS ARIAIII를 이용해 CFSE dilution 정도를 분석하였다

2.5 Stimulation of T lymphocytes

골수성 전구 세포를 GM-CSF/IFN- γ , GM-CSF/IL-4 존재 하에 4 일간 배양한 후 분화한 CD11c⁻, MHCII⁺ 세포와 CD11c⁺, MHCII⁺ 세포를 sorting 한 후, 이 세포들의 항원제시능력을 확인하였다.

DO11.10 CD4+ CD25- 세포를 CFSE를 이용하여 labling 하고, 250 ug/ml OVA protein 혹은 1ug/ml OVA peptide 존재 하에 CD11c⁻, MHCII⁺ 세포 또는 CD11c⁺, MHCII⁺ 세포 5×10^4 와 1:1 비율로 4 일간 공동 배양하였다. 4 일 후 세포를 걷어 anti-DO11.10-PE, anti-CD4-APC antibody로 염색한 후 FACS ARIAIII를 이용해 CFSE dilution 정도를 분석하였다

2.6 Helper T cell differentiation

Naive BALB/C 마우스의 비장에서 CD4+, CD25-, CD44-low, CD62L-high 의 표면 특성을 가지는 naive CD4 T 세포를 분리하여, 이 세포 5×10^4 을 250ug/ml OVA protein 혹은 1ug/ml OVA peptide 존재 하에 CD11c⁻, MHCII⁺ 세포 1×10^4 또는 CD11c⁺, MHCII⁺ 세포 1×10^4 와 4 일간 공동 배양하였다. 각각의 helper T cell 분화 조건은 Th1: mIL-12(4ng/ml), Th2: mIL-4(10ng/ml), Th9: mIL-4(10ng/ml), hTGF- β 1(5ng/ml), iTreg: hTGF- β 1(5ng/ml), Th17: hTGF- β 1(2ng/ml), mIL-6(20ng/ml), mIL-23(20ng/ml)이다. 공동배양 후 세포 내부에 존재하는 사이토카인을 확인하기 위해 ICS(Intracellular cytokine staining)를 실시하였다.

2.7 Statistical analysis

실험 결과의 유의성 평가는 students' t test를 이용하였다.

3. 결과

3.1 골수성 전구 세포의 분화 유도 물질 선별

최근의 연구 결과에서 마우스의 비장 내에 존재하는 골수성 전구 세포의 수가 암 환경에서 크게 증가하며, 이는 미분화 골수성 세포(Myeloid-derived suppressor cell, MDSC)의 축적을 유도하여 암의 진행을 더욱 가속시킨다는 것이 밝혀진 바 있다.[7,8] 또한 지금까지 여러 연구를 통해 면역 억제적인(immunosuppressive) 세포들을 제거하거나 분화를 유도함으로써 항암 효과를 나타낼 수 있다는 것이 알려져 있고[6], 본 연구진은 이러한 원리를 암 환경에서 증가하는 골수성 전구 세포의 분화에 적용하고자 하였다.

GM-CSF(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor)가 골수성 전구 세포의 MDSC(myeloid derived suppressor cell)로의 분화를 촉진시킨다는 기존의 연구 결과[9]를 바탕으로, 골수성 전구 세포를 *in vitro*에서 GM-CSF 존재 하에 IFN- γ (interferon gamma), IL-4, IL-9, IL-17를 각각 첨가하여 4 일간 배양하였을 때의 분화 양상을 FACS ARIAIII를 이용해 분석하였다.

그 결과 GM-CSF 와 IL-9, IL-17 배양 조건에서는 전구 세포의 분화가 큰 차이 없었으나 GM-CSF/IL-4 배양 조건의 경우 CD11c $^{+}$, MHC II $^{+}$ population 으로의 분화가 촉진되었으며, 이는 IL-4 가 수지상 세포로의 분화를 유도한다는 기존의 연구 결과와 일치한다.[10] 그리고

GM-CSF/IFN- γ 배양 조건의 경우 CD11c⁻, MHC II⁺ 세포로의 분화가 크게 촉진된 것을 확인 할 수 있었다.(그림 1)

3.2 Naive 마우스와 암 이식 마우스의 골수성 전구 세포의 분화 분석

앞선 결과에서 암 이식 마우스의 비장에서 분리한 골수성 전구 세포가 GM-CSF/IL-4 혹은 GM-CSF/IFN- γ 에 의해 항원 제시 세포로의 분화가 유도됨을 확인하였다. 이때 이러한 분화가 암 환경의 골수성 전구 세포뿐 만 아니라 Naive 마우스의 골수성 전구 세포에서도 일어나는지 확인하였다. 그 결과 Naive 마우스의 골수에서 분리한 골수성 전구 세포 역시 각 사이토카인 배양 조건 하에서 암 이식 마우스의 비장에서 분리한 골수성 전구 세포와 비슷한 양상의 분화가 일어났으며, 분화한 세포의 비율 역시 두 그룹간의 유의적인 차이를 확인할 수 없었다(그림 2A, B). 이를 통해 Naive 마우스와 암 이식 마우스의 골수성 전구 세포 간에 사이토카인에 대한 유의적인 분화 차이는 없으며, 암 환경이 골수성 전구 세포의 변화에 영향을 미침으로써, 체내에서 미분화 골수성 세포로의 분화가 촉진되는 것임을 알 수 있다.

3.3 IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포의 표면 특성 규명

지금까지 여러 연구를 통해 다양한 골수성 세포들의 phenotypic definition이 밝혀져 있고[11], 이를 토대로 GM-CSF/IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포가 발현하는 표면 분자들을 규명함으로써 기존에 밝혀져 있는 골수성 세포 중 유사한 것이 있는지를 확인하고자 하였다. 우선 암 이식 마우스의 비장에서 얻은 골수성 전구 세포를 GM-CSF/IFN- γ 혹은 GM-CSF/IL-4 존재 하에 4 일간 배양 한 후 골수성 세포 계열과 항원 제시 세포에서 빈번하게 발현되는 표면 marker 들인 F4/80, CD11b, CD40, CD80, CD86 을 확인해보았다. 그 결과 IFN- γ 에 의해 유도된 CD11c $^{-}$ MHC-II $^{+}$ 항원 제시 세포는 CD11b, F4/80, CD86 을 높게 발현하였으나, CD40 과 CD80 은 GM-CSF/IL-4에 의해 유도된 수지상 세포보다 낮게 발현하였다.(그림 3) CD40, CD80, CD86 은 공동 자극 분자이며, T 세포의 CD154, CD28, CTLA-4 등 과 결합하여 보조적인 자극으로 T 세포의 활성화를 유도하므로[12], 이들의 발현이 낮다는 것은 CD11c $^{-}$ MHC-II $^{+}$ 세포의 항원제시능력이 수지상 세포보다 약할 것임을 의미한다. 또한 IFN- γ 에 의해 유도된 CD11c $^{-}$, MHC-II $^{+}$ 세포는 MHC-II $^{+}$, CD11c $^{-}$, CD11b $^{+}$, CD40 $^{+}$, CD80 $^{+}$, CD86 $^{+}$, F4/80 $^{+}$ 의 표면 특성을 가지며, 기존 골수성 세포들의 표면 특성과 비교해 본 결과[11] M1 대식세포와 유사함을 확인하였다.

3.4 CD4 T 세포의 증식에 IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포가 미치는 영향 분석

기존의 연구 결과에서 MDSC는 크게 CD11b⁺ LY6G⁻ LY6C^{high} 한 monocytic MDSC와 CD11b⁺ LY6G⁺ LY6C^{low} 한 granulocytic MDSC로 나뉘며[2], granulocytic MDSC는 ROS(Reactive oxygen species)를 생성하여 T 세포 수용체의 modification을 일으키거나 항원 특이적인 T 세포의 반응성을 감소시키고, monocytic MDSC는 NO(Nitric Oxide)를 생성함으로써 T cell 세포 사멸 등을 일으켜 T 세포의 증식을 억제한다는 것이 잘 알려져 있다.[3] 이를 바탕으로 IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포는 *in vitro*에서 CD4 T 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다.

우선 골수성 전구 세포를 GM-CSF 혹은 GM-CSF/IFN- γ 혹은 GM-CSF/IL-4 존재 하에 4 일간 배양한 후, 분화한 MDSC와 CD11c⁻, MHCII⁺ population, CD11c⁺, MHCII⁺ population을 sorting 하여 OVA 특이적인 CD4 T cell을 지닌 DO11.10 splenocytes를 CFSE 염색 한 후 이들을 250ug/ml OVA protein 존재 하에 공동 배양하였다. 4 일 후 세포를 걷어 anti-DO11.10-PE, anti-CD4-APC antibody로 염색한 후 FACS ARIAIII를 이용해 CFSE dilution 정도를 살펴 CD4 T 세포의 증식 정도를 확인해보았다(그림 4A). 또한 DO11.10 splenocytes 단독으로 OVA protein 존재 하에 배양한 것을 positive control(그림 4B), OVA protein 없이 DO11.10 splenocytes만 배양한 것을 negative control로 이용했다.(그림 4C) 그 결과 GM-CSF 조건에서 분화한 MDSC는 CD4T 세포의 증식을 억제하였고, GM-CSF/IFN- γ 조건에서 분화한 CD11c⁻, MHC-II⁺ 세포 역시

MDSC 보다는 약하지만 CD4 T 세포의 증식을 어느 정도 억제하였다. 하지만 GM-CSF/IL-4 조건에서 분화한 수지상 세포는 CD4 T 세포의 증식을 전혀 억제하지 않았고, 오히려 positive control보다 CD4 T 세포의 증식을 잘 유도함을 확인하였다.(그림 4A, B) 즉, 적어도 *in vitro*에서 다른 APC가 존재하는 상황에서, CD11c⁻, MHC-II⁺ 항원 제시 세포는 CD4 T 세포의 증식을 억제한다는 것을 유추할 수 있다.

3.5 IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포의 항원 제시 능력 확인

앞의 결과에서 IFN- γ 에 의해 유도된 CD11c⁻, MHC-II⁺ 항원 제시 세포의 CD40, CD80 발현이 낮은 것을 확인하였고(그림 3), 따라서 이 세포의 항원 제시능이 수지상 세포에 비해 약할 것이라는 가설을 세울 수 있었다. 이를 검증하기 위해 CFSE 염색 된 DO11.10 CD4+ CD25- 세포를 OVA protein 혹은 peptide 존재 하에 CD11c⁻, MHCII⁺ 항원 제시 세포 혹은 수지상 세포와 같이 배양하여, 분열 정도를 확인하였다.

그 결과 수지상 세포와 배양한 CD4 T 세포의 경우 분열이 활발히 일어났으나, CD11c⁻, MHCII⁺ 항원 제시 세포와 배양한 경우에는 분열 정도가 감소됨을 확인하였다.(그림 5A, B) 또한 수지상 세포의 경우 OVA protein, peptide 조건에 따라 T 세포의 증식 정도가 변화하지 않았지만, CD11c⁻, MHCII⁺ 항원 제시 세포의 경우 OVA protein 조건은 negative control 정도로 거의 분열하지 않았으나 OVA peptide

조건에서는 약간 더 잘 분열한 것을 확인하였다.(그림 5A, B, C) 이는 CD11c⁻, MHCII⁺ 항원 제시 세포가 protein 을 processing 하여 MHC II 분자에 loading 하는 능력이 약하기 때문이라 생각된다. 결과적으로, CD11c⁻, MHCII⁺ 항원 제시 세포의 항원 제시 능력은 수지상 세포에 비해 약하다는 것을 확인 할 수 있었다.

3.6 Naive CD4 T 세포의 분화에 항원 제시 세포가 미치는 영향 분석

체내에 항원이 침투하거나 염증 반응이 진행되면 항원 제시 세포가 항원을 섭취 후 MHC molecule 을 통해 제시하고, 이 자극은 naive T 세포에 전달되어 T 세포의 분화를 유도하며, 이때 T 세포는 주어지는 자극에 따라 Th1, Th2, Th9, Th17 등 여러 아형으로 분화되고, 각각의 사이토카인을 분비하는 것으로 알려져 있다.[13] 이처럼 항원 제시 세포의 가장 중요한 기능 중 하나가 T 세포를 자극하여 분화를 유도하는 것이므로, 앞의 실험에서 CD11c⁻, MHC II⁺ 세포가 CD 4 T 세포의 증식을 억제한다는 결과를 얻은 것에 착안하여, in vitro 에서 naive T 세포를 Th1, Th2, Th9, Th17, 그리고 면역 조절 T 세포(Treg)으로 분화시킬 때 CD11c⁻, MHC II⁺ 세포가 각각에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다.

먼저 GM-CSF/IL-4, GM-CSF/IFN- γ 조건에서 골수성 전구 세포를 분화시키고, 분화한 세포를 각각의 helper T cell 분화 사이토카인 조건에서 naive T 세포와 4 일간 공동 배양하였다. 그 후

각각의 helper T 세포가 분비하는 사이토카인인 IFN- γ , IL-13, IL-9, IL-17 의 생성과 transcription factor 인 Foxp3 의 발현 변화를 확인해보았다.

그 결과 CD11c $^{-}$, MHC II $^{+}$ 세포와 Naive CD 4 T 세포를 공동배양 하였을 때 GM-CSF/IL-4 조건에서 유도된 수지상 세포와 공동 배양한 것에 비해 IFN- γ , IL-13, IL-9, IL-17 의 사이토카인을 분비하는 CD4 T 세포의 비율이 낮았으며, OVA protein 과 peptide 배양 조건은 결과에 큰 영향을 미치지 않았다.(그림 6A, B) 하지만 Foxp3 를 발현하는 조절 T 세포의 비율은 CD11c $^{-}$, MHC II $^{+}$ 세포와 공동 배양하였을 때 더 높게 나타났다. 조절 T 세포는 naive T 세포가 분화할 때 TGF- β 가 존재할 경우 유도되며, 대표 전사인자로서 foxp3 을 발현하고[13], effector T 세포의 여러 작용들을 억제하여 면역반응을 조절하는 역할을 한다.[14] 따라서 CD11c $^{-}$, MHC II $^{+}$ 세포는 적어도 *in vitro* 에서는 iTreg 의 분화를 잘 유도하며, 이를 통해 면역 억제작용을 할 것이라 기대할 수 있다.

4. 고찰

최근 전세계적으로 암 환자의 수와 그로 인한 사망률이 해마다 증가하고 있는 추세이다. 의학 기술이 발달하고, 새로운 약이 끊임없이 개발되고 있지만 아직까지 암 치료는 인류에게 있어 큰 과제로 남아있다. 최근 각광 받고 있는 암 치료 요법 중 하나인 면역 요법은 우리 몸의 면역 세포를 활성화 시켜 암 세포 특이적으로 작용할 수 있기 때문에 그동안 다양한 항암 면역 치료 방법이 연구되었고, 치료제도 지속적으로 개발 되어왔다. 하지만 암 환경에서는 많은 면역 억제적 세포들이 생성되어 있기 때문에 면역 세포 및 항체들이 그 효과를 제대로 발휘하지 못하며[1], 특히 monocytic 세포와 granulocytic 세포의 이종 그룹으로 알려진 MDSC(Myeloid-derived suppressor cell)는 암 유래 면역 억제 환경 조성에 중요한 요소임이 밝혀져 있다.[15,16] 그 동안 MDSC를 표적으로 하여 암 환경의 면역 억제 조성을 극복하려는 많은 연구들이 진행되었지만[17–19], 아직까지 MDSC 와 면역 억제 환경의 조성을 완벽하게 저해하지는 못한 실정이다. MDSC의 축적 및 형성에 관여하는 인자는 매우 많지만, 본 연구실은 최근 비장이 염증 상황에서 골수성 세포를 저장함으로써 면역 억제 세포 생성에 기여하며[20,21], 암 이식 마우스의 비장에서 증가하는 골수성 전구 세포가 MDSC의 축적과 면역 억제 환경 형성에 기여한다는 연구 결과[7,8]에 주목하여, 골수성 전구 세포를 면역 억제 환경 극복을 위한 새로운 표적으로 하려는 접근을 시도하였다.

본 연구에서는 암 환경에서 증가하는 골수성 전구 세포가 특정 사이토카인에 반응하여, MDSC로의 분화가 저해될 뿐만 아니라 MHC II 분자를 높게 발현하는 항원 제시 세포(Antigen-presenting cell, APC)로의 분화가 촉진 될 수 있으며, 이 항원 제시 세포들은 T 세포의 증식과 기능에 각각 다른 영향을 끼칠 수 있음을 밝혔다. 먼저 4T1 유방암 마우스의 비장에서 분리한 골수성 전구 세포를 GM-CSF 존재 하에 여러 사이토카인을 첨가하여 배양하였을 때, IL-9 과 IL-17은 골수성 전구 세포의 분화에 영향을 끼치지 않았으나 GM-CSF/IFN- γ , GM-CSF/IL-4 조건에서는 MHC II를 발현하는 항원 제시 세포로의 분화가 유도됨을 확인하였다.(그림 1) IFN- γ 에 의해 유도된 CD11c $^{-}$, MHC II $^{+}$ 항원 제시 세포는 그 기능이 아직 잘 알려져 있지 않다. 만약 IFN- γ 에 의해 생성된 항원 제시 세포가 immunogenic 하다면 면역 억제 환경 극복은 물론, 체내 면역 반응 증진도 동시에 일으킬 수 있으리라 생각된다.

골수성 전구 세포는 GM-CSF에 의해 MDSC로 분화가 유도되며 [9], IL-4가 첨가 될 경우 수지상 세포로의 분화가 촉진된다는 것은 잘 알려져 있다.[10] 또한 최근 연구 결과에 따르면 골수성 전구 세포가 IL-7, IL-15 등의 사이토카인에 의해 자연 살해 세포로 분화될 수 있으며[22], 따라서 본 연구진에서 사용한 사이토카인 이외에도 골수성 전구 세포의 분화를 유도하는 물질들을 선별하는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

데이터로 보여주지는 않았지만, 암 환경에서 일부 tumor cell 과 자극된 T 세포는 GM-CSF(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)를 생성함으로써 GM-CSF의 level 을 systemic 하게 증가시키므로 [23,24] GM-CSF, IFN- γ 그리고 IL-4의 농도를 증가시키거나 감소시킬 때 항원 제시 세포의 분화 비율이 변화 하는지 확인하였다. 그 결과, 일정 농도 이상의 사이토카인만 존재한다면, 농도에 상관 없이 항원 제시 세포로의 분화가 잘 일어남을 확인할 수 있었다.

IFN- γ 와 IL-4 에 의한 골수성 전구 세포의 분화가 암 이식 마우스 뿐 아니라, naive 마우스의 골수성 전구 세포에서도 분화가 거의 유사하게 일어남을 확인하였다. 이를 통해 암 환경에서 골수성 전구 세포의 분화 능력 자체에 결함이 생긴 것은 아니며, 체내에 특정 사이토카인을 systemic 하게 유도하여 항원 제시 세포로의 분화를 유도할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포는 M1 대식세포와 유사한 세포 표면 marker 를 발현하였으나, [그림 3] 데이터로 보여주지는 않았지만 M1 대식세포와는 다르게 Ly-6C 의 발현이 현저하게 증가되어 있는 등 약간의 차이점은 존재하였다. 활성화된 M1 대식세포는 IRF5 와 iNOS 를 발현하고 IL-12 와 IL-23 같은 pro-inflammatory 사이토카인을 생성함으로써 항암 효과를 나타낸다고 알려져 있다. [25-27] 따라서 IFN- γ 에 의해 유도된 CD11c $^{-}$, MHC II $^{+}$ 항원제시세포가 CD4 T 세포의 증식을 억제한 결과는(그림 4A) iNOS 의

발현으로 인한 NO의 생성에 의한 것이라 추측되며, 이를 검증하기 위해 실제로 CD11c⁻, MHC II⁺ 세포가 NO를 생성하는지 확인하는 실험이 추가적으로 필요하다.

IFN- γ 에 의해 유도된 CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포는 IL-4에 의해 유도된 수지상 세포에 비해 Th1, Th2, Th9, Th17의 분화는 덜 촉진하였으나 iTreg으로의 분화는 더 잘 유도하였다.(그림 6A, B) 조절 T 세포는 naive T 세포로부터 자극에 의해 분화된 induced Treg과 흥선에서 바로 생성된 natural Treg이 있다. 이들 조절 T 세포는 대표 전사 인자로서 핵 내 foxp3를 발현하고[28] Th1, Th2, Th17 등 effector T 세포의 작용을 억제하는 기능을 한다[29]. 따라서 IFN- γ 에 의해 유도된 CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포는 iTreg으로의 분화를 촉진함으로써 면역 억제 환경 형성에 기여할 것이라 추측할 수 있다. 그런데 이는 M1 대식세포가 IL-12와 IL-23을 분비하여 Naive CD 4 T 세포가 Th1과 Th17로 분화하도록 유도한다는 연구 결과[30,31]와 모순된다. 이러한 결과가 나온 이유는 크게 두 가지로 생각할 수 있다. 첫째, 실험 조건에서 이미 IL-12와 IL-23이 고농도로 존재하기 때문에 CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포가 IL-12와 IL-23을 분비하더라도 사이토카인 농도에 큰 영향을 끼치지 못할 가능성이 있다. 둘째, CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포가 M1 대식세포가 아니라 M1 대식 세포와 유사한 다른 종류의 세포일 가능성이 있다. 따라서 CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포가 IL-12, IL-23 혹은 TGF- β

등의 사이토카인 중 어떤 것을 많이 분비하는지 확인하는 실험이 추가로 필요하다고 생각된다.

수지상 세포는 항원을 포식하여 T 세포에 강한 공자극 (costimulatory signal)과 함께 제공함으로써 효율적으로 T 세포를 활성화시키고 항원 특이적인 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있고[32], 본 연구에서 IL-4에 의해 유도된 CD11c⁺, MHCII⁺ 수지상 세포 또한 CD4 T 세포의 증식을 잘 유도하였다.[그림 5A, B] 하지만 IFN- γ 에 의해 유도된 CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포는 수지상 세포보다 CD4 T 세포를 잘 증식시키지 못했다.[그림 5A, B] 이러한 결과가 도출된 것에 대해 두 가지 가설을 세울 수 있다. 우선 CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포의 CD40, CD80 공동 자극 분자 발현이 수지상 세포보다 낮은 결론 미루어보아(그림 3) T 세포에 강한 공자극을 제공하지 못해 T 세포가 잘 활성화 되지 않았을 거라 생각할 수 있다. 둘째, CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포가 CD4 T 세포의 증식을 억제한 결과로 미루어 볼 때(그림 4A), NO의 생성에 의해 CD4 T 세포의 증식이 억제 되었을 가능성이 있다. CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포 자체의 CD4 T 세포 활성화 능력은 뛰어나지만 분비된 NO가 이를 억제하여 결과적으로 증식이 잘 안된 것처럼 보일 수 있기 때문에, NO의 효과를 배제한 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

최근 화학요법을 통해 종양 세포의 면역원성을 증가시킴으로써 암 특이적인 면역 반응을 유도할 수 있다는 연구 결과가 보고되었고,[33] 본 연구실에서도 Gemcitabine 투여를 통해 암 환경에 존재하는 미분화

골수성 세포를 제거한 후 면역요법을 시행하여 암 항원 특이적인 면역 세포를 활성화시킴으로써 항암 효과를 유도할 수 있음을 확인한 바 있다.[34] Gemcitabine 은 피리미딘 항 대사물질로 항암 효과가 있으며, 비장의 미분화 골수성 세포를 선택적으로 제거함이 잘 알려져 있으며,[35,36] 데이터로 보여주지는 않았지만 Gemcitabine 을 암 이식 마우스에 복강 주사 할 경우, 비장 내의 미분화 골수성 세포는 제거되지만 골수성 전구 세포는 증가한 상태를 유지함을 확인할 수 있었다. 따라서 gemcitabine 투여 이후 체내의 Th1, Th2 반응을 유도하여, 골수성 전구 세포의 CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포 혹은 수지상 세포로의 분화 유도를 극대화 할 수 있으리라 생각된다.

비록 본 연구의 결과들을 종합해 볼 때, 적어도 *in vitro*에서 CD11c⁻, MHC II⁺ 항원제시세포는 면역 억제적인 성격을 지니는 것으로 생각되지만, 실제로 *in vivo*에서 이 세포의 면역학적 기능은 다를 수도 있다. 따라서 추후 진행될 연구에서는 골수성 전구세포의 *in vivo* 분화 기전을 규명해야 할 것이며, 이는 Gemcitabine 과의 병용요법을 통한 항암 면역 치료의 적용에 많은 도움이 될 것이라고 생각된다.

5. 그림

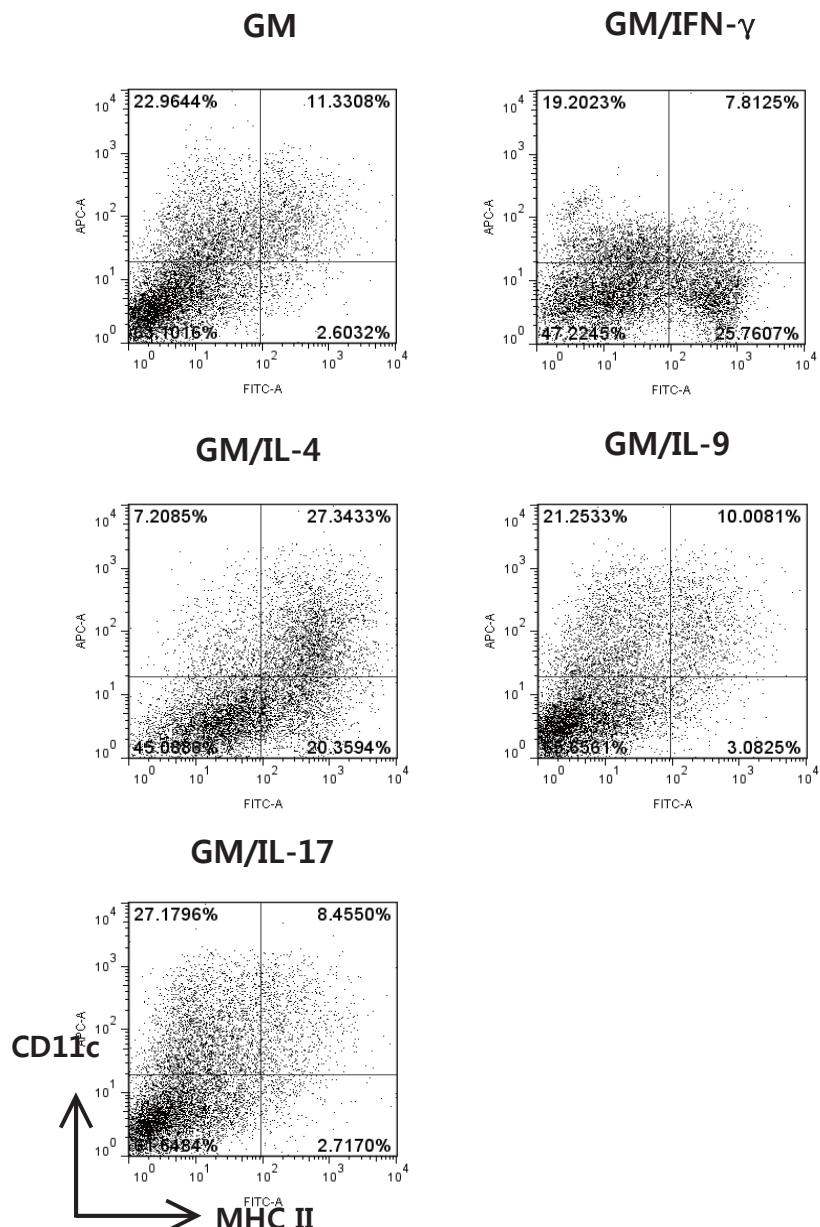


그림 1. 골수성 전구 세포의 분화 유도 물질 선별

Naive BALB/c 마우스의 원쪽 옆구리에 4T1 을 2×10^6 피하 이식하고, 이식 10 일 후에 마우스의 비장을 적출하여 비장 내 골수성 전구 세포를 분리하였다. 골수성 전구 세포를 *in vitro*에서 GM-CSF 존재 하에 IL-4, IL-9, IL-17, IFN- γ (interferon gamma) 를 각각 첨가하여 4 일간 배양하였을 때 골수성 전구 세포의 분화 양상을 FACS ARIAIII를 이용해 분석하였다.

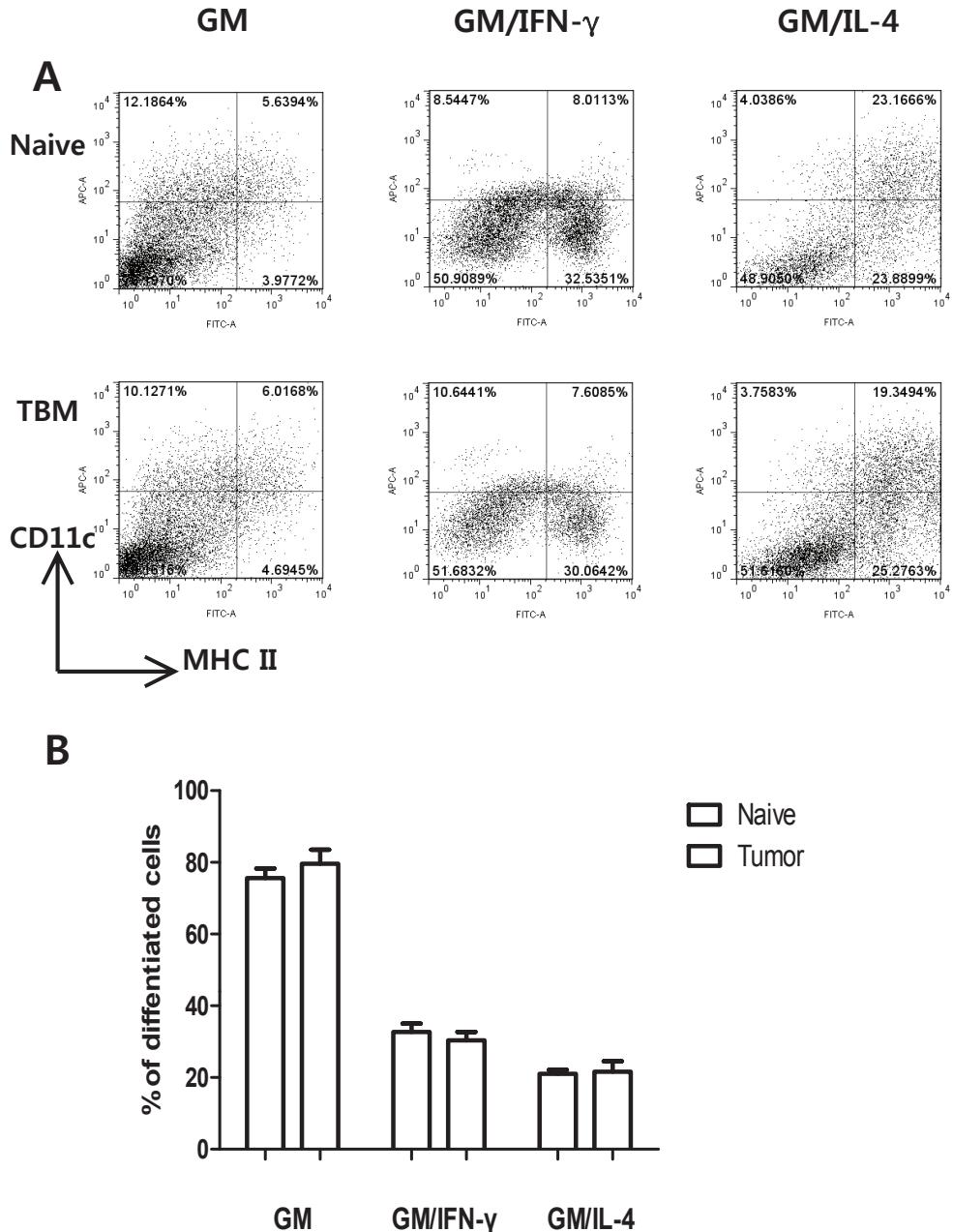


그림 2. Naive 마우스와 암 이식 마우스의 골수성 전구 세포의 분화 분석

골수성 전구 세포의 분화가 암 환경의 골수성 전구 세포뿐 만 아니라 Naive 마우스의 골수성 전구 세포에서도 일어나는지 확인하였다.

(A) 각각의 마우스에서 골수성 전구 세포를 분리한 후, 같은 사이토카인에 대한 분화 반응성 변화 여부를 FACS ARIAIII를 이용해 분석하였다. (B) Naive 마우스의 골수와 암 이식 마우스의 비장에서 얻은 골수성 전구 세포를 각 사이토카인 조건에서 배양하였을 때 분화되는 세포들의 비율. GM-CSF 의 경우 MDSC, GM-CSF/IFN- γ 의 경우 CD11c $^-$, MHC II $^+$ 항원제시세포, GM-CSF/IL-4 의 경우 CD11c $^+$, MHC II $^+$ 항원제시세포의 생성 비율을 나타내었다.

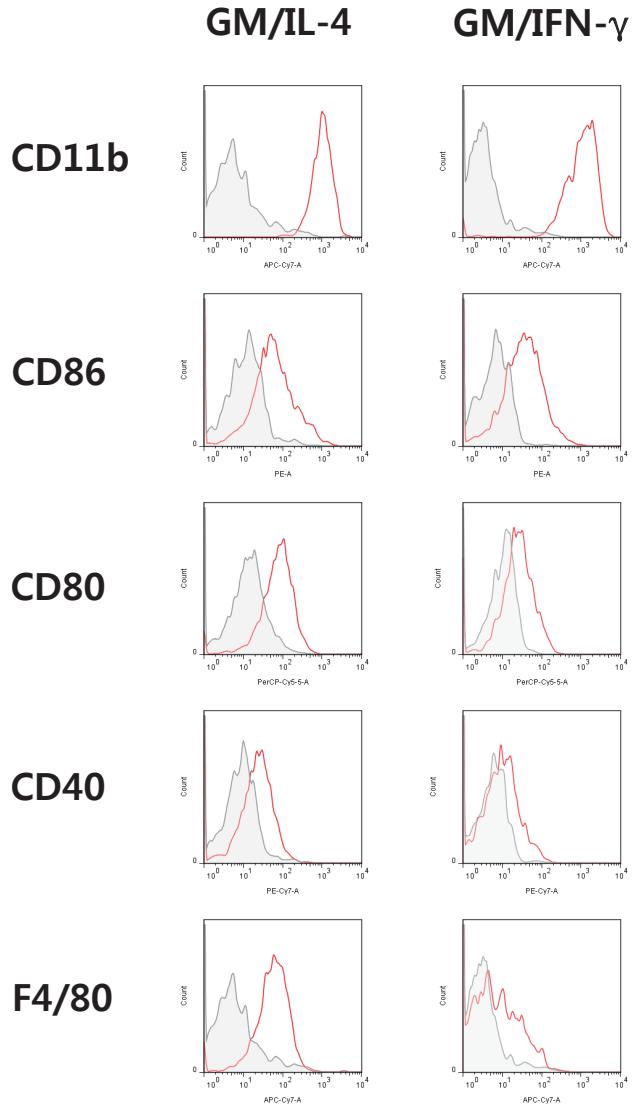


그림 3. GM-CSF/IFN- γ 에 의해 유도된 항원 제시 세포의 표면 특성 규명

4T1 이식 후 10일이 된 마우스의 비장에서 얻은 골수성 전구 세포를 GM-CSF/IFN- γ 혹은 GM-CSF/IL-4 조건에서 4일간 배양 후, CD11b, CD86, CD80, CD40, F4/80을 염색하여 발현 양상을 FACS ARIAIII를 이용해 분석하였다.

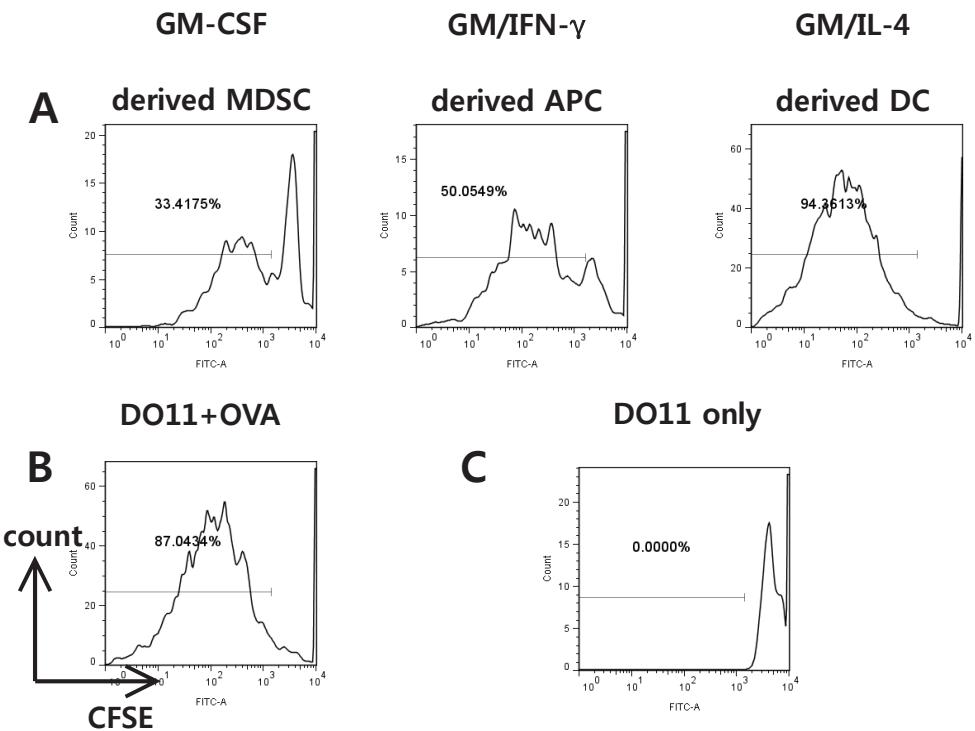


그림 4. CD4 T 세포의 증식에 골수성 전구 세포로부터 분화한 항원 제시 세포가 미치는 영향

골수성 전구 세포를 GM-CSF 또는 GM-CSF/IFN- γ 또는 GM-CSF/IL-4 존재 하에 4 일간 배양한 후 분화한 (A)MDSC 혹은 CD11c $^{-}$, MHC II $^{+}$ 항원제시세포 혹은 수지상 세포를 sorting 하여 CFSE 염색된 DO11.10 splenocytes 와 250ug/ml OVA protein 존재 하에 공동 배양하여 4 일 후 세포를 겉에 anti-DO11.10-PE, anti-CD4-APC antibody로 염색한 후 FACS ARIAIII를 이용해 CD4 T 세포의 CFSE dilution 정도를 분석하였다. (B)DO11.10 splenocytes 을 OVA protein 존재하에 (C)OVA protein 없이 배양한 결과.

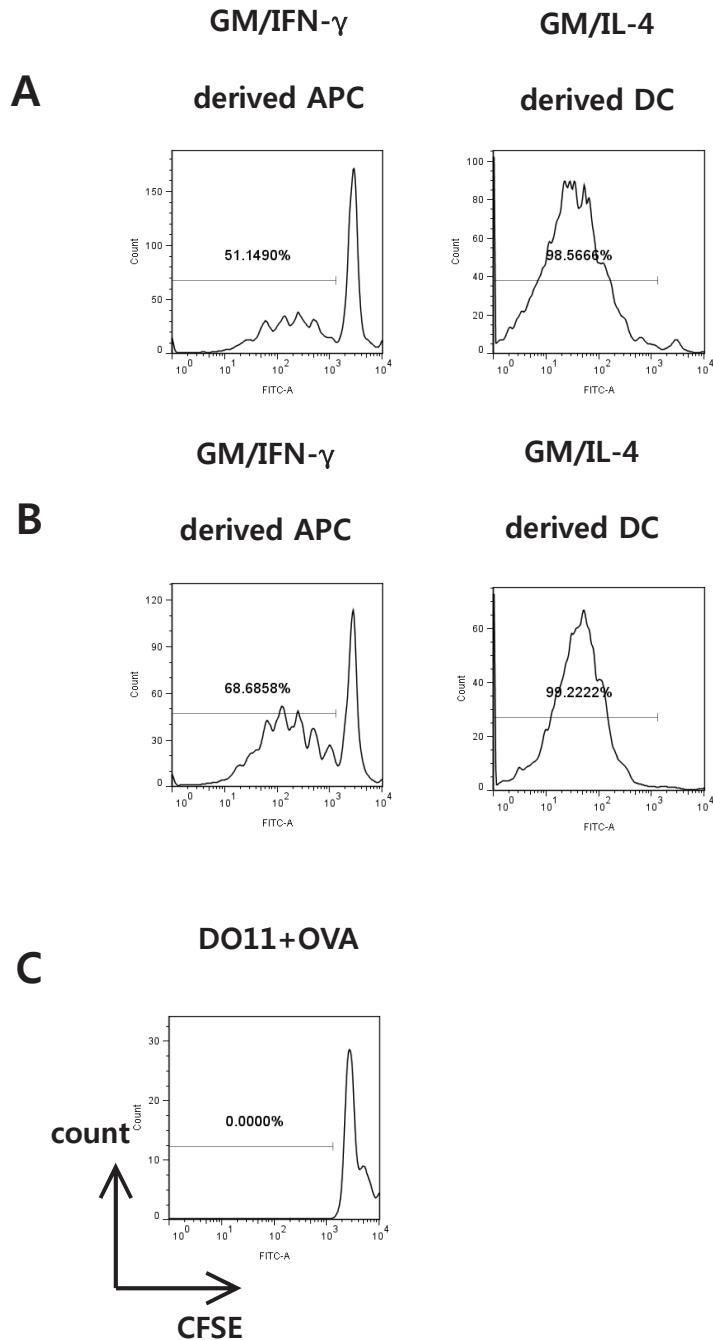


그림 5. 골수성 전구 세포로부터 분화한 항원 제시 세포의 항원 제시 능력 확인

골수성 전구 세포를 GM-CSF/IFN- γ , GM-CSF/IL-4 존재 하에 4 일간 배양한 후 분화한 CD11c $^-$, MHCII $^+$ 세포와 CD11c $^+$, MHCII $^+$ 세포를 sorting 한 후, 이 세포들의 항원제시능력을 확인하였다.

DO11.10 CD4 $^+$ CD25 $^-$ 세포를 CFSE를 이용하여 labeling 하고, 250ug/ml OVA protein 혹은 1ug/ml OVA peptide 존재 하에 CD11c $^-$, MHCII $^+$ 세포 또는 CD11c $^+$, MHCII $^+$ 세포 5×10^4 와 1:1 비율로 4 일간 공동 배양하였다. 4 일 후 세포를 걷어 anti-DO11.10-PE, anti-CD4-APC antibody로 염색한 후 FACS ARIAIII를 이용해 CFSE 발현 양을 분석하였다. (A) OVA protein과 배양한 CD4 T 세포의 CFSE dilution 결과(B)OVA peptide 와 배양한 CD4 T 세포의 CFSE dilution 결과(C)Negative control로써 항원제시세포 없이 OVA peptide 존재 하에 배양한 CD4 T 세포의 CFSE dilution 결과.

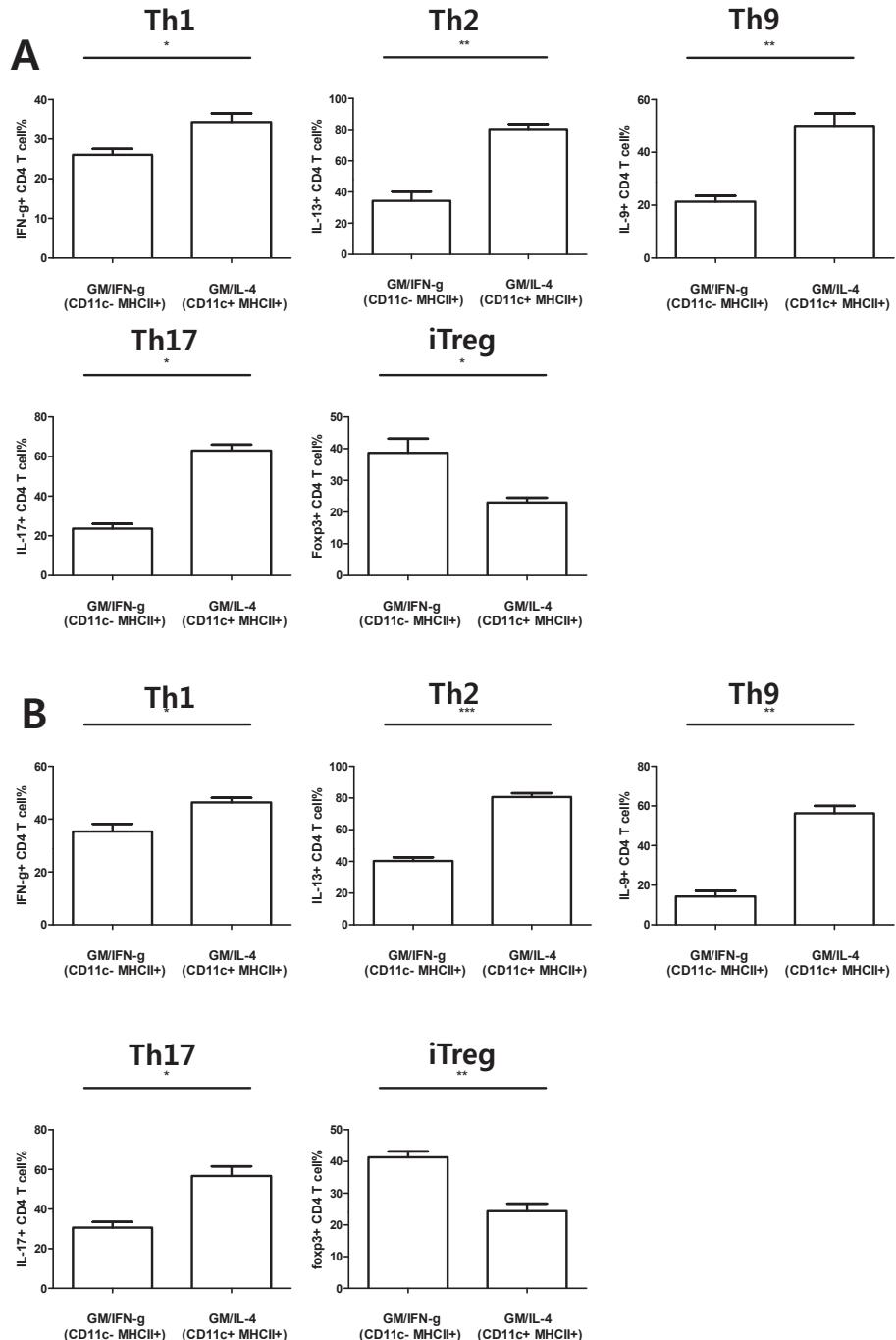


그림 6. Naive CD4 T 세포의 분화에 항원 제시 세포가 미치는 영향

GM-CSF/IL-4, GM-CSF/IFN- γ 조건에서 골수성 전구 세포를 분화시키고, 분화한 세포를 각각의 helper T cell 분화 사이토카인 조건에서 Naive T 세포와 4 일간 공동 배양하였다. 그 후 각각의 helper T 세포가 분비하는 사이토카인인 IFN- γ , IL-13, IL-9, IL-17의 생성과 transcription factor인 Foxp3의 발현 정도가 변하였는지를 PMA 와 ionomycin으로 자극을 주고, ICS 방법을 이용하여 확인해보았다. (A)OVA protein과 배양하였을 때 (B)OVA peptide와 배양하였을 때의 결과.

참고문헌

1. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006;6:715–27.
2. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, cheng P, et al. HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* 2010;207:2439–53.
3. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 2009;182:4499–506.
4. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:162–74.
5. Harry D.Bear, Hanh K. Le, Esther Cha. Gemcitabine directly inhibits myeloid-derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int immunopharmacol* 2009;9(7–8):900–9.
6. YoungJun Park, Boyeong song, Yun-sun Kim et al. Tumor microenvironmental Conversion of Natural Killer cells into Myeloid-Derived Suppressor cells. *Cancer Res* 2013;73(18):5669–81.
7. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chundnovskiy

- A, Berger C, *et al.* Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:2491–6
8. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;325:612–6.
9. Morales JK, Kmiecik M, Knutson KL, Bear HD, manjili MH, *et al.* GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1- bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123(1):39–49.
10. Xu Y, Zhan Y, Lew AM, *et al.* Differential Development of murine dendritic cells by GM-CSF *versus* Flt3 ligand has implications inflammation and trafficking. *J Immunol* 2007;179:7577–84.
11. Dmitry I, Gabrilovich, Suzanne Ostrand-Rosenberg & Vincenzo Bronte. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012;12:253–268.
12. Rattis FM, Peguet-Navarro J, Staquet MJ, Dezutter-Dambuyant C, Courtellemont P, Redziniac G, Schmitt D. Expression and function of B7-1(CD80) and B7-2(CD86) on human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 1996;26:449–453.
13. Chen, W.J., *et al.* Conversion of peripheral CD4+ CD25- naïve T

- cells to CD4+ CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor foxp3. *J Exp Med* 2003;198(12):1875–1886.
14. Sakaguchi, s., *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18–32.
 15. Youn JI, *et al.* Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 2008;181(8):5791–802.
 16. Lindau D, *et al.* The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 2013;138(2):105–115.
 17. Lee JM, *et al.* The restoration of myeloid-derived suppressor cells as functional antigen-presenting cells by NKT cell help and all-trans-retinoic acid treatment. *Int J Cancer* 2012;131(3):741–51.
 18. Kim YS, *et al.* Functional changes in myeloid-derived suppressor cells(MDSCs) during tumor growth: FKBP51 contributes to the regulation of the immunosuppressive function of MDSCs. *J Immunol* 2012;188(9): 4226–34.
 19. Youn JI, *et al.* Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat Immunol* 2013; 14(3):211–20.
 20. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, *et al.* Identification of splenic

- reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;325:612–6.
21. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Ryan R, Pucci F, Sio SW, *et al.* Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. *Immunity* 2013;38:296–308.
 22. Grzywacz B, Kataria N, Blazar BR, Miller JS, Verneris MR. Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* 2011;117:3548–3558.
 23. Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA, *et al.* Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization; induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol* 1998;161:5313–20.
 24. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, *et al.* Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* 1999;162:5728–37.
 25. Edin Sofia, Wikberg Maria L, Dahlin Anna M, *et al.* The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 phenotype in Relation to prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 2012;7(10): e47045.
 26. Krausgruber T, *et al.* IRF5 promotes inflammatory macrophage

- polarization and TH1–TH17 responses. *Nat Immunol* 2011;12(3):231–8.
27. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, *et al*. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest*, 2011;121(3):985–997.
 28. Hori S, Nomura T & Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609):1057–61.
 29. Williams, L.M. & Rudensky, A.Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007;8:277–284.
 30. Benolt M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 2008;15:181(6):3733–9.
 31. F. A. W. Verreck, T. de Boer, D. M. L. Langenberg *et al*, Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;30:101(13):4560–5.
 32. Banchereau, J. & Palucka, A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005;5(4):296–306.
 33. Zhang, B. *et al*. Induced sensitization of tumor stroma leads to

- eradication of established cancer by T cells. *J Exp Med* 2007;204:49–55.
34. Ko, H.J. *et al.* A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolleogenic murine tumor model. *Cancer Res* 2007;67:7477–7486.
35. H.K. Le *et al.* Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol* 2009;9(7–8):900–9.
36. Suzuki *et al.* Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 2005;11(18):6713–21.

Abstract

Studies on the regulation of extramedullary myeloid progenitor differentiation in the tumor environment

Gwan-Jin

Laboratory of Immunology

Dept. of Molecular Medicine and Biopharmaceutical Sciences

Graduated School of Convergence Science and Technology

Seoul National University

Recently, immune therapy has emerged as a new treatment because it induces anti-tumor response efficiently and has fewer side effects by acting specifically on cancer cells. However, because lots of myeloid cells in the tumor environment differentiate into immunosuppressive cells such as myeloid-derived suppressor cells (MDSC), there is a limitation in the actual therapeutic effect. A lot of research has been performed to reduce the immunosuppressive environment around the cancer cells and our laboratory has also presented the results that differentiation of

natural killer cell(NK cell) into MDSC can be suppressed by using IL-2. Indeed, recently published results showed that expansion of myeloid progenitor in the tumor environment were involved in the establishment of immunosuppressive environment and MDSC accumulation. Based on this, we investigated the regulation of extramedullary myeloid progenitor differentiation in the tumor environment and suggested that the regulation of extramedullary myeloid progenitor differentiation could become therapeutic target to overcome tumor-derived immunosuppressive environment. To find responsible factors that induce differentiation of myeloid progenitor cells from spleen of tumor-bearing mice, we cultured progenitor cells with GM-CSF and multiple cytokines in vitro. As a result, we observed that IFN- γ and IL-4 promote differentiation of myeloid progenitor cells into antigen-presenting cells(APC), rather than into MDSC. Indeed, there was no significant differences in differentiation of myeloid progenitor cells between naive mice and tumor-bearing mice.

We identified surface molecules of IFN- γ induced APC. And we found that surface phenotypes of IFN- γ induced APC are similar to those of M1 macrophage. Moreover, we analyzed the suppressive ability of IFN- γ induced APC. As a result, we observed that IFN- γ induced APC weakly inhibited CD 4 T cell proliferation.

Finally, we investigated the effect of differentiated APC on CD 4 T cell activation and differentiation. As a result, IFN- γ induced APC exhibited lower antigen-presenting capacity than dendritic cell and promoted generation of iTreg.

In conclusion, through this study, we clarified the immunological properties of APC derived from extramedullary myeloid progenitor cells in vitro and this study may serve as a valuable reference for further studies on overcoming tumor-derived immunosuppressive environment.

Keywords: Myeloid-derived suppressor cells, Tumor-derived immunosuppressive environment, Antigen-presenting cells, Myeloid progenitor, GM-CSF, IFN- γ

Student number: 2013-22738