啓明醫大學術誌 第21券 2號
Keimyung Med J
Vol. 21, No. 2, December, 2002

B형 간염바이러스 유전자 및 유전자 이입 항원제공세포를 이용한 항바이러스 항체생성 유도*

계명대학교 의과대학 면역학교실

박종욱 · 권택규

Induction of Antiviral Antibody using HBV Gene and HBV mRNA Pulsed Antigen Presenting Cell

Jong Wook Park, M.D., Taeg Kyu Kwon, Ph.D.

Department of Immunology,
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Abstract : In order to develop effective vaccine to recover incomplete immunity in patients with chronic hepatitis B virus infection, we produced various types of vaccine for Hepatitis B virus core (HBc) antigen and compared their effects on anti-HBc antibody response. Intramuscular injection of HBc DNA vaccine (pc -HBc) and intraperitoneal injection of HBc-transfected Renca and EL-4 effectively induced anti-HBc antibody response in mouse. Lipopolysaccharide (LPS) induced gene expressions of IP-10, GM-CSF, and IL-12 in dendritic cell (DC). However, LPS-stimulated DC or peritoneal macrophage, that were trasnsfected with HBc mRNA, on HBc mRNA vaccine itself induced lower anti-HBc antibody response in mouse compared to pc-HBc vaccine. These results suggest HBc DNA vaccine is more simple and effective for the induction of anti-HBc antibody response than HBc mRNA or mRNA-transfected cell vaccine.

Key words : Core antigen, Hepatitis B virus, Vaccine

서 론

B형 간염바이러스(Hepatitis B virus, HBV) 보균자는 세계적으로는 약 2억 5천만명이며 우리나라에서는 약 250만명 정도로 추산하고 있다. 우리나라 성인의 HBV 항원의 양성율은

* 이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2001-015-FP0091)에 의하여 연구 되었음.

약 7% 정도이며 산모와 소아는 각각 5.9~7.4% 및 5% 정도이다. 급성 B형 간염환자 중에서 약 10%는 만성 B형간염으로 진행하며 이들중 약 10~30% 정도가 만성활동성 간염이 되어 황달, 간문맥압항진증 및 간경화로 이행한다[1,2].

HBV에 의한 만성 간질환의 다양한 원인은 아직 완전히 밝혀지지 않고 있으나, 환자의 면역기능과 감염된 HBV 유전자의 변이가 깊이 관여하고 있는 것으로 생각되고 있다[3]. 감염된 간세포의 상해와 HBV 제거가 모두 환자의 T 세포 활성에 의해 결정된다는 것은 Chisari[4]가 제시한 HBV 형질전환 마우스 모델과 여러 임상연구들에서 밝혀졌다[5-7]. 급성간염의 경우는 숙주의 면역계 세포들이 HBV를 제거하기 위한 세포성 면역과 체액성 면역반응을 통하여 영구면역을 획득함으로서 간조직 손상으로부터 완전히 회복하지만 HBV에 대한 면역반응이 불완전한 경우에는 HBV가 지속적으로 남아 만성 간질환을 지속시킴으로서 다양한 임상경과를 취하게 된다. 한국에서 HBV에 의한 만성감염은 모자감염에 의한 경우가 많으며, 이러한 경우에는 대개 오랜기간 동안의 면역관용기가 개재하여 보균자 상태가 된다. HBV 보균자의 성립 기전이나 경로 등은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나, HBV 보균자의 면역학적 특징은 면역의 부전상태(immunoinsufficiency) 때문에 HBV-infected hepatocytes(및 기타 세포들)의 제거가 불충분하다는 것이다. 보균자의 면역관용상태가 없어지게 되면 환자의 면역반응의 효율성에 따라 완전한 치유도 가능하나, 면역기능이 불완전한 경우에는 지속성 감염상태, 즉 만성활동성 간염 및 간경변 등의 다양한 임상경과를 보이게 된다. 간염만성화를 예방하거나 치료하기 위해서는 HBV에 대한 불완전한 면역반응을 면역적격 상태로 전환시킬 수 있는 면역요법이 필요하다. HBV에 감염된 사람 중에 약 90%는 정상회복 되므로 신체내부에 HBV를 저지할 수 있는 정상적 면역방어체제가 있다고 생각되며, 면역요법에 의해 mutant virus 등에 의해 초래되는 불완전한 면역반응을 개선할 수 있다면 만성질환자의 치료도 가능하리라고 본다.

본 연구에서는 HBV에 대한 불완전한 면역반응을 개선할 수 있는 새로운 형태의 면역반응 유도제를 알아보기 위하여 HBV DNA, HBV RNA 백신 및 이들을 이입시킨 antigen presenting cell의 면역반응 유도성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

무균 환경에서 사육된 7주령의 암컷 C57BL6 마우스를 대한실험동물 센터에서 구입하여 실험에 사용하였다. 계명대학교 의과대학 동물실에서 사육하며 8주령에서 10주령의 마우스를 실험에 사용하였다.

2. 진핵용 발현 백터에 HBc DNA의 클로닝

만성 B형 간염환자의 혈청에서 분리한 DNA로부터 PCR법을 사용하여 precore 영역을 포함하는 HBV core 유전자를 증폭시켰다. PCR에 사용한 primer에는 각각 *BamH*I 과 *Xab*I 제한효소 부위를 삽입하여 제작하였으며, 염기서열은 sense 부위가 5'-GTA AGG ATC CGT TCA CCA GCA CCA TGC AA-3'이며, antisense 부위는 5'-GAG CTC TAG AGT TTC CCA CCT TAT GAG TCC-3'로 바이오니아사(한국)에서 합성하여 사용하였다. PCR로 증폭된 HBV core DNA를 pcDNA3에 클로닝(pc-HBc)하였다.

3. Renca 및 EL-4 세포주의 transfection

pc-HBc의 mRNA 발현을 조사하기 위하여, Renca 및 EL-4 세포에 Lipofectin reagent (GibcoBRL, 미국)를 이용하여 pc-HBc를 transfection 시켰다. 간기하면 serum-free RPMI 1640 800 ㎕에 DNA 8 ㎍을 녹여

serum-free RPMI1640 800 ㎕에 Lipofectin 48 ㎕ 가 혼합된 배지에 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 45분간 반응시킨 후 serum-free배지로 한번 세척 한 세포에 첨가하여 48시간 및 72시간 배양 후 실험에 이용하였다.

4. 역전사 중합효소 연쇄반응

RNA분리는 TRIzol를 이용하여 분리하였다. pc-HBc 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여, transfection 된 세포주를 0.1% DEPC가 첨가된 PBS로 3회 세척 후 TRI zol을 넣어 잘 섞은 후 100 ㎕의 클로로포름을 넣고 15분간 얼음에 정치 시켰다. 그 후 4℃, 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 윗층을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 45분 정치한 후 원침하고, 70% DEPC 에탄올로 1회 세척하였다. RNA를 실온에서 건조 시킨 후 DEPC가 첨가된 증류수에 녹여 RT-PCR에 사용하였다. RT-PCR반응에서 클로닝된 DNA의 증폭을 막기 위하여 RNA에 DNase를 첨가하여 실험에 사용하였다. cDNA 합성에는 Promega 사의 MMLV-RT와 oligo dT primer를 사용하였다. PCR 반응은 94℃에 10분간 1 cycle 반응 후, 94℃ 30초, 56℃ 45초, 72℃ 1분간 35 cycle 반응시켰으며, 72℃에서 5 min extention을 시행하였다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에 전기 영동 하여 DNA band를 확인하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응에 사용한 cytokine primer 서열은 Table 1에 정리하였다.

5. Dot blot analysis

Transient transfection된 세포주의 배양액을 회수하여 dot blot에 사용하였다. 배양액을 vacuum tranfer 로 nitrocellulose막에 전달시킨 후 3% bovine serum albumin-TPBS (0.05% Tween-20 in PBS)로 blocking한 후 높은 anti-HBc 또는 HBe역가를 보이는 만성 간염 보균자의 혈청을 blocking 용액에 500배 희석하여 4시간 반응시켰다. TPBS로 3회 세척 후 horseradish peroxidase conjugated goat anti human IgG(Tago Inc., CA, USA)를 blocking 용액에 500배 희석하여 반응시키고, ECL kit(Amersham Pharmacia Biotech Inc., 미국)를 사용하여 반응 정도를 측정하였다.

6. pc-HBC 생산 및 주사

많은 양의 endotoxin free 플라스미드를 얻기 위하여 Qiagen사(미국)의 Endofree plasmid maxi kit를 사용하여 플라스미드를 분리하였으며, 또한 미국의 Aldevron사(미국)에 의뢰하여 pcDNA3 vector에 cloning된 HBc DNA 플라스미드를 준비하였다. PBS 60 ㎕에 플라스미드 DNA 농도를 여러 농도로 녹여 근육내로 주사하였다.

7. HBc mRNA 생산

먼저 In vitro transcription에 사용할 HBc cDNA를 만들기 위하여 TagDT, Tag, T7 switch primer 및 T7 primer를 제작하였다(TagDT,5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3' V=GAC, N=GATC; Tag, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'; T7 switchprimer,5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCGGG-3' 및 T7, CCATCCTAATACGACTCACTA TAGGGC -3'). pc-HBc가 transfection된 Remca cell에서 Trizol 법을 이용하여 total RNA를 분리한 후 다음과 같이 HBc cDNA를 합성하였다. 먼저 시험관에 Tag dT(20 pmol), total RNA(2 ㎍), 10 mM dNTP mix(1 ㎕) 와 DEPC-DW를 넣어 total 12 ㎕가 되게 한뒤 65℃ 5분간 둔 후 즉시 ice에 두었다. 여기에 5X First-strand buffer(4 ㎕), 0.1M DTT(2 ㎕), 40 U/㎕ RNase inhibitor(1 ㎕)를 첨가하여 부드럽게 혼합한 후 42℃에 2분 두었다. 여기에

200 U/㎕ Superscript II Enz(1 ㎕)를 첨가하여 pipette으로 mix후 42℃에 30분 간 두었다. T7switch primer(20 pmol)을 첨가하고 42℃에 30분간 처리하여 1st cDNA를 합성하였다.

10x cDNA PCR reaction buffer(10 ㎕), 50pM Tag primer(0.5 ㎕), 20pM T7 primer(0.5 ㎕), 10mM dNTP mix(8 ㎕), advantage cDNA polymerase mix(2 ㎕, Clontech Laboratories, 미국)를 혼합한 후 여기에 상기한 cDNA를 2 ㎕ 첨가하고 DW로 총 volume을 100 ㎕로 조정한 후 PCR machine에서 95℃ 1분(1 cycle), 95℃ 30초, 65℃ 30초, 68℃ 6분 (25 cycle), 68℃ 7분(1 cycle)간 열처리하여 2nd cDNA를 합성하였다. 합성된 2nd cDNA는 QIA quick PCR purification kit(Qiagen, 미국)를 이용하여 순수 분리하였으며 농축하여 HBc RNA 합성에 사용하였다.

In vitro transcription은 Ambion사(미국)의 T7 mMessage mMachine Kit를 사용하였다. 간기하면 10x transcription buffer (2 ㎕), 2x Ribonucleotide mix(10 ㎕), cDNA (1 ㎍), 10x enzyme mix (2 ㎕)를 시험관에 넣은 후 RNase free DW를 첨가하여 총량이 20 ㎕ 되게 하였다. 가습된 37℃ 배양기에 3시간 작용 후 RNase free DNase I(2 U/㎕)를 1 ㎕ 넣고 15분 반응시켰다.

상기 반응믈을 1 mL Trizol이 든 시험관으로 옮긴 후 혼합하고 chloroform 150 ㎕를 첨가하여 혼합한 후 원심하였다(12,000 rpm, 15분). 상층액을 수거하여 동량의 isopropanol과 혼합한 후 원심하여 RNA pellet을 침전시켰다. 70% ethanol로 RNA pellet을 세척한 후 DEPC-DW 30 ㎕에 녹였으며 LiCl 25 ㎕를 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 RNA를 침전시켰다. 생성된 RNA pellet을 70% ethanol로 다시 세척한 후 DEPC-DW에 녹이고 농도를 측정하여 실험에 사용하였다.

8. DC 및 macrophage 분리 및 배양

마우스에서 장골을 추출한 후 골수를 분리하였다. 골수세포에 ACK lysis buffer 2 mL을 넣어 2분간 처치하여 RBC를 제거하였다. 세포를 3회 세척한 후 DMEM 배지에 넣어 5 x 10^6 cell/mL 농도로 부유하고 GM-CSF 40 ng/mL, IL-4 20 ng/mL을 첨가하여 4시간 배양하였다. 배양접시를 흔든 후 상층(비부착세포)을 수거하여 6 well plate에 7.5 x 10^6 cell/ 3 mL/well 농도로 분주하고 CO_2 배양기에서 배양하였다. 2일 후 plate를 부드럽게 흔들어 상층을 제거하고 GM-CSF 및 IL-4가 함유된 DMEM 배지(DMEM-GM-IL4)를 3 mL 첨가하여 배양하였다. 2일 후 배양접시를 부드럽게 흔들어 상층을 제거하고 다시 DMEM-GM-IL4를 첨가하여 cell cluster를 파괴한 후 세포수를 측정하고 실험에 사용하였다.

마우스 복강 macrophage는 다음과 같이 분리하였다. 마우스 복강에 생리식염수를 5-8 mL 주사 후 재 추출하여 복강 세포를 추출하였으며, 이세포를 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 37℃에 3시간 둔 후 접시에 부착된 세포를 수거하여 사용하였다.

9. Anti-HBc ELISA

마우스에 여러 형태의 백신을 주사한 후 3주가 경과한 후 심장을 천자하여 채혈하고 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 -20℃에서 보관하며 실험에 사용하였다. 간략하게 설명하면, 먼저 PBS로 혈청을 희석하여 recombinant HBc 가 코팅된 microtiter plate에 50 ㎕ 씩 첨가하고, 양성, 음성 대조군은 ELISA kit 내 제품을 사용하였다. 그 다음 horesradish peroxidase conjugated human HBc 항체 용액을 100 ㎕첨가하여 37℃에서 1시간 반응하였다. TPBS으로 5회 세척 후 tetramethyl benzidine 기질액 100 ㎕를 첨가하여 실온에서 30분간 반응한 후 1.6 N H_2SO_4를 100 ㎕ 첨가하여 반응을 정지시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. ELISA에 사

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Name[a]	Sequences (sense/antisense)
G3PDH	GCCACCCAGAAGACTGTGGATGGC/ CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC
MIG	GATCAAACCTGCCTAGATCC/ GGCTGTGTAGAACACAGAGT
IP-10	ACCATGAACCCAAGTGCTGCCGTC/ GCTTCACTCCAGTTAAGGAGCCCT
GM-CSF	GGATGTGGCTGCAGAATTTACTT/ TCATTTTTGGACTGGTTTTTTGCA
IL-12	GACATGTGGAATGGCGTCTC/ CCAACCAAGCAGAAGACAGC

[a]G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IP-10, IFN-γinducible protein 10; MIG, monokine induced by IFN-γ; GM-CSF, granulocyte monocyte colony stimylating factor; IL-12, interleukin-12.

용된 Kit는 녹십자사에서 제작한 GENEDIA Anti-HBc ELISA Plus kit를 사용하였다. 이번 실험에 사용된 ELISA는 microplate의 각 well에 코팅된 HBc 항원에 대하여 horesradish peroxidase conjugated human HBc 항체와 HBc DNA에 의해 유도된 마우스의 anti-HBc 항체에 대한 경쟁적 효소 면역반응으로 마우스 혈청의 항체 역가는 % competition 값으로 계산하였다. 계산식은 다음과 같다.

% competion = 100 - (실험군 혈청의 450 nm에서의 흡광도/양성 혈청의 450 nm에서의 흡광도×100)

성 적

1. HBc DNA 플라스미드 및 HBc RNA 생산

만성 간염환자의 혈액에서 DNA를 분리한 뒤 PCR법으로 HBc DNA를 증폭시키고 이를 pcDNA3 플라스미드에 클로닝하였다(Fig. 1A). 이 플라스미드(pc-HBc)를 EL-4 및 Renca cell에 transfection하여 stable transfectant를 분리한 후 이 세포로부터 RNA를 분리하였다. RNA에서 RT-PCR법으로 HBc mRNA가 세포내에서 발현되고 있음을 확인하였으며(Fig. 1B), 이 세포로부터 단백질을 추출하여 dot blotting법으로 HBc 단백질이 생산됨을 확인하였다(Fig. 1C). HBc DNA로부터 HBc RNA를 in vitro transcription 법으로 생산하였으며 생산된 RNA가 HBc 임을 RT-PCR법으로 확인하였다(Fig. 2).

2. HBc DNA의 항 HBV 면역반응 유도성

PBS, pcDNA3 플라스미드(100 μg), pc-HBc(100 μg)를 마우스(n = 3) 근육에 주사한 후 3주 째에 채혈하여 혈청을 수거하였으며, 혈청내 anti-HBc 항체를 ELISA법으로 측정하였다. PBS 및 pcDNA를 주사한 대조군에 비해 pc-HBc를 면역조치한 마우스에서 anti-HBc 항체반응이 증가하였다(Fig. 3A). 또 pcDNA3를 이입시킨 Renca 및 EL-4 세포와 pc-HBc를 이입시킨 Renca 및 EL-4 세포를 냉동한 후 녹여 마우스 복강에 주사하고 3주 후 채혈하여 위와 동일한 방법으로 anti-HBc 항체를 측정한 결과 pc-HBc를 이입시킨 Renca 및 EL-4를 주사한 군에서 항체반응이 증가함을 관찰하였다(Fig. 3B)

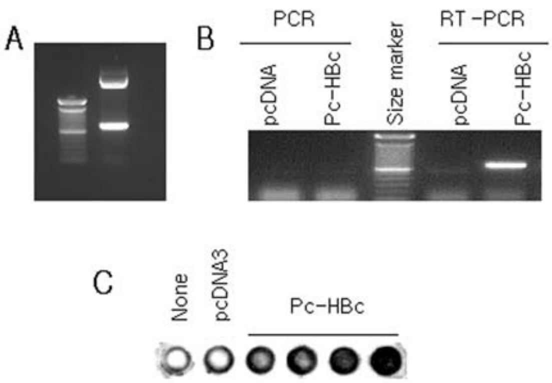


Fig. 1. Production of pc-HBC. HBc DNA amplified from DNA isolated from blood of HBV patient was cloned into pcDNA 3 plasmid (A). After trasnfecting pc-HBc into EL-4 and Renca cell, stable transfectants were selected in G418 media. HBc mRNA in transfectant was deteced by RT-PCR (B), and recombinant HBc protein in transfectant was detected by dot blotting (C).

3. LPS 에 의한 DC cytokine 발현 변화

DC를 항원을 발현시키는 세포로 사용하기 위하여 먼저 IFN-γ 및 LPS가 DC 사이토카인 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 배양된 DC에 IFN-γ(10 U/mL) 및 LPS(1 μg/mL)를 처치한 후 6시간 후 RNA를 수거하여 RT-PCR법으로 MIG, IP-10, GM-CSF, IL-12 발현 변화를 측정한 결과 IFN-γ는 DC 사이토카인 발현에 큰 영향을 미치지 않았으나 LPS는 IP-10, GM-CSF 및 IL-12의 발현을 대조군에 비해 현저히 증가시킴을 알수 있었다(Fig. 4A). LPS가 DC에 미치는 영향을 세밀히 분석하기 위해 배양된 DC에 LPS(1 μg/mL)를 처치한 후 2시간, 6시간 및 24시간 후 세포로 부터 RNA를 추출하여 RT-PCR을 실시한 결과 IP-10, GM-CSF 및 IL-12의 발현이 LPS처치 2시간 후부터 현저히 증가함을 관찰하였으며, 특히 GM-CSF의 경후 24시간 이후에도 지속적으로 증가하고 있음을 확인하였다(Fig. 4B).

4. HBc DNA, RNA, RNA 이입 DC 및 MP의 면역반응 유도성

여러 형태의 HBc 백신의 면역반응 유도성을 비교하기 위하여 마우스(n=3)에 PBS, pcDNA(100 μg), pc-HBC(10 및 100 μg), HBC RNA(0.5 및 1 μg)를 근육주사 하였으며, HBc RNA(1 μg)을 전달시킨 LPS 자극 DC (HBc-DC-LPS) 및 macorphage(HBc-MP)를 복강에 주사한 후 3주째 혈청을 분리하여 상기한 방법으로 anti-HBc 항체반응을 측정하였다. pc-HBc를 투여한 군에서는 투여된 DNA 백신에 비례하여 anti-HBc 항체반응이 증가하였으나, naked HBc mRNA를 투여한 결과 항체반응 증가가 나타나지 않았다. HBc RNA를 이입시킨 DC세포로 면역한 군에서는 다소 항체반응이 증가하였으나 pc-HBc에 비해 현저히 반응이 낮았으며, HBc mRNA를 이입이킨 MP의 경우 항체반응을 나타내지 않았다(Fig. 5).

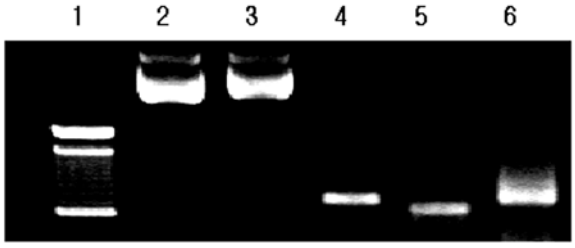
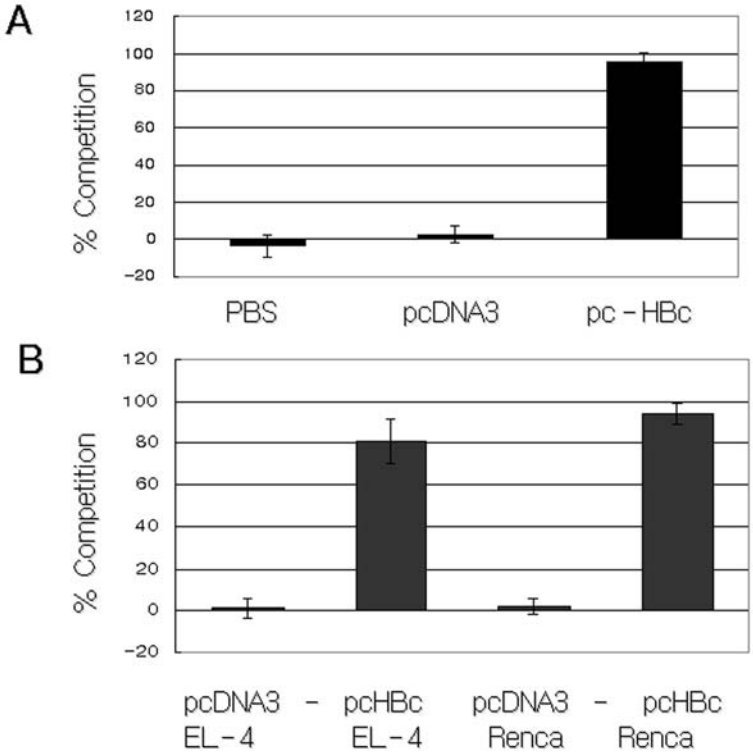


Fig. 2. Production of HBc RNA by in vitro transcription. Lane 1, size marker; lane 2, pcDNA 3 plasmid; lane 3, Pc-HBc; lane 4, HBc amplified from pc-HBc by PCR; lane 5, mHBC produced from HBc by in vitro transcription; lane 6, HBc amplified from mHBc by RT-PCR.



Fug. 3. Induction of anti-HBc antibody response by immunization with pc-HBc, pc-HBc-Renca and pc-HBc-EL-4. Mice were injected with PBS, pcDNA3 (100 ㎍), pc-HBc (100 ㎍), pcDNA-Renca, pc-HBc-Renca, pcDNA-EL-4 and pc-HBc-EL-4. Three weeks after immunization, serum was harvested and anti-HBc antibody in serum was measured by competitive ELISA.

고 찰

만성 B형간염의 불완전한 면역성을 극복시키는 방법을 찾기 위하여 여러 가지 형태의 HBc 백신을 만들어 그 효과를 비교해 보았다. 이 실험에 사용된 HBc 유전자는 만성간염환자에서 분리되

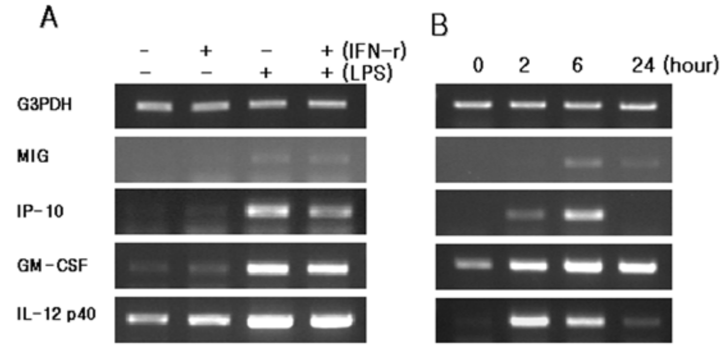


Fig. 4. Effect of LPS on cytokine gene expression of DC. DC was stimulated with IFN-γ (10 U/㎖) or LPS (1 μg/㎖) for 6 hours (A) or DC was stimulated with LPS (1 μg/㎖) for 2, 6, 24 hours (B). Total RNA was isolated and cytokine mRNA was detected by RT-PCR.

었음에도 불구하고 pcDNA 3 플라스미드에 클로닝하여 세포 및 생체 내에 전달하였을 때 mRNA 및 단백질 생산이 잘 되고 있음을 알 수 있었다. DNA 백신은 항원에 대한 항체반응과 세포성 면역반응을 모두 유발시킬 수 있다. 세포 내로 전달된 DNA 백신은 항원을 세포 내에서 발현시키며 이 항원은 B세포에 인식되어 항체생산을 유도시킨다. 또 세포 내에서 class I MHC 분자와 결합되어 세포면에 표출됨으로서 세포독성 T 세포의 활성화도 유발할 수 있다[8,9]. 이와 같은 일반적인 DNA 백신과 마찬가지로 이 연구에 사용된 pc-HBc 역시 마우스 생체 내에서 anti-HBc 항체반응을 잘 유도함을 알 수 있었다. 또 pc-HBc를 전달받은 Renca나 EL-4 세포주를 이용한 면역반응 조사결과에서도 항체반응이 증가함을 관찰하였다. 이 결과로 보아 이 연구에 사용된 HBc DNA는 anti-HBc 항체반응을 충분히 유도시킬 수 있다고 생각된다.

pc-HBc 백신에 비해 pc-HBc로부터 생산된 HBc mRNA를 바로 근육에 주사한 결과 anti-HBc 항체가 유도되지 않았다. HBc를 전달시키는 플라스미드내에 있는 CMV promoter는 강하게 유전자를 발현시킬 수 가 있으며 플라스미드 DNA의 genomic DNA 내 삽입가능성이 있어 세포 유전자에 이상을 일으킬 가능성이 있다. 이에 비해 HBc mRNA는 세포 유전자에 이상을 일으킬 가능성이 전혀 없으며, 일시적으로 항원을 표현시키기 때문에 DNA 형태의 백신에 비해 안전성에서 장점이 있다. 그러나 mRNA는 DNA에 비해 쉽게 파괴되는 단점이 있으며, 본 연구결과에서 HBc mRNA의 직접 주사가 비효과적인 이유는 조직 내에서 mRNA의 급속한 degradation이 주 원인인 것으로 생각된다. 따라서 RNA를 생체 내로 직접 주사하기에 앞서 생체 내에서 RNA 안정성을 증가시키는 방법이 고안되어야 할 것으로 사료된다.

DC는 강력한 항원제공능력을 가지고 있어 각종 난치성 질환의 예방 및 치료를 위해 연구되고 있다[10-12]. DC는 시험관 내에서 증식시켜 이용하는 방법과 생체 내에서 DC 세포수를 직접 증가시켜 질병치료에 이용하는 방법이 있다. 본 연구자는 기존에 알려진 DC 유도 사이토카인인 Flt-3 ligand[13,14] 플라스미드를 사용하여 생체 내에서 DC를 증가시킨 후 HBc 면역반응에 미치는 영향을 조사해 본 결과 Flt-3 ligand 농도가 증가할수록 pc-HBc에 의한 anti-HBc 항체량이 감소하였으며, pc-HBc와 flt-3 ligand의 접종시기 및 접종 부위에 따른 면역유발효과를 비교한 결과에서 두 플라스미드를 동시에 같은 장소에 주사할수록 면역반응이 감소함을 보고한

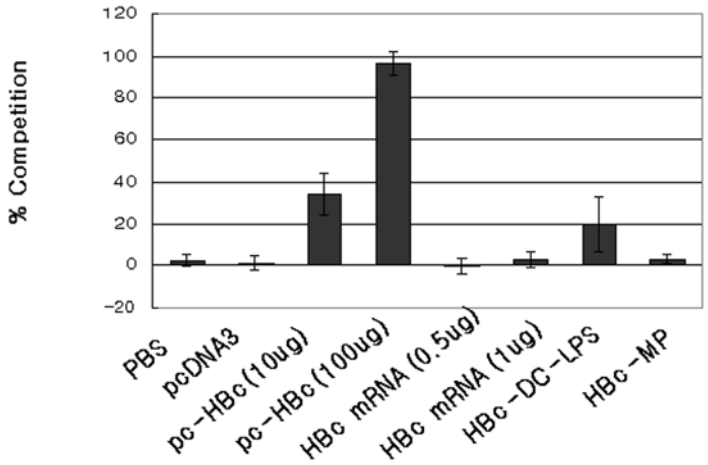


Fig. 5. Anti-HBc antibody response induced by immunization with pc-HBc, HBc mRNA and cells transfected with HBc mRNA. Mice were injected with PBS, pcDBA3 (100 μg), pc-HBc (10, 100 μg), HBc mRNA (0.5, 1 μg), HBc-DC-LPS, HBc-MP. Three weeks after immunization, serum was harvested and anti-HBc antibody in serum was

바가 있다[15]. Flt-3 ligand에 의해 생체 내에서 증가된 DC는 휴지기 상태에 있으며 세표면에 CD80과 CD86의 발현이 매우 낮은 것으로 알려져 있으며[16], 이런 DC는 high affinity CTLA4 수용체를 이용하여 T cell의 CD28에 결합하며 T cell 관용을 유도시킨다고 알려져 있다. 따라서 Flt3 ligand에 의해 생체 내에서 유도된 미성숙 DC는 항원을 관용원 양상으로 제공할 가능성이 있다[17,18]. 본 연구에서는 DC의 강력한 항원제공능력을 이용하기 위해 시험관 내에서 DC를 배양한 후 LPS로 자극하여 활성화시켜 항원제공 세포로 사용하고자 하였다. 먼저 배양된 DC를 LPS로 자극한 후 cytokine을 조사한 결과 IP-10, GM-CSF 및 IL-12의 발현이 모두 증가하였으며, DC에서 증가된 IP-10은 활성화된 T cell의 화학주성을 유발하고[19,20] GM-CSF[21] 및 IL-12 [22,23]는 면역활성제로 작용할 수 있다고 기대되었다. 그러나 실제 HBc mRNA를 전달시킨 DC를 마우스에 주사한 결과 pc-HBc에 비해 면역반응 유도성이 낮았다. DC는 성숙형과 비성숙형이 있으며, 항원 세포내 흡수는 비성숙형이 우수하고 항원 제공은 성숙형이 우수하며, LPS자극은 DC의 성숙을 유도한다고 알려져 있다[24-26]. HBc RNA를 전달 받은 후 RNA uptake에서 항원 발현까지 미성숙 DC가 효율적인지 또는 성숙형 DC가 효율적인지는 알 수 없으며, 따라서 DC 분화 상태에 따른 전달된 항원 RNA의 발현과의 상관관계는 추후 더 연구되어야 할 것으로 생각된다. 탐식세포는 DC 보다 쉽게 분리될 수 있어 항원제공세포로서의 기능성은 있으나 DC에 비해 항원제공 능력이 현저히 낮으며 특히 RNA를 전달 받을 경우 이를 단백질로 표현시키기 보다는 이물질로 up-take하여 RNA 자체를 파괴시킬 가능성이 있다.

이상의 실험을 통하여 HBc DNA 백신은 다른 형태의 백신에 비해 anti-HBc antibody 반응을 유도하는 데 매우 효과적임을 알 수 있다. mRNA 백신 또는 mRNA를 이입시킨 DC를 이용한 면역법은 더 효율적인 형태가 개발되어야 할 것으로 생각되며, DC의 경우 단순한 DC 수의 증가 또는 활성화 보다는 이런 유전자 발현에 의한 항원전달에 적합한 DC를 유도하는 방법이 우선

개발되어야 한다고 생각된다.

요 약

만성 B형간염의 불완전한 면역성을 극복시키는 방법을 찾기 위하여 여러 가지 형태의 HBc 백신을 만들어 그 효과를 비교해 보았다. Hepatitis B virus의 core 항원(HBc) 유전자를 삽입한 DNA 백신은 생체 내에서 anti-HBc antibody response를 잘 유도하였으며, 이 유전자를 이입받은 Renca 및 EL-4 cell도 면역반응을 유발할 수 있었다. 새로운 면역형태를 개발하기 위하여 우선 dendritic cell(DC)를 배양한 후 lipopolysaccharide를 처치한 결과 IP-10, GM-CSF, IL-12 등 중요 사이토카인 발현이 현저히 증가하였으며, 이 세포가 유전자를 이입 받을시 뛰어난 면역반응을 일으킬 것으로 예상하였다. 그러나 HBc mRNA 백신 자체 또는 이를 전달받은 DC나 탐식세포는 pc-HBc 백신에 비해 면역반응 유도성이 낮거나 없었다. 이상의 실험을 통하여 HBc DNA 백신은 다른 형태의 백신에 비해 anti-HBc antibody 반응을 유도하는 데 매우 효과적임을 알 수 있으며, mRNA 백신 또는 mRNA를 이입시킨 DC를 이용한 면역법은 더 효율적인 형태가 개발되어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;**13**:29-60.
2. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS, *et al.* Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;**2**(8256):1129-33.
3. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;**337**:1733-45.
4. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;**206**:149-73.
5. Moradpour D, Wands JR. Understanding hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1995;**332**:1092-3.
6. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995;**332**:1065-9.
7. Koh KC, Lee HS, Kim CY. Association of the core clustering mutations (codon 21-34) and the severity of chronic hepatitis B in Korean patients. *Korean J Intern Med* 1995;**10**:87-93.
8. Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet* 1993;**2**:1847-51.
9. Davis HL, Schirmbeck R, Reimann J, Whalen RG. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Hum Gene Ther* 1995;**6**:1447-56.
10. Brossart MD. Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases. *Transfus Apheresis Sci* 2002;**27**:183-6.
11. Piguet V, Blauvelt A. Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. *J Invest Dermatol* 2002;**119**:365-9.
12. Morse MA, Lyerly HK. DNA and RNA modified dendritic cell vaccines. *World J Surg* 2002;**26**:819-25.
13. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Layman SD, Shortman K, *et al.* Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996;**184**:1953-62.
14. He Y, Pimenov AA, Nayak JV, Plowey J, Falo LD

Jr, Huang L. Intravenous injection of naked DNA encoding secreted flt3 ligand dramatically increases the number of dendritic cells and natural killer cells in vivo. *Hum Gene Ther* 2000;**11**:547-54.

15. Kwon TK, Park JW. Intramuscular co-injection of naked DNA encoding HBV core antigen and Flt3 ligand suppresses anti-HBc antibody response. *Immunology letters* 2002;**81**:229-34.
16. Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol* 1996;**157**:1406-14.
17. Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA. Expanding dendritic cells *in vivo* enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol* 1998:**160**:5815-25.
18. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance *in vivo* requires CTLA4 engagement. *Immunity* 1997;**6**:411-7.
19. Arai K, Liu ZX, Lane T, Dennert G. IP-10 and Mig facilitate accumulation of T cells in the virus-infected liver. *Cell Immunol* 2002;**219**:48-56.
20. Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997;**61**:246-57.
21. Gaudernack G, Gjertsen MK. Combination of GM-CSF with antitumour vaccine strategies. *Eur J Cancer* 1999;**35** (Suppl) 3:S33-5.
22. Wigginton JM, Park JW, Gruys ME, Young HA, Jorcyk CL, Back TC, *et al*. Complete regression of established spontaneous mammary carcinoma and the therapeutic prevention of genetically programmed neoplastic transition by IL-12/plus IL-2: induction of local T cell infiltration, Fas/Fas ligand gene expression, and mammary epithelial apoptosis. *J Immunol* 2001;**166**:1156-68.
23. Park AY, Scott P. IL-12: keeping cell-mediated immunity alive. *Scand J Immunol* 2001;**53**:529-32.
24. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetstellier P, *et al*. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. *J Exp Med* 1996;**184**:1413-24.
25. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:621-67.
26. Suri RM, Austyn JM. Bacterial lipopolysaccharide contamination of commercial collagen preparations may mediate dendritic cell maturation in culture. *J Immunol Methods* 1998;**214**:149-63.