

기관고유연구사업 최종보고서

과제번호 : 1010090

Sprouty1과 Ndrp1억제를 통한 T세포관용 파괴 및 항암T세포요법 연구 II

Study on T cell tolerance breakage and
T cell Immunotherapy by inhibition of Sprouty1 and Ndrp1 (II)

과제책임자 : 이 상 진

국립암센터

(뒷면)

(측면)

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

(14 pont, 고딕체)

↑
5cm
↓

Sprouty1과 Ndrp1억제를 통한 T세포관용 파괴 및 항암T세포요법 연구 II

국립암센터

↑
3cm
↓

↑
6cm
↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “Sprouty1과 NdrG1억제를 통한 T세포관용 파괴 및 항암T세포요법 연구 II” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 11. 7

국립암센터

과 제 책 임 자 : 이 상 진

연 구 원 : 최 경 호

” : 이 지 은

” : 오 유 미

” : 신 재 훈

” : 임 동 표

목 차

< 요약 문 >

Sprouty1과 NdrG1억제를 통한 T세포관용 파괴 및 항암T세포요법 연구 II

Study on T cell tolerance breakage and T cell Immunotherapy by inhibition of Sprouty1 and NdrG1 (II)

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

< 요약 문 >

연구분야(코드)	G-4	과제번호	1010090
과제명	Sprouty1과 NdrG1억제를 통한 T세포관용 파괴 및 항암T세포요법 연구 II		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2010년 1월 1일 ~ 2012년 12월 31일	405,000
	1차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	135,000
	2차년도	2011년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일	135,000
	3차년도	2012년 1월 1일 ~ 2012년 12월 31일	135,000
과제책임자	성명	이상진	
	소속	비뇨생식기암 연구과	
색인단어	국문	Sprouty1, NdrG1, T세포관용, T세포요법	
	영문	Sprouty1, NdrG1, T cell tolerance, T cell therapy	
◆ 연구목표 <최종목표> Sprouty1 및 NdrG1 유전자조작생쥐를 이용한 면역관용파괴 및 항암효과분석 <당해년도 목표> 면역관용파괴 유전자조작T세포를 이용한 항암T세포요법의 확립			
◆ 연구내용 및 방법 <ul style="list-style-type: none"> - 최근 항암면역치료, 특히 T세포치료법이 악성흑색종 등 일부 종양에서 큰 효과를 보이면서 관심의 대상이 되고 있으나, 항암T세포요법이 극복해야 할 큰 장애요인으로 종양에 의한 T세포억제현상(T세포관용, T세포 anergy)이 존재함. 즉, 다수의 항암T세포가 종양에 접근한다 할지라도, 종양이 T세포를 불능화시키는 기전이 존재하므로, 그 효과가 크게 반감될 수 있음. 따라서 종양에 의한 T세포불능화의 기전을 이해하고 이를 방지할 수 있는 대책을 마련하는 것은 항암T세포요법의 치료효율을 크게 증진시킬 수 있음. - 본 연구자는 최근 T세포 관용관련분자로 새로이 Sprouty1 및 NdrG1을 발굴하였고, 선행연구를 통하여 이들의 작용기전 및 조절기전의 일부를 밝혔다. 특히 NdrG1의 경우, anergy자극에 의해 T세포에서 그 발현이 증가되고, T세포에 과발현시켰을 때 anergy유사상태를 보임이 증명되었음. 또한, anergy를 막아주는 costimulatory signal에 의해 그 활성이 억제되며, NdrG1이 결핍된 세포는 in vitro anergy유도가 되지 않음이 확인되었음. Sprouty1의 경우 dominant negative mutant를 발굴하여 dominant negative Sprouty1 mutant를 과발현하는 transgenic mice를 제작하였음 - 본 연구에서는 선행연구에 이은 후속연구로, NdrG1 KO mice 및 dominant negative Sprouty1 transgenic mice를 이용하여, 이들 단백질의 T세포 관용에서의 역할을 in vivo에서 증명하고, 이어서 이들 단백질의 T세포에서의 기능억제를 통해 항암T세포요법의 효능증가방안을 마련하려 시도하였음. - Sprouty1의 경우, dominant negative transgenic mice의 T세포반응을 분석한 결과, 그 항진효과가 너무 미약하게 나타난 관계로 이후 연구를 NdrG1에 집중하여 진행하였음. - NdrG1의 경우, NdrG1 KO mice를 이용한 개체수준의 연구를 통하여, NdrG1이 결핍된 세포를 항원특이적 T세포수용체 transgenic mice와 교배하여 in vivo anergy model에 적용한 결과, in vivo T cell anergy가 유도되지 않음이 확인되었음. - NdrG1의 결핍이 자가항원에 대한 면역관용을 파괴하여 자가면역현상이 일어나는지 분석한 결과, 특히 1년이상 높은 NdrG1 KO mice의 T세포는 과활성을 보이는 자가면역경향성을 보이며, 자가면역질환을 실험적으로 유도하였을 때 자가면역질환의 중증도가 심화됨을 확인함. 			

<p>- 따라서, NdrG1은 T세포 anergy현상의 중요한 mediator이고 자가면역질환 억제에 중요한 역할을 함을 선행연구 및 본 후속연구를 통하여 다각적으로 증명할 수 있었음. 현재 이 결과는 Nature medicine에 투고하여 revision중임.</p> <p>- 또한, NdrG1의 T세포 anergy와의 연관성에 대한 심화연구로서, cytokine(IL-2) 처리에 의한 anergy reversal조건에서 NdrG1의 인산화 및 degradation이 일어남을 증명함으로써 NdrG1이 anergy induction뿐 아니라 anergy maintenance에도 중요함을 증명하였음</p> <p>- 높은 NdrG1 KO mice에서 보이는 T세포과활성화가 T cell anergy blockade의 결과인지 확인하는 일환으로, 과활성화된 T cell subset을 분석한 결과, T cell anergy현상이 관찰되는 effector/memory T cell subset에서만 과활성화가 관찰됨으로써 이 현상의 T cell anergy와의 연관성을 높임.</p> <p>- 상기 연구를 바탕으로 종양특이적 CD4 T세포에서 NdrG1이 결핍되면 종양에 의한 T세포관용파괴를 통해 종양치료효과가 개선되는지를 확인하기 위하여, model항원(ovalbumin)을 발현하는 mouse lymphoma(EG7)을 mouse의 피부에 주사한 syngenic tumor graft model에서, ovalbumin특이적 TCR transgenic mice(OT-II 및 OT-I mice)로부터 분리한 CD4(OT-II) 및 CD8(OT-I) T세포를 정맥주사하는 combined T cell therapy model을 확립하고, NdrG1 KO CD4 T세포의 CD8 T세포의 종양살상능 증가효과를 관찰함. 그 결과, NdrG1 KO T세포의 종양살상능 증진효과를 확인하지 못함. 따라서, NdrG1결핍이 자가항원에 대한 반응성은 증가시켜 자가면역경향성은 증가시키지 않지만, 항종양효과를 항진시키기는 부족한 것으로 판정됨.</p> <p>- 따라서, T세포관용파괴의 표적단백질을 교체하여 기존 T세포관용유도에 중요한 단백질로 알려져 있던 CTLA4에 대한 dominant negative mutant를 새로이 발굴하고 이를 CTLA4-CD28 chimera라고 명명함. 상기 combined T cell therapy model을 이용하여 CTLA4-CD28 chimera유전자를 이입한 CD4 T cell의 CD8 T세포 종양살상능 증가효과를 확인한 결과, 종양살상능이 크게 증가함을 확인함. 이어서 CD8 T세포에도 유전자이입을 시행한 결과, 종양살상능이 극대화됨이 확인됨</p> <p>- 좀 더 physiological model로 악성흑색종세포(B16) 및 흑색종 종양항원특이적 TCR transgenic mice(Pmel-1)를 이용한 CD4 및 CD8 combined T cell therapy model을 통하여 CTLA4-CD28 chimera 유전자이입 T세포요법의 치료효능이 재차 확인됨.</p> <p>- 따라서, 표적단백질을 바꾼 결과, T세포관용파괴 유전자를 이입한 유전자이입 T세포요법은 기존 T세포요법의 항암효능을 크게 증강시킬 수 있음을 확인함. 본 연구결과는 미국혈액학회지 Blood(IF 10.558)에 최근 출간됨.</p>		
◆ 연구성과 -정량적 성과		
	구분	달성치/목표치 ¹⁾
	SCI 논문 편수	1/1
	IF 합	10.558/15
기타 성과	국내 및 PCT특허출원 1건	70.4%
1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값		
-정성적 성과 · NdrG1 KO mice를 이용한 T세포관용기전 연구를 통하여 NdrG1이 T cell anergy의 중요한 매개분자임을 in vivo에서 증명하였고, 자가면역질환 억제에 중요한 역할을 함을 입증함. · 또다른 T세포관용유도단백질 CTLA4에 대한 dominant negative mutant를 새로이 개발하여 이를 이용한 유전자이입 T세포요법이 T세포의 항암효능을 증진시킬 수 있음을 확인함으로써 T세포관용파괴 유전자이입 T세포요법의 실현가능성을 입증함.		
◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)		
성명	이상진, 최경호, 이지은, 오유미, 신재훈, 임동표	

* 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	Study on T cell tolerance breakage and T cell Immunotherapy by inhibition of Sprouty1 and Ndrgr1 (II)
Key Words	Sprouty1, Ndrgr1, T cell tolerance, T cell therapy
Project Leader	Sang Jin Lee
Associated Company	Research Institute National Cancer Center

Recently, cancer immunotherapy, especially T cell therapy is showing significant progress in treatment of some tumors including malignant melanoma. However, T cell therapy has a barrier to overcome to succeed: tumor-induced T cell inactivation (T cell tolerance or T cell anergy). Therefore, understanding the mechanisms of T cell inactivation and developing strategies to overcome this phenomenon are key issues for enhancing the efficacy of T cell therapy. In the previous study, we developed new T cell tolerance-mediating molecules, Sprouty1 and Ndrgr1 and identified parts of their action mechanism and regulatory mechanism. Especially, we showed that Ndrgr1 protein is induced by anergic stimulus and Ndrgr1-overexpressing T cells show the anergic phenotype. Also, the inhibitory activity of Ndrgr1 was inhibited by costimulatory signal which prevents the induction of anergy. Furthermore, Ndrgr1-deficient T cells was not able to be anergized in vitro. In case of Sprouty1, we found a novel dominant negative mutant of Sprouty1 and generated dominant negative Sprouty1(DN-Spry1) transgenic mice.

In this study, we tried to analyze the role of Ndrgr1 and Sprouty1 in T cell tolerance using Ndrgr1 KO mice and DN-Spry1 transgenic mice. Subsequently, we aimed at developing a novel strategy to inhibit these molecules in T cell to enhance anti-tumor T cell reactivity. Unfortunately, the analysis of DN-Spry1 transgenic T cells revealed that the effect of DN-Spry1 in enhancing T cell reactivity was too mild to mediate efficient in vitro and in vivo effect. Therefore, we decided to focus on the analysis of Ndrgr1 KO mice. When we cross-bred Ndrgr1 KO mice to antigen-specific TCR transgenic mice and performed in vivo anergy induction using these mice, we could observe that Ndrgr1 KO T cells were not anergized in vivo. Moreover, when we analyzed the autoimmune tendency of Ndrgr1 KO mice, the old Ndrgr1 KO T cells showed hyperresponsiveness when stimulated. This autoimmune tendency was further verified by the experiment, in which these T cells aggravated the inducible autoimmunity when adoptively transferred to another normal mice to induce autoimmune encephalitis. Thus, Ndrgr1 is a novel mediator of T cell anergy and contributes to maintenance of T cell tolerance to prevent autoimmunity.

To test whether Ndrgr1 KO T cells could enhance therapeutic efficacy of anti-tumor T cell therapy, we developed a T cell therapy model in mice. In this model, ovalbumin-transfected mouse lymphoma cells (E.G7) were used as target tumor cells, and ovalbumin was used as a

model tumor antigen. As the source of the tumor antigen-specific T cells, ovalbumin-specific TCR transgenic mice for either CD4 (OT-II mice) or CD8 T cells(OT-I mice) were used. When OT-I T cells were co-injected with OT-II T cells intravenously into E.G7 tumor-bearing mice, OT-II T cells could enhance the tumor-killing activity of OT-I T cells, which supported the effectiveness of CD4 and CD8 combined T cell therapy. However, when Ndrgr1 KO OT-II T cells were coinjected with OT-I T cells, Ndrgr1 KO OT-II T cells did not further enhance tumor-killing activity of OT-I T cells compared with the wild type OT-II T cells. Thus, although Ndrgr1 KO T cells enhanced the autoreactive potency of self-reactive T cells, they failed to enhance therapeutic efficacy of anti-tumor CD4 T cells.

Therefore, we decided to change the target molecule to manipulate to break T cell tolerance against tumor. The new target molecule was CTLA4, which is well-known tolerance inducing receptor. To this end, we developed a novel CTLA4 dominant negative mutant called CTLA4-CD28 chimera. When this mutant was transduced into OT-II T cells using retroviral vector, these modified T cells could enhance tumor-killing activity of OT-I T cells. Moreover, CTLA4 mutant-modified OT-I cells together with the modified OT-II T cells further enhanced anti-tumor effect in vivo. When we tried the second tumor model using B16 melanoma and anti-melanoma antigen-specific TCR transgenic T cells(Pmel-1 mice), the similar enhancing effect was observed by CTLA4-CD28 chimera gene modification. Thus, using a novel CTLA4 dominant negative mutant gene modification, we could verify that tolerance-breaking gene-modification of tumor-specific T cells could enhance therapeutic efficacy of anti-tumor T cell therapy.

※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

1. 연구의 최종목표

(1) 최종목표

Sprouty1 및 Ndrgr1 유전자조작생쥐를 이용한 면역관용과피 및 항암효과분석

(2) 연구의 필요성

1) 연구의 배경

고형 암의 치료에 있어 가장 일차적이고 효과적인 방법은 외과적 절제이다. 그러나 외과적 절제만으로는 residual tumor나 metastatic foci의 제거가 쉽지 않으므로 그동안 chemotherapy, radiation therapy등 여러가지 치료가 병행되어 왔다. 그러나 이러한 다양한 치료법의 발전에도 불구하고 multiple metastasis나 외과적 절제 후 보이는 biochemical recurrence의 효과적인 치료는 아직 어려운 실정이며 현재 의학계가 해결해야 할 큰 숙제로 남아있다. 이러한 **여러 장기의 tumor foci나 가지적으로 확인이 불가능한 micro-foci의 치료를 위한 좋은 대안으로 체내의 면역계를 이용한 면역요법이 제시될 수 있다.** 체내에는 tumor-associated antigen을 인지할 수 있는 특이적인 항체 내지 T세포가 존재하며 이들이 가지는 특이성과 조직침투력은 여러 곳에 산재해 있는 tumor foci를 한꺼번에 효과적으로 제거할 수 있는 좋은 이론적 근거를 제공한다. 특히 T세포는 그 자신이 extravasation을 통해 직접 조직에 침투하여 특이적으로 항원을 발현하는 세포를 살해할 수 있으므로 여러 전이조직에 각각 침투하여 암세포를 제거할 수 있는 장점을 가지고 있다.

그러나, **이러한 암특이T세포가 암세포를 효과적으로 제거하기 위해서 넘어야 할 장애요인으로 T세포 관용(T cell tolerance)라는 현상이 있다.** T세포 관용이란 T세포가 자신이 인지하는 항원을 만나서 활성화자극을 받더라도 반응하지 못하는 현상을 말한다. 생리적으로는 자가면역을 방지하는 기전으로 정상조직을 인지하는 T세포는 비활성화되는 것을 의미하는데, 암의 입장에서 보면 암세포가 항암면역을 저지하려는 면역회피기전으로 이해되고 있다. 즉, 암세포가 자신을 항원으로 인지하는 T세포를 만나면 그 T세포를 비활성화시킴으로써 자신을 지킨다는 것이다. 암조직에 의한 T세포관용의 예는 그림1과 같은 실험에서 단적으로 보여진다. melanoma환자의 혈액에서 채취한 암항원특이T세포(A2/Melan-A tetramer양성, 원형으로 표시된 부위)는 암항원(Melan-A peptide)으로 자극시 IFN- γ 를 분비하는 반면, 암조직이나 암조직립프절에서 채취한 암항원특이T세포는 암항원으로 자극해도 IFN- γ 를 분비하지 못하는 비활성화상태에 있음을 알 수 있다. 이는 암환자의 말초혈액에는 암세포를 인지하여 반응할 수 있는 T세포가 존재하지만 이들 T세포가 암조직에 가게 되면 국소적으로 비활성화, 즉 관용에 빠지게 됨을 의미한다. 이는 역으로 말하면, 암세포에 의한 T세포관용을 깨게 되면 암세포가 T세포에 의해 효과적으로 제거될 수 있음을 의미한다. **따라서 T세포관용과피는 항암면역요법의 좋은 target이 될 수 있다.**

실제 이러한 논리는 임상시험에도 적용되어 효과를 본 바 있다. 기존의 관용관련분자로 알려져 있는 T세포표면의 CTLA4에 대한 blocking antibody를 metastatic melanoma환자에게 투여한 결과 일부 환자에서 metastatic foci의 regression을 관찰함으로써 관용과피가 항암면역을 증강시킴을 확인할 수 있었다(그림2).

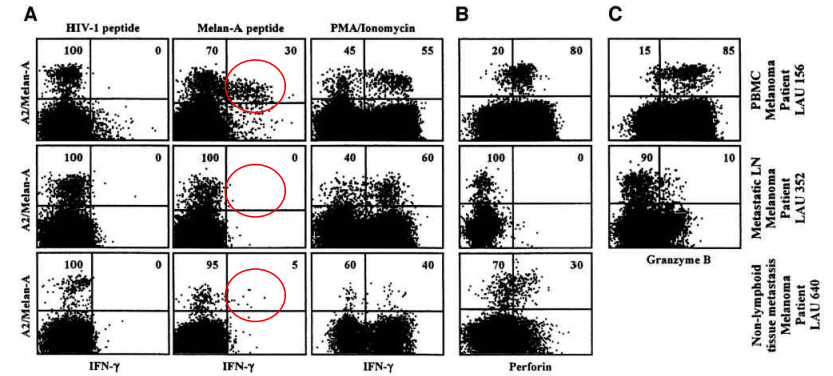


그림1. Tumor에 의한 항암T세포관용의 예 (CANCER RESEARCH 64, 2865-2873, April 15, 2004)

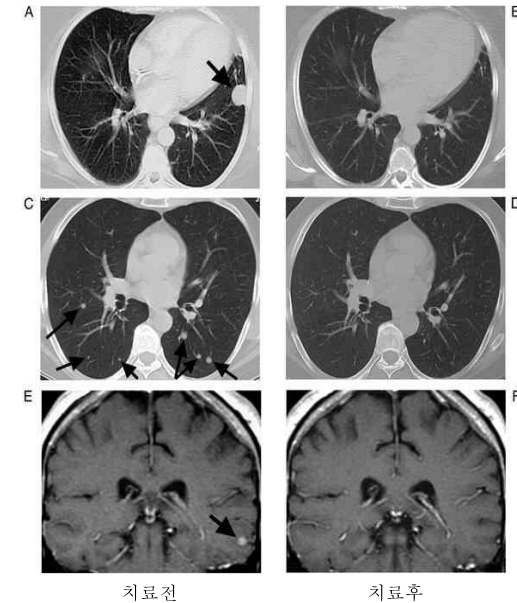


그림2. metastatic melanoma에 대한 항CTLA4항체요법의 임상시험결과 (PNAS 2003 Jul 8;100(14):8372-7)

2) T세포관용의 기전 ; T세포마비(T cell anergy)

이러한 T세포관용은 어떻게 일어나는가? 대표적인 T세포관용의 기전으로 T세포마비(T cell anergy)라는 현상이 있다. T cell anergy란 T세포가 항원을 인지할 때 염증(inflammation)과 같은 적절한 동반자극(costimulation)을 받지 못하면 T세포의 기능이 마비되어 다음에 다시 항원을 인지하더라도 반응할 수 없는 상태가 됨을 말한다(그림3). Physiological하게는 self-reactive T cell이 자기 자신의 조직을 인지하는 경우 대부분 염증반응없이, 즉 costimulation없이 자기 항원을 인지하게 되므로 이들 세포는 마비에 빠지게 됨으로써 자가면역을 방지한다는 model이다. 조금 더 분자적인 model로 설명하자면, 대부분의 T세포가 인지하는 항원은 dendritic cell과 같은 항원제시세포(antigen presenting cell)에 의해 탐식,소화되어 MHC molecule에 얹어져서 세포 표면에 display되면 T세포는 T세포수용체(T cell receptor)를 이용하여 이 항원을 인지하고 세포내부로 활성화신호를 전달한다. 이 때 항원제시세포가 inflammation등에 의해서 activation되어 있는 상태라면 표면에 B7과 같은 costimulatory molecule을 발현시키게 되는 데, 이 경우 T세포는 그에 대한 ligand(CD28)를 이용하여 costimulatory signal을 동시에 받게 된다. 그러나 항원제시세포가 활성화되지 않은 상태에서, 즉 costimulatory molecule이 발현되지 않은 상태에서 T세포가 항원을 인지하게 되면 T세포는 마비에 빠지게 된다. 면역반응이 활성화되어야 하는 감염의 경우는 대부분 염증반응을 동반하므로 적절한 T세포활성화를 이룰 수 있지만, 정상조직의 경우는 대부분 염증반응없이 항원을 항원제시세포가 제시하게 되므로 자가면역 T세포는 마비에 빠지게 된다는 논리다.

반면, 암세포의 경우도 이러한 자가면역방지 기전을 악용하여 T세포마비를 일으킬 수 있는데, 암항원이 특이적인 T세포를 자극할 때 근처에 적절한 염증반응을 동반하지 못하거나, 암세포 자체가 어떤 억제인자를 분비함으로써 적절한 costimulation을 방해한다면, 암항원을 인지하는 T세포는 마비에 빠지게 된다.

그러면, 어떻게 T세포가 활성화자극으로 사용될 수 있는 T세포수용체 자극을 마비를 일으키는 자극으로 바꾸게 되는가? 이는 T세포수용체가 세포내부로 전달하는 신호는 활성화 신호와 비활성화 신호를 동시에 전달하게 되는데, costimulatory signal이 비활성화신호를 막고 활성화신호를 강화시키면 결과적으로 T세포전체의 활성화로 나타나게 되고, costimulatory signal이 없는 상태에서는 비활성화신호가 더욱 강화되거나 오래 지속됨으로써 T세포가 비활성화상태에 빠진다고 설명될 수 있다. 그러므로 우리가 T세포수용체를 통해 내려오는 비활성화 신호체계와 그에 관련되는 분자들의 작용을 자세히 이해할 수 있다면, 이들 비활성화 신호체계를 억제함으로써 T세포가 면역관용에 빠지는 것을 억제할 수 있고, 마비에 빠진 항암T세포를 다시 활성화시켜 암세포를 공격하도록 할 수 있을 것이다.

따라서, **T세포관용, 즉 T세포수용체의 비활성화 신호전달체계의 분자기전을 이해하고** 이를 바탕으로 **관용파괴법을 개발**하여 항암T세포면역을 증강시키는 것이 중요한 면역요법의 target이 된다 하겠다.

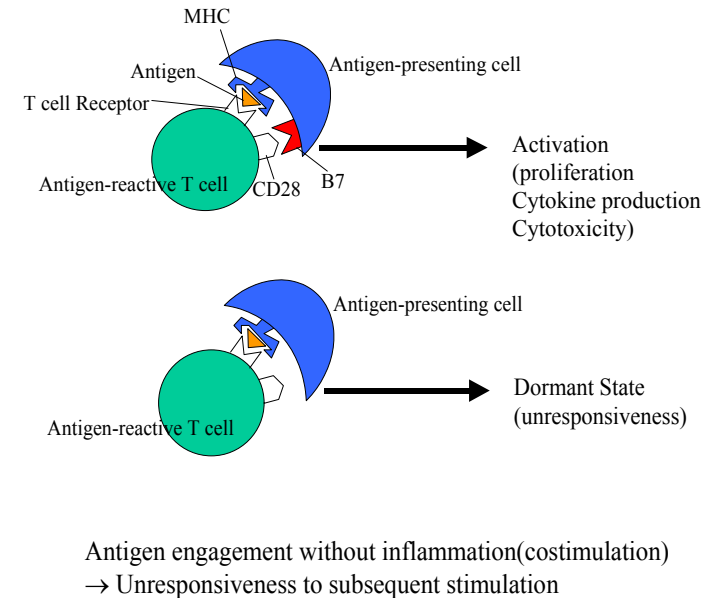


그림3. T cell anergy model의 모식도

3) 새로운 관용관련분자 ; Sprouty1과 Ndrgr1

본 연구자는 선행연구를 통해 T세포마비에 중요한 역할을 하는 분자들을 찾아내려는 노력을 경주하여 T세포마비의 cell culture model을 이용한 DNA microarray screening으로부터 Sprouty1과 Ndrgr1이라는 단백질을 찾아내었다.

Sprouty는 처음 초파리에서 Fibroblast growth factor receptor(FGFR)의 antagonist로 발견된 signaling adaptor molecule로서 FGF이외에도 VEGF, PDGF등의 receptor tyrosine kinase(RTK) signaling을 일반적으로 억제하는 것으로 알려져 왔다. 현재 포유류에서는 Sprouty1,2,3,4의 4가지 isoform이 존재하는 것으로 알려져 있다. 그 작용기전으로는 Ras/MAPK pathway에 특이적으로 작용하는 것으로 알려져 있으나 구체적인 작용기전은 growth factor나 세포별로 다양하게 보고되고 있다. 대표적으로 Sprouty1,2의 경우, FGF자극을 받은 후 Grb2와 결합하여 그 하위 신호전달을 저해하는 것이 보고되었고 Sprouty4의 경우, VEGF자극 후 Raf와 결합하여 그 하위 신호전달을 억제하는 것이 알려져 있다.

그러나, 대부분 Sprouty에 대한 연구는 growth factor signaling에 국한되어 있어 면역계에서의 Sprouty단백질의 역할은 보고된 바가 없었으며, 본 연구자에 의해 최초로 T세포에서의 역할이 보고되었다(J. of Immunology 176(10):6034-4). 하지만, 구체적인 작용기전에 대해서는 아직 연구가 부족한 상태였다.

NdrG1은 처음 N-myc에 의해 그 발현이 억제되는 유전자로 발견되었으며 그 외에 각종 세포분화 model에서 분화 자극에 의해 그 발현이 증가되는 유전자로 Differential display법에 의해 찾아짐으로써 세포분화과정에 관여하는 유전자로 의심되어 왔다. 또한 각종 cellular stress(hypoxia, ER stress, DNA damaging reagent등)에 의해서도 그 발현이 증가됨이 보고되었다. NdrG1의 기능에 대한 연구는 많이 보고되지 않았으나, 한 논문에 따르면 암세포에서 NdrG1의 발현이 감소되어 있고, 암세포에 NdrG1을 과발현했을 때 세포성장을 억제됨을 확인할 수 있었다. 최근 암과 NdrG1과의 관련성에서는 전이된 암조직에서 NdrG1단백질 발현이 감소되어 있고, NdrG1 과발현이 in vitro invasion assay에서 암세포침윤을 억제하고 실험동물에 주입하였을 때 NdrG1이 과발현된 세포의 전이가 현저히 억제됨이 여러 논문에 게재됨으로써 암전이억제 유전자로서 주목받고 있다. 그러나 역시 이런 기능에 관련된 분자기전은 아직 전혀 밝혀져 있지 않은 상태이고, 특히 T세포에서의 NdrG1의 역할은 전혀 알려져 있지 않았다.

Sprouty1은 기존 growth factor receptor signaling에서 신호전달을 억제함으로써 세포성장 및 이동등을 억제하는 단백질로 알려졌다, 또 흥미로운 점은 anergic T cell의 경우 Ras pathway가 현저히 억제되어 있으므로 T세포마비에 관여할 가능성이 높았고, NdrG1의 경우도 tumor growth를 억제함으로써 growth arrest와의 연관성이 제시되어 왔으며, 이는 anergic T cell이 일종의 growth arrest상태에 있음을 고려할 때 좋은 연관성을 보였다.

자세한 실험에서 두 단백질 모두 T세포마비가 유도되는 상황에서 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었고 이어진 기능적 연구에서 두 단백질의 과발현이 T세포마비와 유사하게 T세포활성화를 억제함을 관찰함으로써 이들 단백질이 T세포관용에 중요한 역할을 할 가능성을 시사했다(자세한 내용은 선행연구 편 참조).

그러나 이들 단백질의 T세포내에서의 활성화억제기전에 대한 연구 및 in vivo에서의 역할 규명에 관한 연구가 필요한 상태였고 진전된 기전연구를 통하여 이들 단백질의 기능 억제 reagent를 개발함으로써 아래 기술된 T세포치료에 응용할 수 있을 것으로 사료되었다.

4) Adoptive T cell transfer therapy

최근 면역요법 중에 가장 촉망받는 치료법으로는 세포치료법을 들 수 있다. 그 중에서도 T세포 치료법은 가시적인 성과를 올리고 있다. 기본적인 idea는 환자 체내의 암항원특이 T세포를 꺼내어 in vitro 세포배양상태에서 대량증폭하여 다시 환자의 혈액으로 돌려보냄으로써 암세포를 공격하도록 한다는 논리이다. 즉, 소수의 암특이T세포의 양을 키워서 인체진술을 편다는 것이다. 암항원특이 T세포의 source로는 최근까지 암조직으로부터 분리한 Tumor infiltrating lymphocyte(TIL)을 사용하였으며 최근 시도된 임상시험에서는 50%에 가까운 response rate를 기록하였다. 그러나, TIL의 분리 및 배양, 증폭과정은 복잡하고 긴 기간 (3-6주)이 소요되므로 최근에는 이들 TIL을 환자의 말초혈액으로부터 분리된 T세포로 대체하려는 노력이 이루어지고 있다. 특히 암항원특이적 T세포수용체 유전자를 retrovirus를 이용하여 말초혈액세포에 transduction시킴으로써 암항원특이적인 T세포의 수를 늘린 후 다시 환자혈액으로 돌려주는 시도가 일부 성공을 거듭으로써 유전자치료의 첫 임상성공사례로 보고된 바 있다(Science. 2006 ;314(5796):126-9)(그림 4). 따라서 이런 방식의 유전자조작 T세포 치료법(Adoptive transfer therapy of genetically engineered T cell)의 전망이 상당히 밝아지고 있는 현실이다.

그러나 이들 치료가 역시 일부 환자에게서만 효과를 보인 것을 감안하면 역시 아직 넘어야 할 장벽이 많이 있음을 알 수 있고, 그런 면에서 볼 때 T세포 유전자조작을 통한 면역관용의 파괴는 이러한 장벽의 일부를 제거하는 시도가 될 것이다. 따라서 본 연구자는 새롭게 발견된 면역관용관련 분자 Sprouty1과 NdrG1의 작용기전연구로부터 얻어진 정보를 바탕으로 이들

분자를 억제시킬 수 있는 조절분자(dominant negative mutant 혹은 siRNA)를 탑재한 viral vector를 design하여 말초혈액 T세포에 전달함으로써 면역관용이 파괴된 T세포를 환자에게 되돌려주는 시도에 대한 연구를 고안하였다.(그림 5).

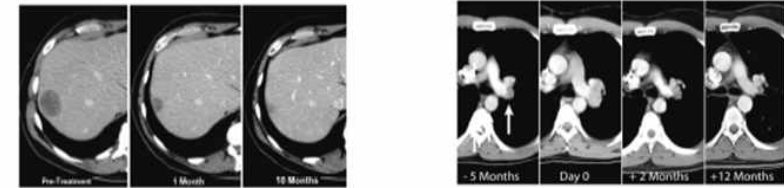


그림 4. TCR 유전자조작 T세포의 치료효과

Molecular dissection of tolerance-related molecules/negative regulators of T cells (Spry1, Ndr1, Cbl-b, TGF-beta, CTLA-4, etc.)

Development of reagents modulating regulators (Dominant negative mutants / siRNA in lentivirus/adeno-associated virus)

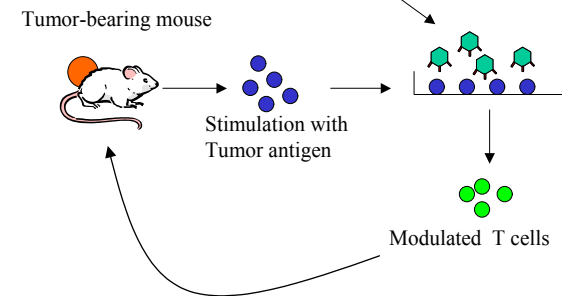


그림 5. 면역관용파괴를 통한 adoptive T cell therapy의 모식도

(3) 선행연구

1) NdrG1

가. Novel T cell anergy factor, NdrG1의 발견

본 연구진은 DNA microarray기법을 이용하여 CD4(+) T cell clone[#]에서 anergy유발조건에서는 발현이 증가되지만, anergy유발이 억제된 조건에서는 발현되지 않는 유전자를 screening한 결과, 13종의 단백질이 이런 조건을 만족함을 확인하였다(그림 6). 이중 Egr2는 기존 study를 통하여 T세포 anergy를 유도하는 중요한 전사인자로 밝혀진 바 있다. 그러나, Egr2는 다른 유전자의 발현을 조절하는 전사인자이므로, 실제 T세포의 활성화를 억제하는 effector molecule은 Egr2에 의해 유도되는 다른 단백질일 가능성이 높았다(그림 7). ([#]T cell clone: primary T cell을 반복적인 항원자극으로 line화시킨 세포로서, T 세포 anergy현상이 처음 보고된 system이고, 정상세포의 세포주기가 유지되는 특성이 있음)

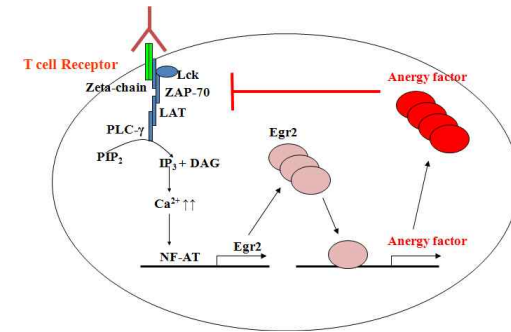


그림 7. Anergy factor 작용의 모식도

따라서, 본 연구진은 T cell clone에 anergy자극(CD28 costimulation을 동반하지 않은 TCR signal)을 가한 후, 시간에 따른 유전자 발현양상을 DNA microarray로 다시 분석한 결과, 대부분의 유전자는 Egr2와 유사하게 자극 후 2시간에 mRNA발현이 정점에 다다른 반면, 2가지 유전자만이 4시간 이후에 정점에 다다른 것을 관찰하였고, 이 중 한 유전자인 NdrG1은 그 발현이 5일후까지도 계속 증가되어 있음을 확인하였다(그림 8). 이러한 발현 양상은 단백질수준에서도 확인되어, NdrG1단백질은 delayed induction이 되어 18시간에 정점에 도달함이 western blot으로 확인되었고(그림 9a), anergy유발자극 후 5일이 지난 시점, 즉 T세포의 불활성화가 완료된 시점에서도 높은 단백질 수준을 유지하고 있음이 확인되었다(그림 9b). 이 시점에서는 T세포에 CD28 costimulation이 동반된 TCR signal을 가하더라도 IL-2의 생성이 훨씬 감소된 anergic 상태를 보임이 확인되었다(그림 9c). 또한 첫 번째 DNA microarray의 결과와 유사하게 anergy유도를 억제하는 약물이 처리된 상태에서는 NdrG1단백질의 증가가 억제됨이 역시 확인되었다(그림 10). 따라서, NdrG1은 anergy유발자극에 의해 그 발현이 증가되고, anergic T세포에서 그 발현이 유지되며, anergy억제제에 의해 발현이 억제되는 등, anergy현상을 매개할 가능성이 매우 높다 하겠다. 특히, NdrG1은 cancer cell에서 그 발현이 감소되고, NdrG1을 과발현하는 경우 cancer cell의 growth arrest를 유발한다는 보고 등이 있어, T세포의 불활성화에도 기여할 가능성이 높게 점쳐졌다.

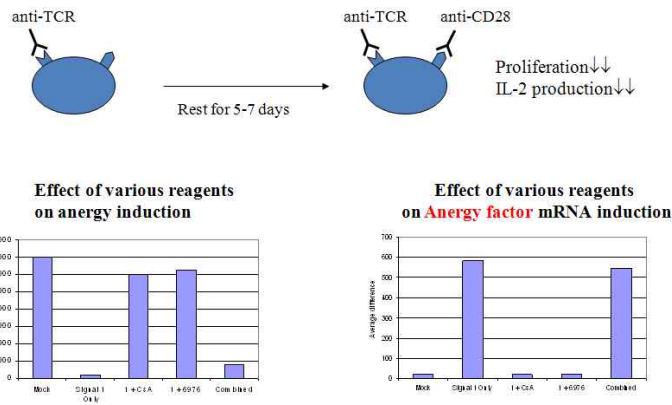


그림 6. T세포 anergy유도의 세포배양 model.

(anti-TCR, agonistic antibody로서 TCR signal, 즉, anergy signal(signal 1)로 작용. anti-CD28, agonistic antibody로서 CD28 costimulation signal(signal 2)로 작용. Signal I only, anti-TCR자극; I+Csa, anti-TCR+cyclosporinA; I+6976, anti-TCR+Go6976; Combined, anti-TCR+Erk inhibitor+P38 inhibitor+Rapamycin)

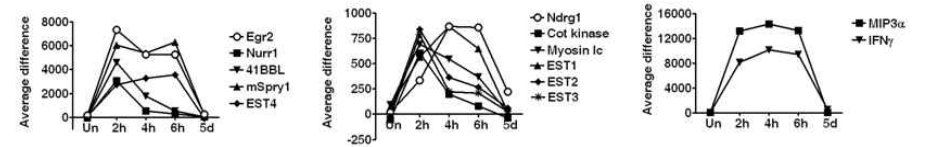


그림 8. anergy 자극 후 13개 후보유전자 mRNA의 발현양상

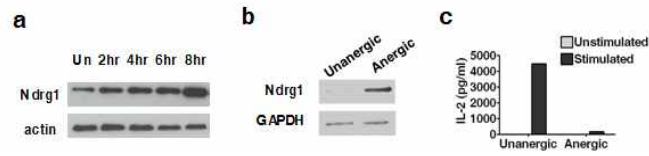


그림 9. anergy 자극에 의한 NdrG1 단백질의 발현양상

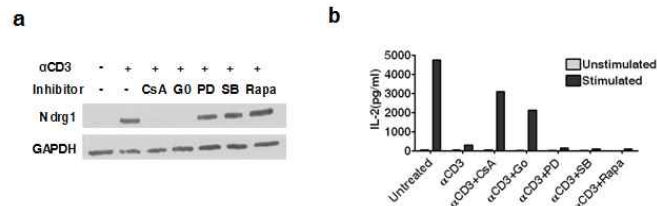


그림 10. anergy 유도 억제제에 의한 NdrG1 단백질의 발현억제

(CD3는 TCR complex의 일원으로서 anti-CD3는 anti-TCR과 같은 anergy signal로 사용되며, 서로 interchangeably 사용됨)

나. NdrG1과발현에 의한 anergy 유도

상기 연구에 의해 anergy유발조건에서 NdrG1이 증가함은 관찰되었으나, NdrG1이 기능적으로 anergy를 매개하는지 확인하기 위하여 T세포에 NdrG1을 과발현한 후 anergy와 같이 T세포의 불활성화가 유도되는가를 확인하였다. NdrG1과발현을 위해, TAT protein transduction domain을 tagging한 NdrG1 재조합단백질을 T세포에 처리한 후, rechallenge 자극으로 anti-CD28 존재하에서 다양한 농도의 anti-CD3를 처리한 결과, 세포분열의 억제 및 현저한 IL-2 생성감소를 관찰할 수 있었다(그림 11). 이러한 현상은 정상적으로 anergy가 유발된 세포가 보이는 세포분열의 억제 및 IL-2 감소정도와 유사한 양상을 보임으로써 NdrG1의 과발현이 anergy 유사 상황을 유도하였음이 확인되었다(그림 11). 또한, 정상적인 anergic T세포는 IL-2에 비해 IL-3 및 IFN- γ 의 생성은 덜 영향받는 것으로 알려져 있는데, NdrG1과발현세포에서도 동일한 현상을 관찰할 수 있었다(그림 11). 마지막으로, 정상적인 anergic T세포는 비록 TCR 자극 및 costimulation에 의한 활성화는 억제되어 있으나, IL-2에 의한 세포분열은 정상적이 알려져 있는데, NdrG1과발현세포 역시 IL-2에 의한 세포분열은 유지되어 있음이 확인되었다(그림 12). 따라서, NdrG1과발현은 T세포 anergy를 유도함이 확인되었다.

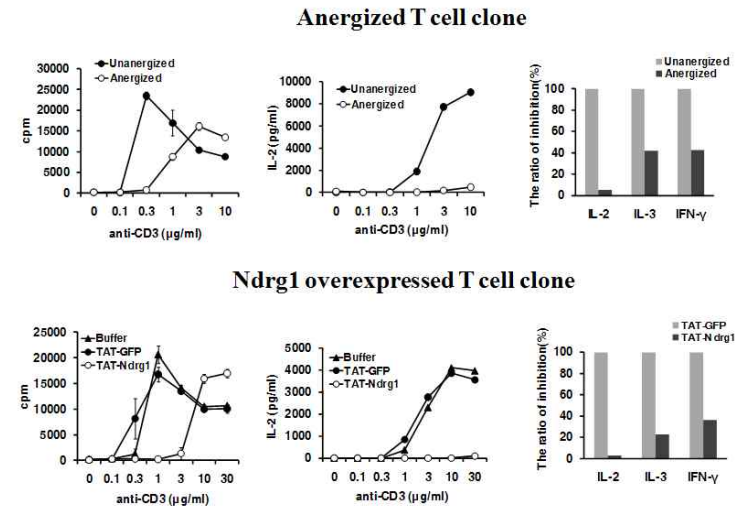


그림 11. NdrG1과발현T세포 및 정상적인 anergic T세포의 TCR 및 CD28 costimulation에 의한 활성화

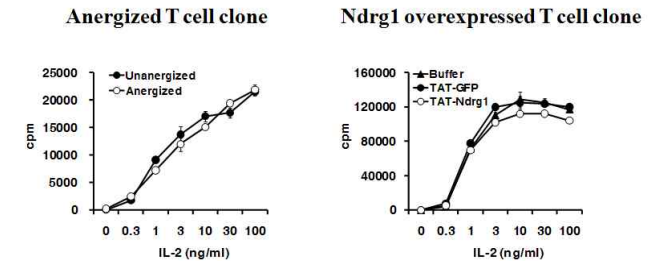


그림 12. NdrG1과발현T세포 및 정상적인 anergic T세포의 IL-2에 의한 분열능

다. CD28 costimulation에 의한 NdrG1 억제

그림 3에서 TCR signal과 함께 CD28 signal을 받으면 anergy에 빠지지 않음은 다시 말하면, TCR signal에 의해 생기는 anergy factor가 어떤 식으로든 CD28 signal에 의해 억제되어야 함을 의미한다. 따라서, NdrG1이 anergy factor라면 CD28 signal에 의해 그 기능이 억제되어야 함을 의미한다. 기존 보고에 의하면, CD28 signal에는 Akt의 활성화가 매우 중요함이 보고되어 있는데, NdrG1단백질에는 Akt에 의해 인산화될 수 있는 아미노산잔기가 5개 존재함이 보고되어 있다(그림 13a). 따라서, NdrG1이 CD28 하위의 Akt에 의해 인산화되면, NdrG1의 기능이 억제될 가능성이 있었다. 이를 확인하기 위해, NdrG1발현 플라스미드와 Akt발현 플라스미드를 IL-2 promoter luciferase 플라스미드와 함께 Jurkat T 세포주에 과발현한 후 anti-CD3 및 anti-CD28 자극에 의한 IL-2 promoter활성화를 확인하였다. Akt없

이 NdrG1만을 과발현한 경우, 위의 T cell clone의 현상과 일치하게 IL-2 promoter 활성이 dose-dependent하게 감소함이 확인되었다(그림 13b). 그러나, Akt와 함께 co-transfection하였을 때는 NdrG1에 의한 IL-2 억제현상이 소실됨을 확인함으로써, Akt가 NdrG1의 기능을 억제함을 확인하였다(그림 9c). 그러나, 이것이 Akt에 의한 NdrG1인산화의 결과인지는 확신할 수 없으므로, NdrG1의 Akt인산화부위를 모두 mutation시켜 인산화가 불가능하도록 mutant를 제작한 후 Akt와 co-transfection한 결과, Akt에 의한 기능소실을 관찰할 수 없었다(그림 13c). 그러므로, Akt는 NdrG1을 인산화시킴으로써 NdrG1의 기능을 억제함을 확인할 수 있었다. Akt에 의한 NdrG1의 인산화는, 면역침전된 NdrG1을 anti-pAktS 항체(Akt에 의해 인산화된 peptide만을 인지하는 항 phosphoAkt-substrate 항체)로 western blot함으로써 확인하였고, mutant의 경우는 인산화 band를 관찰하지 못함으로써 인산화가 효과적으로 저해되었음을 확인하였다(그림 13d).

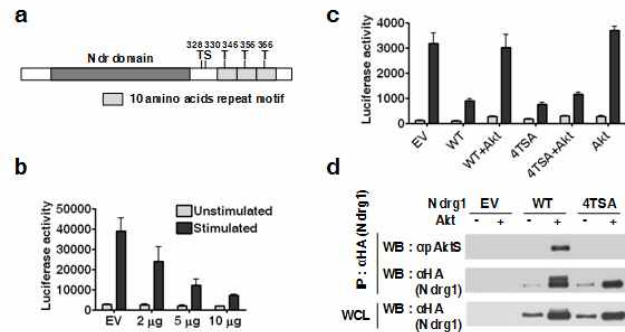


그림 13. Akt에 의한 NdrG1 인산화 및 기능억제

(T, threonine; S, serine; EV, empty vector control; WT, wild type NdrG1; 4TSA, 인산화불능화된 NdrG1 mutant)

Akt과발현이 아닌 실제 CD28 signal이 NdrG1을 인산화시키는지 확인하기 위해 NdrG1이 과발현된 Jurkat T세포를 anti-CD28 항체로 자극한 후 NdrG1 면역침전 및 anti-pAktS 항체로 western blot을 시행한 결과, 일시적으로 NdrG1의 인산화가 검출되었다. 그러나, 예상밖으로 NdrG1 단백질 자체의 양이 CD28자극에 의해 감소됨이 확인되었다(그림 14a). NdrG1의 인산화가 NdrG1단백질감소에 선행함으로써, 인산화된 NdrG1이 CD28자극에 의해 degradation되는지 확인하기 위해, 인산화불능화 NdrG1 mutant를 과발현시킨 세포에 CD28자극을 가한 결과, NdrG1단백질의 감소현상이 관찰되지 않음으로써, NdrG1인산화가 단백질 감소에 기여함을 확인하였다(그림 14b). 또한, NdrG1 단백질감소가 proteasome pathway에 의한 단백질 degradation에 의한지를 확인하기 위하여, proteasome inhibitor인 MG132존재하에서 실험한 결과, 단백질 감소현상이 없어짐이 관찰되었다(그림 14c). 따라서, CD28 signal은 NdrG1의 인산화를 유도하고, 인산화된 NdrG1은 proteasome의존적으로 degradation됨이 확인되었다.

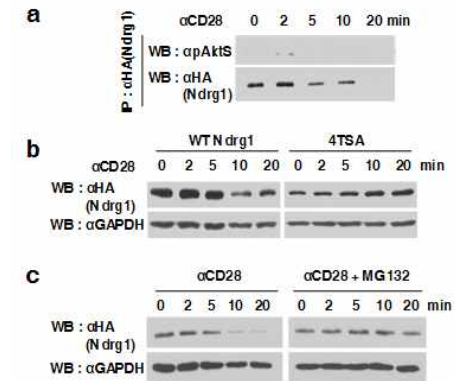


그림 14. CD28 signal에 의한 NdrG1의 인산화 및 degradation

실제 anergy유도상황에서 CD28 signal에 의해 NdrG1이 인산화 및 degradation되는지 확인하기 위하여, T cell clone을 MG132 존재하에서 anti-CD3 및 anti-CD28 (혹은 IL-2)로 밤새 자극한 후, NdrG1 면역침전 및 anti-pAktS 항체로 western blot한 결과, anti-CD3로만 자극했을 때보다, anti-CD3 및 anti-CD28 (혹은 IL-2까지 결합했을 때) 훨씬 강한 인산화가 일어남을 확인하였다(IL-2는 역시 Akt pathway를 통하여 anergy유도를 억제하는 것으로 알려져 있다)(그림 15a). 이러한 인산화는 NdrG1단백질에 대한 western blot에서는 upper shift된 band로 관찰되었다. 그러나, proteasome inhibitor가 없는 상황에서는 이러한 upper shift된 band가 관찰되지 않음으로써, 인산화된 band는 빠르게 degradation되어 사라짐이 확인되었다. 또한 이러한 인산화는 Akt상위의 PI3K inhibitor인 LY294002를 처리한 경우 사라짐이 확인됨으로써, Akt에 의한 인산화일 가능성을 높혀주었다. 이러한 18시간 정도의 anti-CD3 및 anti-CD28자극은, 5일 후 restimulation으로 anergy정도를 측정하였을 때, 완전치는 않았지만 부분적으로 anergy 유도를 저해한 것으로 확인되었다(그림 15b). 따라서, CD28 costimulation 존재하에서 NdrG1의 인산화 및 degradation이 Akt pathway의존적으로 일어남을 확인할 수 있었다. 그러므로, NdrG1은 인산화 및 degradation을 통해 CD28 costimulation에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

정리하면, anergy자극(costimulation없는 TCR자극)에 의해 NdrG1발현이 유도되고 증가된 NdrG1단백질은 restimulation phase에서 TCR 및 costimulation에 의한 T세포활성화를 저해하게 된다. 반면, CD28 costimulation과 함께 TCR자극이 주어지면 CD28 signal 및 이때 생성되는 IL-2가 Akt를 활성화시켜 NdrG1을 인산화시키고 degradation시킴으로써, 다음 restimulation시 정상적인 T세포활성화를 이룰 수 있게 된다고 할 수 있다(그림 16).

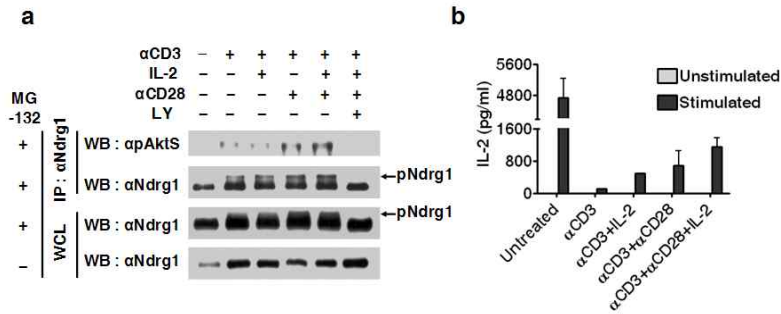


그림 15. CD28 및 IL-2에 의한 NdrG1의 인산화 및 anergy유도 억제현상

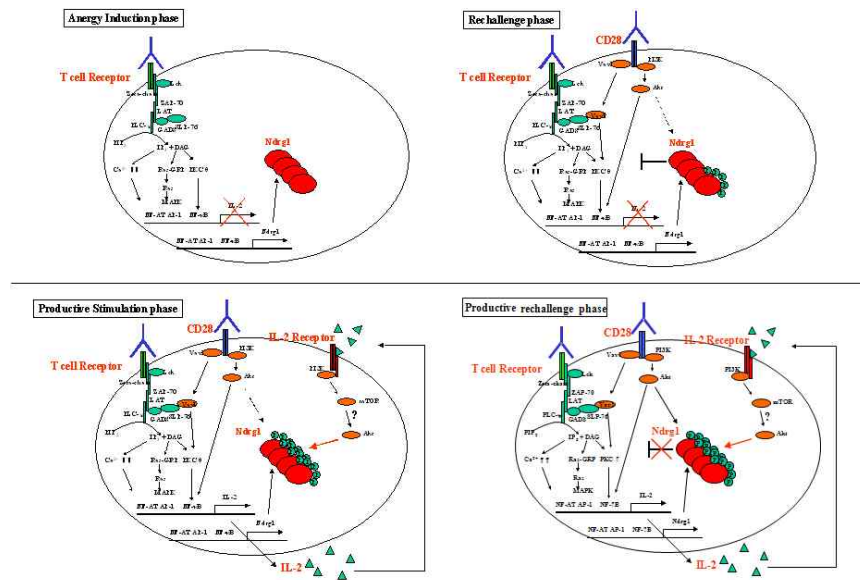


그림 16. CD28 및 IL-2 recetor를 통한 NdrG1의 활성화 억제

라. Egr2에 의한 NdrG1전사유도

위의 그림 7에 의하면, anergy 자극에 의한 NdrG1의 발현은 Egr2의 발현에 비해 delay되어 일어나고, Egr2가 anergy factor의 전사를 유도할 것으로 예상되므로, NdrG1이 Egr2에 의한 전사유도될 가능성이

높다 하겠다. 따라서, NdrG1 promoter부위를 luciferase vector에 cloning하여 NdrG1 promoter luciferase 플라스미드를 제작하고, 이를 Egr2발현플라스미드와 함께 Jurkat T세포에 transfection한 후 NdrG1 promoter활성을 측정된 결과, mild하지만 재현성있게 NdrG1 promoter가 활성화됨을 관찰하였다. 반면, 보고된 Egr2 mutant플라스미드로 같은 실험을 시행한 결과, NdrG1 promoter 활성을 10배이상 증가시킴을 확인하였다(그림 17a). 이 때 Egr2 플라스미드의 IL-2 promoter활성억제를 측정해보면, wild type Egr2는 moderate한 IL-2억제를 보이는 반면, mutant는 강력한 IL-2억제를 보임으로써, NdrG1 promoter활성화와 좋은 일치를 보임을 확인하였다(그림 17b). 따라서 Egr2 mutant는 constitutively active mutant로 작용하여 NdrG1의 전사를 촉진시킴으로써 IL-2 전사를 억제하는 것으로 해석된다.

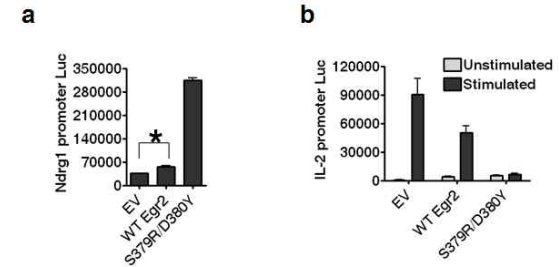


그림 17. Egr2에 의한 NdrG1 promoter활성조절

이러한 Egr2에 의한 NdrG1전사촉진이 Egr2가 직접적으로 NdrG1 promoter에 결합하여 일어나는 지를 확인하기 위하여 T cell clone에서 anergy 자극후, Egr2항체를 이용한 NdrG1 promoter부위의 chromatin immunoprecipitation(ChIP) assay를 시행한 결과, 시간이 경과함에 따라 Egr2 단백질이 NdrG1 promoter에 강력하게 결합함을 확인하였다(그림 18). 이는 Egr2 단백질 자체의 발현증가와 병행하여 관찰되었고, 이에 비해 NdrG1단백질은 지연되어 증가됨이 확인되었다. 따라서, anergy 자극에 의해 유도되는 Egr2단백질은 NdrG1 promoter에 결합하여 NdrG1 전사촉진 및 단백질 발현을 유도한다고 해석된다.

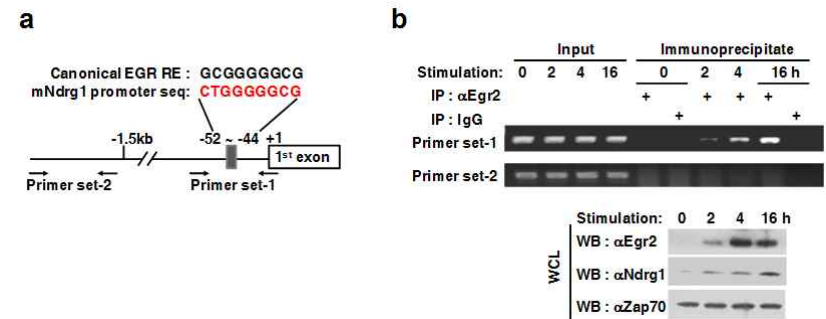


그림 18. Anergy 자극에 의한 Egr2단백질의 NdrG1 promoter결합실험

마. Ndrg1 knockout T세포의 anergy 저항성

Ndrg1이 T세포 anergy 유도에 중요한 역할을 한다는 결정적인 증명은, Ndrg1이 없는 경우, anergy가 유도되는 양은 가일 것이다. 따라서, 본 연구진은 Ndrg1 knockout mice를 보유한 일본 National cardiovascular center의 Dr. Miyata와의 공동연구를 통해, Ndrg1 knockout mice를 도입하였다. Ndrg1 KO mice로부터 CD4 T세포를 분리한 후, anti-TCR 및 anti-CD28으로 activation시켜 previously activated T세포로 분화시킨 후, 이들 세포를 anti-TCR만을 처리하여 anergy를 유도하였다. 수일 후 restimulation한 결과, wild type T세포는 anergy가 유도되어 IL-2생성이 현저히 감소된 반면, Ndrg1 KO T세포는 IL-2 감소가 관찰되지 않으므로써, anergy가 유도되지 않음을 확인하였다(그림 19). 따라서, Ndrg1은 T세포 anergy유도에 결정적인 역할을 함이 증명되었다.

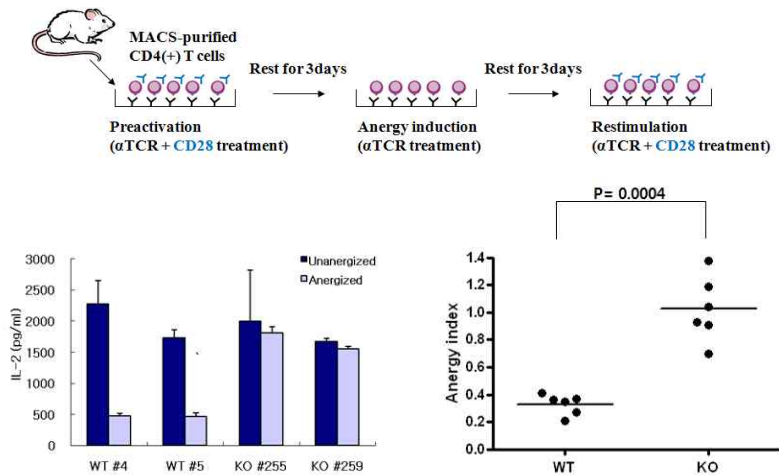


그림 19. Ndrg1 KO T cell의 in vitro anergy저항성
(anergy index = IL-2 produced by energized cells/IL-2 produced by unenergized cells)

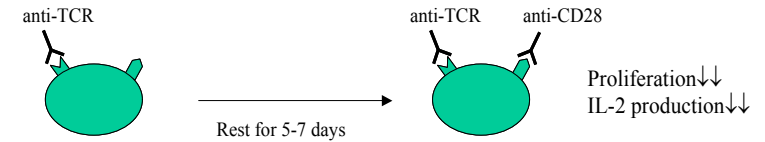
종합적으로, 선행연구를 통해 Ndrg1은 anergy자극에 의해 그 발현이 증가되고, T세포에 과발현시켰을 때 anergy유사상태를 보임이 증명되었다. 또한, anergy를 막아주는 costimulatory signal에 의해 그 활성이 억제되며, Ndrg1이 결핍된 세포는 in vitro anergy 유도가 되지 않음이 확인되었다.

2) Sprouty1

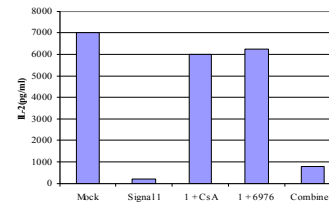
가. Sprouty1의 T세포기전 연구

Sprouty1의 경우도 Ndrg1과 함께 anergy조건에서 발현이 유도되는 단백질로 찾아졌으며 (그림 20), 주로 작용기전 연구에 집중하여 TCR자극(anergy자극)에 의해 발현유도된 Sprouty1이 활성화자극에 의해

T세포와 항원제시세포의 접촉부위(immune synapse)로 이동하여 TCR signaling의 proximal signaling complex에 결합함으로써 T세포 활성화를 억제함을 증명하였고, 이를 미국면역학회지에 보고한 바 있다 (그림 21).



Effect of various reagents on anergy induction



Effect of various reagents on mRNA induction

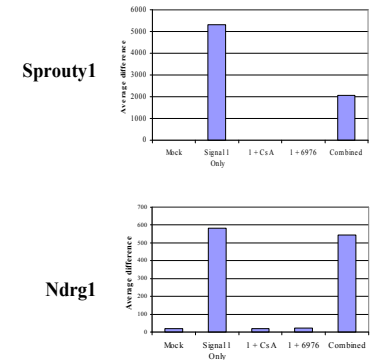
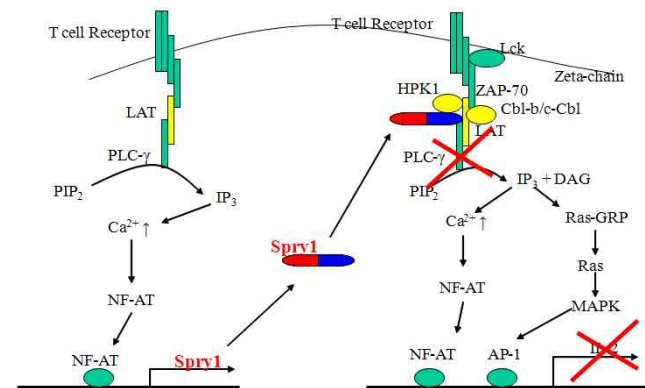


그림 20. T세포마비 model을 이용한 DNA microarray screening



(Journal of Immunology, 183(11): 7178-7186)

그림 21. Sprouty1의 T세포 활성화 억제기전

나. Sprouty1 dominant negative mutant의 발견

Sprouty1 domain study의 일환으로 몇가지 internal deletion mutant를 제작하여 Jurkat transfection 및 IL-2 promoter luciferase assay를 시행한 결과, Sprouty4의 Raf-binding motif(RBM)에 해당하는, Sprouty1의 부위를 deletion시킨 mutant(dRBM)의 경우, T세포억제력을 상실하는 것을 관찰하였다. 더욱이 특이한 점은 이 mutant가 억제력을 상실한 것 뿐 아니라, 오히려 IL-2 transcription을 향진시키는 효과를 보인다는 것이다(그림 50). 따라서, 이 mutant가 endogenous Sprouty1에 대해 dominant negative효과를 가진 것이 아닌가 하는 추측이 가능하다. 이 가능성을 검증하기 위하여, wild type Sprouty1과 dRBM mutant를 cotransfection하여 dRBM mutant가 wild type Sprouty1의 기능을 상쇄할 수 있는가 관찰한 결과, 실제 dRBM mutant는 wild type의 IL-2 transcription 억제력을 상쇄시킴을 관찰함으로써, dRBM mutant가 dominant negative mutant임을 확인하였다(그림 22). 또한 RBM 부위는 각 Sprouty isoform (Sprouty1,2,3,4)에 공통적으로 잘 보존되어 있으므로, Sprouty1의 dRBM mutant가 다른 Sprouty isoform에 대해 같은 효과가 있는지를 test해 보기 위해 각 Sprouty isoform을 Jurkat cell에 overexpress하고 같이 dRBM mutant를 cotransfection하여 IL-2 promoter luciferase activity를 측정하였다. 그 결과, Sprouty1 dRBM mutant는 Sprouty4에 대해서도 dominant negative 기능이 있음이 확인되었다. 그러나 Sprouty2에 대해서는 이러한 기능이 관찰되지 않았다(그림 23).

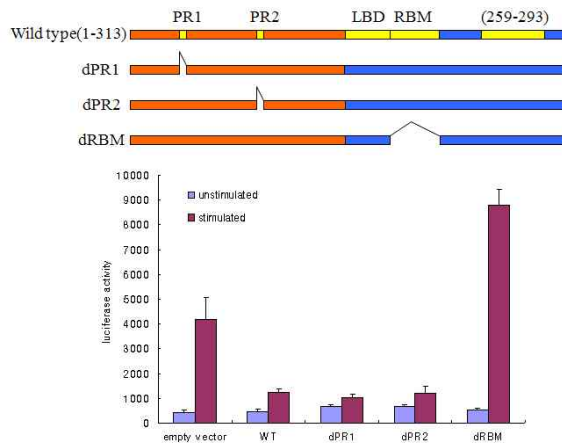


그림 22. dRBM mutant의 IL-2 transcription 향진 효과

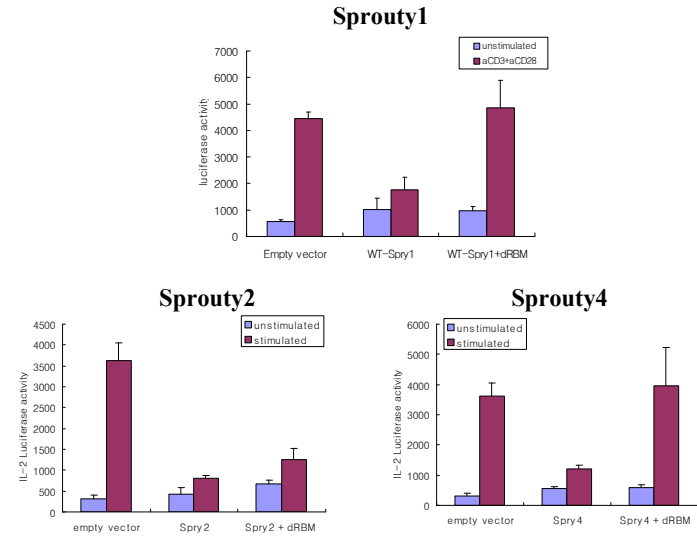


그림 23. Sprouty1 dRBM mutant의 각 isoform에 대한 영향

다. Sprouty1 dominant negative mutant transgenic mice의 제작

Sprouty1 dominant negative mutant의 발견은 본 과제의 목적인 항암T세포기능 향상에 기여할 가능성이 높았다. 즉, 항암T세포에 Sprouty1 DN mutant를 과발현시키면 potential energy mediator인 Sprouty1의 기능을 억제함으로써 항암T세포의 활성능을 크게 향진시킬 수 있기 때문이다. 더욱이, 이 mutant는 Sprouty4의 기능까지 함께 억제할 수 있으므로, double knockout의 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대되었다.

따라서, 본 연구진은 Sprouty1 DN mutant를 T cell에서만 과발현시킨 transgenic mice를 제조하여 그 in vivo 기능 및 항암활성을 연구하기로 하였다. 이를 위하여 transgenic promoter로 CD4 promoter(CD8 silencer-deleted)를 사용함으로써 Sprouty1 DN mutant단백질이 T세포에 한정하여 발현되도록 tissue-specificity를 부여하였다(그림 24).

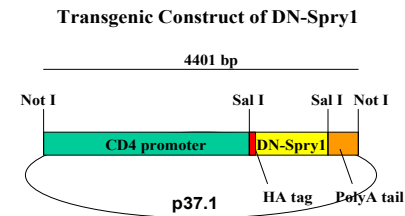


그림 24. Sprouty1 DN transgenic construct의 구조

2. 연구의 내용 및 결과

(1) 유전자조작생쥐를 이용한 in vivo 연구결과

상기 선행연구를 통하여 Ndrgr1과 Sprouty1의 T세포anergy에서의 분자적 조절기전 및 억제기전을 밝힐 수 있었으나, 그 physiological relevance는 in vivo model을 통해 더욱 공고해질 수 있다. 즉, 이들 유전자가 deletion되거나 그 기능이 억제된 유전자조작 생쥐의 경우는 개체내의 T세포의 활성이 증가되어 자가면역질환이 심화될 것으로 예상되며, 항암T세포의 경우는 그 활성 증가로 종양의 regression을 더욱 촉진시킬 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

따라서, 유전자조작생쥐를 이용한 in vivo 실험을 위하여 본 연구진은 Ndrgr1 knockout mice를 사용하였고, Sprouty1에 대해서는 상기연구에서 발굴된 dominant negative mutant Sprouty1(DN-Spry1)을 T세포 특이적 promoter에 의해 발현되도록 조작한 transgenic mice를 제작하였다.

1) Sprouty1 dominant negative transgenic mice를 이용한 연구

가. Transgenic mice에서의 transgene 발현분석

선행연구에서 발굴된 Sprouty1의 dominant negative mutant(DN-Spry1) cDNA를 CD4 promoter하에서 발현하도록 transgenic mice를 제작한 결과, 3종의 transgenic line을 확보하여 실험을 진행하였다(그림 25). DN-Spry1발현은 splenocyte에서 western blot 및 flow cytometry(intracellular staining)로 확인하였다. western blot상에서는 세 line 공히 단백질 발현이 확인되었으나, flow cytometry결과, Line#3은 소수의 T세포만이 DN-Spry1을 발현하는 것으로 확인되었고, Line#6는 T세포이외의 다른 세포군에서도 DN-Spry1단백질이 발현되는 것이 확인되었다. Line#2의 경우는 모든 T세포에서 DN-Spry1이 발현되면서 다른 세포군에서는 발현되지 않는, T세포 특이적인 단백질 발현이 확인되었다(그림 20). 이런 heterogenous한 발현 pattern은 transgenic cDNA의 random incorporation에 따른 주변 genomic loci의 영향으로 보여진다.

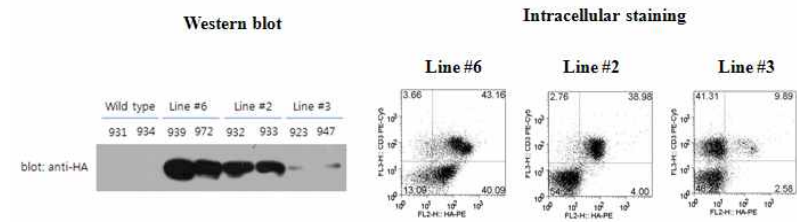


그림 25. Splenocyte에서의 DN-Spry1 transgenic line별 transgenic expression pattern

따라서, 이상적인 발현양상을 보인 Line#2를 위주로 분석하였으며, 일부 실험에서는 line#6를 사용하였다.

나. DN-Spry1 transgenic mice의 면역학적 population 분석

세 line을 대상으로 Thymus 및 Spleen, Lymph node의 T세포 발생 및 분화를 flow cytometry로 분석

한 결과, wild type mice에 비해 큰 변화가 없는 것을 관찰하였다(그림 26, 27). 따라서, DN-Spry1단백질의 발현은 일차적인 T세포의 발생 및 분화에 영향이 없는 것으로 판단되었다.

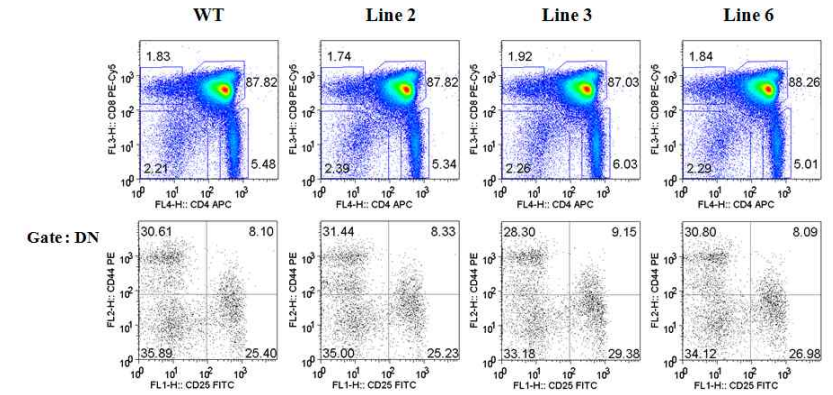


그림 26. Thymus에서의 T세포 분화과정의 분석

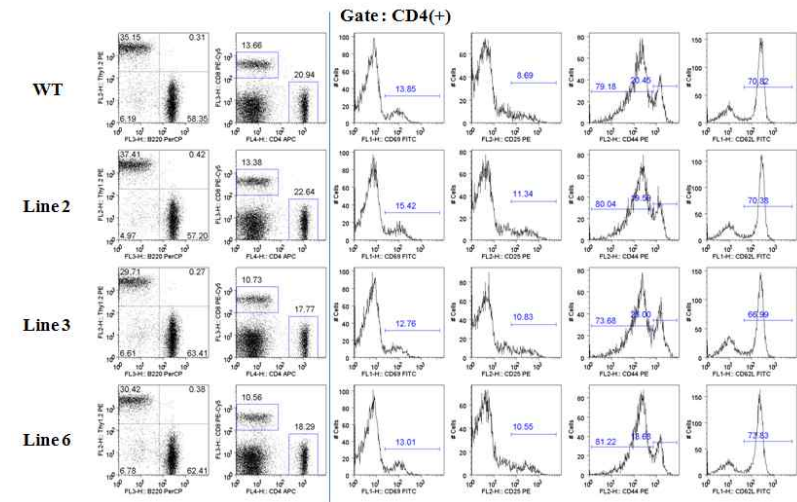


그림 27. Spleen에서의 T세포 및 B세포 population 분석

다. DN-Spry1 transgenic T세포의 in vitro 반응성 분석

T세포 특이적 발현양상을 보인 Line#2로부터 분리한 CD4 T세포의 반응성을 anti-CD3 및 anti-CD28으로 자극한 후 세포분열과 IL-2 생성량을 통해 분석한 결과, naive T cell의 반응성에는 큰 영향이 없음

을 확인하였다. 또한 effector/memory population의 반응성을 확인하기 위하여 naive CD4 T세포를 anti-CD3 및 anti-CD28으로 자극하여 분화시킨 후, 다시 이들을 anti-CD3 및 anti-CD28으로 재자극하였을 때(activated T cell 이라 불림) 역시 반응성의 변화를 관찰할 수 없었다(그림 28). Line#6의 경우는 naive CD4 T세포의 반응성은 역시 변화하지 않았으나, activated T cell에서는 약간의 반응성 향진을 관찰할 수 있었다(그림 29). 이는 Line#6 T세포의 DN-Spry1의 발현양이 Line#2세포의 발현양보다 높다는 점에서 DN-Spry1의 영향은 다량의 단백질 발현을 필요로 할 가능성을 시사하였다.

라. DN-Spry1 transgenic mice의 자가면역 경향성 분석

DN-Spry1단백질이 T세포내의 endogenous Sprouty1단백질을 효과적으로 억제할 수 있다면, Line #2의 경우 T세포특이적으로 DN-Spry1단백질이 발현되므로 Line#2 쥐는 CD4 T세포의 과활성화 여부를 in vivo에서 볼 수 있는 좋은 대상이 된다. 따라서, Line#2 쥐를 대상으로 EAE 자가면역질환(experimental autoimmune encephalomyelitis)을 유도하여 EAE가 심화되는지를 확인하였다. 8-12주령 Line#2 쥐에 MOG peptide와 CFA, pertussis toxin을 주사하고 EAE의 clinical manifestation을 scoring 하였다. 그러나, Line #2 쥐의 EAE severity는 wild type에 비해 증가하지 않음을 확인하였다(그림 30).

또한 Line #2의 자가면역 경향성이 old age에서 증가하는 지 관찰하기 위하여 1년이상 된 Line #2로부터 CD4 T세포를 분리하여 anti-CD3 및 anti-CD28으로 자극하여 반응성을 확인한 결과, 반응성의 증가를 관찰하지 못하였다(그림 31). 또한 anti-dsDNA 항체의 증가 역시 관찰하지 못하였다(그림 32).

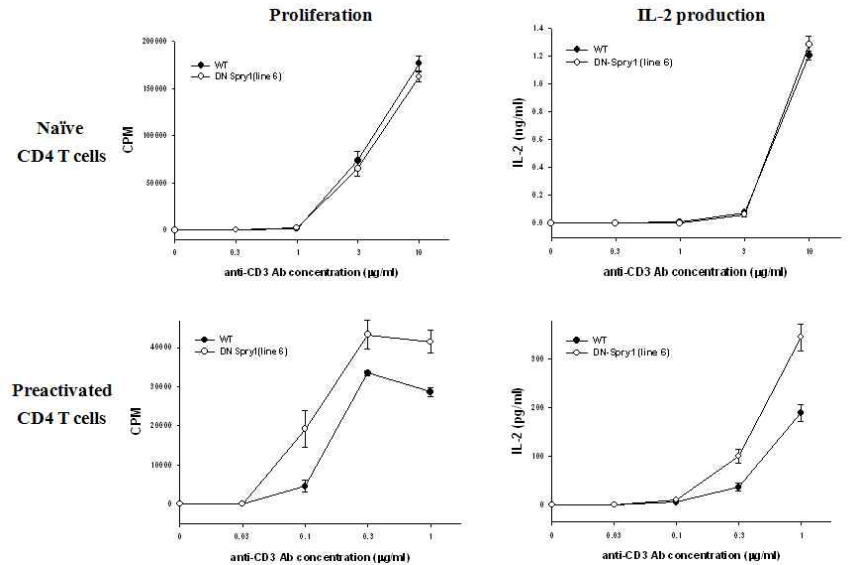


그림 29. DN-Spry1 transgenic mice Line#6로부터 분리한 CD4 T세포의 반응성

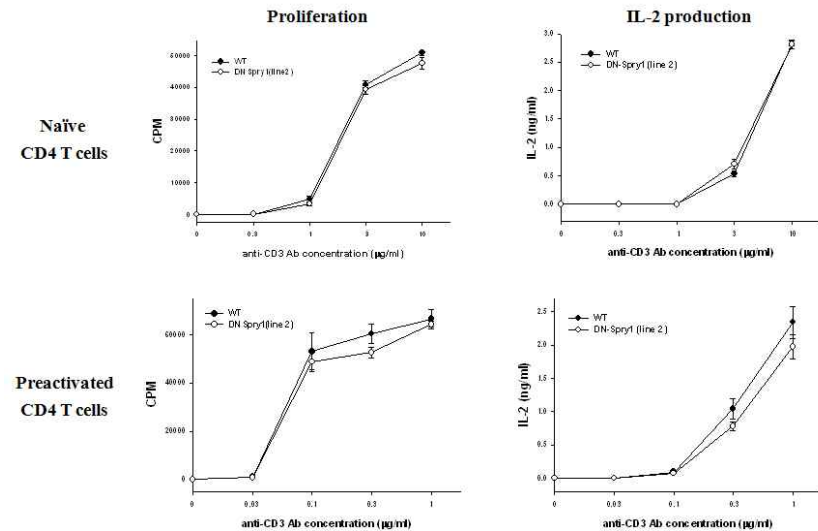


그림 28. DN-Spry1 transgenic mice Line#2로부터 분리한 CD4 T세포의 반응성

그림 30. DN-Spry1 transgenic mice Line#2의 자가면역질환 유발성

그림 31. old Line #2 쥐로부터 분리한 CD4 T세포의 반응성

에 도입하여 사용하였다. 기존 연구에서는 Ndr1 knockout mice가 나이가 들면서 human Charcot-Marie-Tooth disease와 유사한 peripheral neuropathy를 보임이 보고된 바 있으나, 면역학적 phenotype은 아직 보고된 바가 없으므로, Ndr1 knockout이 개괄적인 T세포 및 B세포의 발생 및 분화에 미친 영향을 flow cytometry를 이용한 population analysis를 통해 분석하였다.

일단 T세포의 분화과정을 thymus로부터 분리된 thymocyte를 분석하였다. thymic T세포의 발생은 CD4(-)CD8(-)(double negative) → CD4(+)CD8(+) (double positive) → CD4(+) or CD8(+)(single positive) stage의 순서로 진행하게 된다. 또한 double negative stage에서는 CD44(+)CD25(-) → CD44(+)CD25(+) → CD44lowCD25(+) → CD44(-)CD25(-) stage로 세분되게 된다. 따라서 3회 이상의 반복실험을 통해, 전체 thymocyte의 CD4와 CD8발현 및 double negative population의 CD44, CD25 발현을 살펴본 결과, 각 stage의 세포의 percentage 및 세포수가 wild type mice와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(그림 33).

T세포가 thymus에서의 분화과정이 끝나면 mature T cell이 되어 말초림프계로 분포하게 된다. 특히 spleen과 lymph node는 mature T세포의 집결지로 T세포 population analysis가 필요한 대표적인 기관들이다. 역시 3회 이상의 반복실험을 통해, 각 기관에서의 T세포(Thy1.2양성) 및 B세포(B220양성)의 비율 및 CD4(+), CD8(+) T cell의 비율을 비교한 결과, 역시 wild type과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(그림 34,35). 또한 activation marker인 CD25, CD69, differentiation marker인 CD62L 및 CD44등의 발현도 역시 큰 차이를 보이지 않았다. CD62L과 CD44의 발현양상에 따라, 항원을 경험하지 않은 naive T cell(CD62L^{high}, CD44^{low})과 항원자극에 의해 분화된 effector/memory population(CD62L^{low}, CD44^{high})으로 나누어 분석하였을 때도, knockout과 wild type mouse사이에 큰 차이를 관찰하지 못하였다. 따라서 말초면역계의 T세포군의 비율도 Ndr1-deficiency에 의해 크게 영향받지 않는 것으로 보인다.

그림 32. Old Line #2 쥐 혈청의 자가항체 역가

이상과 같이 DN-Spry1 Line #2의 in vitro 및 in vivo 실험 결과, CD4 T세포의 과활성화 및 자가면역 경향성은 확인되지 못하였다. 그러나, Line #6의 경우, preactivated CD4 T세포의 일부 과활성화가 관찰되는 바, DN-Spry1단백질이 역할을 수행하기 위해서는 높은 농도의 단백질 발현이 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과로 볼 때, DN-Spry1단백질의 경우, 기존 예상보다 일차세포수준 및 in vivo에서 dominant negative effect를 통한 효과적인 T세포 과활성화를 달성하기 어려운 것으로 판단되었다. 따라서, 향후 연구는 anergy현상과 높은 연관관계를 보이고, KO mice를 사용할 수 있는 Ndr1연구에 집중하여 진행하였다.

2) Ndr1 knockout mice를 이용한 연구

선행연구를 통하여 Ndr1 knockout mice로부터 분리한 T세포가 세포배양상에서 유도한 in vitro anergy에는 resistant한 것을 알 수 있었다. 이후 연구는 Ndr1 knockout mice자체의 면역학적 분석 및 in vivo anergy model, 자가면역질환 등에 관한 심도있는 mouse 분석을 시행하였다.

가. Ndr1 knockout mice의 면역학적 population analysis

Ndr1 knockout mice는 일본 National cardiovascular research institute의 Dr. Miyata와의 공동연구하

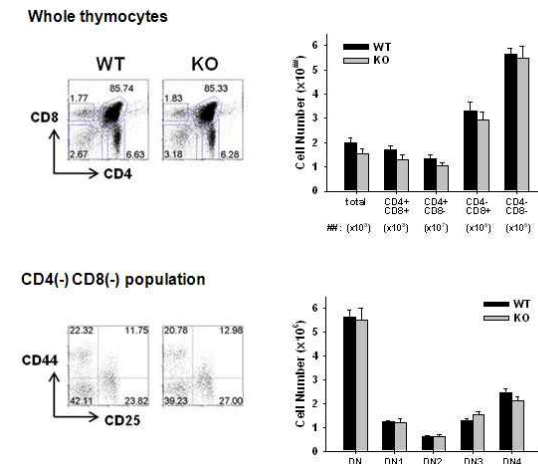


그림 33. Ndr1 knockout에 의한 thymic T세포군의 변화

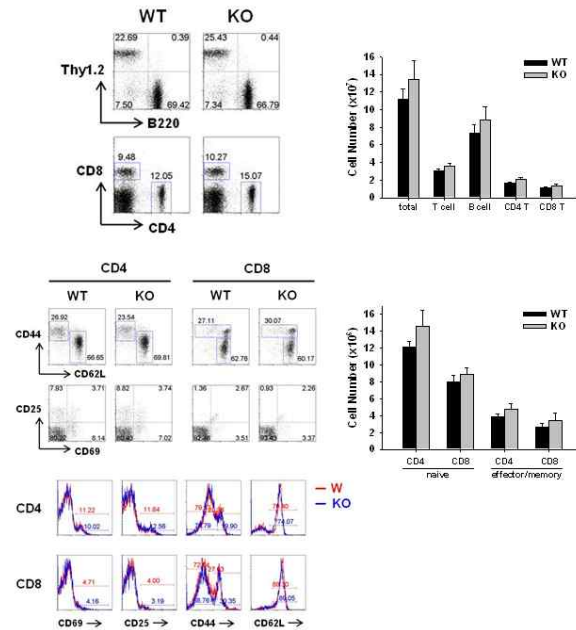


그림 34. Ndr1 knockout에 의한 spleen T cell 및 B cell population의 변화

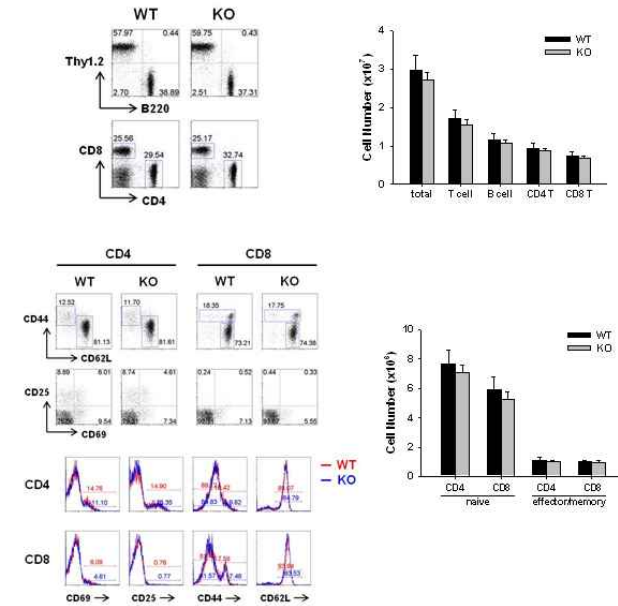


그림 35. Ndr1 knockout에 의한 lymph node T cell 및 B cell population의 변화

이상의 결과로, Ndr1은 T세포의 일차적인 발생 및 분화과정에서는 큰 역할을 하지 않음이 확인되었다.

나. Naive T세포에서의 Ndr1의 기능성

T cell anergy는 주로 항원자극을 겪은 effector/memory population에서 주로 관찰되는 현상이므로, 항원을 겪지 않은 naive T세포에서의 기능성에는 영향이 없을 가능성이 있다. 이를 확인하기 위하여, 12-15주령의 젊은 Ndr1 knockout mice의 lymph node T세포를 agonistic anti-CD3⁺ 및 agonistic anti-CD28항체로 자극한 후 세포의 분열능 및 IL-2 분비능을 ³H-labelled thymidine incorporation assay와 ELISA법을 통해 측정하였다. 그 결과, 예상대로, Ndr1 knockout mice의 T세포는 wild type T세포와 비슷한 정도의 분열 및 IL-2 생성을 보임을 확인하였다(그림 36). 이는 3회이상의 반복실험에서 유사한 양상을 보였다.

CD3는 T Cell Receptor(TCR) complex의 일부로 anti-CD3는 anti-TCR과 동일한 효과를 나타내는 antibody로 interchangeable하게 사용됨.

그림 36. naive T cell의 항원반응성

다. In vivo anergy model에서의 Ndr1의 역할

상기 예비연구에서 세포배양상에서 T세포를 anti-CD3 및 anti-CD28으로 자극하여 effector/memory T cell로 분화시킨 후 anti-CD3만을 다시 처리하여 anergy를 유도하면 Ndr1 knockout T cell은 anergy에 빠지지 않음을 증명한 바 있다(그림 19). 이 결과는 분리된 T세포를 이용한 in vitro assay로서 이러한 현상이 in vivo에서도 일어나는 지 증명할 필요가 있다. 이를 위하여, peptide-induced in vivo anergy model을 사용하여 Ndr1의 in vivo anergy현상에서의 역할을 규명하였다. 그 이론적 배경을 간단히 설명하면, 정상 쥐의 T세포는 다양한 항원에 대한 소수의 T세포들이 매우 많은 종류가 존재하므로 특정항원에 대한 항원특이적 T세포반응을 관찰하기 매우 어렵다. 따라서, 연구자들은 특정 항원에 대한 T cell receptor(TCR)를 유전자이식한 TCR transgenic mice를 만들어, 그 쥐에서 만들어지는 많은 수의 T세포가 특정항원만을 인식하도록 하였다. 더욱 완벽하도록 이들 mice를 endogenous T cell과 B cell이 존재하지 않는 Rag1 knockout mice와 교배하면 거의 100%의 T세포가 특정항원을 인식하는 TCR 발현 T세포만이 존재하는 쥐를 만들 수 있다. 따라서, 이러한 TCR transgenic, Rag1(-/-) mice로부터 T세포를 분리하면 다량의 항원특이적 T세포를 naive mature T세포의 형태로 얻을 수 있다. 이렇게 분리된 항원특이적 T세포를 정상 쥐에 정맥주사하고, 항원peptide를 다량 정맥주사하게 되면 donor T cell은 항원자극에 의해 자극받게 되어 일부 분열하지만, costimulation이 없는 상황에서 항원자극을 받게 되므로 결국 anergy상태에 빠지게 된다.

본 연구진은 ovalbumin(OVA) 항원에 특이적인 TCR(OT-II) transgenic mice로서 OT-II(+),Rag1(-/-) mice를 이용하여 위와 같은 in vivo anergy 실험을 계획하였다. 이 setting에서의 Ndr1의 효과를 연구하기 위하여 본 연구진은 선행연구기간 동안 여러 세대에 걸친 intercrossing을 통해 OTII(+),Rag1(-/-),Ndr1(-/-) mice를 제작하였다(그림 37). 이렇게 제작된 mice로부터 분리된 OVA특이적 T세포를 정상 쥐에 정맥주사한 후 OVA peptide를 정맥주사하여 anergy를 유도하였다. 수 일 후, host 쥐의 lymph node와 spleen으로부터 donor T cell을 분리하여 OVA peptide에 대한 항원반응성을 측정하였다(그림 38). 그 결과, wild type OT-II(+),Rag1(-/-) T세포는 anergy자극을 받지 않은 T세포에 비해 현저하게 세포분열 및 IL-2 생성이 감소하여 anergy가 유도되었음이 관찰되었으나, Ndr1 knockout OT-II(+),Rag1(-/-) T세포는 anergy자극을 받지 않은 T세포와 거의 비슷한 수준의 세포분열을 보였고, IL-2 생성도 wild type T세포에 비해 상당히 증가되어 있음을 관찰함으로써 in vivo

anergy induction에 resistant함을 알 수 있었다(그림 39). 이러한 현상은 5회이상 반복실험에서 재현성 있게 관찰되었다. 따라서, Ndr1의 anergy현상에서의 역할은 in vitro뿐만 아니라 in vivo에서도 효과적으로 증명되었다.

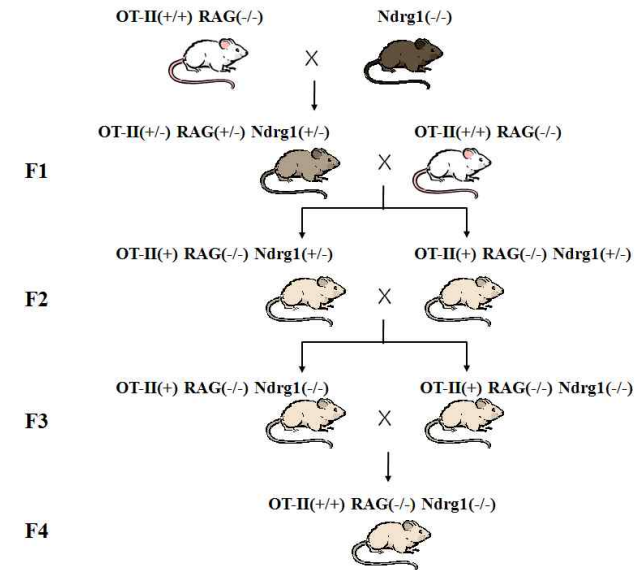


그림 37. Ndr1-KO OT-II-transgenic mice line화의 모식도

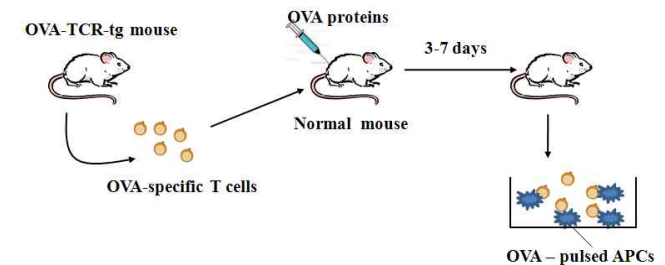


그림 38. in vivo anergy model의 모식도

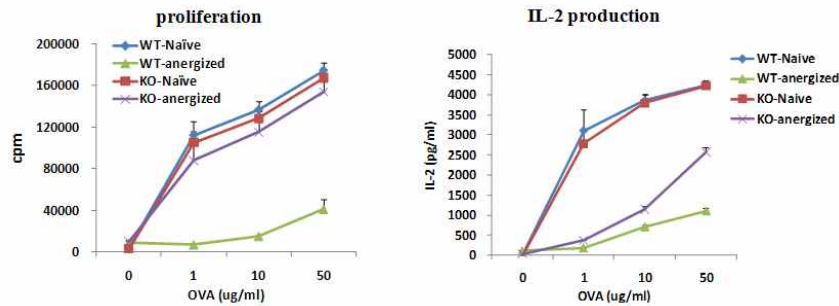


그림 39. NdrG1의 in vivo anergy현상에서의 역할

라. NdrG1 knockout mice의 자가면역현상 분석

T cell anergy현상은 종양세포의 면역억제현상뿐 아니라, 자가항원(self antigen)에 대한 T세포반응을 억제하는 자가면역억제의 기전으로도 이해되고 있다. 즉, 자가항원이 costimulation의 동반없이 자가항원특이적 T세포를 자극하면 T세포가 불능화되어 자가면역이 억제된다는 것이다. 따라서, NdrG1이 T cell anergy현상에 중요한 역할을 한다면, NdrG1이 결핍된 쥐에서는 자가면역현상이 생길 수 있다. 자가면역현상은 특히 나이가 들면서 많은 항원에 노출되는 경우 발생하는 경우가 많으므로, NdrG1 knockout mice를 1년 이상 늙은 후 실험을 진행하였다. 1년 이상 늙은 NdrG1 knockout mice의 각종 장기를 떼어 H&E 조직염색 혹은 육안으로 관찰한 결과, wild type에 비해서 눈에 띄는 leukocyte infiltration을 관찰하지 못하였다. 또한 autoantibody의 증가여부를 보기 위하여 anti-dsDNA 항체의 증가여부를 ELISA로 test하였으나, 자가항체의 증가가 관찰되지는 않았다(그림 40).

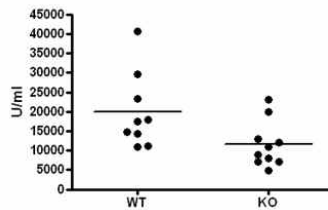


그림 40. old NdrG1 knockout mice serum의 anti-dsDNA 항체역가

이상의 관찰로는 NdrG1의 결핍이 눈에 보이는 자가면역현상을 유도하지 않았다고 판단된다. 그러나, NdrG1은 여러 장기에서 발현되는 것으로 알려져 있고, NdrG1 knockout mice는 전 장기에서의 NdrG1의 발현이 없어진 상황이므로, 다른 세포에서의 NdrG1결핍이 면역계에 영향을 미쳤을 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 늙은 NdrG1으로부터 T세포를 분리정제하여 그 반응성을 세포배양상에서 확인하였다. 그 결과, 놀랍게도 NdrG1 knockout T cell은 wild type에 비해 훨씬 많은

양의 IL-2, IFN- γ , IL-17등을 분비하는 등 과활성화되어 있음이 확인되었다(그림 41). 특히 IFN- γ 및 IL-17은 자가면역현상에서 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있는 cytokine으로 이들 cytokine의 증가는 자가면역 경향성을 보여주는 중요한 지표라 할 수 있다.

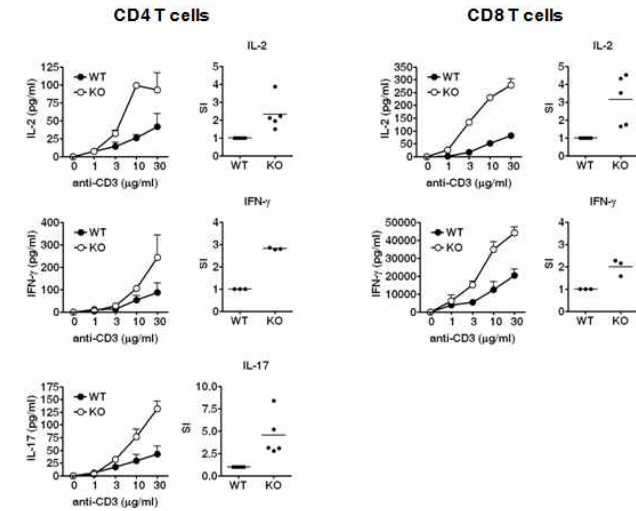


그림 41. Old NdrG1 knockout mice로부터 정제된 T세포의 반응성 (SI: stimulation index : cytokine conc. of KO/cytokine conc. of WT)

이어서, 만약 이들 T세포를, 다른 조직에서는 정상적으로 NdrG1이 발현되는 다른 쥐에 옮길 경우, 자가면역현상을 항진시키는가를 관찰하기 위하여 다음과 같은 실험을 design하였다. 일단 자가면역질환 model로서 EAE model(Experimental allergic encephalomyelitis)을 선택하였다. 실험적으로 쥐 myelin항원 (myelin oligodendrocyte glycoprotein:MOG)을 고농도의 Complete Freud's adjuvant(CFA) 및 pertussis toxin과 함께 정상쥐에 주사하면 사람의 multiple sclerosis와 유사한 encephalomyelitis가 유발된다. 이는 MOG특이적 autoreactive CD4 T cell이 과활성화되어 자가면역현상을 일으킴이 알려져 있다. 본 연구에서는 이를 약간 modify하여 adoptive T cell transfer 실험을 design하였다. 1년 이상 늙은 NdrG1 knockout mice로부터 분리정제한 CD4 T 세포를 T세포와 B세포가 결여된 Rag1(-/-) mice에 정맥주사한 후, host Rag1(-/-) mice에 MOG와 CFA, pertussis toxin을 주사하여 EAE를 유도하였다. 이와 같은 setting에서는 host mice의 다른 조직에는 NdrG1이 정상적으로 존재하면서, endogenous T세포의 영향없이 우리가 넣어준 NdrG1 knockout CD4 T세포에 의해 유도되는 자가면역현상을 관찰할 수 있다는 장점이 있다. 실험결과, NdrG1 knockout CD4 T cell은 wild type에 비해 훨씬 severe한 자가면역질환을 유발함을 확인할 수 있었다(그림 42). 따라서 old NdrG1 knockout T cell의 과활성이 실제 자가면역질환의 심화에 영향을 미칠 수 있음을 질환모델을 통하여 증명되었다.

signaling의 하위에 Akt가 존재함이 잘 알려져 있으므로, NdrG1이 Akt-dependent phosphorylation에 의해 억제될 가능성이 높다.

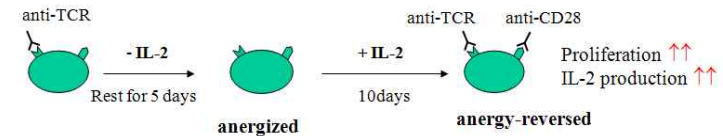


그림 43. IL-2 induced anergy reversal의 모식도

이에 anti-CD3 자극에 의해 anergy 유도한 후 5일이 경과하여 안정화된 anergic T cell clone에 IL-2를 24시간 동안 가한 후 NdrG1의 phosphorylation을 western blot으로 확인하였다. proteasome inhibitor인 MG132 존재하에서 phosphorylation에 의해 upper shift된 phospho-NdrG1 band를 확인할 수 있었다(그림 44). 특히, phospho-NdrG1은 Akt상위의 PI3K inhibitor인 LY294002를 처리한 경우 사라짐이 확인됨으로써, CD28 signal의 경우(그림 11)처럼 Akt에 의한 인산화될 가능성을 높혀주었다. 더욱이, MG132가 존재하지 않는 상황에서는 phospho-NdrG1 band가 소실됨을 관찰함으로써, IL-2에 의해 인산화된 NdrG1은 정상적으로 proteasome의존적으로 degradation됨을 알 수 있었다. 따라서, anergic T세포에 reversal 자극인 IL-2를 가할 경우, NdrG1이 PI3K/Akt pathway의존적으로 인산화되며, 인산화된 NdrG1은 degradation됨을 알 수 있었다.

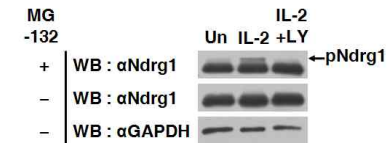


그림 44. Anergic T cell에서 IL-2에 의한 NdrG1의 인산화

24시간 동안의 IL-2 처리로는 NdrG1 전체 단백질의 감소는 볼 수 없었으나, IL-2에 의한 anergy reversal에는 수일-10일 정도의 IL-2 treatment가 필요한 것으로 알려져 있으므로 anergy가 완전히 reversal된 시점에는 세포내 NdrG1 전체 단백질의 양이 감소할 것으로 예상되었다. 따라서, anergic T cell에 IL-2를 10일간 처리한 후 NdrG1 western blot을 시행한 결과, NdrG1 단백질 양이 unanergized T세포 수준으로 감소하였음을 확인할 수 있었다(그림 45a). 이 때, 이들 세포를 anti-CD3 및 anti-CD28으로 자극하였을 때, IL-2 생산이 unanergized T세포 수준으로 완전히 회복됨을 보임으로써, anergy 상태에서 완전히 reversal되었음이 확인되었다(그림 45b). 그러므로, NdrG1은 anergy induction뿐만 아니라, anergy maintenance에도 관여하고 있으며, IL-2에 의한 NdrG1 degradation이 anergy 상태를 벗어나는 데 기여하는 것으로 사료된다.

그림 42. NdrG1 knockout T세포의 자가면역질환 유발성 실험

종합적으로, 선행 연구를 통해 NdrG1은 anergy 자극에 의해 그 발현이 증가되고, T세포에 과발현시켰을 때 anergy 유사 상태를 보임이 증명되었다. 또한, anergy를 막아주는 costimulatory signal에 의해 그 활성이 억제되며, NdrG1이 결핍된 세포는 in vitro anergy 유도가 되지 않음이 확인되었었다. 이어 현 후속 연구를 통해, NdrG1이 결핍된 세포는 in vivo anergy 역시 유도되지 않음이 확인되었고, 늙은 NdrG1 결핍 쥐의 T세포는 과활성을 보이는 자가면역경향을 보이며, 실제 자가면역질환을 유도시에 자가면역질환을 심화시킬 수 있음이 증명되었다. 따라서, NdrG1은 T세포 anergy 현상의 중요한 mediator임을 다각적인 각도에서 명백하게 증명할 수 있었다.

(2) NdrG1과 T cell clonal anergy와의 연관성- 심화연구

상기 연구결과를 통하여 NdrG1과 T cell clonal anergy와의 연관성이 많은 부분 증명되었으나, NdrG1의 구체적인 작용기전에 대한 연구는 부족한 상태이다. 따라서, NdrG1의 보다 명확한 작용 지점을 파악하기 위한 심화 연구를 시행하였다.

1) IL-2에 의한 anergy reversal에서의 NdrG1의 변화연구

상기 연구를 통하여 NdrG1의 발현이 anergy 유도에 중요함이 증명되었으나, NdrG1이 anergy 유도에만 관여하는지 혹은 anergic state를 유지하는데 작용하는지는 아직 불분명한 상태다. NdrG1이 Egr2에 의해 유도됨을 고려할 때, NdrG1은 T세포의 불활성화를 매개하는 effector molecule일 가능성이 높다. 이 경우, NdrG1은 anergy 상태의 유지에 작용할 가능성이 높다.

T cell clonal anergy의 큰 특징 중 하나는, 안정화된 anergic T세포에 IL-2를 수일간 가하면, T세포가 분열하면서 anergy 상태에서 풀려나오게 된다는 점이다. 이를 IL-2 induced anergy reversal이라고 부르며, 이렇게 풀려나온 세포는 다시 TCR 및 costimulation 자극에 의해 반응성을 회복하게 된다(그림 43). 따라서, NdrG1이 anergy 상태를 유지하는 데 중요한 요소라면, IL-2를 가하여 anergy가 풀리는 상황에서는 NdrG1이 억제 혹은 제거될 것이다. 또한, IL-2 receptor

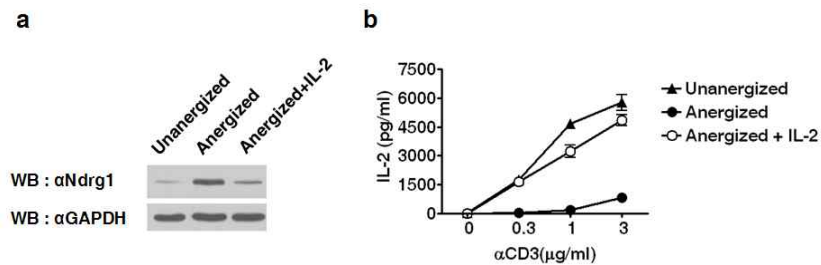
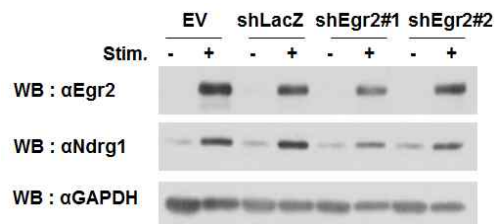


그림 45. IL-2 induced reversal 완료후 NdrG1 단백질량의 변화

2) Anergy특이적 전사인자 Egr2에 의한 NdrG1유도 심화연구

상기선행연구에서 anergy특이적 전사인자 Egr2의 과발현에 의해 NdrG1 전사가 증가하고 (그림 17), anergy자극하에서 Egr2 단백질이 NdrG1 promoter에 결합함을 증명하였으나 (그림 18), anergy자극하에서 Egr2가 없을 때 NdrG1의 induction이 저해되는 지 (loss-of-function study)가 검증되지 못하였다. 따라서, Egr2 mRNA에 대한 shRNA 발현용 retrovirus를 제작한 후, 항원특이적 TCR-transgenic mice(OT-II, Rag-/-)로부터 분리한 primary T cell을 항원자극으로 활성화시키면서 이 retrovirus를 transduce하여 Egr2 shRNA가 과발현된 primary T cell을 제작하였다. 이 T cell에 anti-CD3 항체를 가하여 18시간동안 anergy자극을 가한 후, NdrG1단백질의 발현양을 western blot으로 확인한 결과, Egr2 shRNA를 발현하여 Egr2단백질의 증가가 감소된 상태에서는 NdrG1단백질의 발현역시 감소됨을 확인함으로써, NdrG1의 발현이 확실히 Egr2에 의존적임을 최종 확인하였다(그림 46).



(EV, empty vector-transduced T cell; shLacZ, negative control shRNA-transduced T cell, shEgr2#1,shEgr2#2, Egr2 shRNA-transduced T cells using two different shRNA)

그림 46. Egr2 발현억제에 의한 NdrG1 단백질의 유도저해

3) NdrG1 knockout mice에서의 hyperresponsive T cell subset연구

T cell clonal anergy는 주로 항원을 경험한 previously activated T cell(effector/memory T cells)에서 볼 수 있는 phenotype으로써 항원을 경험하지 않은 naive T cell에서는 잘 관찰되지 않는다. 따라서, NdrG1이 T cell clonal anergy에 특이적으로 작용하는 anergy factor라면 NdrG1 KO mice

의 naive T cell은 그 기능성에 영향이 거의 없고, previously activated T cell population에만 그 영향이 국한될 수 있다. 이러한 가능성은 naive T cell이 주종을 이루는 young mice(12-15주령)의 lymph node T세포의 경우, NdrG1 KO에 의해 그 활성이 크게 영향 받지 않음을 전년도 연구를 통해 밝힌 바 있다. 반면, 나이가 1년 이상된 old NdrG1 KO mice의 T세포의 경우, wild type T세포에 비해 hyperresponsiveness를 밝힌 바 있다(그림 41).

그렇다면 과연 old KO mice에서 보이는 hyperresponsiveness는 naive T세포로부터 오는 현상이 아니라, previously activated T세포의 과활성화때문인지를 확인하기 위하여, old NdrG1 KO mice의 lymph node로부터 naive CD4 T cell (CD4⁺, CD62L^{hi}, CD44^{lo}) 및 effector/memory T cell (CD4⁺, CD62L^{lo}, CD44^{hi}) population을 sorting한 후 anti-CD3 및 anti-CD28으로 자극한 결과, 역시 NdrG1결핍에 의해 naive T cell의 반응성은 증가하지 않았지만, effector/memory T cell의 반응성은 항진되었음이 확인되었다(그림 47). 따라서, **NdrG1은 주로 effector/memory T세포의 반응성에만 국한되어 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이는 T cell clonal anergy현상과 좋은 상관관계를 다시 한 번 확인해 주는 결과라 하겠다.**

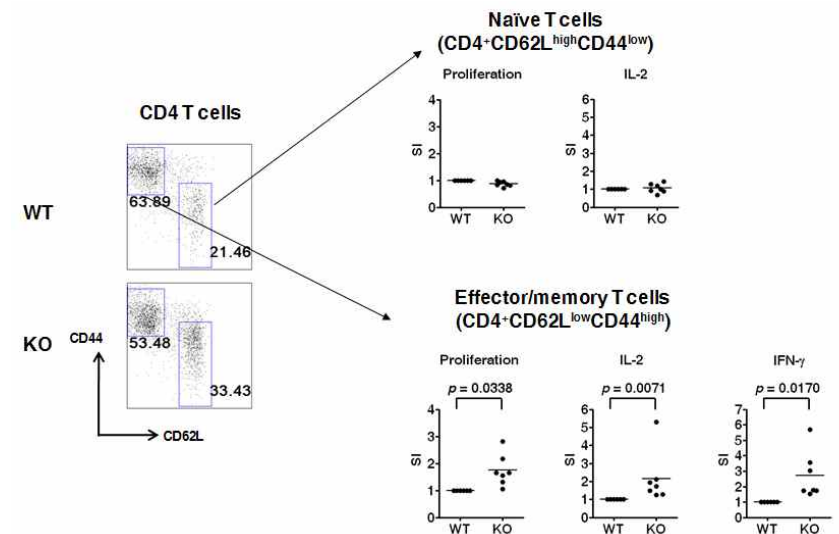


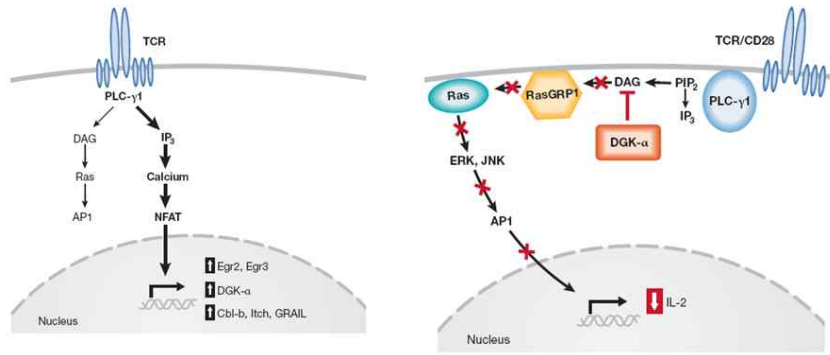
그림 47. Old NdrG1 KO mice T cell subset의 반응성

3) 기존 보고된 anergy factor DGK-alpha와 NdrG1의 연관성 연구

기존 타 group의 연구결과에 의하면, T cell clonal anergy의 mediator로 Diacyl glycerol kinase-alpha (DGK-alpha)가 대두된 바 있다. 이 group의 연구결과에 의하면, anergic T cell에서 DGK-alpha mRNA 및 단백질이 증가하여, T cell receptor signaling의 중요한 second messenger인 diacyl glycerol을 인산화하여 감소시킴으로써 T세포를 불활성화시킨다는 가설이 제시되었다(그림 48). 따라서, NdrG1

의 작용기전의 일부로 DGK-alpha와의 상호작용이 있는지를 검증하기로 하였다.

일단 우리가 사용하는 T cell clone인 A.E7 cell에서 anergy자극에 의해 DGK-alpha가 증가하는지를 확인하였다. anergy자극 후 mRNA 발현의 변화를 kinetic microarray data를 이용하여 살펴본 결과, 놀랍게도 DGK-alpha의 mRNA는 anergy자극에 의해 시간이 감에 따라 감소하는 양상을 보였다. 5일이 지난 resting anergic T세포에서는 mRNA level이 돌아오기는 하였으나, unenergized cell에 비해 크게 증가된 양상을 볼 수는 없었다(그림 49a). 이러한 양상은 단백질 수준에서도 비슷하게 관찰되었다. preactivated primary T세포에 anergy자극(anti-CD3자극)을 준 후, 시간에 따른 DGK-alpha 단백질량의 변화를 western blot으로 확인한 결과, 역시 8시간 이후로 DGK-alpha단백질의 현저한 감소를 확인할 수 있었다(그림 49b). 또한 anergy자극 후 5일이 경과된 resting anergic A.E7 cell에서도 DGK-alpha 단백질의 증가는 확인할 수 없었다(그림 50).



EMBO reports (2008) 9, 50-55.

그림 48. DGK-alpha의 작용기전

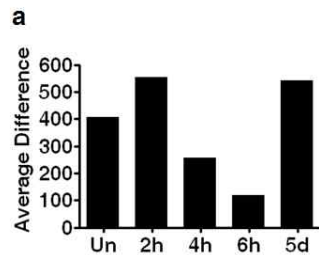


그림 49. Anergy자극에 의한 DGK-alpha의 mRNA 및 단백질량의 변화

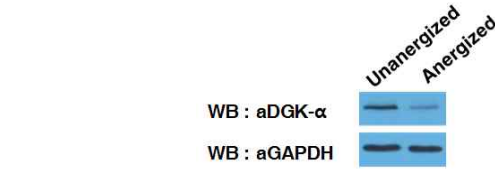
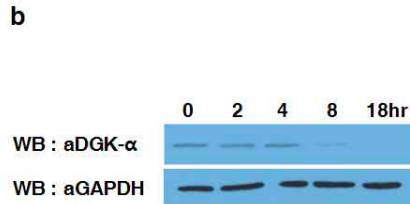


그림 50. Resting anergic T cell에서의 DGK-alpha단백질의 양

혹시, resting anergic A.E7 cell에서 restimulation phase에 unenergized A.E7에 비해 DGK-alpha가 훨씬 빠르게 induction됨으로써 T세포의 불활성화를 유도할 가능성을 점검하기 위하여, anergic A.E7 cell과 unanergic A.E7 cell에서의 DGK-alpha induction을 western blot으로 확인한 결과, DGK-alpha의 induction은 관찰되지 않았다. 대신 8시간 이후에 DGK-alpha단백질의 감소가 anergic T cell에서 둔화되는 것이 관찰되었으나, 이는 restimulation을 억제하기에는 너무 늦은 시간대이고, anergic T세포의 TCR signaling이 감소되어 있는 결과로 DGK-alpha의 감소가 둔화된 것으로 판단되었다(그림 51).

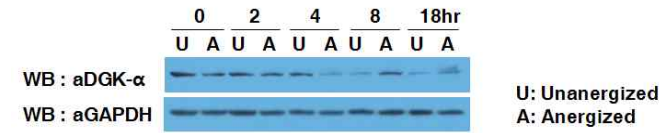


그림 51. restimulation phase에서의 DGK-alpha 단백질의 발현변화

이와 같은 현상을 Ndrgr1이 과발현되어 anergy유사상태가 된 A.E7 세포에서 확인한 결과, 역시 Ndrgr1이 과발현된 세포에서 DGK-alpha의 증가를 확인할 수 없었고, restimulation phase에서도 역시 DGK-alpha의 faster induction을 관찰할 수 없었다(그림 52). 따라서, 적어도 A.E7 cell system에서는 DGK-alpha의 anergy에서의 역할은 불분명하며, Ndrgr1은 DGK-alpha와 독립적으로 작용함을 확인할 수 있었다.

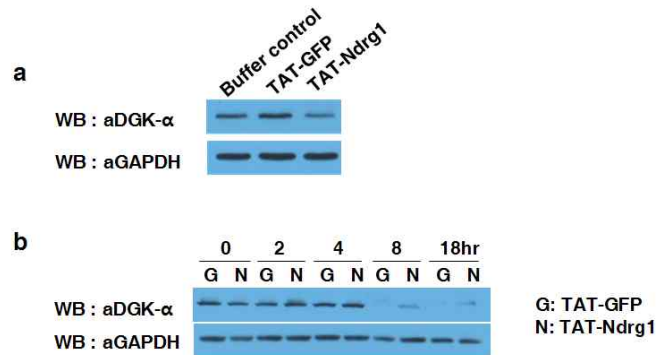


그림 52. Ndr1과발현세포에서의 DGK-alpha단백질의 발현

기존의 DGK-alpha induction은 pharmacologica anergy induction model인 ionomycin-induced anergy model에서 증명된 것으로, ionomycin-induced anergy는 T cell clonal anergy보다 훨씬 potent한 signaling defect를 가져오는 등 molecular mechanism이 상이할 것으로 예측된다. 이러한 예측은 clonal anergic T cell의 signaling defect는 DGK-alpha가 작용하는 PLC-r1 상위에서도 일부 관찰된다는 점과도 일맥상통하는 점이다. 혹은 DGK-alpha가 증명된 T세포 clone은 A.E7과는 다른 mouse strain으로부터 isolation된 것으로 strain의 차이에 기인할 수도 있다. 여하튼, 상기결과를 통해 DGK-alpha는 general anergy factor라고 보기는 어렵다고 판단된다.

종합적으로, 상기연구를 통해 Ndr1이 T cell anergy의 중요한 매개단백질이며, T cell anergy에 의한 자가면역질환 예방에 중요한 역할을 하고 있음을 증명하였고, 이 결과는 현재 Nature Medicine에 제출되어 revision중에 있음.

(3) 종양항원특이적 TCR-transgenic mice를 이용한 Ndr1-deficient T세포의 항암효과 분석

상기 연구결과를 통해 Ndr1이 T세포 관용을 통한 자가면역질환 예방에 중요함이 증명되었으므로, 항암면역의 측면에서, 종양특이적 T세포내부의 Ndr1을 없애서 종양에 의한 T세포관용을 깨는 경우, 종양특이적 T세포를 이용한 항암T세포요법의 치료효율을 증가시킬 수 있을 지를 확인하기로 하였다.

1) 종양항원특이적 CD4 및 CD8 T cell의 병합치료 model의 확립

T cell anergy는 T cell subset중 주로 CD4 helper T cell에서 주로 제시되는 model로서 상기 Ndr1에 관한 연구는 주로 CD4 T cell을 대상으로 진행되었다. 항암면역의 경우, 주로 종양에 직접적인 살상효과를 가지는 T세포군은 CD8 cytotoxic T cell로 알려져 있으나, 이들 CD8 T cell의 종양살상능에는 CD4 T cell의 도움이 절대적으로 중요한 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구진은 CD4 T cell anergy가 결핍된 종양특이적 T세포가 CD8 T cell의 종양살상능을 증가시키는 지를 확인하기 위하여 종양특이적 CD4 및 CD8 T cell을 동시에 종양합유 마우스에 주입하여 종양을 제거하는 combined T cell therapy의 mouse model을 확립하였다.

이를 위하여 가상종양항원(artificial tumor antigen)인 ovalbumin이 transfection된 EL4 mouse lymphoma cell line (E.G7)을 표적종양으로 사용하였고, 종양항원특이적 CD4 T cell로는 ovalbumin-특이적 T cell receptor를 transgene으로 발현하는 OT-II TCR transgenic mice로부터 분리한 CD4 T cell을 사용하였고, 종양항원특이적 CD8 T cell로는 역시 또다른 ovalbumin-특이적 T cell receptor를 transgene으로 발현하는 OT-I TCR transgenic mice로부터 분리한 CD8 T cell을 사용하였다. 구체적으로, E.G7 tumor를 B6 syngenic mice에 피하주사하고 7일 경과후, OT-I T cell 단독 혹은 OT-II T cell과 병행하여 정맥주사하였을 때, 이들 T세포에 의한 종양의 regression을 관찰하였다. 그 결과, CD8 T세포(OT-I)를 단독으로 투여하였을 때보다, CD4 T세포(OT-II)와 병합하여 투여하였을 때 훨씬 강력한 항종양효과를 관찰할 수 있었고, CD4 T세포의 비율을 증가시킬수록 치료효율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 53). 따라서, **CD4 및**

CD8 병합T세포요법의 model은 성공적으로 확립되었다.

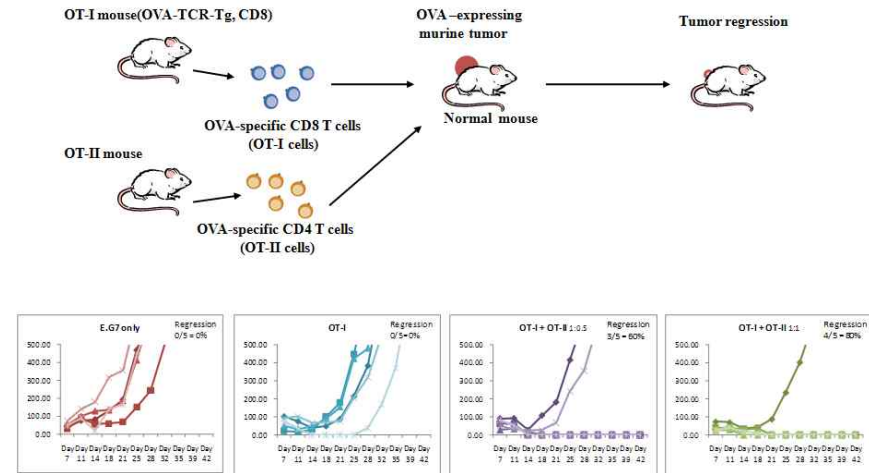


그림 53. CD4 및 CD8 T세포요법 model의 확립

2) Ndr1 deficient CD4 T cell의 항종양효과분석

상기 in vivo anergy실험을 위해 ovalbumin특이적 OT-II mice를 Ndr1 knockout(KO) mice와 수차례 교배를 통해 Ndr1 KO OT-II mice를 제작하였으므로, Ndr1이 결핍된 OT-II CD4 T cell이 OT-I T cell에 의한 항종양효과를 증가시키는지의 지를 위에서 확립한 CD4 및 CD8 T cell therapy model을 이용하여 검증해 보고자 하였다.

그러나, Ndr1 KO OT-II T cell을 OT-I T cell과 함께 E.G7 종양합유마우스에 주사하였을 때, Ndr1이 intact한 wild type OT-II T cell에 비해 OT-I의 항종양력 상승효과가 더 증가되지 못함을 관찰하였다 (그림 54).

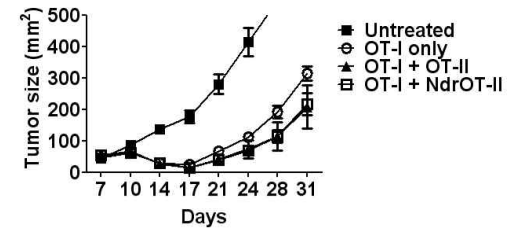


그림 54. Ndr1 KO OT-II T세포의 EG7 lymphoma에 대한 항종양효과 (NdrOT-II, Ndr1 KO OT-II T cells)

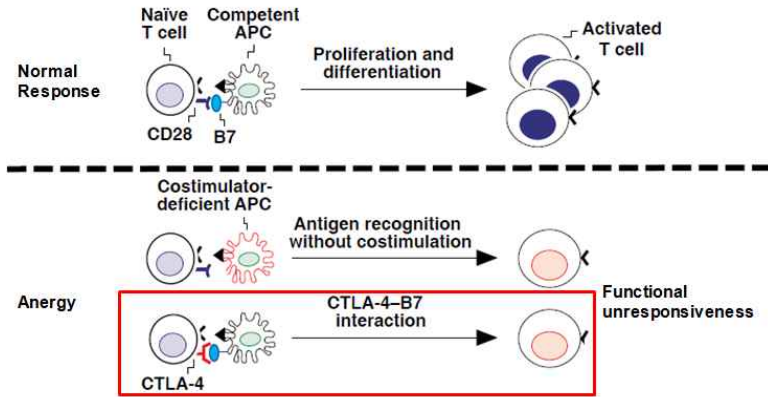
따라서, 비록 CD4 T cell내부의 Ndrp1 결핍이 자가항원에 대한 T cell anergy를 깨서 자가면역질환을 심화시키는 데 기여하지만, 중앙항원에 대한 반응성 증진에 의한 항종양효과를 증가시키기에는 부족하다는 점을 알 수 있었다.

(4) T cell anergy의 또다른 매개단백질 CTLA4 억제제를 통한 T세포요법 정립

상기 결과에 따라, 본 연구진은 항암T세포의 관용파괴를 통한 T세포요법의 치료효율 향상이라는 본 과제 목적을 달성하기 위하여, T cell anergy의 또 다른 기전으로 알려진 CTLA4-induced anergy현상의 파괴를 다음 목표로 설정하였다.

1) CTLA4-induced anergy와 항암면역

앞선 T cell anergy의 기전으로, CD28 costimulation 없는 항원자극이 T세포의 비반응성(unresponsiveness)을 유발한다고 설명하였다 (“연구의 필요성” 참조). 이 외에 또다른 anergy의 기전은 T세포 억제자극의 존재하에서 항원자극이 주어질 때 역시 T세포의 비반응성이 유도되며, 이 때 T세포억제자극은 CTLA4라는 T세포 표면수용체가 항원제시세포의 B7과 결합함으로써 전달된다고 알려져 있다 (그림 55). 이를 co-inhibitory signal이라고 부른다. 이 경우, T cell이 항원자극을 받게 되면 CTLA4단백질의 발현이 유도되어 CD28과 결합하던 B7분자와 경쟁적으로 결합함으로써 CD28 costimulatory signal이 더 이상 전달되는 것을 방해하고, 또 CTLA4 자신도 intracellular domain을 통해 억제신호를 T세포내부로 전달함으로써 T세포의 반응성을 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다 (그림 56).



Modified from Science 1998, 280(5361) 243-8

그림 55. T cell anergy의 두가지 기전

따라서, 이러한 CTLA4 co-inhibitory pathway를 억제하면 T cell anergy를 파괴함으로써 항종양 T세포면역을 향진시킬 수 있음이 이미 보고되어 있으며, CTLA4억제제를 위한 CTLA4 중화항체는 이미 2011년에 FDA승인이 되어 악색흑색종 치료제로 시판되고 있다(제품명 ipilimumab; 상품명

Yervoy) (그림 56). 그러나, CTLA4중화항체는 전신적인 T cell anergy를 파괴하여 자가면역 T세포의 반응성도 향진시킴으로써, 부작용으로 자가면역질환을 일으킴이 보고되고 있으며, 이 중 심각한 경우 autoimmune enterocolitis에 의한 장천공도 보고된 바가 있다. 그러므로, CTLA4의 억제제가 종양항원특이적 T세포에 국한되는 것이 T세포관용파괴에 의한 항암효율을 높이면서도 자가면역 부작용을 낮추는 이상적인 T세포요법이 될 것이다.

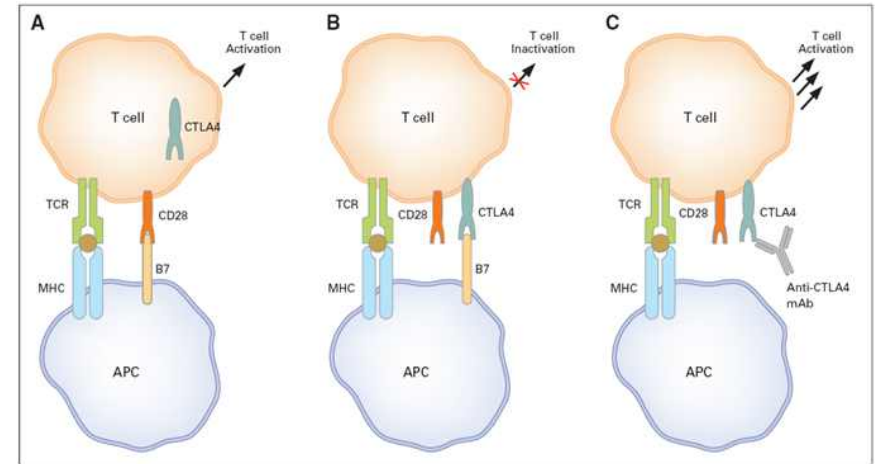


그림 56. CTLA4 및 항 CTLA4항체의 작용기전 (J Clin Oncol. 2008)

2) 항암T세포 특이적인 CTLA4 억제력 부여 Design

따라서, 본 연구진은 종양특이적 T세포에서만 CTLA4기능을 억제하기 위하여 CTLA4 dominant negative mutant를 T세포에서 발현시키는 전략을 사용하기로 하였다. 그러나, CTLA4 dominant negative mutant는 기존 학계에서 보고된 바가 없으므로, 본 연구진에서 새롭게 design하여 사용하기로 하였다.

일차적으로 endogenous CTLA4와 경쟁적으로 ligand (B7 molecule)에 결합하되 inhibitory signal을 보내지 못하도록 CTLA4의 intracellular signaling domain을 deletion한 truncated CTLA4 mutant를 design하여 CTLA4 decoy receptor로 명명하였다. 그러나, CTLA4 decoy receptor는 활성화수용체인 CD28과 B7 간의 결합도 저해함으로써 전체적인 T세포의 반응성을 떨어뜨릴 수 있는 문제점이 발견되었다 (그림 57). 따라서 개선된 design으로 decoy receptor의 intracellular portion에 CD28의 intracellular signaling domain을 연결시킨 chimeric receptor를 제조하였다. 이 경우, CTLA4-CD28 chimera는 B7과 결합하여 경쟁적으로 endogenous CTLA4를 통한 inhibitory signal을 억제하는 동시에, CD28 intracellular domain을 통해 stimulatory signal을 보냄으로써 T세포의 활성을 강화시키는 역할을 하는 dual effect를 가지게 된다(그림 57). 그러므로 궁극적으로, CTLA4의 억제신호를 활성화신호로 바꾸는 효과를 통해 훨씬 강력한 T세포 활성화가 가능해진다.

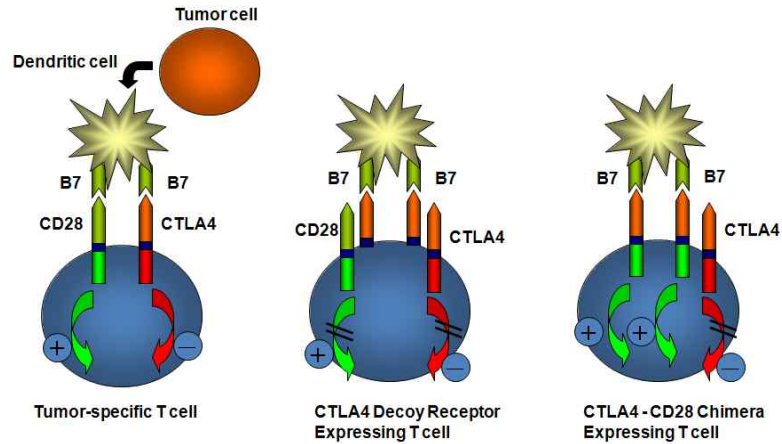


그림 57. CTLA4 mutant의 design 모식도

따라서 CTLA4-CD28 chimera분자를 retrovirus를 이용하여 종양항원특이적 T세포에 발현시키는 경우, 종양에 의한 면역관용을 극복하는 T세포의 제조가 가능해지므로, 기능이 훨씬 향상된 항암 T세포의 투입이 가능함과 동시에 전신적인 CTLA4억제를 동반하지 않게 됨으로써, 자가면역의 부작용을 회피하는 이상적인 T세포치료법이 가능해진다.

3) CTLA4-CD28 chimera gene-modified CD4 T cell의 항종양효과

CTLA4-CD28 chimera mutant를 발현하는 T세포의 항종양효과를 검증하기 위하여 상기 연구에서 사용한 OT-I 및 OT-II combined T cell therapy model을 사용하기로 하였다. CTLA4-CD28 chimera의 발현을 위하여 retroviral construct를 pMSCV-IRES-GFP vector(pMIG)를 이용하여 제작하였으며, 이들 단백질의 발현율을 개선하기 위하여 WRE element를 추가한 pMIG-w vector를 최종 사용하였다. gene-modified T cell을 trace할 수 있도록 GFP가 tagging되었다 (그림 58).

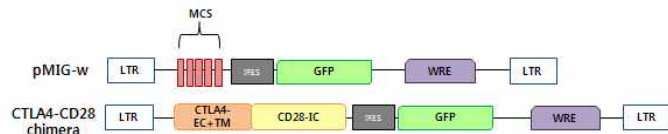


그림 58. CTLA4 mutant retroviral construct의 모식도

B6 mouse에 E.G7 세포를 피하주사하고 7일 후, CTLA4-CD28 gene-modified OT-II세포를 단독 혹은 OT-I T세포와 함께 정맥주사하였다. OT-II T세포를 단독으로 투여하였을 때는 유전자입과 관계없이 종양의 regression을 관찰할 수 없었으므로 CD4 T세포 자체의 종양살상능은 없음이 다시 한 번 확인되었다.(그림 59). 그러나, OT-I T세포와 병합하여 주사한 경우는, unmodified OT-II T세포가 전혀 도움을 줄 수 없는 세포 dose(OT-I : OT-II = 2 : 0.5)에서도 CTLA4-CD28

chimera가 이입된 OT-II T cell은 OT-I cell에 의한 종양의 regression을 현저하게 증가시켰으며, OT-II의 수를 점차 늘려감에 따라, unmodified OT-II T cell의 항종양효과가 나타나는 dose에서도 chimera가 유입된 OT-II T cell의 항종양력 향상효과는 그대로 유지되어 2:2 dose에서는 완전한 tumor의 regression을 관찰할 수 있었다 (그림 60).

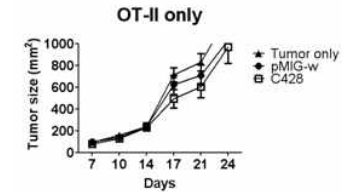


그림 59. E.G7 tumor에 대한 OT-II T세포 단독투여의 효과

(pMIG-w, empty vector-transduced OT-II T cells; C428, CTLA4-CD28 gene-modified OT-II T cells)

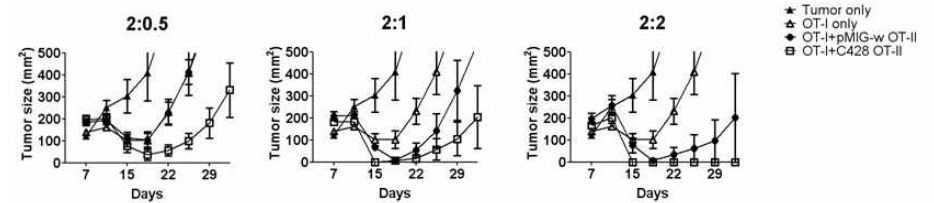


그림 60. E.G7 tumor에 대한 CTLA4-CD28 modified OT-II T세포 및 OT-I T세포의 병합투여의 효과 (2 : 0.5 - 2 : 2, ratio of the number of injected OT-I T cells versus OT-II T cells)

따라서, 비로소 CTLA4-CD28 chimera를 이용한 종양항원특이적 T세포의 관용파괴가 항암T세포요법의 효율을 향상시킬 수 있음이 증명되었다.

4) CTLA4-CD28 chimera gene-modified CD8 T세포의 항종양효과

상기 실험에서는 OT-II CD4 T cell만 CTLA4-CD28 chimera를 발현시켰을 때 항종양효과의 증가를 보았으므로 OT-I CD8 T cell도 같이 gene-modification을 시켰을 때 그 효과가 극대화되는지를 확인하기 위하여 OT-I T cell도 같이 modify한 후 항종양효과를 확인한 결과, OT-II T cell만 modify시켰을 때보다 항종양효과가 더욱 강해짐을 확인하였다 (그림 61). 따라서, CD4 및 CD8 T cell을 double modification시킨 T cell therapy가 더욱 효율적임이 확인되었다.

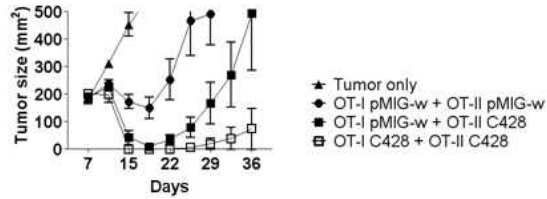


그림 61. OT-II 및 OT-I T세포의 동시 modification의 효과

이러한 modified OT-II 및 OT-I T세포의 항종양효과는 중앙합유 생쥐에 주사된 OT-II T세포 및 OT-I T세포를 분리하여 측정된 항원특이적 IL-2 혹은 IFN- γ 의 생성의 증가와 상관됨이 확인되었다(그림 62).

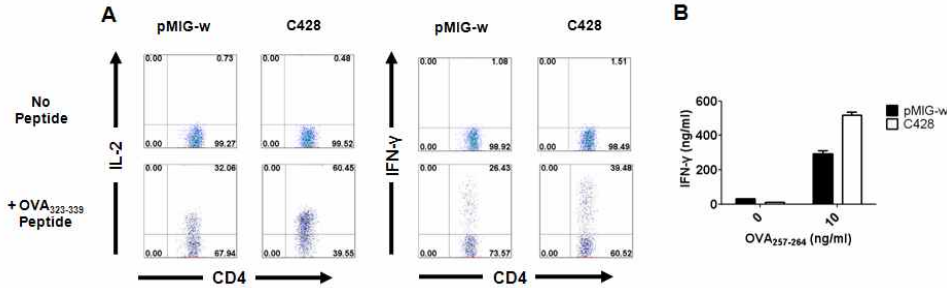


그림 62. 중앙합유 mouse에서 분리한 OT-II 및 OT-I T세포의 항원 반응성

(A, Intracellular cytokine staining에 의한 OT-II T세포의 항원특이적 cytokine분비능. B, IFN- γ ELISA에 의한 OT-I T세포의 항원특이적 IFN- γ 분비능)

5) Physiological한 중앙항원특이적 T세포의 CTLA4-CD28 modification에 의한 항종양효과

상기 model은 Ovalbumin이라는 인위적인 중앙항원에 대한 항종양효과를 관찰한 것이므로, 좀 더 physiological한 중앙항원특이적 T cell therapy model로서, mouse syngenic melanoma cell(B16)과, B16 tumor가 발현하는 내재중앙항원(gp100)에 특이적인 CD8 TCR transgenic mice(Pmel-1)를 이용하여 CTLA4-CD28 modification의 효과를 관찰하였다.

B6 mice에 B16 melanoma cell을 피하주사하고 7일 후, 5Gy의 전신방사선조사를 통해 lymphocyte depletion과정을 거친 후(최근 T세포요법시행 전의 lymphodepletion이 T세포의 치료 효과를 급격히 증가시킴이 보고됨), transgenic mice로부터 분리한 melanoma특이적 CD8 T세포(Pmel-1)를 정맥주사하고 중앙의 regression정도를 관찰하였음. 상기 model과 같은 CD4 병합치료를 위하여서는 B6 mice로부터 분리한 polyclonal CD4 T세포(regulatory T cell이 제거된 CD4+CD25- population)를 사용하였다. 비록, 이들 CD4 T세포의 항원특이성은 확보되지 못하였으나, 기존 보고에 의하면 이들 polyclonal CD4 T세포와 Pmel-1 T세포와의 병합치료가 Pmel-1 T

세포의 항종양효과를 증가시킴이 보고되어 있으므로, CTLA4-CD28 modification에 의해 그 효과가 배가되는지를 확인하였다.

CD4 T세포와 Pmel-1 T세포 모두를 CTLA4-CD28 gene modification을 거친 후, B16합유 B6 mice에 정맥주사하였을 때, unmodified CD4 T세포 + Pmel-1 T세포에 비해 훨씬 강력한 항종양효과를 보임이 중앙의 크기 및 생쥐의 생존율 측정을 통해 확인되었다(그림 63A와 B).

또한 이러한 항종양효과는 말초혈액내의 CD4 T세포 및 pmel-1 T세포의 비율 및 절대수의 증가와 상관됨이 확인됨(그림 63C-E).

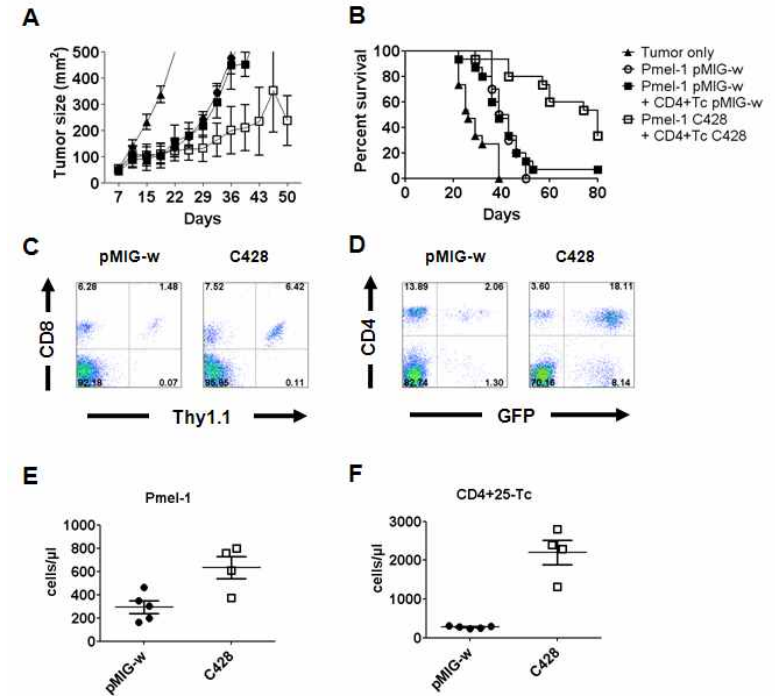


그림 63. 유전자조작 CD4 및 CD8 T세포 병합요법의 항 melanoma 효과

최종적으로, CTLA4-CD28 modified T cell therapy는 CD4 및 CD8 T세포의 병합요법에서 항종양효과의 큰 증가를 유발하였으며, 이는 CTLA4 수용체를 통한 T세포면역관용 현상을 회피함으로써 항암T세포요법의 효능이 크게 증가될 수 있음을 증명하였다.

이 결과는 최근 미국 혈액학회지인 Blood에 출간되었다 (Blood. 2012;119(24):5678-5687, IF: 10.558).

3. 연구결과 고찰 및 결론

현 과제에서 본 연구진은 T세포관용의 새로운 매개분자로서 선행연구에서 발굴된 Sprouty1 및 Ndrgr1의 유전자조작 생쥐를 이용하여 이들의 T세포관용 특히 T cell anergy에서의 역할을 규명하고자 하였다. 이중 특히 Ndrgr1 KO mice를 이용한 연구에 집중하여, Ndrgr1이 T cell anergy에 중요한 매개분자임을 다각도의 연구를 통해 증명하였다. 특히, Ndrgr1이 결핍시 자가면역질환의 발병이 심화됨을 확인함으로써 **Ndrgr1이 자가면역질환 예방에 중요하게 작용함을 학계 최초로 증명하였다.** (이 결과는 현재 Nature medicine에 투고하여 revision중에 있다.)

이어서, 본 연구진은 Ndrgr1의 억제에 의한 T세포관용을 파괴하여 T세포요법의 항종양효과를 증진시키는 지 실험하였으나, Ndrgr1억제가 항암T세포요법을 향상시키기에는 부족함을 확인하였다. 이에 본 연구진은 Ndrgr1외에 또 다른 강력한 T세포관용유도분자인 CTLA4로 목표를 수정하여, 새로운 CTLA4 dominant negative mutant를 개발하였으며, 이를 이용한 유전자입 T세포요법모델에서 CTLA4 mutant가 이입된 T세포의 항종양효과가 현저히 개선됨을 확인하였다.

따라서, 표적단백질의 수정을 통하여 궁극적으로 항암 T세포관용 파괴를 통한 항암T세포요법의 효능 향진이라는 본래의 목표를 달성할 수 있었다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(IF.)	Year: Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Ndrgr1 is a critical mediator of T cell clonal anergy and is negatively regulated by CD28-costimulation and Interleukin-2	최 경 호 (교신)	Nature Medicine (25.430)	under revision	국외 SCI	1010090
Positive conversion of negative signaling of CTLA4 potentiates anti-tumor efficacy of adoptive T cell therapy in murine tumor models	최 경 호 (교신)	Blood (10.558)	2012; 119(24):5678-5687	국외 SCI	1010090
Quantitative measurement of anti-aquaporin-4 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant human aquaporin-4	최 경 호 (교신)	Multiple Sclerosis (4.23)	2011 Sep 30. [Epub ahead of print]	국외 SCI	없음
An RNA aptamer that specifically binds pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor inhibits migration and growth of pancreatic cancer cells	최 경 호 (공동)	Cancer Lett.	2011; 313(1):76-83.	국외 SCI	1010224
Downregulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas	최 경 호 (공동)	Oncogene.	2011; 30(21):2433-42	국외 SCI	1010171

1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동

2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

3) 지원과제번호(Acknowledgement)

- 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
Costimulation-dependent regulation of Ndrgr1, a novel T cell clonal anergy factor downstream of Egr2	최경호	2011 Seoul Forum on Xenotransplantation	국내	1010090
Positive conversion of negative signaling of CTLA4 potentiates anti-tumor T cell reactivity	최경호	The 5th international conference on cell therapy	국내	1010090
Positive conversion of negative signaling of CTLA4 potentiates anti-tumor efficacy of adoptive T cell therapy in murine tumor models	최경호	대한면역학회 추계학술대회	국내	1010090

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	변이 CTLA4 유전자 이입 T 세포 및 이를 포함하는 항암 면역치료용 조성물	최경호	대한민국출원	10-2011-0109729
발명특허	변이 CTLA4 유전자 이입 T 세포 및 이를 포함하는 항암 면역치료용 조성물	최경호	PCT출원	PCT/KR2012/008878

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)		
			연차	최종	
	1차년도	1) Sprouty1 dominant negative transgenic mice (DN-Spry1 mice) 및 NdrG1(-/-) mice로부터 분리한 T세포의 분화력 및 항원반응성 측정	-NdrG1 KO, OTII transgenic mice로부터 분리한 CD4 T세포를 이용해 NdrG1이 in vivo anergy에서 중요한 역할을 함을 증명함 -Old NdrG1 knockout mice로부터 분리한 T세포의 과활성화를 확인함으로써 자가면역경향성을 확인함 -DN-Spry1의 경우 발현도가 높은 line6 T세포의 mild한 과활성화를 확인함	100	100
		2) DN-Spry1 mice 및 NdrG1(-/-) mice의 자가면역현상 분석	-Old NdrG1 knockout CD4 T세포의 adoptive transfer system을 이용한 자가면역유도실험에서 NdrG1결핍이 자가면역현상을 심화시킴을 확인함		
	2차년도	1) NdrG1과 T cell clonal anergy와의 연관성- 심화연구	-IL-2 induced anergy reversal 조건에서의 NdrG1인산화 및 degradation 증명 -Old NdrG1 knockout mice로부터 분리한 T세포의 subset analysis를 통해 NdrG1의 clonal anergy와의 연관성 증대 -DGK-alpha의 clonal anergy 및 NdrG1과의 연관성 분석완료	100	200
		2) 중앙 항원 특이적 TCR-transgenic mice를 이용한 NdrG1-deficient T세포의 항암효과 분석	-CD4 및 CD8 병합T세포치료요법 model확립 -NdrG1 KO T세포를 이용한 항암 효과분석 완료		
	3차년도	1) NdrG1과 T cell clonal anergy와의 연관성- 심화연구	-Egr2 shRNA를 이용한 NdrG1발현억제 실험완료	100	300
		2) 면역관용과괴 유전자조작 T세포의 항암효과분석	-CTLA4-CD28 chimera 유전자가 도입T세포의 치료효율 증대 확인		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
Sprouty1 및 NdrG1 유전자조작 생쥐를 이용하여 이들 유전자의 T세포관용에서의 역할을 규명하였나	Sprouty1의 경우, dominant negative mutant의 T세포활성화효과가 크지 않아 그 in vivo효능분석이 원활치 않았음. 그러나, NdrG1 KO를 이용한 실험을 통해 NdrG1의 T cell anergy 및 자가면역질환 억제에 관한 효과를 명백히 입증하였음
T세포관용과괴를 이용한 항암T세포요법의 증진효과를 확인하였나	NdrG1 KO T세포를 이용한 T세포요법 연구에서는 항암효율의 증진을 확인하지 못하였으나, 표적단백질을 CTLA4로 바꾸어 시행한 CTLA4 dominant negative mutant 유전자가 도입T세포요법의 항암효율이 크게 증진됨을 확인함

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	Nature Medicine (IF: 25.430)
산업재산권 등록	1	면이 CTLA4 유전자 이입 T 세포 및 이를 포함하는 항암 면역치료용 조성물 (대한민국, 미국, 일본, 호주 등)
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

CTLA4-CD28 chimera 유전자를 이입한 gene-modified T cell therapy는 향후 국내 T세포유전자 치료 전문기업인 바이로메드와 공동개발을 통해 향후 5년안에 임상시험 진입을 목표로 하여 후속 연구를 지속할 예정이다.

특히, 현재 유전자가이입 T세포요법은 암세포표면단백질에 대한 항체와 T세포수용체의 chimeric receptor (chimeric antigen receptor CAR)를 말초혈액 T세포에 이입함으로써 중앙특이적 T세포를 확보하는 전략으로 이행하고 있어, 이미 CAR-modified T세포요법은 구미에서 20건이상이 초기임상시험에 진입한 상태다. 따라서, 본 연구진은 CAR와 CTLA4-CD28 chimera 유전자를 동시에 이입하는 dual gene-modified T cell therapy를 통해 차세대 유전자 T세포요법의 후속연구를 진행할 예정이다.

6. 참고문헌

7. 첨부서류