

알레르기 질환에서의 DNA vaccine

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

권 순 석

서 론

알레르기 질환은 항원 특이성 IgE 항체의 생성이 증가되어서 항원에 대한 초기 과민반응을 주도하며, 항원 특이성 T 림프구들은 초기 감작 시기뿐만 아니라 항원에 대한 후기반응에도 주도적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이런 helper T 세포들 중에서 주로 Th2 표현형 세포에서 분비되는 cytokine들의 영향을 받아서 IgE 항체 생성과 호산구를 비롯한 단핵구들이 후기반응에 관여하고 있으며, 이것이 알레르기성 염증반응 및 알레르기성 질환의 병인론에서 중요한 역할을 수행한다고 한다¹⁾. 이러한 알레르기 질환의 치료법으로는 알레르겐이나 유발인자로부터 회피하거나, 부신피질 호르몬 등의 약물요법들이 있으나, 그 효과의 정도나 병인적인 치료에는 한계가 있다. 또한 면역요법은 처음에 소량의 천연 항원 추출물 (crude allergen extract)을 주사하고 서서히 증량하여 어느 정도의 부분적인 둔화현상(tolerance)이 생길 때까지 주기적으로 주사를 계속하는 것이다. 이 면역요법의 효과기전은 알레르겐에 대한 반응성 T 세포의 anergy와 면역반응 조절 등의 변화로서 설명되어 지고 있으나 아직도 효과의 기전에 대하여 논란이 있으며^{2,3)}, 적어도 1주에서 4주 간격으로 적어도 6개월에서 1년 이상의 기간동안 계속적으로 치료를 함으로써 임상적인 효과를 기대할 수 있으므로, 비용문제, 치료의 효과정도, 주기적으로 많은 시간이 요구되는 문제점을 가지고 있어서 새로운 치료법의 개발이 요구되는 실정이다⁴⁾. 한편 최근에 plamid DNA를 예방 접종

(immunization)한 후에 DNA에 코드화된(en-coded) 항원에 대한 세포성 면역 및 체액성 면역이 증진되고 지속적으로 항진되어 있음이 알려진 이후에 여러 질환에서 DNA 백신(vaccine)을 이용한 치료를 시도하여 항원에 대한 면역반응이 항진되어 질환이 예방될 수 있음을 동물실험에서 증명되고 있어 현재는 임상활용을 위한 여러 가지 노력이 이루어지고 있는 실정이다⁵⁻⁷⁾. 이처럼 DNA 백신이 새로운 치료법으로 대두되는 이유는 MHC(major histo-compatibility complex) class I 과 II molecule을 통한 항원 제시(antigen presenting)가 가능하며, 지속적이고 보다 강력한 면역반응을 유도하는 특성 때문이다. 이런 면역학적인 특성을 이해하기 위해 DNA 백신에 의해 유발되는 면역기전과 plamid DNA의 구조와 특성들에 대하여 알아보려고 한다.

DNA vaccine과 protein vaccine의 차이점

plamid는 이중회선(double circular) 구조의 extrachomosomal DNA이며, 박테리아내에서나 또는 다른 세포에서는 적절한 전사요소(transcriptional elements)가 있는 경우에 재생산이 된다. 일반적으로 DNA가 포유동물 세포내로 들어가기 위해서는 지질, 펩타이드, 단백질 등과 응축(condensing)을 형성하는 과정이 필요하거나 vehicle을 이용하지만, plamid DNA는 이러한 복잡한 매개기구 (vector system) 없이도 세포내로 들어가서 표현될 수 있는 특징을 가지고 있어서 naked DNA로 명명되기도 한다^{8,9)}. 기존의 단백질 항원 그 자체를 이용한 단백질

통신저자 : 가톨릭의대 내과 권순석

경기도 부천시 원미구 소사 2동 (우 420-743)

e-mail : kwonsoon@yahoo.com

백신(protein vaccine)은 단백질 분해효소에 의하여 빠른 분해과정과 적은 분자크기로 인해 혈청 내에서 대단히 짧은 반감기를 가지기 때문에 충분하지 않은 면역항원(immunogen)으로 인식되며¹⁰, 또한 T 세포의 초기 활성화를 유발하는 데에 요구되는 필요 충분한 MHC class II molecules을 형성하기 위해서는 많은 양의 단백질 항원이 필요한 단점을 가지고 있다¹¹. 반면에 DNA 백신은 조작이 아주 쉽고 간단하며, 지속적으로 면역기구 (immune system)를 활성화된 상태로 유지될 수 있도록 오랫동안 항원이 표현될 수 있으며, 단백질과는 기전이 완전히 다른 면역반응을 유도한다. 또한 cDNA 수준에서 단백질의 항원성 (antigenicity)을 조작하므로 단백질 생산 및 순도를 향상시키기 위한 새로운 조절단계가 필요하지 않다¹². 이러한 장점들을 이용하여 최근에 Wolff 등이 reporter gene이 포함된 plasmid DNA를 근육주사 후에 발현되는 것을 보고한 이후에¹³, 항원의 DNA가 코드

화된 plasmid DNA를 예방 접종하여 여러 감염 질환에서 강력하고 지속적인 세포성 면역 및 체액성 면역이 유도됨을 보여 주었다⁵⁻⁷.

DNA vaccine에 의한 MHC class I 과 II 제한성 T 세포반응의 유도성 (DNA vaccine induction for MHC class I and II restricted T cell responses)

면역반응이 일어나기 위해서는 먼저 항원을 제시하는 과정이 필요하며, 기존의 단백질 항원을 이용한 면역요법은 외부에서 만들어진 단백질을 주사함으로써 세포질의 항원으로 인식되어 항원 제시세포(antigen presenting cell)에 의하여 탐식 및 세포내 이입(endocytosis) 의하여 항원이 세포질내로 이동하여 MHC class II molecules을 통한 항원 제시 경로를 통하여 항원이 세포표면으로 표현되어 MHC class II 제한성 CD4+ T 세포의 활성화를 유도하여 항체나 대식세포 같은 작동세포 기구 (effect cell

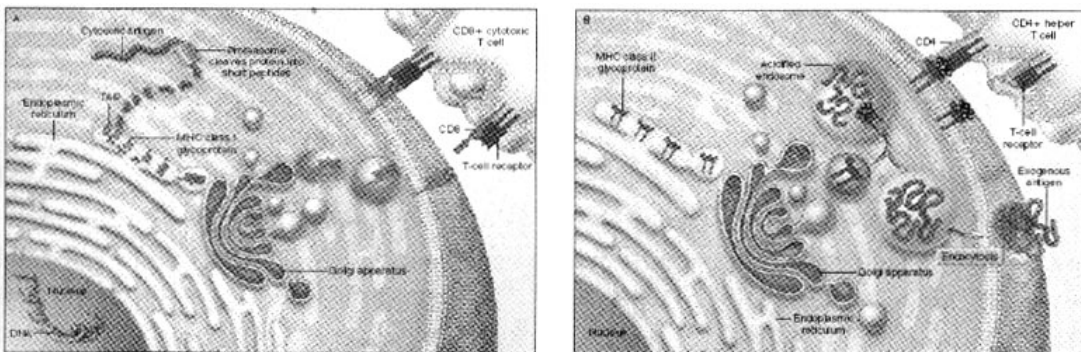


Fig. 1. Presentation of Antigen to T Cells through the MHC Class I and Class II Molecules.

Panel A shows the endogenous pathway by which intracellular proteins in the cytosol are cleaved into short peptides (comprising 8 to 10 amino acids). The peptides enter the endoplasmic reticulum with transport-associated proteins (TAP1 and TAP2) and bind there to MHC class I molecules. After binding, the complex is transported through the Golgi apparatus to the cell surface, where it can be recognized by cytotoxic T cells (CD8+). Panel B shows the exogenous pathway through which antigen-presenting cells take up extracellular proteins by either endocytosis or phagocytosis. MHC class II molecules in the endoplasmic reticulum pass through the Golgi apparatus and enter acidified endosomes in which the foreign protein has been fragmented into peptides. The MHC-peptide complex is then brought to the cell surface, where it can be recognized by helper T cells (CD4+). Depending on the type of helper T cell that binds to the complex, B cells are stimulated and antibody production augmented.

system)들을 활성화시킨다(Fig. 1)⁸⁾.

이와는 달리 DNA 백신에서는 바이러스 감염과 유사한 방법으로 DNA가 숙주의 핵내로 유입되어 코드화되어 있는 항원이 세포질내에서 생산되어 MHC class I molecules을 통한 항원 제시경로로 통하여 세포질내 항원으로서 세포표면에 표현되어 MHC class I 제한성 CD8+ 세포독성 T 세포 (cytotoxic T cell) 반응을 유도하여 세포성 면역을 항진시킨다(Fig. 2)⁸⁾. 여러 동물실험에서 influenza 바이러스⁹⁾, Hepatitis B virus¹¹⁾의 단백질을 코드화한 plasmid DNA를 사용하여 유전자 백신 치료법 (gene vaccination)을 시행한 후에 바이러스 특이 세포독성

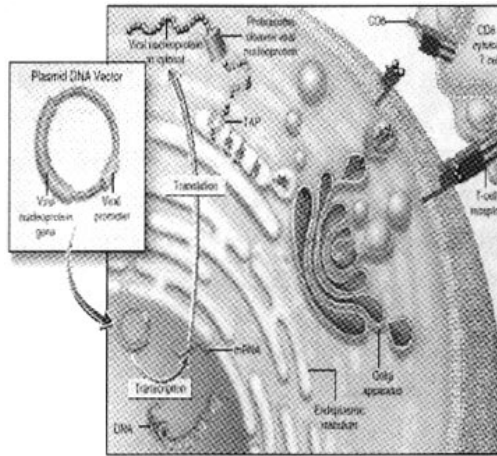


Fig. 2 Molecular route of a DNA vaccine. Naked-DNA vaccines are plasmids that contain a gene from the target pathogen, in this case the nucleoprotein gene from the influenza virus. Gene transcription is regulated by a cytomegalovirus promoter element in the plasmid. The DNA plasmid enters the cell and nucleus, where the gene is transcribed into messenger RNA (mRNA). Nucleoprotein mRNA is translated into protein by ribosomes in the rough endoplasmic reticulum (not shown). In the cytosol the protein is cleaved by proteasomes, and the oligonucleotides are transported into the endoplasmic reticulum, where they bind to MHC class I molecules. The complex is transported to the cell surface, where binding to cytotoxic T cells and stimulation of cell-mediated immunity occur.

T 세포 반응이 유도됨을 보여 주고 있어 이러한 기전을 뒷받침해 주고 있다. 하지만 이처럼 바이러스 특이 세포독성 T 세포반응을 유도하기 위해서는 MHC class I의 제시 경로를 통한 항원 제시가 이루어 져야 가능할 것으로 생각되는데, 그 이유는 오직 세포내에서 생산된 단백질 즉 세포질내 항원만이 이 경로를 거쳐서 항원제시가 된다고 알려져 있기 때문이다⁶⁾. 그러므로 유전자 백신 치료법을 시행한 경우에는 DNA가 직접적으로 항원 제시세포 자체의 세포내로 전이되는 현상을 유발하여야 바이러스 특이 세포독성 T 세포반응을 유도할 수 있으나, 근육내에는 항원 제시세포가 거의 존재하지 않으므로 이러한 기전에 의한 T 세포의 활성화를 설명할 수가 없다. 그러나 최근에는 세포질의 단백질 항원이 MHC class I의 제시경로로 유입될 수 있는 다른 경로가 존재한다고 보고하고 있어^{15, 16)}, DNA 백신 치료법이 직접적인 항원 제시세포에 대한 전이현상 없이도 MHC class I의 제시경로를 통한 항원제시가 가능하여 MHC class I 제한성 세포독성 T 세포반응이 유발 될 수 있겠다.

생산되는 cytokines의 양상에 따라서 MHC class II 제한성 CD4+ T helper 세포들이 두 가지로 분류가 되고 있으며, Th1 표현형 세포는 주로 interleukin-2 (IL-2)과 interferon- γ (IFN- γ)를 생산하여 대식세포를 활성화시키고 지연성 과민반응(delayed-type hypersensitivity)을 증진시킨다. 반면에 Th2 표현형 세포는 IL-4, IL-5, IL-6과 IL-10을 생산하여 IgE 항체 생성을 촉진하고 호산구 분화를 활성화시키는 것으로 알려져 있다^{17, 18)}.

Raz¹⁹⁾ 등의 발표에 의하면 단백질 백신 치료법을 시행하였을 경우에는 항원 특이 Th2 세포 반응을 유도하여 IL-4와 IL-5를 분비하여 혈청내 주로 IgG1과 IgE 항체가 증가됨을 보이고, 경피내로 유전자 백신 치료법을 시행한 경우는 반대로 Th1 세포반응을 유발하여 고농도의 IFN- γ 를 분비하여, 혈청내 IgG2a 항체가 높게 측

정됨을 보여 주었다(Table 1).

그러므로 DNA 백신 치료법의 경우에는 단백질 치료법과는 전혀 기전이 다른 면역반응을 유발하는 것을 알게 되었으며, 이러한 유전자 백신 치료법에 의한 면역반응의 변화는 알레르기 질환에서도 관찰되어지고 있다. Hsu²⁰⁾ 등은 집먼지진드기 알레르겐의 일종인 Der p V 유전자를 plasmid DNA에 코딩화하여 rat의 다리 근육으로 주사한 후 근육내에서 적어도 약 6개월까지 Der p V 단백질이 표현되고 있음을 확인하였고, 다시 Der p V 단백질로 반복적으로 초회 항원 자극 (primed)을 하고 다시 감작을 계속적으로 시행함에도 불구하고 Der p V에 대한 특이 IgE 항체반응이 의미 있게 억제되었다. 또한 기도 과민반응정도나 기관지폐포세척액에서 분리된 세포에서의 히스타민 유리능도 의미 있게 감소됨을 보여 주었으며, 치료된 쥐에서 분리된 CD8+ T 세포를 수동적으로 전이한 쥐에서도 이와 같은 억제효과를 보여서 이는 CD8+ T 세포가 CD4+ T 세포에 대하여 영향을 미쳐서 알레르기 반응에 대한 둔화현상을 유도한다고 설명하고 있다. 다른 종에서 다른 모델의 알레르겐을 사용한 경우에서도 마찬가지로 유전자 백신 치료법이 알레르기 반응을 억제하는 것을 보여 주고 있으며^{19, 20)}, 이러한 면역효과의 기전은 주로 지속적인 Th2 세포의 반응을 하향 조절됨으로서 일어난다고 설명하고 있다.

면역주사경로에 따른 항원 제시세포의 역할

DNA 백신은 대부분은 피내주사 또는 근육주사로 투여되나, 일부에서는 혈관내 또는 비강내로 투여 후에도 면역반응이 일어남을 관찰하였다. 피내주사는 피하주사바늘을 사용하여 피내로 소량의 DNA를 주입하는 것이며, 피부와 점막은 해부학적인 구조상 외부의 항원이 정상적으로 자주 출현되는 곳이므로 면역감시 기능이 잘 발달되어 있다¹⁹⁾. Langerhans cell 이나 수상돌기세포 (dendritic cell) 들은 피부에 출현되는 항원을 램프질로 운반 후 제시하여 T 세포를 활성화시키는 역할을 한다. 동물실험에서도 plasmid DNA를 피내 주사 후 피내에 존재하는 각질세포 (keratinocyte), 섬유모세포, 수상돌기세포 모양의 세포들에 의해서 세포질내에서 항원이 표현되고 있음을 보여주고 있으며, gene gun을 이용한 유전자 백신 치료법을 시행한 경우에도 마찬가지로 직접적으로 수상돌기 세포의 세포내로 전이현상이 일어난 후에 곧바로 국소 임파절로 이동하여 T 세포의 초기활성화를 유도하는 것으로 생각되고 있으며, 이러한 현상은 유전자 백신 치료법을 시행한 후 24시간 내에 임파절에서 DNA가 전이된 수상돌기 세포가 발견됨으로써 증명되었다. DNA 백신을 피내 주사하는 경우는 피부에서 항원이 일시적으로 표현되고 곧 항원 제시세포들이 이 항원을 국소 임파절에 있는 T 세포에게 제시하여, T 세포들이 초

Table 1. Invitro production of lymphokines by B-gal-specific splenic CD4+ T cells following gene, protein or no immunization

Immunization	IFN- γ (pgml ⁻¹)	IL-4(pgml ⁻¹)	IL-5(pgml ⁻¹)
pCMV-LacZ	741 $\pm$ 170	<2	<2
β -gal/saline	<10	12 $\pm$ 2.1	14.7 $\pm$ 4.2
β -gal/alum	<10	351 $\pm$ 24	642 $\pm$ 51
None	<10	<2	<2

* Plasmid-DNA-immunized mice were injected intradermally with 100 μ g of pCMV-LacZ three times at weekly intervals. Protein-immunized mice were given single injections of either 10 μ g β -gal protein in saline or 1 μ g β -gal protein in 3 mg alum. Mice were boosted with 10 μ g of β -gal three days before sacrifice at week 9.

회 항원자극을 받아서 면역반응이 유도되는 것으로 설명되고 있다^{21, 22}. 피부에는 여러 가지의 항원 제시세포들이 존재하지만 근육에는 전문적인 항원 제시세포들이 거의 없는 것으로 알려져 있으며, 대다수를 차지하고 있는 근세포들은 단지 저농도의 MHC class I molecules들이 표현되고 있으며, MHC class II 나 costimulatory molecules들의 표현은 거의 없다. CD8+ T 세포가 항원 특이성 세포독성 T 세포반응을 획득하기 위해서는 naive T 세포가 항원 펩타이드와 결합된 MHC class I molecules과 costimulatory molecule로부터의 2가지의 신호전달이 필요하다²³. CD8+ T 세포의 초기활성화를 위해서는 costimulatory molecule을 표현하고 있는 전문적인 항원 제시세포의 역할이 기본적으로 필요하며, 비전문적인 항원 제시세포는 costimulatory molecule이 결핍이 되어있기 때문에 이런 세포들에 의해서 항원이 제시되었을 경우에는 T 세포의 면역반응을 항진을 시키는 것이 아니라 오히려 둔화현상을 유발한다고 하였다²⁴. 그러므로 근육내로 유전자 백신 치료법을 시도할 경우에는 DNA가 근세포에 전이되어 항원이 서서히 유리되어 골수에서 유래된 전문적인 항원 제시세포들에 의하여 이 항원과 MHC class I molecules이 결합되어 MHC class I 제한성 세포독성 T 세포반응을 증진하는 것으로 제시하고 있다²⁵. 이러한 가설은 지금까지 일반적으로 세포질내에서 생성된 것이 아닌 세포질외 항원은 MHC class I molecule을 통한 항원 제시경로로 유입이 되지를 않는다고 알려져 있으므로 항원이 코드화된 plasmid DNA가 근세포내로 전이된 후에 생산되는 항원은 전문적인 항원 제시세포의 측면에서는 세포질의 항원으로 인식되므로 MHC class I 제한성 세포독성 T 세포반응은 일어나지 않을 것으로 추측된다. 하지만 최근에 세포질외에 존재하는 펩타이드들도 같은 세포나 주변세포들의 phagosome으로부터 역류 후에 MHC class I molecule을 통한 항원 제

시경로로 유입될 수 있음을 보여주었고, 탐식작용의 과부하(overload)로 소화된 단백질들이 세포질내로 유입되어 세포질내 항원으로 인식되므로, DNA 백신 치료법을 시행 한 후 직접적으로 전문적인 항원 제시세포들의 세포내로 전이가 일어나지 않더라도 코드화된 항원이 전이된 근세포에서 유리되어 전문적인 항원제시세포들에 의해서 MHC class I molecules을 통한 항원 제시경로를 통하여 CD8+ T 세포의 활성화를 유도할 수 있는 가능성이 있을 수 있다^{15, 16}.

그러므로 DNA 백신을 근육 주사시에는 costimulatory molecule을 가지고 있는 전문적인 항원 제시세포인 대식세포나 수상돌기 세포들이 DNA가 전이된 근세포에서 유리되는 항원을 받아들여서 적절한 펩타이드로 처리하여 MHC class I 또는 II molecules을 통한 항원 제시경로를 통하여 세포표면에 표현되고, 주변에 있는 임파절로 이동하여 CD8+나 CD4+ T 세포의 초기활성화를 유도하는 것으로 추측되고 있다. 초기 활성화 단계에서 CD4+ T helper 세포는 B 세포와 협력하여 전이된 세포에서 표현된 항원에 대한 적절한 항체를 생산하여 항원-항체 복합체를 형성하며, 이 복합체는 follicular 수상돌기 세포에 침착되어서 낮은 농도의 항원이 오랫동안 서서히 유리되게 되어 결국에는 장기간 동안 면역반응이 일어 날 수 있도록 면역기구의 기억을 유지하게 된다고 한다²⁶.

이에 따라 코드화된 항원을 사용하는 유전자 백신 치료법은 MHC class I molecule의 항원 제시경로를 통하여 CD8+ T 세포를 초기 활성화하여 MHC class I 제한성 세포독성 T 세포반응과 MHC class II의 항원 제시경로를 통하여 CD4+ Th1 세포의 반응을 증진시켜, 알레르기 반응을 억제 할 수 있는 것으로 생각된다.

Immunostimulatory DNA sequence (ISS)의 역할

DNA를 adjuvant로 처음으로 사용한 사람은

60년 전의 Freund로서 결핵균 추출물 전체 (whole mycobacterial extract)를 파라핀 기름과 섞은 Complete Freund's adjuvant(CFA)를 사용하였으며, 현재까지도 이 CFA가 주로 Th1 세포반응을 유도하는 가장 유명한 adjuvant로 알려져 왔다²⁷⁾. CFA는 많은 면역학적 반응의 활성화를 유도하고 있는데 이는 주로 결핵균의 genomic DNA에 의한 작용의 결과로 설명되고 있다^{28, 29)}. 결핵균의 DNA가 이러한 면역증강효과와 관련된다고 알려진 이후에 3가지의 BCG 단백질의 코드영역 (coding region)에 해당되는 13가지의 45mer oligonucleotide를 합성하여 실험한 결과에서 주로 CpG motif를 포함하고 있는 6가지의 합성 oligonucleotides에서만 B 세포에서 IFN- γ 의 생성을 유도하고 NK 세포의 활성화를 촉진시킨다고 하였다³⁰⁾. 즉 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3' (eg. 5'-GACGTC-3', 5'-AGCGCT-3'과 5'-AACGTT-3')의 palindromic hexamer를 가지고 있는 CpG motif가 백신의 adjuvant로서 Th1 세포의 기능을 증진시키는 ISS로 제시되고 있다. 그러나 이러한 NK 세포에 대한 면역자극 효과는 단지 박테리아 DNA에서만 유도되고 척추 (vertebral) DNA로서는 유도되지를 않고 있으며, 이러한 차이점은 척추 DNA는 70%정도에서 CpG core에 있는 cytosine이 C-5 methylation되어 있지만 오히려 박테리아 DNA는 70-90%정도에서 unmethylation되어 있는 것으로 알려져 있다^{31, 32)}. 또한 척추 DNA는 박테리아 DNA에 비해 CpG motif의 빈도가 5배이상 감소되어 있다고 한다³³⁾. 그러므로 unmethylated CpG motif를 가지는 DNA sequence들이 선천적인 면역반응 (innate immune response)에서는 항원 제시세포인 대식세포나 수상돌기 세포의 활성화를 유도하며, Th1 성향의 cytokine인 TNF- α , IL-12, IL-18, IFN- α/β 등을 분비, NK 세포의 활성화를 촉진하며, 항원 특이적인 면역반응에서는 특징적인 Th1 표현형 세포의

발달로 진행되어 간다^{34, 35)}. 유전자 치료법에 사용되는 plasmid DNA는 전사단위와 adjuvant/mitogenic 단위의 2가지 단위로 이루어져 있으며, 전사단위는 promoter, 항원 cDNA와 polyadenylation adding sequence로 구성되어 주로 직접적인 항원생산에 관여하는 것으로 알려져 있다. 박테리아의 ampicillin resistance gene (*ampR*)을 포함한 expression vector에서 kanamycine resistance gene (*kanR*)을 포함하는 expression vector보다 더 적은 양의 항원 단백질을 생산됨에도 불구하고 훨씬 더 강한 면역반응을 유도할 수 있으며, 이는 *ampR*의 유전자는 2번 반복되는 ISS를 가지고 있으나, *kanR*의 유전자는 이를 포함하고 있지 않는 차이점으로 설명하고 있다³⁶⁾. 그래서 plasmid backbone에 ISS를 포함하는 adjuvant 단위가 있음을 알게 되었다 (Fig. 3.)³⁷⁾. 일반적으로 유전자 치료법에 사용되고 있는 plasmid DNA의 backbone은 ampicilline resistance gene을 사용하고 있어 적어도 2개 이상의 ISS를 가지고 있으므로 이를 통한 Th1 반응을 유도할 수 있는 것으로 생각되고 있다.

기관지천식 및 알레르기 질환들은 대부분 항원에 대한 Th2 반응이 항진되어 진행되는 것으로 강력한 Th1 반응을 유도하는 치료법이 항원 특이적 Th2 반응을 억제하거나 조절함으로써 병을 치료할 수 있겠다. 이러한 관점에서 plasmid DNA가 가지고 있는 면역증진 및 조절능력을 이용하여, 동물실험에서 집먼지진드기의 일부항원이나 epitope를 코드화한 DNA 백신 치료법이 알레르기 질환을 예방할 수 있는 것을 보여 줌으로써^{20, 38, 39)}, 곧 임상적으로 활용할 수 있는 길이 열릴 것으로 기대되고 있다. 임상적으로 사용하기 위해서는 첫째로 바이러스 매개체들이 가지고 있는 문제인 숙주게놈에 결합이 될 수 있는 가능성 유무가 해결이 되어야 한다. 지금 현재까지는 plasmid DNA가 숙주게놈에 결합된다는 보고는 없으나, 만일 결합되면 정상적인 유

전자의 기능을 파괴하거나 암으로 변형을 유도할 수 있는 가능성이 있으므로 검정이 필요하겠¹⁰⁾. 둘째로는 이미 알레르겐에 감작되어 있는 경우에 이 알레르겐의 DNA를 면역 주사시에 아나필락시스같은 부작용이 일어날 수 있는 가능성에 대한 연구가 요구된다. 셋째로는 plasmid DNA 자체가 국소적인 염증반응을 유발할 수 있는 가능성이 있으나 현재까지는 항원 유도성 면역반응을 증가시키며, 전반적인 염증반응을 유도하지 않는 것으로 알려져 있다¹¹⁾.

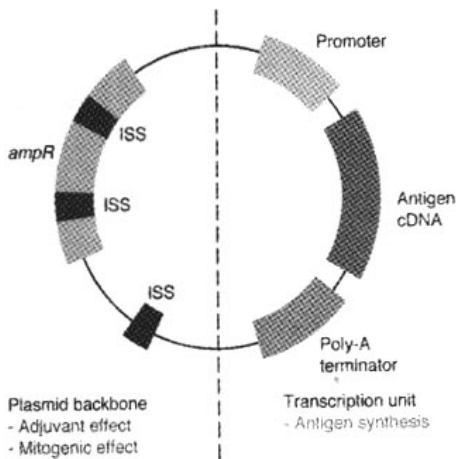


Fig. 3. Plasmid DNA for gene vaccination has two major units: (1) a plasmid backbone that delivers adjuvant and mitogenic activity via immunostimulatory sequences (ISS); and (2) a transcription unit comprising a promoter, antigen cDNA and poly-adenylation (A) addition sequence, which together direct protein synthesis. ISS are shown schematically as being located within the ampicillin antibiotic resistance gene (*ampR*) and the noncoding region of the plasmid. Although antigen synthesis requires sequence integrity of the transcription unit, this is not the case for the adjuvant/mitogenic effects, since ISS-containing oligonucleotides exert the same effects as ISS-enriched noncoding plasmid DNAs.

결론

유전자 백신 치료법은 안정적이면서 지속적으로 단백질 항원을 공급해 줄 수 있으며, 바이러스 감염과 같은 원리로 MHC class 1과 MHC

class II molecules의 두 가지 경로를 통하여 항원이 제시될 수가 있다. 그러므로 DNA 백신을 이용하는 치료는 plasmid DNA에 포함되어 있는 immunostimulatory DNA sequence에 의하여 선천적인 면역기구를 활성화시켜서 NK 세포, 대식세포, 수상돌기세포와 B 세포를 자극하여 IFN- γ , IgM 항체생성이 증진되어 항원 특이적인 Th1 반응을 유도하는 adjuvant 효과와 MHC class I 제한성 세포독성 T 세포의 활성화를 통한 면역반응과 주로 IFN- γ 를 분비하는 CD4⁺ Th1 표현형 세포의 활성화로 항원에 대한 Th1 반응이 유도되어 알레르기 질환의 주 기전인 Th2 반응을 억제할 수 있는 면역기전을 인도할 수 있다. Naked plasmid DNA에 의하여 특징적인 면역반응이 유도되고 있으나 생산되는 항원 단백질의 양이 적어서 적절한 B 세포의 활성화에 의한 항체생성이 부족하다. 그러므로 이러한 B 세포 활성화를 유도할 수 있도록 적정수의 ISS를 plasmid DNA에 보충하는 방법이나 새로운 adjuvant의 개발이 필요하며, 나아가서 더욱 더 효율적인 면역조절기능을 가질 수 있도록 항원 DNA에 Th1 반응을 유도하는 cytokine을 결합시키는 등의 방법이 요구되기도 한다. 이러한 점을 보완한다면 DNA 백신을 이용한 치료법은 높은 효율성, 특이성, 안정성과 특이적인 면역반응을 유도하는 기능을 가지고 있으므로 여러 가지 제한점을 가지고 있는 기존의 면역치료법을 대신할 수 있는 새로운 치료법으로 사용될 수 있으리라 기대된다.

참고 문헌

- 1) Ricci M, Rossi O, Berton M, Matucci A : The importance of Th2-like cells in the pathogenesis of airway allergic inflammation. Clin Exp Allergy 23: 360-9, 1993
- 2) Varney VA, Hmid QA, Gaga M, Ying S, Jacobson M, Frew J et al : Influence of grass pollen immunotherapy on cellular

- infiltration and cytokine mRNA expression during allergen induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest* 92: 644-51, 1993
- 3) Durham SR, Ying S, Varnery VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS et al : Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon- γ . *J Allergy Clin Immunol* 97: 1356-65, 1996
- 4) Van Metre Jr TE, Adkinson Jr NF : allergy : Principles and Practice, Mosby Year-Book, St.Louis, MO: 1489, 1993
- 5) Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL : DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11478-82, 1993
- 6) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ et al : Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-9, 1993
- 7) 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* 2: 1847-51, 1993
- 8) McDonnell MW, Askari FK : DNA vaccine. *N Eng J Med* 334: 42-5, 1996
- 9) Stephen JR : Science, medicine, and the future: gene therapy. *BMJ* 315: 1289-92, 1997
- 10) Demotz S, Grey HM, Sette A : The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249: 1028-30, 1990
- 11) Bot A, Bot S, Karjalainen K, Bona C : Kinetics of generation and persistence on membrane class II molecules of a viral peptide expressed on foreign and self proteins. *J Immunol* 157: 3436-42, 1996
- 12) Bona CA, Casares S, Brumeanu TD : Towards development of T-cell vaccines. *Immunol Today* 19: 126-33, 1998
- 13) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A et al : Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-8, 1990
- 14) 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* 6: 1447-56, 1995
- 15) Kovacsics-Bankowski M, Rock KL : A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267: 243-6, 1995
- 16) Reis e Sousa C, Germain RN : Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med* 182: 841-51, 1995
- 17) Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW, Gajewski TF : Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol* 11: 29-48, 1993
- 18) Mosmann TR, Coffman RL : TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-73, 1989
- 19) Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M et al : Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc*

- Natl Acad Sci USA 93: 5141-5, 1996
- 20) Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Lai YL, Wu HD, Huang SK et al : Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nature Med* 2: 540-4, 1996
- 21) Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD Jr : DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* 2: 1122-8, 1996
- 22) Banchereau J, Steinman R : Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-52, 1999
- 23) Schwartz RH : Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71: 1065-8, 1992
- 24) Jenkins MK, Schwartz RH : Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 165: 302-19, 1987
- 25) Corr M, Lee DJ, Carson DA, Tighe H : Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 184: 1555-60, 1996
- 26) Kumar V, Sercarz E : Genetic vaccination: The advantages of going naked manipulating the immune system with DNA vaccines shows promise for protecting against pathogens and suppressing autoimmune disease. *Nature Med* 2: 857-9, 1996
- 27) Freund J, Casals J, Hosmer EP: Sensitization and antibody formation after injection of tubercule bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 37: 509-13, 1937
- 28) Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A et al : Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvant. *Nature Med*. 3: 509-54, 1997
- 29) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y et al : Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG, I: isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl. Cancer Inst.* 72: 955-62, 1984
- 30) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R et al : CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-9, 1995
- 31) Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigatsubo Y : Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol* 158: 3635-9, 1997
- 32) Bestor TH : The host defence function of genomic methylation patterns. *Novartis Found Symp* 214: 187-9, 95-9, 1998
- 33) Bird AP : DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 1499-504, 1980
- 34) Metzger WJ, Nyce JW : Oligonucleotide therapy of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 104: 260-6, 1999
- 35) Uden JV, Raz E : Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 104: 902-10, 1999
- 36) Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD et al : Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273: 352-4, 1996
- 37) Tighe H, Corra M, Romanb M, Raz E : Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunology Today* 19: 89-97, 1998
- 38) Kwon SS, Kim NS, HY Lee, Yoo TJ : Immunoprotective effect of vaccination with DNA encoding T-cell epitopes on

- the Der p induced IgE production. J Allergy Clin Immunol 103: A418, 1999
- 39) Li X, Huang CK, Schofield BH, Burks AW, Bannon GA, Kim KH et al: Strain-dependent induction of allergic sensitization caused by peanut allergen DNA immunization in mice. J Immunol 162: 3045-52, 1999
- 40) Moffat M, Cookson W: Naked DNA: New shots for allergy? Nature Med 2: 515-6, 1996
- 41) David HL, Millan CL, Watkins SC : Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA. Gene Ther 4: 181-8, 1997