

Induction of IL-12 Expression in Bone Marrow-derived Mouse Dendritic Cells

골수에서 유래한 마우스 수상돌기세포에서의 IL-12 표현 유도

Ae-Yung Kim, Sun Park, Hyung-Il Kim, Jung-Koo Youn
and Millina Lee

김애영 · 박 선 · 김형일 · 윤정구 · 이미리나

*Department of Microbiology, Ajou University School of Medicine,
Suwon, Korea*

아주대학교 의과대학 미생물학교실

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen presenting cells that can activate naive T cells. Mature DCs express high levels of MHC and costimulatory molecules on their surface and have capacity to produce IL-12, a 75 kDa heterodimeric cytokine composed of p35 and p40 subunit. IL-12 is currently thought to be one of most critical determinants for skewing the immune response towards Th1. Expression of IL-12 in dendritic cells seems to be regulated by various stimuli including CD40L.

In the present study we investigated expression of IL-12 in mature DCs, which were cultured from bone marrow cells in the presence of GM-CSF. Maturity of the DCs was confirmed by morphologic characteristics, immunophenotypes, and allostimulatory activities. Expression levels of IL-12 p40 in the DCs were measured by semi-quantitative RT-PCR. Increases in IL-12 p40 expression were observed after treatment with lipopolysaccharide (LPS), an anti-MHC class II monoclonal antibody, or an anti-CD40 monoclonal antibody. The most remarkable increases, however, were observed in the DCs treated with an anti-CD40 monoclonal antibody. These results support a previous notion that signals through CD40/CD40L interaction may be important for the production of IL-12 by DCs. Moreover, results of this study show a possibility of using monoclonal antibodies against CD40 molecules for preparing DCs producing high amount of IL-12, which can be used for anti-tumor or anti-viral immunotherapy.

Korean J. Immunol. 21, 2: 121~127, 1999

Key Words: IL-12, Dendritic Cells, CD40, LPS

서 론

수상돌기세포 (dendritic cells)는 항원을 처리하여 면역계로 전달하는 능력이 매우 뛰어난 전문 항원 전달세포로서 골수에서 분화하여 림프계에서는 주로 T 림프구 분포영역에 존재하고 있다^{1~4}. 수상돌기세포는 B 림프구나 대식세포와 같은 다른 항원 전달세포와는 달리 naive T 림프구를 활성화시킬 수 있고, 적은 수로도 강력한 T 림프구 반응을 유도할 수 있으므로⁵ 접촉 과민 반응, 이식편 거부반응, 병원성 미생물에 대한 면역 반응 등에서 일

차 T 림프구 반응 (primary T lymphocyte response)을 유도하는 세포로 여겨지고 있다⁶. 최근 GM-CSF와 같은 싸이토카인을 이용하여 수상돌기세포의 배양이 가능해짐에 따라^{7~14}, 면역치료법 개발, 수상돌기세포와 T 림프구의 상호관계, 수상돌기세포를 이용한 항원 특이 T 림프구 배양 등이 활발히 시도되고 있다^{15~20}.

수상돌기세포는 IL-12를 생산함으로써 바이러스 및 종양에 대한 방어면역에서 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다^{21~25}. 또한 IL-12가 T 림프구 무반응 (anergy)상태를 복귀시키거나 방지할 수 있다는 보고도 있다²⁶. 따라서 수상돌기세포의 IL-12 생산은 T 림프구 활성화에서 매우

Reprint request to: Dr. Millina Lee, Department of Microbiology Ajou University School of Medicine 5 Wonchon-Dong, Paldal-Gu Suwon, Korea, 442-749, Tel) 0331-219-5074 Fax) 0331-219-5079 E-mail) millina@madang.ajou.ac.kr

각주: 이 논문은 1998년 한국 학술진흥재단의 신진교수과제 (1998-003-F00069) 학술 연구비에 의하여 지원되었습니다.

중요하다고 할 수 있다. 수상돌기세포에서의 IL-12 생산은 여러 요인에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, CD40L은 IL-12 생산을 자극하는 반면, IL-10, prostaglandin E₂, glucocorticoid 등은 IL-12 생산을 억제한다고 보고되었다²⁷⁻³². 본 연구에서는 C57BL/6 마우스 골수로부터 분화 유도한 수상돌기세포를 대상으로 LPS, anti-MHC class II, 그리고 anti-CD40 단클론항체가 IL-12 p40 mRNA 표현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

수상돌기세포의 배양

약 6 내지 8 주령의 암컷 C57BL/6 마우스의 대퇴골과 경골로부터 골수세포를 얻었다. 적혈구 용해 완충액 (Tris-buffered ammonium chloride; 90 ml of 0.16 M NH₄Cl, 10 ml of 0.17 M Tris, pH 7.2)을 처리한 후, 림프구와 I-A^b 양성세포를 제거하기 위해 골수세포에 단클론항체 혼합액 [53-6.72 (anti-CD8, ATCC TIB105), GK1.5 (anti-CD4, ATCC TIB207), RA3-3A1/6.1 (anti-B220, ATCC TIB46), B21-2 (anti-I-A^{b,d}, ATCC TIB229)]을 4°C에서 30 분간 처리한 후 보체 (guinea pig serum; Serotec, Oxford, UK)를 37°C 항온수조에서 40 분간 처리하였다. GM-CSF (Peprotech, London, UK) 20 ng/ml (100 U/ml)이 포함된 배양 배지 (RPMI 1640, 우태아 혈청 10%, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 50 µM 2-mercaptoethanol)에 부유된 골수세포 (1 × 10⁶/well)를 24 well culture plate (Costar, Cambridge, MA, USA)에서 배양하였다. 이를 간격으로 배양 plate를 부드럽게 흔들어 준 후 기존의 배지 750 µl를 제거하고 새 배지 750 µl를 채워주었으며 배양 8 일째에는 배지 내에 떠 있는 세포만을 거두어 2 일간 더 배양하였다. 위상차 현미경을 통해 배양 일자 별로 세포의 형태, 세포 덩어리 생성정도, 그리고 고착정도 등을 관찰하였으며 전자 현미경으로 성숙 수상돌기세포의 형태를 조사하였다.

수상돌기세포의 표현형 조사

배양 9 내지 10 일째 얻어진 세포에 FITC가 결합되어 있는 단클론 항체 (anti-CD80, anti-CD3ε, anti-CD4, anti-CD40; PharMingen, San Diego, CA, USA)를 첨가하여 4°C에서 30 분간 염색하거나, 단클론항체 배양액[anti-I-A^{b,d} (ATCC TIB229), anti-F4/80 (ATCC HB198), anti-CD11b (ATCC TIB128), anti-B220 (ATCC TIB46)]을 첨가하여 4°C에서 30 분간 둔 후 FITC나 PE가 결합된 anti-rat IgM 또는 anti-rat IgG 이차항체를 첨가하여 4°C에서 30 분간 염색하였다. Paraformaldehyde로 고정된 후 유세포 분석기 (FACS Vantage; Beckton Dickinson, USA)를 이용하여 분석하였다.

Mixed Lymphocyte Reaction

수상돌기세포의 T 림프구 자극능을 조사하기 위해, 8 내지 12 주령의 암컷 BALB/c 마우스의 비장세포를 nylon wool column을 통과시켜 얻은 T 림프구 (1 × 10⁵/well)에 C57BL/6 마우스 골수세포로부터 얻어진 수상돌기세포를 well당 1 × 10, 1 × 10², 1 × 10³, 1 × 10⁴, 1 × 10⁵ 개씩 96 well flat-bottomed culture plate에 넣고 37°C 세포배양기에서 배양한 후, 반응세포의 증식을 BrdU incorporation assay kit (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)로 측정하였다. 약술하면, 72 시간 동안 배양한 세포에 BrdU labelling 용액 (10 µM/well)을 넣어주고, 다시 24 시간동안 배양한 후, 고정시킨 세포에 peroxidase가 결합된 anti-BrdU 용액을 첨가하여 실온에서 2 시간동안 반응시켰다. 기질액인 TMB (3,3',5,5'-tetra-methyl benzidine)를 첨가하여 발색이 일어나면 1 M sulphuric acid로 반응을 정지시킨 후 ELISA reader (E max; Molecular Device, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IL-12 표현능 조사

수상돌기세포의 IL-12 표현능을 조사하기 위해 24 well culture plate에 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640 배지 1 ml로 부유시킨 7 × 10⁵ 개의 수상돌기세포에 LPS (Sigma, Saint Louis, MO, USA), anti-mouse MHC class II/I-A^{b,d} (B21-2 ATCC TIB229), anti-mouse CD40 (MH 40.3; PharMingen, San Diego, CA, USA)을 각각 첨가한 후 37°C 배양기에서 6 시간 혹은 20 시간동안 배양하였다. Anti-MHC class II 단클론 항체 배양액은 최종농도가 1:5, anti-CD40 단클론 항체는 5 µg/ml, 그리고 LPS는 1 µg/ml의 농도로 사용하였다. Acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction법을 이용하여 얻은 0.3~0.5 µg의 RNA를 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 µg/ml oligo (dT)12-18, 10 mM dithiothreitol, 0.5 mM dNTP, 2 U/µl RNase inhibitor (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 25 U Superscript RNaseH-reverse transcriptase (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 역전사반응액에서 37°C, 1시간동안 반응시켜 cDNA를 얻었다. 각각의 cDNA는 DEPC가 처리된 증류수를 첨가하여 예비실험에서 결정된 농도로 만든 후 -20°C에 보관하였다. 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)의 주형으로 1: 1, 1: 5, 1: 25 희석한 cDNA 20 µl를 사용하였으며 총 반응액이 50 µl가 되게 PCR 반응액 (1.5 mM MgCl₂, PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 200 ng의 IL-12 혹은 HPRT에 대한 5' primer와 3' primer, 2.5 U Taq polymerase (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA))을 만든 후 thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400; Perkin Elmer, Branchburg, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 먼저 95°C에서 5 분간 두고 94°C에서 45 초간 denaturation, 60°C에서 45 초간 annealing, 72°C에서 45초간 DNA extension시키는 과정을 IL-12는 30 cycle, HPRT는 28 cycle 한 후 반응이

끝나면 72℃에서 7 분간 유지하였다. 얻어진 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 DNA량을 확인하였다. 각각의 primer에 대한 sequence는 다음과 같다. IL-12 p40 5' primer: ATGGCC-ATATGGGAGCTGGAG, 3' primer: TTTGGTGCTTCACA-CTTCAGG (PCR 산물의 크기; 335 bp), HPRT 5' primer: GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC, 3' primer: CCAGC-AAGCTTGCAACCTTAACCA (PCR 산물의 크기; 214 bp).

결 과

수상돌기세포의 형태학적인 특징

배양 2 일째부터 GM-CSF에 반응하는 세포들이 덩어리를 형성하며 증식하기 시작하였으며 배양 6 내지 7 일째까지 약하게 붙어서 증식하던 세포의 덩어리가 배양 7 일이 지나면서 배지 내로 하나씩 떨어져 나오기 시작하였고, 이 중 일부는 세포표면에 돌기를 가진 수상돌기세포의 형태를 나타냈다. 배양 8 일째가 되면 대부분의 세포들이 배지 내로 부유하였으며, 배양 9 내지 10 일째는 거의 모든 세포들이 세포표면에 여러 방향으로 뻗은 돌기와 veil을 가진, 전형적인 성숙 수상돌기세포의 형태를 보였다 (Figure 1). 이들을 전자현미경으로 관찰한 결과 세포 본체로부터 여러 방향으로 뻗어져 나간 돌기를 가진 전형적인 성숙 수상돌기세포의 형태를 확인할 수 있었다 (Figure 2).

성숙 수상돌기세포의 표현형

9 내지 10 일간 배양하여 얻어진 수상돌기세포의 표현형을 유세포분석기를 이용하여 조사하였다. 90±5% 정도의 세포가 MHC class II (I-A^b), CD11b (Mac-1), CD80 (B7-1), 그리고 CD40를 표현하고 있었고, CD4, CD3ε과 같은 T 림프구 표지, B220과 같은 B 림프구 표지, 그리고 F4/80과 같은 대식세포 표지는 5% 미만의 세포들만이 양

성이었다 (Figure 3).

수상돌기세포의 allostimulatory activity 측정

수상돌기세포의 T 림프구 자극능을 조사하기 위하여, nylon wool column을 통과시킨 BALB/c 마우스의 T 림프구 (1×10⁶/well)를 사용하여 mixed lymphocyte reaction을 시행하였다. 대조세포로 사용된 C57BL/6 마우스의 비장세포와 비교하였을 때, 수상돌기세포는 반응세포의 1/100 개, 즉 1×10³개의 수로 자극하여도 강력한 T 림프구 증식반응을 유도하였다 (Figure 4).

RT-PCR을 이용한 IL-12의 표현 측정

수상돌기세포를 LPS, anti-MHC class II, 그리고 anti-CD40 단클론 항체로 6 시간 혹은 20 시간 자극한 후 RT-PCR을 수행하여 IL-12 p40 mRNA의 표현 정도를 조사하였다. 미자극 대조군에서도 IL-12 p40 mRNA의 표현이 관

Figure 1. Phase contrast microscopy of dendritic cells: Bone marrow-derived dendritic cells were cultured in the complete medium supplemented with 20 ng/ml of GM-CSF for 10 days. Note that most cells have processes or veils (×200).

Figure 2. Electron microscopy of dendritic cells: Dendritic cells show cytoplasmic processes extending from the cell body.

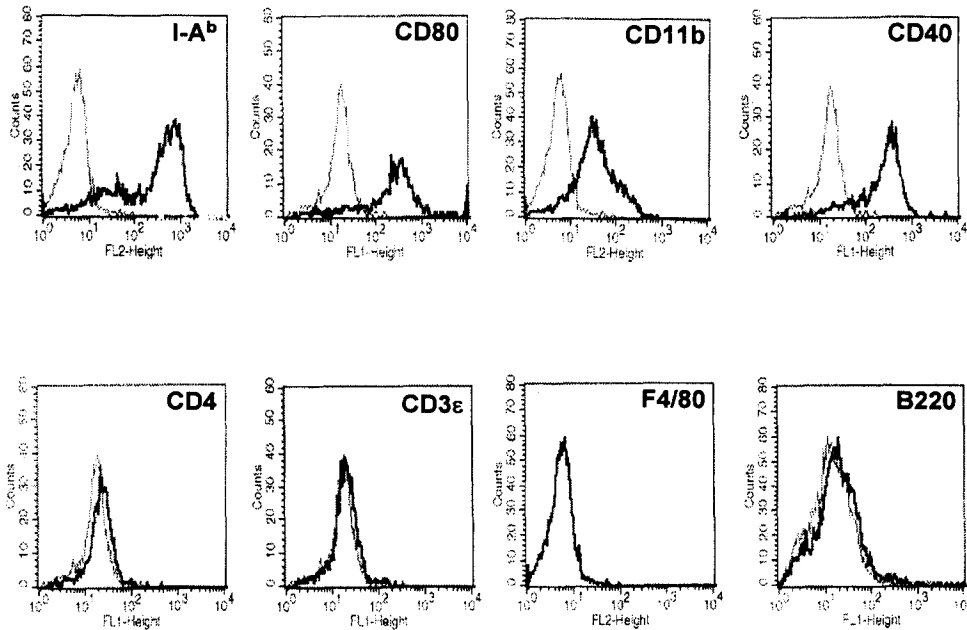


Figure 3. Immunophenotypes of dendritic cells.

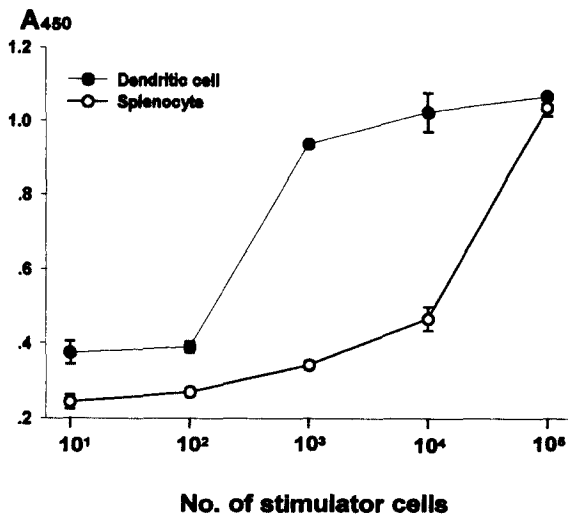


Figure 4. Allostimulatory activity of dendritic cells: Nylon wool column-purified allogeneic T cells (1×10^5 /well) were stimulated with various numbers of irradiated dendritic cells that had been cultured for 9~10 days or freshly isolated spleen cells. Proliferation of responder T cells was measured by BrdU incorporation assay.

찰되었고, 미자극 대조군과 자극을 받은 처리군을 비교하였다. Anti-CD40 단클론 항체로 자극한 경우, 6 시간과 20 시간 자극한 경우 모두에서 미자극 대조군에 비해 IL-12 p40 mRNA의 표현이 증가되었음이 관찰되었다 (Figure 5). 특히 5배 희석된 농도의 cDNA를 주형으로 사용한 경우에서도 IL-12 p40 mRNA의 표현이 강하게 나타났다. LPS로 자극한 경우에도 anti-CD40 단클론 항체 자극에 비해 표현 정도는 낮았지만 6 시간과 20 시간 모두에서 IL-12 p40 mRNA 표현이 증가되어 있음을 관찰할 수 있

었다. 이에 비해 anti-MHC class II 단클론 항체 처리군은 6 시간 자극한 경우에서만 IL-12 p40 mRNA 표현의 증가가 관찰되었다. 30시간 자극한 경우에는 anti-CD40 단클론 항체 처리군에서만 미자극 대조군에 비해 IL-12 p40 mRNA 표현이 증가됨이 관찰되었다 (data not shown).

고 찰

수상돌기세포는 대부분의 림프계와 비림프계 기관에 존재하며 이동과 귀화 (homing)에 의해 전신적인 체계를 이루고 있다¹⁻³. 림프절이나 비장과 같은 림프계 기관에 존재하는 성숙 수상돌기세포는 MHC 분자, 부착 분자, 그리고 보조자극 분자를 높게 표현하고 있어서 naive T 림프구를 활성화시킬 수 있다^{4,5}. 수상돌기세포가 강력한 항원 전달세포로서의 기능을 수행하는데 있어 이들 세포가 분비하는 사이토카인은 중요한 역할을 하리라 생각되고 있다. 특히, IL-12가 바이러스에 대한 방어 면역과 종양 면역을 유도하는데 중요한 역할을 한다는 것이 보고되면서, 수상돌기세포에서 IL-12 생산을 자극하는 조건을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다²⁷⁻³⁴. IL-12는 p35와 p40 chain이 공유결합으로 연결되어 구성된 75 kDa의 heterodimeric cytokine으로서, IL-12 p35는 자극받지 않은 상태에서도 다양한 종류의 세포에서 표현되는 반면, IL-12 p40은 B 림프구, monocyte, 그리고 수상돌기세포와 같은 항원 전달세포에서 제한적으로 표현된다²³. IL-12는 T 림프구의 Th1으로의 분화를 유도하는데 중요할 뿐 아니라, NK 세포의 IFN- γ 생산을 유도하고 세포독성능을 높인다고 알려져 있다²¹⁻²³.

수상돌기세포의 IL-12 생산을 조사한 지금까지의 연구들

Figure 5. Expression of IL-12 p40 mRNA in the stimulated dendritic cells: Dendritic cells that had been cultured in the presence of GM-CSF for 9~10 days were stimulated with LPS, an anti-MHC class II monoclonal antibody, or an anti-CD40 monoclonal antibody. After 6 or 20 hrs of stimulation, total RNA was prepared and subjected to RT-PCR. PCR products of various concentrations of cDNA were analysed on an agarose gel stained with ethidium bromide.

은 주로 마우스의 비장과 사람의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포를 이용한 것이며 골수에서 유래한 수상돌기세포에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 마우스 비장이나 사람의 말초혈액에서 유래한 수상돌기세포를 CD40L, 혹은 anti-CD40 단클론항체로 자극하면 IL-12 생산이 증가되고^{28,29)} ICAM-1, CD80, CD86 등의 표현도 증가된다고 한다^{30,31)}. 따라서 CD40를 통한 signal이 수상돌기세포에서 IL-12 생산을 자극하는데 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다. 또한 마우스 비장에서 유래한 수상돌기세포를 anti-MHC class II 단클론항체로 처리한 경우에서도 CD40를 통한 자극에 비해 약하긴 하였으나 IL-12 생산이 증가된다고 보고되었다³¹⁾.

본 연구에서는 마우스 골수로부터 GM-CSF를 이용하여 분화 유도한 수상돌기세포를 anti-MHC class II 단클론항체, anti-CD40 단클론 항체, 혹은 LPS로 자극한 후 IL-12 p40 mRNA 표현 정도를 RT-PCR로 조사하였다. Anti-CD40 단클론 항체로 자극하였을 때 6시간과 20시간 자극한 경우 모두 IL-12 p40 mRNA 표현이 미자극 대조군에 비해 월등히 증가되는 결과를 보였다 (Figure 5). 이것은 CD40L를 transfection시킨 세포주로 자극한 경우³¹⁾와 유사한 결과이며, 본 연구에서 사용한 anti-CD40 단클론항체는 이전에 사용된 보고가 없는 새로운 자극원이다. 마우스 비장에서 유래한 수상돌기세포에 CD40L를 처리한 후 IL-12 p40 mRNA 표현을 자극시간에 따라 조사한 보고에 따르면, 6시간 자극하였을 때 IL-12 p40 mRNA 표현이 최고에 도달하였고 그 상태가 24시간까지 유지되었는데²⁹⁾, 본 연구에서도 이와 유사하게 anti-CD40 단클론 항체를 6시간, 20시간 처리한 모두에서 IL-12 p40 mRNA 표현이 증가되어 있음이 관찰되었을 뿐만 아니라, 30시간 처리한 경우에도 IL-12 표현이 증가되어 있음이 관찰되었다. CD40와 함께 T 림프구의 cognate interaction에 관여하는 MHC class II 분자에 대한 단클론 항체를 처리한 결과, anti-CD40 단클론 항체로 자극한 경우보

다는 약하지만 6시간 자극하였을 때 IL-12 p40 mRNA 표현이 증가되어 있음이 관찰되었다 (Figure 5). 이러한 결과는 CD40를 통한 자극이 MHC class II를 통한 것보다 IL-12 표현을 강하게 유도한다는 것과 본 연구에서 사용한 anti-CD40 단클론항체로 골수에서 유래한 수상돌기세포를 처리할 경우 강하게 IL-12 생산을 자극할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

CD40L가 수상돌기세포의 IL-12 생산을 증가시킨다는 것은 여러 연구자들에 의해 일관성 있게 보고된 반면, LPS는 수상돌기세포의 출처 및 자극시간, 자극농도 등의 조건에 따라 다양한 결과가 보고되었다^{28~30,34)}. 본 연구에서는 골수에서 유래한 수상돌기세포를 LPS로 자극한 경우 anti-CD40 단클론 항체로 자극한 것 보다는 약하지만 6시간, 20시간 자극한 경우 모두에서 IL-12 p40 mRNA 표현이 증가됨이 관찰되었다. 마우스 비장에서 유래한 수상돌기세포의 경우에는 10 ng/ml~10 µg/ml의 다양한 농도의 LPS로도 IL-12 생산을 유도하지 못했는데, 이는 대식세포에는 표현되어 있는 LPS receptor인 CD14가 수상돌기세포에는 표현되지 않기 때문일 것이라고 추측되었다²⁹⁾. 한편, 사람 수상돌기세포에서는 LPS 자극에 반응하여 IL-12 생산이 증가되었는데 이는 사람 수상돌기세포가 CD14를 약하게 표현하고 있기 때문이라고 보고되었다³⁴⁾. 본 연구에서 사용된 수상돌기세포는 non-adherent 세포만을 수확한 것으로서 소수의 세포가 F4/80 양성이었으나, 미성숙 수상돌기세포가 F4/80을 표현했을 가능성이 크다. 따라서 대식세포가 오염되었을 가능성은 희박하다고 본다. 그러므로 본 연구 결과는 LPS가 마우스 골수에서 유래한 수상돌기세포의 IL-12 p40 mRNA 표현을 강하게 자극할 수 있음을 보여주었다고 생각한다.

수상돌기세포의 IL-12 생산능을 목적에 따라 조절할 수 있다면 수상돌기세포를 이용한 면역요법에 유용하게 쓰일 수 있다. 예를 들면, IL-10, prostaglandin E2, methylprednisolone과 같은 glucocorticoid 처리는 수상돌기세

포의 IL-12 생산을 억제할 수 있다고 한다^{28,31,32}). 반면에 본 연구에서와 같이 anti-CD40 단클론 항체로 처리하면 강력한 IL-12 생산능을 가진 수상돌기세포를 얻어 바이러스나 종양 항원에 대한 면역반응을 유도하는데 쓰일 수 있으리라고 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev Immunol.* 1991; 9: 271-296
- 2) Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 1997; 9: 10-16
- 3) Roake JA. Pathways of dendritic cell differentiation and development. *Eye.* 1995; 9: 161-166
- 4) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 92: 245-252
- 5) Mellan I, Turley SJ, Steinman RM. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends. Cell. Biol.* 1998; 8: 231-237
- 6) Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 87-97
- 7) Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with GM-CSF. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1693-1702
- 8) Chen-Woan M, Delaney CP, Fournier V, Wakizaka Y, Murase N, Fung J, StarzITE, Demetris AJ. A new protocol for the propagation of dendritic cells from rat bone marrow using recombinant GM-CSF, and their quantification using the mAb OX-62. *J. Immunol. Methods.* 1994; 178: 157-171
- 9) Talmor M, Mirza A, Turley S, Mellman I, Hoffman LA, Steinman RM. Generation of large numbers of immature and mature dendritic cells from rat bone marrow cultures. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 811-817
- 10) Bender A, Sa M, Schuler G, Steinman RM, Bhargwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods.* 1996; 196: 121-135
- 11) Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood-Improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods.* 1996; 196: 137-151
- 12) Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulation identified. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 1953-1962
- 13) Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1109-1118
- 14) Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term culture. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 317-328
- 15) Paglia P, Girolomon G, Robbiati F, Granucci F, Ricciardi Castagnoli CP. Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiate primary T cell response *in vivo*. *J. Exp. Med.* 1993; 179: 1893-1901
- 16) Porgador A, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocyte. *J. Exp. Med.* 1995; 182: 255-260
- 17) Young JW, Inaba K. Dendritic cells as adjuvant for class I MHC-restricted anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 7-11
- 18) Paglia P, Chrodom C, Rodolfo M, Colombo MP. Murine dendritic cells loaded *in vitro* with soluble protein prime cytotoxic T lymphocyte against tumor antigen *in vitro*. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 317-322
- 19) Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ. Virus-mediated delivery of antigenic peptides into dendritic cells as a means to induce CTL. *J. Immunol.* 1997; 158: 3270-3276
- 20) Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvant for immune-mediated resistance to tumors. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1183-1187
- 21) Grohmann U, Fioretti MC, Bianchi R, Belladonna ML, Ayroldi E, Silla S, Puccetti P. Dendritic cells, interleukin 12, and CD4+ lymphocytes in the initiation of class I-restricted reactivity to a tumor/self peptide. *Crit. Rev. Immunol.* 1998; 18: 87-98
- 22) Heuffer C, Koch F, Stanzi U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G. IL-12 is produced by dendritic cells and mediates Th1 development as well as IFN- γ production

- by Th1 cells. *J. Immunol.* 1996; 26: 659-668
- 23) Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 495-521
- 24) Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.* 1995; 154: 5071-5079
- 25) Johnson LL, Sayles PC. Interleukin-12, dendritic cells, and the initiation of host-protective mechanisms against *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1799-1802
- 26) Grohmann U, Bianchi R, Ayroldi E, Belladonna ML, Surace D, Fioretti MC, Puccetti P. A tumor-associated and self-antigen peptide presented by dendritic cells may induce T cell anergy *in vivo*, but IL-12 can prevent or revert the anergic state. *J. Immunol.* 1997; 158: 3592-3602
- 27) Sausa CR, Hieny S, Saharion-Kersten S, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1819-1829
- 28) Buelens C, Verhasselt V, Groote DD, Thielemans K, Goldman M, Willems F. Human dendritic cell response to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 1848-1852
- 29) Kato T, Yamane H, Nariuchi H. Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction of IL-12 production by dendritic cells and macrophages. *Cell. Immunol.* 1997; 181: 59-67
- 30) Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of IL-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 747-752
- 31) Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, Romani N, Schuler G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 741-746
- 32) Tineke CTM van der Pouw Kraan, Leonie CM Boeije, Ruud JT Smeenk, John Wijdenes, Lucien A Aarden. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 775-779
- 33) Skeen MJ, Miller MA, Shinnick TM, Ziegler HK. Regulation of murine macrophage IL-12 production. *J. Immunol.* 1996; 156: 1196-1206
- 34) Verhasselt V, Buelens C, Willems F, Groote DD, Haeflner-Cavillon N, Goldman M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells. *J. Immunol.* 1997; 158: 2919-2925
-