

신경모세포종 항원 종류에 따른 수지상세포의 성숙화 및 면역능력의 차이

라이프코드 의학연구소, ¹아주대학교 의과대학 소아과학교실

장인근 · 최정은 · 김영진 · 황진순¹ · 김성환¹ · 박준은¹

Effect of the Antigenic Differences of Neuroblastoma on the Maturation and Immunoactivity in Dendritic Cells

In Keun Jang, M.A., Jeong Eun Choi, Ph.D., Young Jin Kim, M.D., Jin Soon Hwang, M.D.¹,
Sung Hwan Kim, M.D.¹ and Jun Eun Park, M.D.¹

Biomedical Research Institute, LifeCord Inc., ¹Department of Pediatrics,
Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Purpose: Most of neuroblastoma (NB) patients present with advanced disease, and the survival of patients with advanced stage disease remains poor, despite of aggressive therapy such as high dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. It is necessary to control of minimal residual disease in NB patients in order to reduce relapse rate. Dendritic cells (DC) are crucial for induction of antitumor immunity. Recent studies suggest that tumors avoid immune surveillance by inhibiting DC function. We investigated the effect of NB cells about maturation and/or function of dendritic cells using peripheral blood monocytes as dendritic cell source. **Methods:** DCs were generated in the presence of GM-CSF (granulocyte and macrophage colony-stimulating factor) and IL (interleukin)-4 from peripheral blood of healthy donors. DCs were exposed to human some kinds of NB cells or NB lysate. And the maturation of DC was induced by adding TNF (tumor necrosis factor)- α , IL-1 β , IL-6 and prostaglandin E2 for 2 days. DCs were analyzed by flow cytometry and mixed lymphocyte reactions. **Results:** DCs exposed to NB cells didn't upregulate the expression of CD83, HLA-DR, CD80 and CD86, and DCs exposed to NB lysate didn't upregulate the expression of CD83 and HLA-DR. DCs exposed to NB cells and NB lysate inhibited the proliferation of allogenic T cells in mixed lymphocyte reactions. **Conclusion:** NB cells induced impaired maturation and immune function of DCs. These findings have significant implications for DC-based immunotherapy in the treatment NB and suggested that it was necessary to develop a new method of priming antigen to dendritic cells at NB immunotherapy. (*Korean J Pediatr Hematol Oncol* 2005;12:47~54)

Key Words: Dendritic cell, Neuroblastoma, Immunotherapy, Maturation

책임저자 : 박준은, 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5, 아주대학교 의과대학 소아과학교실, 442-721

Tel: 031-219-5168, Fax: 031-219-5169, E-mail: pedpje@ajou.ac.kr

이 연구는 2003년도 아주대학교 신진교수연구 지원에 의해 수행되었음.

서 론

신경모세포종은 신경능선의 교감신경절 및 부신에서 기원하는 소아의 가장 흔한 고형종양 중의 하나로서 환자의 대부분이 3, 4기에 발견되고 항암요법, 외과적 수술, 방사선 치료, 고용량 화학요법 및 자가조혈모세포이식 등의 적극적인 치료 후에도 미세잔존암으로 인해 재발률이 높다^{1,2)}. 수지상세포는 초기 면역반응을 유도하는 강력한 항원 표지 세포로 항원을 감작한 후 T 세포를 통해 특이 면역과 자연살세포를 통해 비특이 면역을 활성화시킨다^{3,4)}. 이러한 능력은 항암면역치료에서 있어서 매우 유용한 것으로 여러 종양을 대상으로 임상시험이 진행 중에 있다⁵⁻⁷⁾. 본 연구는 신경모세포종 환자의 미세잔존암의 제거를 위해 수지상세포를 이용한 면역치료의 일환으로서 시작하였다. 그러나 최근에 신경모세포종이 수지상세포의 성숙화를 억제하며 면역세포의 능력을 떨어뜨리는 면역회피기전을 일으킨다는 보고들⁸⁻¹¹⁾이 나타나고 있어서 이에 대한 연구 및 이를 극복할 수 있는 기초적인 연구가 필요하다.

저자들은 말초혈액의 단구를 이용하여 수지상세포로 분화하고, 항원으로서 신경모세포종 세포 및 종양분쇄물들이 수지상세포의 성숙화 과정 및 면역능력에 어떠한 영향을 미치는지를 연구하고자 하였다.

대상 및 방법

1) 신경모세포종

신경모세포종 세포주로서 SK-N-MC와 IMR32를 한국세포주은행으로부터 배양받아 사용하였으며 2 mM/L L-glutamine (Gibco-BRL, NY, USA), 100 IU/mL penicillin (Gibco-BRL), 100µg/mL streptomycin (Gibco-BRL), 10% 우태아혈청(Gibco-BRL)이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco-BRL)을 기본배지로 사용하였다. 또한 환자 보호자 동의를 받아 환자로부터 얻은

동결된 신경모세포종 조직을 실험에 사용하였다.

2) 말초혈액으로부터 수지상세포의 분화

말초혈액은 건강한 성인으로부터 동의를 받고 채혈하여 Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077; Sigma, MO, USA)을 이용하여 단핵구 층을 분리하였다. 단핵구를 모아 CD14 단일클론 항체를 이용하여 고 구배 면역 자장 분리법(high gradient immunomagnetic separation, MidiMACS, Miltenyi biotech, CA, USA)을 이용해서 분리된 CD14 양성 세포를 DMEM 배지에 10% 우태아혈청, 2 mM/L L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin 첨가한 기본배지에 100 ng/mL GM-CSF (LG chemical, Seoul, Korea)와 20 ng/mL IL-4 (Endogen, Woburn, USA)를 넣어 5일간 배양하여 미성숙 수지상세포로 배양하였다. 3일마다 배양배지를 바꾸어 주었다. 성숙수지상세포를 만들기 위해서 10 ng/mL TNF-α (Becton Dickinson, CA, USA), 1,000 U/mL IL-6 (Becton Dickinson), 10 ng/mL IL-1β (Becton Dickinson), 1µg/mL prostaglandin E₂ (Sigma)를 기본배지에 넣어 사용하였다.

3) 신경모세포종 세포 및 종양분쇄물과 수지상세포의 혼합배양

1×10⁶개의 미성숙 수지상세포를 동량의 신경모세포종 세포와 25 T 플라스크(Nalge Nunc, IL, USA)에서 24시간 동안 혼합 배양 후 10 ng/mL TNF-α, 1000 U/mL IL-6, 10 ng/mL IL-1β, 1µg/mL prostaglandin E₂를 첨가하여 2일간 배양하여 성숙 수지상세포로 분화시켰다. 대조군은 신경모세포종 없이 이들 사이토카인만으로 성숙 수지상세포로 분화하였다. 종양분쇄물을 만들기 위해 신경모세포종 세포들을 모아 얼리고 녹이는 것을 반복하여 종양 분쇄물을 만들어 미성숙 수지상세포와 24시간 동안 배양한 후 사이토카인을 넣어서 성숙수지상세포로 분화하였다. 또한 동결시킨 환자의 종양조직을 직접 분쇄하여 실험하였다.

4) 유세포분석

유세포분석기(FACScan, Becton-Dickinson)을 이용하여 이들 수지상세포의 표현형을 확인하였다. 유세포분석을 위해 수지상세포를 FITC (fluorescein isothiocyanate)나 PE (phycoerythrin)가 결합된 CD40 (Becton Dickinson), CD80 (Becton Dickinson), CD83 (Becton Dickinson), CD86 (Becton Dickinson), HLA-DR (Becton Dickinson)에 대한 단일클론항체로 4°C에서 15분간 반응시키고 DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline; HyClone, UT, USA)로 세척 후 유세포분석기로 확인하였다. 또한 미성숙 수지상세포의 항원 탐식작용(phagocytosis)을 확인하기 위하여 거대 분자량을 갖는 FITC가 표지된 dextran (Sigma)을 수상돌기 세포와 혼합 배양하여 유세포분석기로 분석하여 세포 내로 탐식된 dextran을 측정하였다. 이때 대조군으로 4°C에서 배양 후 실험하여 비 특이적 결합의 차단효과를 확인하였다.

5) 동종 T 세포 증식 반응

T 림프구의 자극 능력을 알아보기 위해 동종 T 세포와 혼합백혈구반응(mixed lymphocyte reaction)을 시행하였다. 정상인의 혈액에서 칼럼(human T cell enrichment column, R & D, MN, USA)을 이용해서 T 림프구를 분리하여 반응세포(responder cell)로 사용하고, 표적세포(effector cell)는 감마선으로 조사한 성숙수지상세포를 사용했다.

수지상세포와 T-세포를 일정 비율로 넣고 96 well plate (Nalge Nunc)에 넣은 후 3일간 37°C에서 배양 한 후 20 μ L의 BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)를 넣은 후 24시간 더 배양하였다. 고정액을 넣어 30분간 상온에서 기다린 후 플레이트에 100 μ L의 anti-BrdU 용액을 넣고 실온에서 90분간 반응시킨다. DPBS로 세척한 후 발색 기질을 넣어 30분간 반응시킨다. 1 N의 H₂SO₄로 반응을 정지시킨 후 ELISA 측정기(Molecular device, USA)로 450 nm의 파장에서 측정하였다.

결 과

1) 수지상세포의 관찰

분리된 CD14 양성세포에 GM-CSF와 IL-4를 처리하여 5일간 배양한 결과, 미성숙수지상세포를 얻을 수 있었다(Fig. 1A). 이것은 CD40과 MHC class II (HLA-DR)이 99.8%와 99.4%로 각각 높게 나타났고, costimulatory molecule인 CD80과 CD86의 발현이 12.7%, 30.9%로 나타났으며, 성숙수지상세포의 표현형인 CD83은 2.6%로 거의 나타나지 않았고 항원섭취능이 있는 전형적인 미성숙수지상세포임을 확인하였다(Fig. 2). TNF- α , IL-6, IL-1 β , prostaglandin E₂를 처리하여 성숙수지상세포를 배양하였을 때 크기가 크고 다수의 긴 세포질 돌기를 가지면서 부착되지 않고 배지에 떠있는 전형적인 수지상세포 모습을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 또한 이러한 세포를 cytopsin을 이용

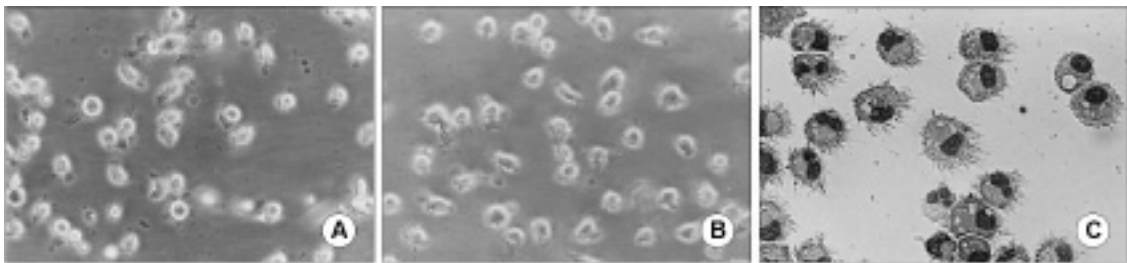


Fig. 1. Morphologic characteristics of *in vitro* generated dendritic cells from peripheral blood CD14⁺ cells. Immature dendritic cells (A) and mature dendritic cells (B, C) morphology under the phase contrast microscope (A, B: $\times 200$) and with Wright stain (C: $\times 400$).

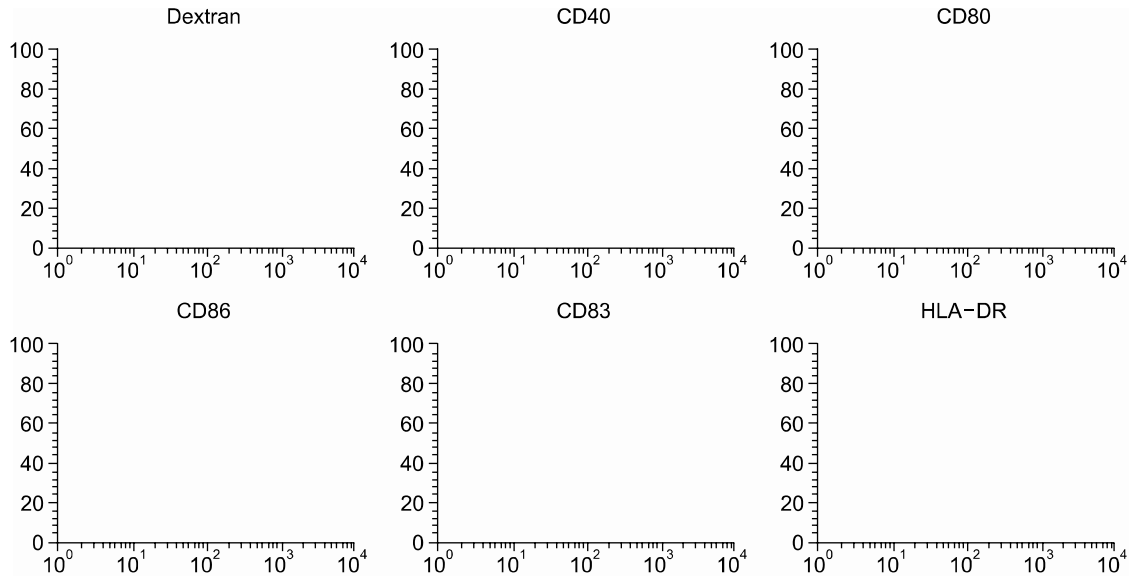


Fig. 2. Phagocytic activity and immunophenotypes of immature dendritic cells at 5th day of differentiation.

하여 슬라이드에 부착시킨 후 Wright 염색하여 돌기가 있는 성숙한 수지상세포의 모습을 확인하였다(Fig. 1C).

2) 신경모세포종 세포와 수지상세포의 혼합배양

미성숙수지상세포와 서로 다른 2가지(IMR32와 SK-N-MC 세포주) 신경모세포종 세포들을 24시간 동안 혼합배양한 후 사이토카인들을 넣고 성숙수지상세포로 배양하였다. 신경모세포종 세포와 배양하지 않은 대조군에 비하여 CD40은 거의 변화가 없었고, CD80, CD86, HLA-DR와 성숙수지상세포의 표지인자인 CD83은 많이 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). IMR32와 SK-N-MC의 세포들이 모두 같은 양상으로 감소하였다.

3) 신경모세포종 세포 및 동결된 신경모세포종 조직의 분쇄물과 수지상세포의 혼합배양

IMR32와 SK-N-MC의 세포들과 신경모세포종 환자로부터 적출한 동결 신경모세포종 조직을 분쇄한 것을 미성숙수지상세포와 24시간 배양한 후 사이토카인들을 넣어 성숙수지상세포로 배양하고 세포표현형의 변화를 확인하였다. 신경모세포종

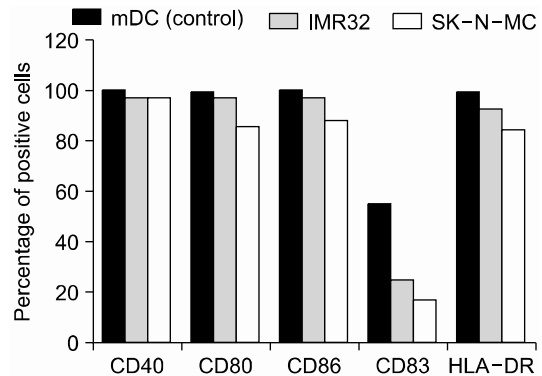


Fig. 3. Immunophenotypes of mature dendritic cells cultured with or without neuroblastoma cells.

세포와 배양하지 않고 사이토카인만으로 배양된 대조군에 비하여 CD83과 HLA-DR의 표현형이 감소한 결과를 나타내었으나 CD80과 CD86 표현형의 변화는 거의 없었다(Fig. 4).

4) T 세포 증식 반응

수지상세포의 가장 중요한 기능인 T 세포 자극 능력의 변화를 확인하였다. 신경모세포종 세포와 혼합배양한 것이나 신경모세포종 분쇄물과 혼합

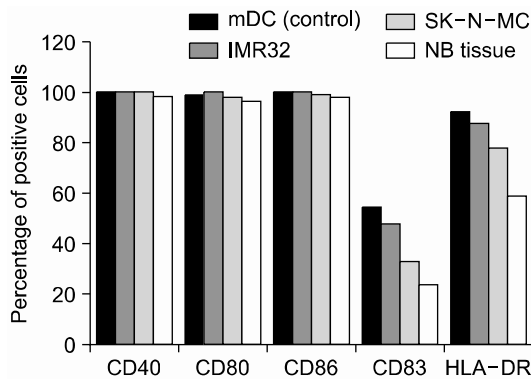


Fig. 4. Immunophenotypes of mature dendritic cells cultured with or without neuroblastoma tumor lysates.

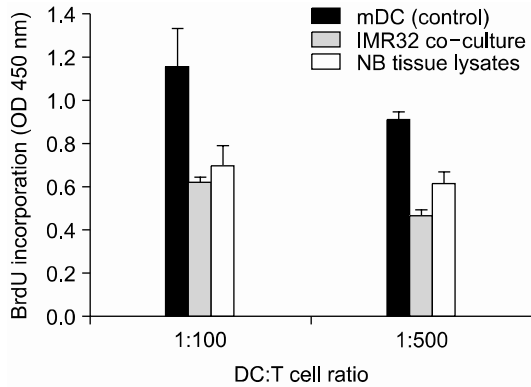


Fig. 5. Mature DCs (control), DCs exposed to NB cells and NB lysate were compared for their capacity to stimulate proliferation of allogeneic T cells in mixed lymphocyte reaction assays.

배양한 것이 사이토카인만으로 배양한 대조군에 비해 훨씬 T 세포 자극능력이 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

고찰

최근 고위험군 신경모세포종 환자를 치료하기 위해 고용량항암요법 및 조혈모세포이식을 하여 치료율이 많이 향상되었으나 치료 후 미세잔존암으로 인해 재발률이 여전히 높다¹⁾. 이를 극복하기 위하여 면역요법 및 분화제 투여하는 시도가 실시되고 있는 가운데 최근 소아의 난치성 고품종

양의 치료 및 구제요법으로 등장하고 있는 것이 수지상세포를 이용한 면역요법이다^{6,7)}.

수지상세포는 항암 면역반응에 중추적인 역할을 수행하는데 생체 내에서 가장 강력한 항원제시세포로 알려져 있다⁴⁾. 수지상세포는 항원 특이 T 세포에게 항원을 제시할 뿐만 아니라 휴지기의 T 세포를 증식하고 분화시켜서 종양특이 항암면역을 유도한다^{4,11)}. 이러한 특성으로 인해 수지상세포는 특정한 항원에 대한 종양 백신의 역할을 함으로 종양을 면역학적으로 치료하는데 있어서 가능성이 있는 세포로 주목 받고 있고, 현재 임상적으로 많은 종양 면역치료를 시도되고 있다. 현재 진행 중인 종양 면역치료에서는 주로 성인질병인 악성흑색종양(malignant melanoma), 전립선암(prostate cancer), 신장암(renal cell carcinoma), 직장암(colorectal cancer)에 대해서 연구^{5,12)}가 이루어지고 있으나 소아암에 대해서는 아직 연구가 미진한 상태이다.

수지상세포를 이용한 면역치료에 있어서 CD34 양성세포^{13,14)}와 CD14 양성세포¹⁵⁻¹⁷⁾를 사용하는 데, CD34 양성세포를 사용하는 경우에는 재료의 획득에 어려움이 있고, 배양 기간이 상대적으로 길어 그 만큼 비용도 많이 든다는 단점이 있다¹⁸⁾. CD14 양성세포는 GM-CSF와 IL-4 존재 하에 미성숙수지상세포로 분화되고 TNF- α , IL-6, IL-1 β , prostaglandin E₂ 존재 하에 성숙수지상세포로 분화되어 높은 순도의 수지상세포를 얻을 수 있어 최근에 미수지상세포를 성숙화 하는 방법으로 사용되고 있다^{12,19)}. 본 연구에서도 CD14 양성의 단구세포에 이들 네 가지 사이토카인으로 성숙화시키는 방법을 이용하였다.

수지상세포가 종양을 제거하도록 유도하기 위해서 수지상세포에 감작시킬 종양항원을 선택하는 것이 중요하다. 일반적으로 알려진 종양항원의 경우 펩타이드를 이용하면 되지만, 대부분 경우 종양 특이 펩타이드가 알려져 있지 않아 종양 분쇄물을 사용하여 종양 특이 수지상세포를 유도하고 있다^{6,12)}. 신경모세포종도 수지상세포를 감작시킬 만한 특이 항원이 없기 때문에 종양 분쇄물

을 이용하고 있다.

최근에 신경모세포종 세포주로부터 얻은 세포들을 직접 수지상세포와 직접 접촉시킨 상태에서 배양을 시키면 성숙화를 억제한다는 보고들이 있다⁸⁻¹⁰. 물론 난소암이나 췌장암 같은 종양들이 IL (interleukin)-10, TGF- β 또는 VEGF와 같은 물질들을 분비함으로써 면역회피하는 기전으로서 작용한다는 것은 이미 알려진 사실이다. 그러나 수지상세포는 이들과는 다르게 수지상세포와 직접 접촉을 통해서 이루어진다는 사실이다. 뿐만 아니라 신경모세포종 세포와 접촉한 수지상세포는 T 세포 분열반응을 충분히 일으키지 못하며 수지상세포의 자연사멸(apoptosis)을 유도한다고 한다. Shurin 등²⁰은 CD34양성 조혈전구세포로부터 유래된 수지상세포가 신경모세포종 세포에서 생산되는 ganglioside, 특히 GD2에 의해서 수지상세포형성(dendritogenesis)을 억제하며 결국은 종양특이 면역능력을 떨어뜨린다고 했다. Wolfi 등¹⁰은 단구로부터 유래된 수지상세포는 Ganglioside 중에서도 GM2에 의해서 수지상세포의 발달과 기능이 억제된다고 하였다. 이런 결과들은 신경모세포종 관련 항원들을 인지하는 특이 T 세포가 있는데도 불구하고 종양이 발생하는 종양회피 기전의 하나로 제시되었다^{8,11,20}. 그러나 이러한 결과들은 단순히 신경모세포종의 면역회피 기전만을 설명하는 의미만 있는 것은 아닐 수 있다. 신경모세포종의 치료로서 수지상세포로 면역반응을 유도하려고 할 때 수지상세포의 성숙화를 억제하고 결국은 면역능력을 억제하는 결과를 가져올 수 있기 때문이다. 본 연구는 여러 신경모세포종 세포주유래의 세포들에서도 면역억제의 결과를 나타내며 또한 신경모세포종의 종양분쇄물을 항원으로서 사용하고자 할 때에도 이런 결과가 나오는 것을 알고자 하였다. 본 연구에서는 신경모세포종 세포와 혼합 배양한 수지상세포는 대조군으로 설정된 사이토카인만 처리한 성숙수지상세포에 비해 CD83과 HLA-DR의 발현이 감소하였고 CD86과 CD80도 감소하였다(Fig. 3). 성숙화 인자인 CD83의 감소와 성숙한 수지상세포에서 증가되어

최대로 발현하는 HLA-DR의 감소는 신경모세포종 세포가 수지상세포의 성숙화를 대조군보다 억제하는 경향이 있음을 나타낸다. 이는 대표적인 신경모세포의 세포주인 IMR32과 SK-N-MC 세포주 모두에서 동일한 결과를 보였다. 이러한 결과들은 신경모세포종의 면역회피기전에서 이미 설명한 것과 같은 결과를 나타낸다. 본 연구에서는 특히 앞으로 실제로 종양백신이나 신경모세포종의 면역치료에 사용할 수 있으며 이미 몇몇 보고에서는 이미 사용한 바 있는 신경모세포종 분쇄물을 사용해서 시험을 하였다. IMR32 세포주와 SK-N-MC 세포주를 배양시킨 세포들의 종양분쇄물과 얼려놓았던 환자의 신경모세포종 추출물로 종양분쇄물을 만들 것을 수지상세포와 혼합배양하였을 때는 CD86과 CD80의 변화는 큰 차이가 없었고 CD83과 HLA-DR의 발현만 감소하였다(Fig. 4). 이는 세포주의 종양분쇄물이나 환자의 얼린 종양조직의 종양분쇄물들이 모두 정도의 차이는 있으나 대조군에 비해서 수지상세포의 성숙화를 억제한다는 것을 알 수 있다. 동종 T 세포를 이용한 T세포증식능력검사도 신경모세포종 세포나 종양분쇄물과 혼합 배양한 것의 능력이 대조군보다 감소되어 있었으므로 종양특이 T세포의 기능도 감소되어 있음을 알 수 있었다.

본 연구를 통해서 신경모세포종 환자에게 수지상세포를 이용한 면역치료를 시행하기 위해서는 직접적인 신경모세포종 세포주를 이용하거나 환자의 신경모세포종의 종양분쇄물을 이용할 때 성숙화 과정이 억제되며 수지상세포의 기능이 충분히 활성화시킬 수 없다는 사실을 알 수 있다. 이런 이유 때문에 신경모세포종을 이용하여 면역치료를 시도한 연구에서 아직 두드러질 만한 연구 결과가 있지 못한 것 같다^{6,7}. 그러므로 향후 이런 면역기능을 떨어뜨리지 않은 항원을 찾거나 수지상세포의 성숙화를 억제하는 물질을 제거하는 등 향후 이를 극복할 다양한 방법에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

목적: 소아의 고위험군 신경모세포종은 고용량 항암요법 및 조혈모세포이식 치료법에도 불구하고 여전히 재발률이 높은 병으로서 치료 후에 미세잔존암을 제거하고자 하는 목적으로 수지상세포를 이용한 암세포에 대한 특이 면역을 유도하고자 하는 시도들이 있다. 그러나 최근 여러 보고에 의하면 신경모세포 자체가 오히려 수지상세포의 성숙화를 억제하며 인체 내에서 면역회피 기전을 일으킬 수 있다는 보고들이 있다. 본 연구는 신경모세포종 세포 및 종양분쇄물이 수지상세포의 성숙화 및 면역능력에 미치는 영향을 밝혀서 향후 수지상세포를 이용한 면역치료에 도움을 주고자 하였다.

방법: 건강한 성인 말초혈 단핵구세포로부터 CD14 양성세포를 분리하여 GM-CSF와 IL-4를 넣고 5일간 배양하여 미성숙수지상세포로 분화한 것을 유세포분석기를 이용하여 확인하였다. 첫 번째 실험에서는 미성숙수지상세포와 2가지(IMR32와 SK-N-MC 세포주)의 신경모세포종 세포와 혼합배양한 후 사이토카인들(TNF- α , IL-6, IL-1 β , prostaglandin E₂)을 넣어 배양하였고, 두 번째 실험에서는 미성숙수지상세포와 2가지의 신경모세포종 세포들의 분쇄물 및 환자로부터 적출한 열려둔 신경모세포종 조직 분쇄물을 배양 후 사이토카인들과 배양하였고, 미성숙 수지상세포에 사이토카인만 처리하여 배양한 것을 대조군으로 하여 서로의 수지상세포로의 분화 및 성숙도를 세포표현형의 변화를 관찰하였으며 T 세포의 증식능력검사도 실시하였다.

결과: 신경모세포종 세포와 혼합 배양한 수지상세포는 사이토카인만 처리한 성숙수지상세포에 비해 CD83과 HLA-DR의 발현이 감소하였고 CD86과 CD80도 감소하였다. 신경모세포종 및 종양조직 분쇄물과 혼합 배양한 수지상세포는 CD83과 HLA-DR의 발현이 감소하였다. T 세포증식능력검사도 신경모세포종 세포나 종양분쇄물과 혼합 배양한

것의 능력이 대조군보다 감소되어 있었다.

결론: 미성숙수지상세포에 신경모세포종 세포를 감작시키는 것은 오히려 면역치료에 사용하고 자 하는 수지상세포의 면역능력을 떨어뜨리고, 신경모세포종 분쇄물로 감작시키는 것도 수지상세포의 성숙화를 감소시킨다. 그러므로 신경모세포종 세포를 항원으로 감작시켜 종양특이 면역을 가진 수지상세포를 얻고자 할 때, 기존과는 다른 새로운 방법의 항원의 감작 및 성숙화방법의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Ryu KH, Ahn HS, Koo HH, Kook H, Kim MK, Kim HK, et al. Autologous stem cell transplantation for the treatment of neuroblastoma in Korea. *J Korean Med Sci* 2003;18:242-7
2. Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H, Ohnuma N, Yamamoto K, Kawa K, et al. Intensified chemotherapy increases the survival rates in patients with stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:613-21
3. Steinman RM. The dendritic cells system and its role in immunogenicity. *Ann Rev Immunol* 1991;9:271-96
4. Pedro LV, Esther CJ, Eddy AW, Martien LK, Pawel K. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environment instruction. *J Immunol* 2000;164:4507-12
5. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004;10:475-80
6. Geiger JD, Hutchinson RJ, Honhenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JE, et al. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 2001;61:8513-19
7. Geiger J, Hutchinson R, Hohenkirk L. Treatment of solid tumors in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells. *Lancet* 2000;356:1163-5
8. Chen X, Doffek K, Sugg SL, Shilyansky J. Neuroblastoma cells inhibit the immunostimulatory function of dendritic cells. *J Pediatr Surg* 2003;38:901-5
9. Redlinger RE Jr, Mailliard RB, Barksdale EM Jr. Advanced neuroblastoma impairs dendritic cell function in adoptive immunotherapy. *J Pediatr Surg* 2003; 38:857-62

10. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:1269-76
11. Wolf M, Batten WY, Posovszky C, Bernhard H, Berthold F. Gangliosides inhibits the development from monocytes to dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2002;130:441-8
12. Holtl L, Zelle-Rieser C, Gander H, Papesh C, Ramoner R, Bartsch G, et al. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:3369-76
13. Ratta M, Rondelli D, Fortuna A, Curti A, Fogli M, Fagnoni F, et al. Generation and functional characterization of human dendritic cells derived from CD34+ cells mobilized into peripheral blood: comparison with bone marrow CD34+ cells. *Br J Haematol* 1998;101:756-65
14. Ohishi K, Katayama N, Mitani H, Araki H, Masuya M, Suzuki H, et al. Efficient ex vivo generation of human dendritic cells from mobilized CD34+ peripheral blood progenitors. *Int J Hematol* 2001;74:287-96
15. 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 alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-18
16. Kiertscher SM, Roth MD. Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 1996;59:108-18
17. Yoo KH, Kim DH, Kim SY, Sung KW, Koo HH. Generation of mature dendritic cells from peripheral blood. *Korean J Pediatr Hematol-Oncol* 2001;8:305-13
18. Romani H, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83-93
19. Lee AW, Truong T, Bickham K, Fonteneau JF, Larsson M, Da Silva I, et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 2002;19 suppl: A8-A22
20. Shurin GV, Shurin MR, Bykovskaia S, Shogan J, Lotze MT, Barksale EM. Neuroblastoma-derived ganglioside inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res* 2001;61:363-9