Journal of Bacteriology and Virology 2014. Vol. 44, No. 3 p.236 – 243
http://dx.doi.org/10.4167/jbv.2014.44.3.236

Review Article

Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin (BCG) and BCG-based Vaccines Against Tuberculosis

Seung Bin Cha and Sung Jae Shin*

Department of Microbiology, Institute for Immunology and Immunological Diseases, Brain Korea 21 PLUS Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Tuberculosis (TB) is the second leading infectious cause of mortality worldwide with about two million deaths per year. The only licensed TB vaccine, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) shows limited protection efficacy suggesting an improved vaccination strategy is required. Recently, several TB vaccine candidates have entered clinical trials. These vaccine candidates are live mycobacterial vaccines designed to replace BCG or subunit vaccines designed to boost immunity induced by BCG. Vaccines with different strategy such as therapeutic vaccines, which can also be used in combination with drug therapy, are in the early stages of development to resolve latent TB or reactivation from the latent state. In this review, we discuss about development of BCG and BCG-based vaccines and further studies necessary for novel TB vaccine development to sterilize tuberculosis.

Key Words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin, BCG-based vaccine

INTRODUCTION

결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)의 감염에 의한 만성 감염성 질환으로 인류 역사상 가장 많은 생명을 앗아간 감염성 질환이다. 결핵균은 감염되어 숙주의 큰포식세포(macrophage) 내에서 증식하며, 숙주의 면역반응에 큰 역할을 하는 세포의 자가사멸(apoptosis)을 억제시키며 숙주세포 내에서 생존하게 된다 (1).

결핵의 예방을 위하여 국내뿐만 아니라 여러 나라에서 신생아에게 우형 결핵균(*Mycobacterium bovis*)을 약하게 만든 Bacille Calmette-Guerin (BCG)를 접종하고 있으나, 이의 예방효과는 0~80%로 개체 차가 심하고 성인에게는 거의 효과가 없는 것으로 보고되고 있다 (2, 3). 또한, 긴 투약치료 기간과 이에 따른 다재내성 및 광범위내성 결핵균의 출현으로 인하여 결핵을 예방하는 백신 개발의 중요성이 점점 부각되고 있다.

최근 결핵백신의 개발 방향은 크게 세 가지로 다음과 같이 나눠볼 수 있다. 첫째, 첫 면역접종(priming vaccination)으로 현재 사용되고 있는 BCG를 대신할 수 있는 재조합 BCG (rBCG) 또는 유전자 재조합을 통해 약독화된 MTB를 사용하는 방법이다. 둘째, BCG를 priming vaccination 후 특정항원을 viral-vector나 면역증강제(adjuvant)를 이용하여 반복접종(boosting injection) 하는 방법으로, 우리나라에서처럼 신생아 때 BCG를 접종하는 경우에 적용하기 수월한 장점이 있다. 마지막으로 면역치료

Received: July 2, 2014/ Revised: July 7, 2014/ Accepted: July 8, 2014
*Corresponding author: Sung Jae Shin. Department of Microbiology and Institute of Immunology and Immunological Diseases, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea.
Phone: +82-2-2228-1813, Fax: +82-2-392-9310, e-mail: sjshin@yuhs.ac
**This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of science, ICT & Future Planning (NRF-2013R1A2A1A01009932).
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/license/by-nc/3.0/).

(Immunotherapeutics)적 방법인데 이는 *Mycobacterium* 속의 다른 종의 균체나 MTB의 fragment를 이용하여 결핵이나 잠복결핵에 대한 항생제 치료의 기간을 단축시키고 재활성화(reactivation)를 막는 방법이다 (4). 이 외에도 결핵의 치료를 위해 면역을 증강시킬 수 있는 렙틴(leptin) pathway를 이용하거나, 염증매개 반응을 조절할 수 있는 peptidylarginine deiminase (PAD) 억제제 등 면역 조절인자를 이용한 방법들도 소개되고 있다 (5, 6).

본 종설에서는 현재까지도 결핵에 대한 유일한 백신으로 널리 사용되고 있는 BCG, 그리고 이 BCG를 기반으로 한 priming-boosting 결핵백신의 연구 동향에 대해 알아보고 향후 결핵백신의 연구 방향에 대하여 논하고자 한다.

1. BCG (Bacille Calmette-Guerin) 백신

BCG 백신은 우형 결핵균(*Mycobacterium bovis*)에서 유래한 것으로, 프랑스 파스퇴르 연구소의 Calmette와 Guérin이 *Mycobacterium bovis*를 1908년부터 1920년까지 총 231회의 계대 배양을 통하여 병원성이 약독화된 균주이다 (7). 근래 유전자 분석을 통하여 MTB와는 달리 BCG에서는 6 kDa early secretory antigenic target (ESAT-6), 10-kDa culture filtrate protein (CFP-10) 등 주요 면역원성 및 병원성 인자를 분비하는 기능을 하는 RD1 (region of difference) 부분이 결손되어 약독화된 것으로 확인되었으며, 인위적으로 MTB에서 RD1을 결손시켰을 때에도 병원성이 약화됨을 관찰할 수 있었다 (8). 프랑스의 파스퇴르 연구소에서 1921년 처음으로 만들어진 BCG는 이 RD1이 결손되어 약독화된 균주이지만 1924년도부터 여러 나라로 분양되어 배양되면서부터 RD1 이외에도 RD2, RD14, RD16 등이 추가로 결손되거나, 순차 중복(tandem duplication)되는 유전자 배열인 DU1, DU2를 갖는 등 병원성 인자에 약간의 차이를 보이는 여러 BCG 균주가 파생되기 시작하였다 (9).

앞서 서술하였듯이 BCG의 예방효능은 지역 및 연령대에 따라 다양한 편차(0~80%)를 보이고 있는데, 영유아 및 소아에서의 결핵성 뇌막염(tuberculous meningitis)이나 속립성 결핵(miliary tuberculosis)과 같은 치명적인 결핵에 대해서는 예방효과가 높은 것으로 평가되고 있으나 성인에 대해서는 거의 효과가 없는 것으로 알려져 있다 (3). WHO에서는 그 원인으로 BCG strain의 다양성, 인종 및 지역별 인간의 개체간의 면역학적 차이, 다른 비결핵 항산균(Nontuberculous mycobacteria)의 감염에 의한 면역간섭(immune disturbance), 기생충 감염에 의한 우세한 Th2 면역반응의 유도, 태양 자외선에 의한 BCG의 변성 등을 이유로 제시하였다 (10).

이렇듯 BCG 백신은 아직까지 결핵의 예방에 사용되는 유일한 백신이면서 어느 정도의 효과는 나타내고 있지만, 사용된 지 수십 년이 지난 지금에도 결핵이 전 세계적으로 문제를 일으키고 있는 점으로 미루어보아 BCG 백신의 예방효능을 능가하는 새로운 결핵백신의 개발이 필요하다.

2. BCG를 기반으로 하는(BCG-based) 백신

1) 재조합 priming 백신

현재 사용되고 있는 BCG 백신은 어린이에게서는 어느 정도의 효과를 보이고 있으나, HIV (Human Immunodeficiency Virus)에 노출된 경험이 있는 어린이에서는 파종성 BCG 감염증(Disseminated BCG disease)을 일으킬 수 있는 가능성이 보고되었다 (11). 이처럼 전반적으로 면역능이 저하된 환자 군에서는 이미 약독화 되어 백신으로 사용되고 있는 BCG도 치명적일 수 있기 때문에, BCG의 일부 유전자를 조작하여 병원성은 줄이고 면역원성은 향상시킬 수 있는 개량된 재조합 priming 백신 개발에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 현재까지 진행 중인 재조합 priming 백신에 대한 연구는 다음과 같다(Table 1).

VPM1002은 독일의 막스프랑크 감염증 연구소(Max Planck Institute for Infection Biology)의 연구팀에 의해 개발된 백신으로, 유전자 재조합을 통하여 listeriolysin (LLO)을 발현하는 *Listeria monocytogen* 균 유래 유전자인 *hly* 유전자를 BCG에 삽입하고, urease C를 발현하는 *ureC* 유전자를 제거한 rBCG 백신이다. Urease C의 결손으로 인하여 LLO가 작용하기 적합한 phagosome 내의 산성 pH가 형성되며, LLO의 작용으로 phagosome에 구멍이 뚫리게 되어 세포질 내로 rBCG 유래 항원의 유입과 숙주세포의 자가사멸을 촉진시킨다. 이로 인하여 세포 내의 항원을 인식하는 MHC class I과의 결합이 증가하게 되고 CD8 T 세포를 더욱 활성화 시키게 된다. Phagosome 내에 남아있던 일부 항원들은 원래대로 MHC class II에 제시되어 CD4 T 세포를 활성화 시키며, apoptosis로 생성된 apoptotic vesicle 등은 근처의 수지상세포(dendritic cell)에 의해 탐식되어 교차 제시(cross presentation)되어 CD4와 CD8 T 세포 면역반응을 더욱 더 활성화 시키게 된다. 이

Table 1. Live mycobacterial vaccines designed to replace a BCG prime

Agent	Description	Status	References
VPM1002	rBCG strain expressing listeriolysin and carries a urease deletion mutation to promote phagosome lysis for better antigen presentation	Phase IIa ongoing	12~14
MTBVAC	Live attenuated MTB by deletion of global regulator *phoP* and phthiocerol dimycocerosates (DIMs) -biosynthetic gene *fadD26* without antibiotic resistance markers	Phase I ongoing	15~18
rBCG30	rBCG Tice strain overexpressing 30 kDa MTB antigen 85B for enhanced immunogenicity	Phase I completed	19, 20
Aeras422	Recombinant BCG expressing mutated PfoA and overexpressing antigens 85A, 85B, and Rv3407 to promote phagosome lysis for better antigen presentation	Phase I terminated	22
BCG zmp1	BCG zmp 1 deletion mutant to promote phagosome maturation for better antigen presentation	Preclinical	23
HG856-BCG	rBCG overexpressing chimeric ESAT-6/Ag85A DNA fusion protein	Preclinical	24
paBCG	BCG with reduced activity of anti-apoptotic microbial enzymes including SodA, GlnA1, thioredoxin, and thioredoxin reductase	Preclinical	25
rBCG38	rBCG Tice strain overexpressing the 38kDa protein, a phosphate transporter belonging to the super family of ABC transporters	Preclinical	26
IKEPLUS	Live *M. smegmatis* with deletion of ESX-3 encoding locus and complementation with MTB locus	Preclinical	27
mc^26435	Live attenuated MTB by deletion of genes critical for replication (*panCD* and *leuCD*) and immune evasion (*secA2*), with simian immunodeficiency virus Gag expression plasmid	Preclinical	28

는 전임상시험 및 임상 1상시험을 통해 BCG보다 우수한 안전성과 면역원성을 입증하였고 현재 임상 2상시험이 진행 중이다 (12~14).

MTBVAC은 BCG가 아닌 임상에서 분리된 MTB 균주를 유전자 재조합을 통해 약독화시켜 만든 백신 후보주이다. 이 백신 후보주는 약독화를 위해 MTB의 세포막을 구성하는 trehalose 유래 지질(lipid)의 생합성 및 병원성 인자인 ESAT-6의 분비를 조절하는 유전자인 *phoP* 유전자를 결손시키고 (15, 16), 숙주세포로의 침입을 촉진시키며 phagosome의 acidification을 방지하여 숙주세포 내에서의 생존에 관여하는 MTB의 주요 병원성 인자인 phthiocerol dimycocerosates (DIM)을 발현하는 *fadD26* 유전자를 결손시켰다 (17). 전임상시험 결과 이는 BCG보다 더 우수한 효과를 보였으며 현재 MTB 유래의 재조합 백신 후보주로는 최초로 임상 1상시험 중에 있다 (18).

rBCG30은 기존 BCG에서는 적은 양만 발현하고 있는 MTB의 주요 분비 단백질인 30 kDa Ag85B (mycolyl transferase)를 과발현 시킨 백신 후보주로 기니픽을 이용한 동물실험에서 BCG보다 더 우수한 효과를 보였고 (19), 임상 1상시험도 완료되어 그 안전성을 입증하였으나, 현재 더 이상의 개발은 진행되고 있지 않다 (20, 21).

Aeras 422는 Ag85B 외에도 Ag85A, Rv3407 항원을 과발현 시켰으며 추가로 perfringolysin (pfo)를 발현시킨 백신 후보주이다 (22). Pfo는 앞서 기술한 VPM1002에 사용된 LLO와 유사한 기능을 하지만 LLO와 달리 세포질에서 분해되는 기능이 없어 숙주세포에 손상을 입힐 수 있기 때문에 임상 1상시험에서 중단되었다 (21).

이 밖에도 숙주세포 내에서 phagosome maturation을 지연시키는 역할을 하는 zinc metalloprotease (Zmp-1)를 결손시켜 항원제시 효과를 향상시킨 백신 후보주인 Δ*zmp1* BCG (23), 대표적인 MTB의 항원인 ESAT-6/Ag85A 키메라 DNA fusion 단백질을 과발현시킨 HG856-BCG (24), 숙주세포의 면역회피 기작의 일종으로 큰포식세포의 산화작용에 대응하여 항산화 물질을 분비하는 기능을 하는 SigH와 SodA를 결손시켜 약독화시킨 백신 후보주인 paBCG (25), 면역반응 유도에 관여하는 주요 단백 항원인 PstS1을 발현시킨 백신 후보주인 rBCG38 (26), 병원성이 없는 mycobacterium인 *M. smegmatis*를 기반으로 ESAT-6 유사 단백질을 분비하며 iron uptake에 관여하는 기능을 하는 ESX3을 MTB의 ESX3으로 교체한 백신 후보주인

Table 2. Subunit vaccines designed to boost immune response induced by a BCG prime

Agent	Type	Description	Status	References
MVA85A/ AERAS-485	Viral vector	Modified vaccinia vector expressing MTB antigen 85A	Phase IIb ongoing	30
Crucell Ad35/ AERAS-402	Viral vector	Replication-deficient adenovirus 35 vector expressing MTB antigens 85A, 85B, TB10.4	Phase IIb ongoing	31
Ad5Ag85A	Viral vector	Replication-deficient adenovirus 5 vector expressing MTB antigen 85A	Phase I completed	31
M72 + AS01E	Adjuvanted subunit	Recombinant protein composed of a fusion of MTB antigens Rv1196 and Rv0125 & adjuvant AS01	Phase IIb	32
Hybrid 1 + IC31	Adjuvanted subunit	Adjuvanted recombinant protein composed of MTB antigens 85B and ESAT-6	Phase IIa	33
Hybrid 1 + CAF01	Adjuvanted subunit	Adjuvanted recombinant protein composed of MTB antigens 85B and ESAT-6	Phase I	34
Hybrid 56 + IC31	Adjuvanted subunit	Adjuvanted recombinant protein composed of MTB antigens 85B, ESAT-6 and Rv2660	Phase IIa	35
Hybrid 4 + IC31/AERAS-404	Adjuvanted subunit	Adjuvanted recombinant protein composed of a fusion of MTB antigens 85B and TB10.4	Phase IIa	35
ID93 + GLA-SE	Adjuvanted subunit	Subunit fusion protein composed of 4 MTB antigens, Mtb proteins associated with virulence (Rv2608, Rv3619, and Rv3620) or latency (Rv1813)	Phase I	37

IKEPLUS (27) 등이 동물모델에서 BCG보다 더 나은 효과가 있음이 밝혀졌다. 또한, HIV-TB에 대한 다가백신의 전략으로 MTB의 증식 및 숙주세포의 immune evasion에 필수적 유전자인 *leuCD*, *panCD*, *secA2*를 제거하고 simian immunodeficiency virus (SIV)의 *gag* 유전자를 발현시킨 재조합 MTB 백신 후보주는 SIV에 감염된 영장류에서도 그 안전성이 입증되었고 현재 면역원성을 확인하기 위한 연구가 진행 중에 있다 (28).

2) Subunit boosting 백신

현재까지도 국내를 포함한 여러 나라에서 BCG를 필수예방접종으로 지정하여 신생아 때 접종하고 있기 때문에 면역원성이 뛰어난 단백질 항원(subunit)과 바이러스 vector, 면역증강제(adjuvant)의 조합을 이용한 boosting을 통해 BCG로 priming된 면역반응을 개선시키고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다. 현재 진행중인 subunit boosting 백신에 관한 연구는 다음과 같다(Table 2). 단백질 항원으로는 주로 Ag85A, Ag85B, ESAT-6, TB10.4, Rv1196, RV0125 등 병원성이 있는 MTB에서 발현하는 단백질을 항원으로 사용하며 (21), 바이러스 vector로는 vaccinia virus, adenovirus를 이용한 백신 후보주가 임상시험 중에 있고 최근에는 lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)도 개발 중에 있다 (29). 면역증강제(adjuvant)로는 IDRI (Infectious Disease Research Institute)에서 개발된 toll-like receptor (TLR)-4에 작용하는 GLA-SE를 비롯하여, TLR-9에 작용하는 IC-31, TLR-4에 작용하는 AS01E, 그리고 항원의 방출을 지연시키는 liposome 성분의 CAF01 등을 사용한 연구가 진행되고 있다.

MVA85A/AERAS-485는 Modified Vaccinia Ankara (MVA) virus vector에 MTB의 주요 항원인 Ag85A를 발현시킨 백신 후보주로, 결핵백신으로는 BCG 이후 최초로 2009년에 임상시험을 실시하였다. 이 시험은 백신 후보주에 대한 안전성과 효능을 평가하는 임상 2상시험 이었으며 BCG 접종을 받았던 4~6개월령의 영아를 대상으로 실시하였으나, 시험 결과 안전성에는 문제가 없었지만 그 효능에서는 음성 대조군과 별 차이를 나타내지 않았다 (30). 하지만, BCG 접종을 받았던 영아에서보다 성인에서 Ag85A에 대한 면역반응이 더 강하게 일어남이 관찰되었고 (4), 성인에서의 효능이 있을 가능성이 제시됨에 따라 HIV에 감염된 성인 및 유아를 대상으로 현재 임상 2상시험 중에 있다.

Ad5Ag85A와 Crucell Ad35/AERAS-402는 증식능이 결여된 Adenovirus verctor에 각각 Ag85A 그리고 Ag85A, Ag85B, TB10.4를 발현시킨 백신 후보주이다. Ad5Ag85A는 Adenovirus type 5 (Ad5)를 vector로 사용하였으나 Ad5는 사람 사이에서 유병률이 높아서 이에 대한 중화항체가 이미 생성되어 있기 때문에 Ad5 vector에 의한 효과가 감소될 수도 있다 (31). 이를 보완하기 위해 Ad5 대신 비교적 유병률이 낮은 Adenovirus type 35 (Ad35)로 교체하고 항원도 Ag85B, TB10.4를 추가로 발현시킨 백신 후보주가 Crucell Ad35/AERAS-402 이며 현재 임상 2상시험이 진행 중에 있다 (4).

면역증강제를 이용한 백신 후보주인 M72 + AS01E는 MTB의 항원인 MTB32A (Rv0125)와 MTB39A (Rv1196)를 융합하여 만든 항원 M72를 AS01E adjuvant와 조합하여 사용하였고, 임상시험 결과 안정성과 적당한 T 세포 면역반응을 보여 현재 임상 2상시험이 진행 중에 있다 (32).

Hybrid 1 (H1), Hybrid 4 (H4), Hybrid 56 (H56) 단백 항원은 각각 TLR-9에 작용하는 adjuvant인 IC31과 조합되어 현재 임상 2상시험 중에 있다. H1은 Ag85B와 ESAT-6을 결합한 단백 항원으로 IC31과 조합하여 사용할 경우 유의적인 면역반응을 보였으며 (33), 추가로 H1을 다른 adjuvant인 CAF01와 조합하여 동물실험을 통해 그 효과를 확인하였고 현재 임상 1상시험도 진행 중이다 (34). H4는 H1을 구성하는 항원 중 하나인 ESAT-6이 IGRA (Interferon gamma release assay)와 같은 결핵 진단에 사용되기 때문에 교차반응을 일으킬 수 있다는 점에 착안하여 이를 TB10.4 항원으로 대체한 단백 항원이다. H4도 역시 IC31과 조합하여 현재 임상시험이 진행 중이다 (21, 35). H56은 H1에 추가로 최근 발견된 휴면기(dormancy)의 MTB에서 발현하는 단백질인 Rv2660을 추가로 결합시킨 단백 항원으로 동물실험을 통해 효과가 더 오래 지속됨을 확인하였으며 (36), 현재 임상시험 중에 있다. ID93은 MTB의 병원성에 관여하는 Rv2608, Rv3619, Rv3620과 잠복기에서 발현하는 단백질인 Rv1813, 총 4개의 항원을 결합하고 면역증강제인 GLA-SE와 조합하여 전임상시험에서 유의적인 효과를 보였다 (37). 특히 이 백신 후보주는 동물실험에서 항생제 치료와 병행하였을 경우 그 치료기간을 단축시키는 효과도 보였으며, 현재 임상 1상시험 중에 있다.

이 밖에도 BCG에서 자연적으로 메틸화(methylated)된 heparin-binding hemagglutinin (HBHA)을 항원으로 이용하여 prime 또는 boosting 백신으로 개발 중인 백신 후보주 (38), 그리고 MTB를 열악한 조건에서 배양하여 단편화된 백신 후보주인 RUTI도 동물실험에서 그 효능을 확인하는 등 최근 들어서도 여러 가지 백신 후보주에 대한 연구가 진행되고 있다 (39).

CONCLUSIONS

BCG 백신은 비교적 안전하고 사람에게 사용 시 부작용이 적은 편이지만, 결국 생체 내에서 MTB의 life cycle을 모방하여 숙주의 면역반응을 유도하는 생백신이다. BCG가 큰포식세포와 같은 항원제시세포(Antigen Presenting Cell, APC) 내로 들어가면 phagosome을 형성하고 이는 곧 lysosome과 합쳐져서 분해되어 항원 펩타이드(peptide)를 내놓게 된다. BCG의 항원 펩타이드는 MIIC compartment이라 명명된 late endosomal compartment에서 MHC class II와 결합하며 CD4 T 세포에 항원을 제시하기 위하여 세포막으로 이동하며, 또한 세포질로 빠져나간 BCG에서 분비된 단백질 항원들은 MHC class I을 통해 제시되어 CD8 T 세포를 활성화 시킴으로써 숙주의 면역반응을 유도하게 된다 (40). 이처럼, BCG 백신 접종을 통해 숙주의 CD4와 CD8 T 세포 면역반응을 모두 유도하여 백신으로서의 기능을 하게 된다. 하지만, BCG도 약독화가 되긴 했지만 live 백신이기 때문에 MTB에서처럼 lysosome과의 결합을 억제하거나 phagosome 내의 pH를 조절하여 항원 단백질의 분해를 억제하여 T 세포에 제시되는 항원을 줄여 숙주의 면역반응으로부터 회피할 수 있는 기능을 가지고 있다. 이것은 백신으로서 BCG의 효능이 떨어지는 원인이 될 수 있다 (40). 또한, 단백질 항원 이외에도 BCG에서 유래된 지질성분도 마우스에서 MHC class II의 발현을 억제하는 작용을 하는 것으로 밝혀졌으며 이도 역시 BCG의 효능 저하와 연관이 있다 (41). 이와 같이 강력한 면역반응을 일으키는 새로운 항원을 찾는 것도 중요하지만, 현재 사용되고 있는 BCG 백신의 개량을 통해 숙주면역세포로의 항원 제시 능력을 증가시킬 수 있는 연구도 필요하다.

앞서 소개한 subunit boosting 백신은 주로 vector나 면역증강제를 이용하여 특정 MTB의 항원에 의하여 숙주에서 강력한 T 세포 매개성 면역반응을 유도하여 MTB 증식의 억제를 통해 감염이나 이로 인한 발병을 예방하는 면역학적 원리를 바탕에 두고 있다. 하지만 가장 최근

에 임상 2상시험을 마친 MVA85A의 결과에서 나타났듯이, 백신을 접종한 실험군에서만 interferon-γ (IFN-γ), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-2 (IL-2)를 동시에 분비하는 Ag85A 항원 특이 multifunctional CD4 T 세포들이 검출되었음에도 불구하고 이들의 질병에 대한 방어효과가 없었다 (30). 그리고 현재 진행되고 있는 새로운 결핵백신에 대한 여러 임상시험이나 전임상시험들도 이와 유사한 면역학적 원리를 이용하고 있기 때문에, 방어를 유도하는 면역학적 또는 생물학적 지표(biomarker)를 발굴하기 위한 연구가 필요하다고 사료된다. 만약 결핵 감염의 여러 단계, 즉 결핵균에 노출(exposure)에서 감염(infection), 진행성 감염(progressive infection)과 잠복 감염(latent infection), 그리고 질병(active disease)을 유발하게 되거나 잠복 감염에서 재활성화(reactivation)되어 유발된 질병 및 방어(protection) 등을 구별할 수 있는 특이한 biomarker를 발굴하게 된다면 막대한 시간과 비용이 소요되는 임상시험으로 넘어가는 후보주의 범위를 줄일 수 있을 것이다.

이러한 강력한 T 세포 매개성 면역반응을 유도하는 백신은 역설적으로 사람에서 결핵의 전파에 영향을 미칠 수 있는데, 이는 T 세포 매개성 면역반응이 폐조직의 파괴와 폐조직 내에서 결핵균이 퍼져나가는 것을 촉진하는 공동화(cavitation)를 이루기 때문이다 (42). 이에 따라 최근에는 결핵균이 퍼지는 것을 감소시켜 개체간의 전파(transmission)를 차단하고, 만약 감염이 되었을 경우라도 초기에 숙주의 면역반응을 강화시켜 폐조직으로의 유입을 억제하는 전략을 기반으로 하는 백신 개발의 필요성도 제시되고 있지만 (42, 43), 이러한 연구를 하기 위해서는 새로운 동물모델 개발이 필요한 실정이다. 현재까지 동물모델로 널리 쓰이고 있는 마우스는 다루기 쉽고 값이 저렴하며 연구에 필요한 시약 등이 많이 개발되어 있는 장점을 가지고 있지만 사람의 결핵감염과 유사한 괴사성 육아종(necrotic granuloma) 형성이 잘 나타나지 않는다는 단점을 가지고 있다 (44). 결핵에 감염된 사람에서 형성되는 육아종(granuloma)은 치즈괴사(caseous necrosis)를 동반하는 특징이 있으며, 경우에 따라서는 치즈괴사 병변이 확대됨에 따라 액화괴사(liquefaction necrosis) 및 석회화(calcification)가 수반되고, 이 병변에는 경우에 따라 10^7~10^9개의 결핵균이 증식하고 있어 사람간의 전파에 중요한 역할을 하며, 항생제 치료를 지연되게 하는 주요 원인이 된다 (44, 45). 그러나 마우스에서는 결핵에 감염됨에 따라 T 세포 매개성 면역반응을 보이며 이에 따라 폐조직에서 염증세포의 침윤(infiltration)이 일어나는 육아종 모양의 병변은 관찰되지만, 결핵의 대표적인 병변인 치즈괴사 병변은 매우 드물게 나타나며 개체간의 전파가 일어나지도 않기 때문에 결핵의 전파를 연구하기 위해서는 새로운 동물모델 개발이 필요한 실정이다 (44).

결핵의 전파를 차단하는 백신 전략 외에도 감염 후 치료를 목표로 하거나 항생제와 병행사용 하여 항생제 투약기간을 단축하는 전략의 백신을 개발하기 위한 연구도 많이 진행되고 있으며, 이를 위해서는 앞서 기술한 BCG 기반의 백신들과 같이 면역반응을 이용해 결핵균을 단지 억제만 하는 것이 아닌 살균할 수 있는 면역반응(sterilizing immunity)에 관한 연구가 필요하다고 사료된다. 현재까지 결핵에 의한 면역반응의 지표로 널리 사용되고 있는 IFN-γ를 분비하는 CD4 T 세포는 분명 숙주에서 결핵균의 증식에 영향을 미치지만 백신접종에 의한 방어효과와의 상관관계는 밝혀지지 않고 있으며, 또한 폐결핵 환자의 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononucleated cell, PBMC)를 MTB의 항원으로 자극하면 IFN-γ가 아닌 Interferon-γ-inducible protein (IP-10 or CXCL10)이 증가한다는 연구 결과도 있다 (46). 이에 따라 CD4 T 세포와 더불어 iNKT 세포(invariant natural killer T cell), CD1 restricted T 세포, MAIT T 세포(mucosal-associated invariant T cell), γδ T 세포 등 다른 그룹의 T 세포들과 TNF, GM-CSF, IL-1β, vitamin C, D 등 큰포식세포를 활성화시킬 수 있는 인자들이 사람에서 결핵의 방어에 어떻게 관여하는 지를 종합적으로 분석해야 할 필요성이 제시되고 있다 (47).

이처럼 BCG를 개량하여 효과를 개선시킨 백신과 BCG를 기반으로 한 subunit 백신 이외에도 여러 다른 전략을 기반으로 하는 백신을 개발하려는 노력이 많이 이루어지고 있지만, 사람의 생체 내에서 일어나는 전반적인 방어면역에 대한 이해와 결핵의 감염 시기에 따른 biomarker의 개발, 적합한 동물모델의 개발 등도 결핵의 퇴치를 앞당길 수 있는 중요한 밑바탕이 될 것이다.

REFERENCES

1) Song CH. Cell Death and Bacterial Infection. J Bacteriol Virol 2013;43:85-91.
2) Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet 1995;346:1339-45.
3) Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E,

Fineberg HV, *et al*. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. JAMA 1994;271:698-702.

4) Frick M. The tuberculosis vaccines pipeline. TAG Pipeline Report. 2013. p. 263-83.
5) Song JH, Shin SJ, Kim JS. Leptin: A Multifunctional Role as an Immunomodulator in Mycobacterial Lung Disease. J Bacteriol Virol 2013;43:1-8.
6) Jang B, Shin SJ. Peptidylarginine Deiminase and Citrullination: Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Diseases. J Bacteriol Virol 2013;43:159-67.
7) Calmette A. Preventive vaccination against tuberculosis with BCG. Proc R Soc Med 1931;24:1481-90.
8) Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, *et al*. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guérin attenuation. J Infect Dis 2003; 187:117-23.
9) Joung SM, Ryoo S. BCG vaccine in Korea. Clin Exp Vaccine Res 2013;2:83-91.
10) Fine PEM, Carneiro IAM, Milstein JB, Clements CJ. "Chapter 8: Reasons for variable efficacy". Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999. p. 18-20.
11) Hesseling AC, Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Fine PE, Godfrey-Faussett P, *et al*. The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children. Vaccine 2007;25:14-8.
12) Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Nasser Eddine A, *et al*. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. J Clin Invest 2005;115:2472-9.
13) Desel C, Dorhoi A, Bandermann S, Grode L, Eisele B, Kaufmann SH. Recombinant BCG *ΔureC hly*+ induces superior protection over parental BCG by stimulating a balanced combination of type 1 and type 17 cytokine responses. J Infect Dis 2011;204:1573-84.
14) Grode L, Ganoza CA, Brohm C, Weiner J 3rd, Eisele B, Kaufmann SH. Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. Vaccine 2013;31:1340-8.
15) Gonzalo Asensio J, Maia C, Ferrer NL, Barilone N, Laval F, Soto CY, *et al*. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 2006;281: 1313-6.
16) Frigui W, Bottai D, Majlessi L, Monot M, Josselin E, Brodin P, *et al*. Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. PLoS Pathog 2008;4:e33.
17) Astarie-Dequeker C, Le Guyader L, Malaga W, Seaphanh FK, Chalut C, Lopez A, *et al*. Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. PLoS Pathog 2009;5:e1000289.
18) Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Uranga S, Puentes E, *et al*. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. Vaccine 2013; 31:4867-73.
19) Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:13853-8.
20) Hoft DF, Blazevic A, Abate G, Hanekom WA, Kaplan G, Soler JH, *et al*. A new recombinant bacille Calmette-Guérin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. J Infect Dis 2008;198:1491-501.
21) Kaufmann SH. Tuberculosis vaccine development: strength lies in tenacity. Trends Immunol 2012;33:373-9.
22) Sun R, Skeiky YA, Izzo A, Dheenadhayalan V, Imam Z, Penn E, *et al*. Novel recombinant BCG expressing perfringolysin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. Vaccine 2009;27: 4412-23.
23) Johansen P, Fettelschoss A, Amstutz B, Selchow P, Waeckerle-Men Y, Keller P, *et al*. Relief from Zmp1-mediated arrest of phagosome maturation is associated with facilitated presentation and enhanced immunogenicity of mycobacterial antigens. Clin Vaccine Immunol 2011;18:907-13.
24) Li Z, Howard A, Kelley C, Delogu G, Collins F, Morris S. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. Infect Immun 1999;67:4780-6.
25) Shoen CM, DeStefano MS, Hager CC, Tham KT, Braunstein M, Allen AD, *et al*. A modified Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine with reduced activity of antioxidants and

glutamine synthetase exhibits enhanced protection of mice despite diminished *in vivo* persistence. Vaccines 2013;1:34-57.

26) Castañon-Arreola M, López-Vidal Y, Espitia-Pinzón C, Hernández-Pando R. A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2005;85:115-26.
27) Sweeney KA, Dao DN, Goldberg MF, Hsu T, Venkataswamy MM, Henao-Tamayo M, *et al*. A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med 2011;17:1261-8.
28) Jensen K, Ranganathan UD, Van Rompay KK, Canfield DR, Khan I, Ravindran R, *et al*. A recombinant attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine strain is safe in immunosuppressed simian immunodeficiency virus-infected infant macaques. Clin Vaccine Immunol 2012;19:1170-81.
29) Flatz L, Hegazy AN, Bergthaler A, Verschoor A, Claus C, Fernandez M, *et al*. Development of replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8+ T cell immunity. Nat Med 2010;16:339-45.
30) Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, *et al*. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. Lancet 2013;381:1021-8.
31) Kaufmann SH, Hussey G, Lambert PH. New vaccines for tuberculosis. Lancet 2010;375:2110-9.
32) Von Eschen K, Morrison R, Braun M, Ofori-Anyinam O, De Kock E, Pavithran P, *et al*. The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A: Tolerability and immunogenicity in humans. Hum Vaccin 2009;5:475-82.
33) van Dissel JT, Arend SM, Prins C, Bang P, Tingskov PN, Lingnau K, *et al*. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naïve human volunteers. Vaccine 2010;28:3571-81.
34) Holten-Andersen L, Doherty TM, Korsholm KS, Andersen P. Combination of the cationic surfactant dimethyl dioctadecyl ammonium bromide and synthetic mycobacterial cord factor as an efficient adjuvant for tuberculosis subunit vaccines. Infect Immun 2004;72:1608-17.
35) Dietrich J, Aagaard C, Leah R, Olsen AW, Stryhn A, Doherty TM, *et al*. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. J Immunol 2005;174:6332-9.
36) Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, Cardona PJ, Izzo A, Dolganov G, *et al*. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. Nat Med 2011;17:189-94.
37) Bertholet S, Ireton GC, Ordway DJ, Windish HP, Pine SO, Kahn M, *et al*. A defined tuberculosis vaccine candidate boosts BCG and protects against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Sci Transl Med 2010;2:53ra74.
38) Temmerman S, Pethe K, Parra M, Alonso S, Rouanet C, Pickett T, *et al*. Methylation-dependent T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin. Nat Med 2004;10:935-41.
39) Vilaplana C, Gil O, Cáceres N, Pinto S, Díaz J, Cardona PJ. Prophylactic effect of a therapeutic vaccine against TB based on fragments of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One 2011; 6:e20404.
40) Bakhru P, Sirisaengtaksin N, Soudani E, Mukherjee S, Khan A, Jagannath C. BCG vaccine mediated reduction in the MHC-II expression of macrophages and dendritic cells is reversed by activation of Toll-like receptors 7 and 9. Cell Immunol 2014; 287:53-61.
41) Fulton SA, Reba SM, Pai RK, Pennini M, Torres M, Harding CV, *et al*. Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by *Mycobacterium bovis* BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein. Infect Immun 2004;72:2101-10.
42) Delogu G, Manganelli R, Brennan MJ. Critical research concepts in tuberculosis vaccine development. Clin Microbiol Infect 2014;5:59-65.
43) Elkington PT. Tuberculosis: time for a new perspective? J Infect 2013;66:299-302.
44) Helke KL, Mankowski JL, Manabe YC. Animal models of cavitation in pulmonary tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2006;86:337-48.
45) Hiyama J, Marukawa M, Shiota Y, Ono T, Mashiba H. Factors influencing response to treatment of pulmonary tuberculosis. Acta Med Okayama 2000;54:139-45.
46) Lee JS, Lee JY, Choi HH, Son JW, Kim KH, Paik TH, *et al*. Elevated Levels of Interferon-inducible Protein-10 (IP)-10/ CXCL10, but not of Interferon-γ, in Patients with Pulmonary Tuberculosis. J Bacteriol Virol 2007;37:137-46.
47) Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. Nat Rev Microbiol 2014;12:289-99.