

사람 무산소 공생균 *Bacteroides ovatus*를 이용한 염증성 대장으로의 Xylan-조절 Keratinocyte Growth Factor-2의 전달

(Xylan-regulated Delivery of Human Keratinocyte Growth Factor-2 to the Inflamed Colon by the Human Anaerobic Commensal Bacterium *Bacteroides ovatus*. Gut 2010;59:461-469)

요약: 사람 증식인자(human growth factor)들은 위장관의 염증성 질환을 치유하는 능력을 갖고 있다. 그러나 이들을 구강으로 투여할 경우 위산, 단백분해효소 등으로 인해 약물 안정성이 낮아지고, 전신적으로 투여할 경우에는 원하지 않는 부위에 약물 부작용을 초래할 가능성이 높다. 이런 단점을 극복하기 위해 살아있는 미생물을 기반으로 한 약물전달체계(live microorganism-based delivery system)가 고안되었다. 이번 연구에서는 미생물 기반 약물전달체계로서 사람의 장내에 정상적으로 존재하는 공생균(commensal bacteria) *Bacteroides ovatus*를 이용하였다. 이 균 내부에 장 상피세포의 회복에 중요한 역할을 하는 keratinocyte growth factor (KGF)-2 생성 유전자를 삽입하였고, 이 유전자가 bacteroides xylanase promoter에 의해 조절되도록 하였다. 이번 논문은 이와 같은 유전자 조작 세균을 *B. ovatus* expressing human keratinocyte growth factor-2 (BO-KGF)라고 명명하였다. *In vitro* 실험 결과 0.05% xylan이 있으면 BO-KGF 세균이 KGF-2를 충분히 생성할 수 있었고, 장 상피세포 증식을 촉진시켰다. *In vivo* 실험에서 BO-KGF를 위관 투여한 후 (oral gavage) 30 mg/mL의 xylan이 포함된 음식을 섭취한 마우스의 대장세척액에서 16 ng/mL 이상의 KGF-2가 측정되었다. 그런데 BO-KGF 균은 무산소 세균이므로 산소에 대해 취약성을 나타낼 것이다. 즉, 보통 대기 환경에 노출될 경우 *B. ovatus*의 50%가 24시간 후에 소실되고 96시간이 지나면 단지 5% 미만이 생존하였다. 또한 2×10^8 colony-forming unit (CFU)의 BO-KGF 균을 위관 투여한 24시간 후 대변에 많은 수의 균이 관찰되었지만 48시간이 지나면 균이 발견되지 않았다. 따라서 치료 후에 환자로부터 유전자 조작 세균이 부주의하게 방출될 가능성은 낮고 보통 환경에서도 생존가능성이 낮다는 점에서 본 유전자 변형 생물체의 생물안전성(biosafety)은 높을 것으로 보인다. 이와 같은 기초실험 후에 저자들은 dextran sodium sulfate (DSS)-마우스 장염 모델에서 BO-KGF 균의 치료 효과를 관찰하였다. 그 결과 BO-KGF 균을 xylan과 함께 투여하면 DSS에 의해 나타나는 각종 지표들(체중 감소, 질환 활동 지표의 증가, 대장 길이 감소 등)

이 현저하게 완화되었다. 그리고 병리생물학적 지표들[염증 세포 침윤, 상피세포 파괴, 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6) 분비]을 억제시켰을 뿐만 아니라, 장 상피세포의 증식과 술잔세포(goblet cell)의 수를 증가시켜 점막치유를 촉진시켰다. 이와 같은 효과는 dexamethasone(1일 투여 용량 3 μ g/g)을 투여한 마우스 모델의 치료효과와 유사하였다. 저자들은 이와 같은 치료모델뿐만 아니라 DSS-예방모델에서도 유전자 조작 BO-KGF 균의 효용성을 증명하였다.¹

해설: 장관 내 균 집단과 그 생태환경조건을 모두 포함하는 의미로 사용되고 있는 ‘장내미생물무리(gut microbiota)’가 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)의 병리기전에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀지고 있다.² 예를 들어 IBD 실험동물 모델을 이용한 많은 연구결과들은 장관 내 균집단에 영향을 받고 있음을 보여 주고 있다. 즉, 염증이 일어난 장관 구획으로부터 대변의 흐름을 탄 곳으로 돌릴 경우 그 염증이 감소된다. 장 내 미생물에 의한 IBD 발병기전 중의 하나로 장점막에서의 세균인지(bacterial recognition)와 처리(processing)에서의 손상과 장관장벽기능(intestinal barrier function)의 손상이 거론된다. 크론병에 대한 인체 연구결과 antimicrobial peptide인 α -defensin의 감소³와 탐식작용의 결함⁴이 보고되었다. 또한 유전적 위험 인자로 세균의 muramyl dipeptide의 수용체인 NOD2에 대한 다형성(polymorphism), 세균인지와 처리에 관여하는 ATG16L과 IRGM의 다형성이 보고되고 있다.⁵ 이외에도 장관벽 기능에 관여하는 단백질(hepatocyte nuclear factor-4, E-cadherin, laminin 등)의 유전자 다형성과 궤양성 대장염과의 관련성도 제시된다.⁶ 이와 같은 여러 연구들은 장관 내 세균이 점막으로 침투하여 부적절한 염증 반응을 유발하여 결국 IBD라는 질병으로 발전한다는 가설을 뒷받침한다고 할 수 있다. 이와 같은 관점에서 크론병 치료에 항균제 요법이 시행되고 있다.⁷

그렇지만 모든 장내 세균들이 해로운 것은 아니다. 예를 들어 공생균인 *Faecalibacterium prausnitzii*의 결핍이 IBD 환

자에서 관찰되고,⁸ 크론병 수술 시점에 회장 점막(ileal mucosa)에서의 *F. prausnitzii*의 수의 감소는 수술 6개월 후의 재발에 영향을 미친다.⁹ 숙주기능향상 미생물(probiotics)의 투여는 낭염(pouchitis)과 궤양성대장염의 재발을 효과적으로 방지한다고 알려져 있다. 이 치료 기전에 대해서는 아직까지 불분명하지만, probiotics가 장내미생물무리의 종간 균형을 변화시키고 생리활성물질(bacteriocin 등)을 생성하여 치료효과를 나타낼 가능성이 제시되고 있다.¹⁰ Probiotics의 대표적인 예로 *Lactobacillus rhamnosus*가 잘 알려져 있다. 이 세균은 p40와 p75라는 두 개의 단백을 생성하여 Akt, protein kinase C, 그리고 mitogen-activated protein kinase 경로를 활성화시킴으로써 장 상피세포의 apoptosis를 억제하고 장벽기능을 회복시킨다.¹¹ 그런데 probiotics가 치료효과를 나타내기 위해서는 많은 수의 균이 필요할 뿐만 아니라 체내의 각종 억제인자(위산, 단백분해효소 등)에 의해 투여한 균 수가 낮아지는 단점이 있다. 본 논문에서는 이를 극복하기 위해 장관 내에 정상적으로 존재하는 공생균을 이용해 치료효과를 나타내는 생리활성물질을 직접적으로 타깃 부위로 전달할 수 있는 방법을 제시하였다.

이번 연구에서 제안한 내용은 생리활성물질 KGF-2를 장관 점막상피세포층에 효과적으로 전달할 수 있는 국소적 미생물 기반 약물전달법(local microorganism-based delivery system)이다. 즉, 식물(주로 녹조류)에 포함된 다당체(polysaccharide)인 xylan만 존재한다면 BO-KGF 균이 KGF-2를 쉽게 생성할 수 있다. 또한 사람의 정상적인 공생균 중 무산소세균인 *B. ovatus*를 이용했다는 점에서 생물안전성을 높일 수 있다. 즉, *B. ovatus*가 무산소 환경에서만 증식하기 때문에 이 균은 장점막을 뒤덮고 있는 점액층(mucin layer)에 머물게 된다. 따라서 KGF-2가 생성되려면 외부에서 들어온 xylan이 있어야만 가능할 것이고, 생성된 KGF-2는 장상피세포의 꼭지면(apical surface)을 타깃으로 하게 된다.

이번 연구에서 이용한 KGF-2는 섬유모세포에서 유도되는 증식인자 계열(fibroblast growth factor family) 중의 하나이다. KGF-2를 치료물질로 선택한 이유는 KGF-2가 *in vitro*에서 포피세포(epidermal cell)의 증식을 유도하고, *in vivo*에서 상처 치유 도중 증가된다는 점에서 위장관 점막상피세포 회복에 대단히 중요한 역할을 할 것으로 보았기 때문이다. 또한 IBD 치료에 증식인자를 사용한 선례, 즉, 관장(enema)으로 투여한 EGF는 좌측의 궤양성대장염을 효과적으로 치료하였고,¹² basic fibroblast growth factor (bFGF)는 마우스 IBD 모델에서 효과를 나타내었다는¹³ 이전 연구결과를 참고한 것으로 보인다.

장점막 세포층의 파괴는 IBD 병리기전의 중요한 특징 중의 하나이다.¹⁴ 따라서 적절한 용량의 KGF-2 투여는 장점막 세포층 기능을 회복시켜 치료효과를 나타낼 것이다. 그렇지

만 Sandborn 등¹⁵이 활동성 궤양성대장염 환자 88명을 대상으로 KGF-2를 투여한 결과, 1-50 μ g/kg 용량에서는 치료효과가 관찰되지 않았다. 치료 실패 이유 중의 하나로 타깃 부위에 약리학적으로 적절한 농도의 약물이 노출되지 않은 것을 들고 있다. 이런 단점을 해결하는 방법으로 이번 연구에서는 국소적 미생물 기반 약물전달법을 제시하였다. 이 방법은 치료부위로 약물을 효과적으로 유도할 수 있다. 그리고 고농도의 증식인자를 전신적으로 투여할 때 나타나는 부작용을 극복할 수 있을 뿐만 아니라, 구강투여에서 노출되는 위산과 단백분해효소를 피해갈 수 있어서 약물의 안정성을 높이는 장점이 있다. 그렇지만 유전자 조작 미생물 치료법을 환자에게 적용할 경우 이식유전자(transgene)에 대한 두려움과 논란이 초래될 가능성이 높다. 따라서 유전자 조작 *B. ovatus*를 임상에서 사용하기 위해서는 앞으로 생물안전성에 대한 보다 깊은 연구와 홍보가 필요할 것으로 보인다. 이와 같은 관점에서 *B. ovatus* 기반 약물전달법은 향후 보다 안정적인 미생물에 생리활성물질 유전자를 결합하는 연구로 발전될 것으로 보인다.

(정리: 한양대학교 의과대학 미생물학교실 김정목)

참고문헌

- Hamady ZZ, Scott N, Farrar MD, et al. Xylan-regulated delivery of human keratinocyte growth factor-2 to the inflamed colon by the human anaerobic commensal bacterium *Bacteroides ovatus*. *Gut* 2010;59:461-469.
- Kim JM. Inflammatory bowel diseases and enteric microbiota. *Korean J Gastroenterol* 2010;55:4-18.
- Wehkamp J, Wang G, Kübler I, et al. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 2007;179:3109-3118.
- Palmer CD, Rahman FZ, Sewell GW, et al. Diminished macrophage apoptosis and reactive oxygen species generation after phorbol ester stimulation in Crohn's disease. *PLoS One* 2009;4:e7787.
- Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* 2010;16:90-97.
- UK IBD Genetics Consortium, Barrett JC, Lee JC, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet* 2009;41:1330-1334.
- Feller M, Huwiler K, Schoepfer A, Shang A, Furrer H, Egger M. Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease: systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials.

- Clin Infect Dis 2010;50:473-480.
8. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. Gut 2006;55:205-211.
9. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:16731-16736.
10. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of Lactobacillus salivarius UCC118. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:7617-7621.
11. Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. Gastroenterology 2007;132:562-575.
12. Sinha A, Nightingale J, West KP, Berlanga-Acosta J, Playford RJ. Epidermal growth factor enemas with oral mesalamine for mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis or proctitis. N Engl J Med 2003;349:350-357.
13. Matsuura M, Okazaki K, Nishio A, et al. Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis. Gastroenterology 2005;128:975-986.
14. Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, Meddings J. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. Gut 2009;58:41-48.
15. Sandborn WJ, Sands BE, Wolf DC, et al. Repifermin (keratinocyte growth factor-2) for the treatment of active ulcerative colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. Aliment Pharmacol Ther 2003;17:1355-1364.