

염증성 장질환의 예방과 치료를 위한 새로운 전략으로서 장내 *Foxp3⁺* 조절 Treg 세포 유도를 촉진할 수 있는 *Clostridium* 균무리 IV 및 XIVa

김정목

한양대학교 의과대학 미생물학교실

Clostridium Clusters IV and XIVa That Can Promote the Induction of *Foxp3⁺* Regulatory Treg Cells in Gut as a Novel Strategy to Prevent and Treat Inflammatory Bowel Diseases

Jung Mogg Kim

Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

Article: Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous *Clostridium* Species (Science 2011;331:337-341)

서 론

요약: Forkhead box P3 (*Foxp3*) 전사인자(transcription factor)를 발현하는 $CD4^+$ T 조절세포(regulatory T cell, *Foxp3⁺* Treg cell)는 면역계의 평형을 유지하는 데 중요한 역할을 한다. Atarashi 등¹은 Science에 발표한 논문에서 Treg 세포가 specific pathogen-free (SPF) 마우스에서 이유기(weaning) 이후 장의 고유층(lamina propria)에서 증가한 반면, 서혜부 림프절(inguinal lymph node)에서는 변화하지 않음을 보고하였다. 또한 Treg 세포수의 증가는 germ-free (GF) 또는 항생제를 처리한 마우스에서는 관찰되지 않았다. SPF 마우스에서 얻은 분변현탁액(fecal suspension)을 GF 마우스에 구강 투여하면 Treg 세포수가 정상으로 회복되었다. 저자들은 장내미생물무리(intestinal microbiota) 중 어떤 균들이 Treg 세포 유도에 관여하는지 연구하였다. 그 결과 장내미생물무리 중 아포(spore) 형성균인 *Clostridium* 속(genus)^o Treg 세포 증가를 촉진시킴을 관찰하였다. 이 역할

을 하는 *Clostridium* 균무리들은 46개의 균주(strain)로 구성되었고, 이들은 cluster IV (예, *C. leptum*)와 cluster XIVa (예, *C. coccoides*)에 속하는 균주들이었다. 한편 장내미생물무리에 속하는 *Lactobacillus*, segmented filamentous bacteria (SFB) 또는 *Bacteroides fragilis*는 *Clostridium*에 비해 Treg 세포 유도 기능이 낮았다. 또 다른 실험으로 cluster IV 와 XIVa에 속하는 46개의 *Clostridium* 균무리들을 혼합(*Clostridium* cocktail) 투여했더니, Treg 세포 분화를 촉진시킬 수 있는 transforming growth factor- β (TGF- β)와 indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)가 풍부한 환경이 조성되었다. *Clostridium* 균무리들의 효과를 알아보기 위해 *Clostridium*이 정착된 마우스(*Clostridium-associated mice*)의 분변현탁액을 2주 된 SPF 마우스(신생아 마우스)에 구강 투여한 뒤, 6주 후(성인으로 성장한 마우스) 장내미생물 조성과 Treg 세포수를 평가하였다. 그 결과 *Clostridium*을 투여한 그룹에서의 분변 *Clostridium* 총수는 투여하지 않은 그룹과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

교신저자: 김정목, 133-791, 서울시 성동구 행당동 17번지, 한양대학교 의과대학 미생물학교실

Correspondence to: Jung Mogg Kim, Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine, 17 Haengdang-dong, Sungdong-gu, Seoul 133-791, Korea.
Tel: +82-2-2290-0645, Fax: +82-2-2282-0645, E-mail: jungmogg@hanyang.ac.kr

Financial support: None. Conflict of interest: None.

*Clostridium*을 투여한 그룹에서는 cluster IV와 XIVa에 속하는 *Clostridium* 균무리의 수가 증가하였고, 장관내의 Foxp3⁺ Treg 세포수가 증가하였다. *Clostridium* cluster IV와 cluster XIVa가 풍부하게 정착한 마우스 모델에 dextran sodium sulfate를 처리하여 염증성장질환(inflammatory bowel disease, IBD)과 유사한 장염을 유발시켰다. 그 결과 신생아 때 *Clostridium* cocktail을 구강 투여한 성인마우스에서는 대조군에 비해 장염 증상이 현저하게 감소하였다. 이와 같은 연구결과들은 유익한 *Clostridium* 균무리 cocktail이 IBD 예방과 치료에 적용될 가능성을 제시해 준다고 할 수 있다.

해설: 사람의 장관은 10¹³-10¹⁴개의 장내미생물무리들이 정착하여 생존할 수 있는 환경을 제공한다. 이 미생물무리들은 1,000종 이상의 각기 다른 세균종(species)으로 구성되어 있다. 또한 숙주 장관 내에서 수백만 년 동안 공존하는 동안, 자신과 숙주 모두에게 이익을 가져올 수 있도록 진화하였다. 즉, 미생물무리들은 인체에 다양한 영양소들을 제공하고 음식물 소화에 관여할 뿐만 아니라 병원균 침입을 방지해준다. 또한 장상피세포의 성숙, 혈관신생, 장내면역계의 발달을 도와준다. 특히 장내면역계는 미생물무리와의 상호작용을 통하여 면역관용(immune tolerance)을 유도한다.^{2,3} 그러나 최근 이들 미생물무리들의 일부 혹은 특정 성분들이 관절염, 당뇨병, 비만, 다발성 경화증, IBD 등의 발병에 관여한다는 보고들이 발표되고 있다.⁴ 특히 *Clostridium*과 밀접한 관련이 있는 또 다른 아포형성 그람양성균인 SFB는 Th17 세포를 유도하여 IBD 증상 악화에 관여하기도 한다.^{5,6}

인체 내에서 면역억제 기능을 담당하는 Foxp3⁺ Treg 세포는 위장관, 특히 대장에 많이 존재한다.⁷ Treg 세포의 유도는 특정 장내 세균에 의해 영향을 받는다. 예를 들어 유산균을 처리한 마우스는 Treg 세포를 유도하여 염증반응을 완화시킨다.⁸ 또한 *B. fragilis*를 정착(colonization)시킨 마우스는 Treg 세포 분화와 interleukin (IL)-10 발현을 촉진한다.⁹ 따라서 장내미생물무리가 장점막 Treg 세포에 미치는 영향을 따라 특정 질병의 발현 혹은 완화에 관여할 가능성이 높다고 할 수 있다.

Atarashi 등¹이 Science에 발표한 논문에서 특정 미생물군이 존재할 때 장 고유총에서 Foxp3⁺ Treg 세포수가 증가하는 것을 제시하였다. 그람양성균의 제거를 위해 vancomycin을 처리한 쥐의 대장의 Treg 세포수를 낮추는 반면, 그람음성균 제거를 위해 colistin을 처리할 경우에는 Treg 세포수가 변화되지 않는다는 결과는 장관 내에서 Foxp3⁺ Treg 세포 유도에 그람양성균이 중요한 역할을 할 것이라는 점을 시사해 준다. 저자들은 그람양성균 중 어떤 종이 Treg 세포 유도에 관여하는지 연구를 더 진행시켰다. 이전에 맹장과 대장상부(proxi-

mal colon)에 서식하는 *Clostridium* cluster IV와 XIVa는 IBD 예방 등과 같은 장내 항상성 유지에 중요한 역할을 한다는 보고들이 발표된 바 있다.^{10,11} 이 기존 연구들을 기반으로 마우스 장내에 정상적으로 존재하는 그람양성균 중 아포를 형성하는 *Clostridium* 종들 중 cluster IV 와 XIVa가 Treg 세포 유도를 촉진함을 증명하였다. 한편 *Bacteroides* 종들을 혼합 투여해도 대장 내에서 Treg 세포 증가를 유도하지만, 그 증가 정도는 *Clostridium*보다는 낮았다.

저자들이 제시한 *Clostridium* cluster IV와 XIVa은 16S rRNA 유전자 분석을 통해 알아낸 계통학적 연구에 따라 균들을 분류한 것이다. 즉, *Clostridium* cluster IV는 *Facecalibacterium prausnitzii*, *C. methylpentosum*, *C. leptum* DSM 753T, *C. sporosphaeroides*, *C. cellulose*, *C. viride* DSM 6836과 기타 여러 종의 균주들로 구성되어 있다. 그리고 *Clostridium* cluster XIVa에는 *C. coccoides* 8F, *C. celiarecrescens* DSM 5628, *C. boltei* 16351, *C. oroticum*, *C. nexile* DSM1787, *C. scindens*과 기타 여러 종의 균주들이 속한다.¹

저자들은 *Clostridium* cluster IV와 XIVa가 Treg 세포를 유도하는 근본 기전을 찾기 위한 노력을 시도하였다. 그 결과 latent 형태의 TGF-β를 활성화 형태(active form)로 변환시킬 수 있는 matrix metalloproteinase 2 (MMP2), MMP9와 MMP13이 *Clostridium*이 정착된 마우스의 장상피세포에서 증가함을 관찰하였다. 또한 Treg 세포 유도에 관여하는 IDO 발현도 증가하였다. 이와 같은 일련의 결과들은 *Clostridium* cluster IV와 XIVa가 장상피세포를 자극하여 활성화된 TGF-β와 IDO의 생성을 증가시킴으로써 Treg 세포가 유도될 것이라는 가설을 가능케 해주고 있다(Fig. 1).

이 연구와 유사하게 프로바이오틱스(probiotics)인 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*을 혼합 투여하면 수지상세포 (dendritic cell)에서 TGF-β와 IDO 생성이 증가하고, 그 결과 Treg 세포가 유도된다는 보고가 있다.¹² 그런데 이 연구에서는 3종류의 *Lactobacillus* 균주를 투여해도 장에서 Treg 세포가 충분히 유도되지 않았다.¹ 그 대신 46종의 *Clostridium* 균무리에 의해 생성된 대사물질들의 다양한 세트가 Treg 세포의 완전한 유도를 위하여 필요할 것으로 보인다. 이와 같은 다양한 연구결과들은 장내미생물사회의 환경 때문으로 추정 할 수 있다. 즉, 장내공생균에서 만들어지는 특정 대사물질이 각각의 균에 작용하고, 그 결과 적절한 주위환경이 확립되어야 비로소 Treg 세포 유도를 촉진시킬 수 있는 조건이 될 수 있을 것이다.

이 연구에서 제시한 *Clostridium* 균무리들은 마우스의 맹장과 상부 대장(proximal colon)에 풍부하게 분포한다. 마우스의 상부 대장에는 점막주름(mucosal fold)이 있는데, 이 구

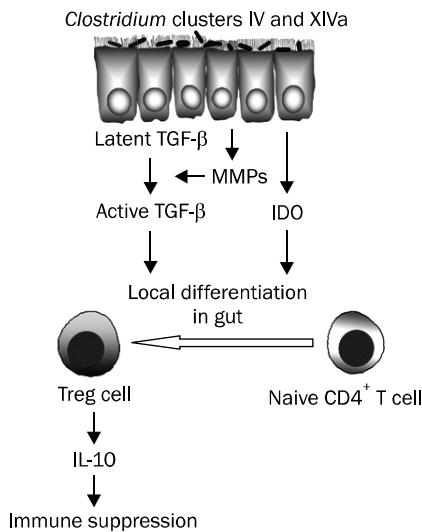


Fig. 1. Summary of the induction of regulatory T (Treg) cells through the interaction between indigenous *Clostridium* species (clusters IV and XIVa) and intestinal epithelial cells (IECs). After weaning, *Clostridium* species containing clusters IV and XIVa become prominent in the colon, where they form a thick layer on the IECs. *Clostridium* species enhance the production of matrix metalloproteinases (MMPs) from IECs to convert transforming growth factor (TGF)- β from the latent to the active form. In addition, *Clostridium* clusters IV and XIVa promote the production of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) from IECs. Naive CD4 $^+$ T cells stimulated with the active form of TGF- β and IDO are differentiated into Treg cells that produce interleukin (IL)-10, leading to suppression of inflammatory responses in the gut (modified from Fig. 2 in the article of Kunisawa and Kiyono [Cell Host Microbe 2011;9:83-84]).

조사 *Clostridium* 생존과 정착에 이용될 것으로 보인다.¹³ 이 연구에서 *Clostridium* 균무리들은 장상피세포 표면에 두꺼운 층을 형성하고 있지만, 이 관찰이 균이 장상피세포에 직접적으로 접촉하고 있는 것인지 확실하지 않다. 그 이유는 숙주가 장관 내 면역항상성을 유지하는 전략 중 하나로 장내미생물무리와 장상피세포와의 접촉을 최소화하고 있기 때문이다.² 이를 위해 숙주는 상피세포층, 점액, 항-미생물 단백, IgA 등과 같은 장벽(barrier)을 보유하고 있다. 즉, 술잔세포(goblet cell)에서 생성되는 점액소 당단백(mucin glycoprotein)은 끈적이는 젤과 유사한 층을 만들어 장내미생물무리가 직접적으로 장상피세포와 접촉하는 것을 제한한다. 또한 세균 세포막을 파괴함으로써 세균 숫자를 줄이는 항-미생물 단백에는 defensin, cathelicidin, C-type lectin 등이 있다. 이 연구에서 제시한 유익한 *Clostridium* 균무리들이 항-미생물 단백에 의해 파괴되지 않는 이유를 대장상피세포에 직접적으로 부착하지 않기 때문으로 추정하고 있다.¹³ 따라서 유익한 *Clostridium* 종에서 분비되는 어떤 대사물질들이 Treg 세포 유도와 IL-10 발현에 관여할 가능성이 높다. 앞으로 이 물질들이 밝혀질 경우 임상적 응용이 가능할 것으로 전망된다.

장내 선천면역계를 구성하는 미생물감지경로(microbial-sensing pathway)로 toll-like receptor (TLR), nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2, 그리고 dectin-1 경로가 대표적이다. 이 연구에서 *Clostridium* 균무리들이 장상피세포에서 Treg 세포 분화에 필수적인 TGF- β 분비를 촉진할 때, 이들 3가지 선천면역 미생물감지경로와는 독립적으로 작용하였다. *B. fragilis*의 polysaccharide A가 TLR2 경로를 통해 Treg 세포를 유도한다는 보고를 참고로 할 때,⁹ 장내미생물무리가 Treg 세포를 유도할 수 있는 방법은 매우 다양한 경로가 존재하는 것으로 추정된다.

장관내 Foxp3 $^+$ Treg 세포는 부분적으로 IL-10를 생성함으로써 면역억제 기능을 발휘한다.¹⁴ IL-10은 흉선(thymus) 내의 Treg 세포에서는 발현되지 않는다. 또한 흉선에서 Treg 세포(thymus-derived naturally occurring Treg cell, nTreg cell)가 유도될 때 장내미생물무리들을 요구하지 않는다.¹ 반면 대장 고유층에 분포하는 대다수의 Treg 세포는 IL-10을 분비할 수 있고, 장내 Treg 세포의 유도에는 특정 장내미생물무리들의 자극이 필요하다. 따라서 특별한 환경이 되면 장관내의 Treg 세포는 IL-10 분비를 촉진하여 면역억제 기능을 나타낼 것이다. 한편 저자들은 *Clostridium* cluster IV와 XIVa가 알레르기 증상을 완화시킴을 증명하였는데, 이것으로 볼 때 *Clostridium* 균무리 cocktail이 간, 비장, 폐 등에도 영향을 미치는 것으로 추정된다.¹ 따라서 특정 *Clostridium* 종에 의해 유도된 Foxp3 $^+$ Treg 세포에서 생성되는 IL-10은 장조직을 포함한 생체 내의 전반적인 면역항상성을 유지하기 위해 충분할 것으로 보인다. 이런 점에서 장관내 면역항상성 유지는 전신적인 질환 예방에 대단히 중요하다는 점을 시사해 주고 있다. 그러므로 장내미생물무리의 변화로 장관내 면역기능이 왜곡될 때 관절염, 당뇨병, 비만 등과 같은 장 이외의 질환 발생이 촉진될 가능성성이 높다.⁴

저자들은 46개의 균주로 구성된 *Clostridium* 균무리 cocktail이 치료목적의 프로바이오틱스로 이용될 수 있다는 가능성을 제시하였지만, 실제 임상에 적용하기에 앞서 해결해야 할 문제점들이 발견된다. 즉, 오늘날 장내미생물무리와 장관의 종양발생과의 연관성이 제시되고 있을 뿐만 아니라, IBD 환자는 장염 연관 대장암(colitis-associated colon cancer)으로 발전할 가능성이 더 높다.¹⁵ 또한 Treg 세포는 몇몇 장기에서 종양발생에 절대적인 역할을 하기도 한다. 이에 따라 항CD25항체(Treg 세포 표면항원에 대한 항체)를 이용하여 Foxp3 $^+$ Treg 세포를 고갈시켜 암치료에 이용하는 임상실험이 진행 중에 있다.^{16,17} 따라서 Treg 세포의 활성을 증강시키는 *Clostridium* 균무리를 이용한 치료는 조심스럽게 접근해야 할 것이다. 또한 인체 장관에는 저자들이 제시한 46종의

Clostridium 종보다 더 많은 수의 *Clostridium* 종이 서식하고 있다. 따라서 외부에서 특정 균무리를 투여하여 장내미생물무리의 조성이 변화될 경우 장내 감염에 민감해질 가능성도 있다.^{18,19} 예를 들어, *B. fragilis*는 마우스 CD4⁺ T 세포로부터 IL-10 분비를 촉진시키기도 하지만, 면역기능이 억제된 숙주(immunocompromised host)에서는 이 균이 조직을 침입하여 감염병을 유발시키기도 한다.¹³ 따라서 저자들이 제시한 *Clostridium* 균무리를 프로바이오틱스로 이용한다는 것은 대단히 매력적인 적용법이라고 할지라도, 이 균무리를 친염증성(pro-inflammatory) 혹은 항염증성(anti-inflammatory)으로 만들 수 있는 정확한 분자 기전 규명이 선행되어야 할 것이다. 이와 같은 미래의 연구들은 우리들에게 장내미생물무리가 정착되어 있는 장내 환경에서 면역계가 어떻게 면역항상성을 유지하면서 방어기능도 수행하도록 진화했는지에 대한 지식을 전달해 줄 것이다. 동시에 이런 지식들은 IBD와 같은 장질환을 예방하고 치료할 수 있는 새로운 전략으로 이어질 것으로 믿는다.

REFERENCES

- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011;331:337-341.
- Kim JM. Inflammatory bowel diseases and enteric microbiota. *Korean J Gastroenterol* 2010;55:4-18.
- Kang JS. Journal walk regarding the expanding role of microbiota in our gut. *J Bacteriol Virol* 2011;41:63-64.
- Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* 2010;10:735-744.
- Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009;31:677-689.
- Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009;139:485-498.
- Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, et al. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. *Immunity* 2008;29:637-649.
- Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 2005;174:3237-3246.
- Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:12204-12209.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13780-13785.
- Momose Y, Maruyama A, Iwasaki T, Miyamoto Y, Itoh K. 16S rRNA gene sequence-based analysis of clostridia related to conversion of germfree mice to the normal state. *J Appl Microbiol* 2009;107:2088-2097.
- Kwon HK, Lee CG, So JS, et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:2159-2164.
- Chiba T, Seno H. Indigenous *Clostridium* species regulate systemic immune responses by induction of colonic regulatory T cells. *Gastroenterology* 2011;141:1114-1116.
- Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity* 2009;31:401-411.
- Kim JM. Inflammatory bowel diseases and inflammasome. *Korean J Gastroenterol* 2011;58:300-310.
- de Vries IJ, Castelli C, Huygens C, et al. Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents. *Clin Cancer Res* 2011;17:841-848.
- Rech AJ, Vonderheide RH. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1174:99-106.
- Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010;10:159-169.
- Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1183-1189.