

비피더스균을 이용한 암세포 표적 delivery system 개발

박 명 수

안양과학대학 호텔조리영양학부

프로바이오틱스(probiotics)의 건강효과에 대한 많은 연구결과들이 축적되면서 2001년과 2002년에 걸쳐 FAO(국제연합식량농업기구)/ WHO(세계보건기구) 합동 프로바이오틱스 전문가위원회에서 프로바이오틱스에 대한 가이드라인을 설정하며 프로바이오틱스란 '살아있는 미생물로서 적정량을 섭취하였을 때 기주(host)에 건강 증진을 가져올 수 있는 미생물'로 정의하였다(1). 프로바이오틱스에 의한 건강증진효과는 면역체계의 조절과 이에 따른 알레르기/아토피의 저감화 효과, 대장암 억제활성, 혈중지질 저하를 통한 심장병 예방효과, 유해균 감염억제 등 매우 광범위하다. 이러한 건강증진효과는 최근에 인체평가를 통한 검증을 통하여 증거에 기반을 둔(evidence based) 프로바이오틱스 제품의 개발에 이용되고 있다. 그러나 유산균의 항암 효과 특히 대장암에 대한 억제효과에 대한 연구결과는 대부분이 실험실 수준의 연구에 한정되어 있으며 인체평가를 통한 객관적인 데이터를 제시하지는 못하고 있다. *In vitro* 연구의 결과에서 얻어진 항암효과의 mechanism에는 프로바이오틱스에 의한 장내 대사의 조절을 통한 발암(촉진)물질의 생성억제, 장내 생리화학적 환경의 변화, 발암물질에 대한 흡착이나 분해, 프로바이오틱스에 의한 항암물질의 생산, host의 면역조절 및 강화작용 등에 의한 것이다(2). 이러한

in vitro 실험 결과를 입증할 만한 인체평가 결과들이 뒷받침이 되어야 객관적인 평가를 내릴 수 있을 것이다. 이를 위하여 EU에서는 SYNCAN(Synbiotics and cancer prevention in humans) project를 진행한 바 있다. 이들은 대장암에 따른 biomarker를 설정하고 symbiotics(probiotics+prebiotics)를 투여하여 biomarker의 변화를 관찰하여 프로바이오틱스의 항암효과를 연구하였다(3).

최근에는 유산균의 천연적인 항암효과연구와 더불어 프로바이오틱스를 적극적으로 항암인자의 전달체로 활용하여 암 치료에 적용하고자 하는 연구들이 진행되고 있다. 진전된 암이나 재발된 암의 경우 신체 전체에 영향을 미치게 된다. 이런 경우 화학요법을 통하여 치료하게 되는 데 이때 투여되는 화학치료제는 암세포 뿐 아니라 정상세포에도 독성을 나타낸다는 문제점이 있다. 고휘암 치료에 있어서 약물이나 항암유전자를 인체 투여 후에 암세포 특이적으로 조직 내부로의 전달이나 조직 내에서의 효율적인 발현을 할 수 있는 delivery-expression system이 없어서 고전하였다. 이를 해결하기 위하여 암세포에 특이적으로 약물이나 항암유전자를 전달하려는 delivery system 개발에 관한 연구가 진행되어 왔다(4).

암환자의 경우 정상인에 비하여 낮은 혈중 산소분압을 나

타내며 특히 고형암의 경우 특징적으로 산소분압이 2.5 mmHg 이하인 hypoxic region이 존재한다(5). *Clostridium* 과 *Bifidobacterium* 등의 혐기성 세균이 혈관주사 후에 고형암의 hypoxic region에서 선택적으로 성장할 수 있다는 사실이 알려지면서(6,7) 이들을 항암유전자의 전달체로 활용하고자 하는 연구가 수행되었다. *Cl. acetobutylicum*이나 *Salmonella*를 이용하여 tumor cell에 항암유전자를 전달하고자 하는 연구들이 진행되었으나(8, 9) 이들은 pathogen으로서의 한계를 가지고 있는 상황이다. *Bifidobacterium*의 경우는 인체 유익균으로 인식되고 있고 인체에 감염을 일으킨다는 보고가 없어 또 다른 후보 미생물로 여겨지고 있으나 이를 위해서는 *Bifidobacterium*의 세포내의 대사, 유전자 발현, 단백질 발현 및 분비 등에 대한 연구가 선행되어야 한다. 최근에 *Bifidobacterium*에 대한 유전자 수준에서의 연구가 진행되어 플라스미드와 이를 이용한 발현벡터 개발과 형질전환에 대한 연구 결과들이 축적되어 이러한 부분에 대한 해결책이 제시되고 있어 *Bifidobacterium*을 항암유전자의 전달 및 발현 매개체로 이용하고자 하는 연구들이 진행되고 있다(10, 11).

일본의 Fujimori 등은 cytosine deaminase(CD)유전자를 도입한 비피더스 형질전환체를 제조하여 혈관주사를 통하여 mouse에 투여하고 prodrug 인 5-fluorocytosine (5FC)를 주입하여 고형암세포에서만 선택적으로 CD에 의하여 5-FC를 5-fluorouracil(5FU)로 전환하는 연구를 수행하였다(12). 먼저 꼬리 혈관을 통하여 투여된 *Bifidobacterium*은 선택적으로 고형암에서만 발견되었고 기타의 장기에서는 발견되지 않아 암세포 특이적으로 전달됨을 확인하였다. 이들은 *B. longum*, *B. adolescentis* 그리고 *B. breve*에 CD 유전자를 도입하였고 *in vitro* 실험에서 CD 유전자가 발현되는 것을 확인하고 이들 중 *B. longum*에서 실험동물을 통한 *in vivo* 연구에서 이 유전자가 발현되어 암세포의 성장을 억제하는 결과를 보여주어 *Bifidobacterium*을 이용한 고형암 치료법의 가능성을 제시하였다(13).

중국의 Wang 등은 *B. infantis*에서 다른 발현 시스템을 이용하여 CD/5-FC 요법을 활용하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 melanoma 세포의 증식억제 효과가 있음을 확인하였다(14).

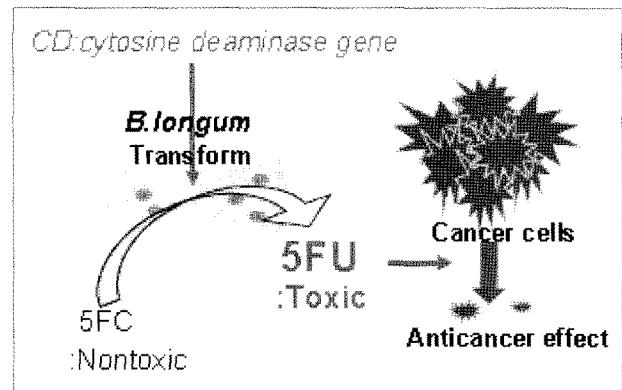


Fig. 1. Schematic representation of Bifidobacterial Selective Targeting-Cytosine Deaminase therapy(13).

Xu 등은 *Bifidobacterium* 벡터에 endostatin gene을 cloning하여 *B. adolescentis*와 *B. longum*에서 발현하였고 이를 쥐에 주사(*B. adolescentis*의 경우) 혹은 경구투여(*B. longum*의 경우)한 결과 liver solid tumor의 성장을 강하게 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 효과는 selenium을 함께 처리하였을 때 더 강하였다고 보고하였는데 이는 selenium과 형질전환 비피더스의 처리가 실험쥐의 NK와 T-cell의 활성화와 IL-2와 TNF-알파의 활성을 강화함으로써 나타난다고 하였다(15, 16).

지금까지 비피더스균의 활용분야는 발효유제품이나 정장기능의 건강기능식품 등에 한정되어 왔으나 추가적인 연구와 검증을 거친다면 *Bifidobacterium*을 고형암 치료의 전달체로 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 국내에서는 *Bifidobacterium* 발현시스템에 대한 기반기술을 확보하고 있어(17-22) 빠른 시간 내에 이 분야 연구에 대한 국제적인 경쟁력을 확보할 수 있을 것이다.

References

1. Report of Joint FAO/WHO Working Group on "Drafting guide lines for the evaluation of probiotics in food" 2002
2. J. Rafter. 2002. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *British J. Nutrition.* **88**:89-94
3. <http://www.synca.be3>.
4. Dachs GU, Patterson AV, Firth JD, Ratcliffe PJ, Townsend KMS, Stratford II, Harris AL.: Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat Med* **3**:515-520, 1997.

5. Vaupel PW.: Oxygenation of solid tumors. In Teicher BA, ed: Drug Resistance in Oncology. Marcel Dekker, New York, pp53-85, 1993.
6. Malmgren RA, Flanigan CC. Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration. *Cancer Res* **15**:473-478, 1955.
7. Kimura NT, Taniguchi S, Aoki K. Selective localization and growth of *Bifidobacterium bifidum* in mouse tumors following intravenous administration. *Cancer Res* **40**:2061-2068, 1980.
8. Fox ME, Lemmon MJ, Mauchline ML, Davis TO, Giaccia AJ, Minton NP, Brown JM. Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. *Gene Ther* **3**:173-178, 1996.
9. Carey RW, Holland JF, Whang HY et al. Clostridial oncolysis in man. *Eur J Cancer* **3**:37-46, 1967.
10. Argnani A, Leer RJ, van Luijk N, Pouwels PH. A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology* **142**:109-114, 1996.
11. Matsumura H, Takeuchi A, Kano Y. Construction of Escherichia coli-Bifidobacterium longum shuttle vector transforming *B. longum* 105-A and 108-A. *Biosci Biotech Biochem* **61**:1211-1212, 1997.
12. Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S: *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther* **7**:269-274, 2000.
13. Fujimori M. Genetically engineered *Bifidobacterium* as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer* **13**: 27-31. 2006.
14. Yi C, Huang Y, Guo ZY, Wang SR. Antitumor effect of cytosine deaminase/f-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on melanoma. *Acta Pharmacologica Sinica*. **26**:629-634. 2005.
15. Fu GF, Li X, Hou YY, Fan YR, Liu WH, Xu GX. *Bifidobacterium longum* as an oral delivery system of endostatin for gene therapy on solid tumor cancer. *Cancer Gene Therapy*. **12**:133-140. 2005.
16. Xu YF, Zhu LP, Hu B, Fu GF, Zhang HY, Wang JJ, Xu GX. A new expression plasmid in *Bifidobacterium longum* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*. **14**. 151-157. 2007.
17. Park MS, Lee KH, Ji GE. Isolation and characterization two plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, **25**:5-7. 1997.
18. Park MS, Shin DW, Lee KH, Ji GE. Sequence analysis of pKJ50 from *Bifidobacterium longum*. *Microbiology*. **145**:585-592. 1999.
19. Park MS, Seo JM, Kim JY, Ji GE. Heterologous gene expression and secretion in *Bifidobacterium longum*. *Le Lait* **84**:1-8. 2005.
20. Moon GS, Pyun YR, Park MS, Ji GE, Kim WJ. Secretion of recombinant pediocin PA-1 by *Bifidobacterium longum* using the signal sequence for bifidobacterial amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5630-5632. 2005.
21. Park KB, Ji GE, Park MS, Oh SH. Expression of rice glutamate decarboxylase in *Bifidobacterium longum* enhances γ -aminobutyric acid production. *Biotechnology Letters*. **27**:1681-1684. 2005.
22. Park MS, Kwon B, Shim JJ, Huh CS, Ji GE. Heterologous expression of cholesterol oxidase in *Bifidobacterium longum* under the control of 16S rRNA gene promoter of bifidobacteria. *Biotechnol. Lett.* **30**:165-172. 2008.