

경구백신의 효율적인 적용을 위한 면역 보조제 개발

김새해 · 서기원 · 김 주 · 장용석

Development of adjuvant for effective oral vaccine application

Sae-Hae Kim · Ki-Weon Seo · Ju Kim · Yong-Suk Jang

Received: 7 August 2010 / Accepted: 20 August 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Vaccine is one of the best known and most successful applications of immunological theory to human health and it protects human life through inducing the immune response in systemic compartment. However, when we consider the fact that mucosal epithelium is exposed to diverse foreign materials including viruses, bacteria, and food antigens and protects body from entry of unwanted materials using layer of tightly joined epithelial cells, establishing the immunological barrier on the lining of mucosal surfaces is believed to be an effective strategy to protect body from unwanted antigens. Unfortunately, however, oral mucosal site, which is considered as the best target to induce mucosal immune response due to application convenience, is prone to induce immune tolerance rather than immune stimulation. Since intestinal epithelium is tightly organized, a prerequisite for successful mucosal vaccination is delivery of antigen to mucosal immune induction site including a complex system of highly specialized cells such as M cells. Consequently, development of efficient mucosal adjuvant capable of introducing antigens to mucosal immune induction site and overcome oral tolerance is an important subject in oral vaccine development. In this review, various approaches on the development of oral mucosal adjuvants being suggested for effective oral mucosal immune induction.

서론

백신은 사람과 동물처럼 면역체계를 가진 개체에 약독화 혹은 불활성화된 병원균, 또는 병원체의 일부나 독소와 같은 항원을 미리 노출시켜 면역의 특성인 항원에 대한 기억을 인위적으로 갖추게 하는 행위이다. 백신에 의한 면역 기억은 이후 실제 동일한 항원을 가지는 병원체의 침입 시 병원체 항원에 대한 빠르고 효과적인 면역반응의 유도를 가능하게 하여 병원체로부터 신체를 효과적으로 방어하게 하는 방법으로, 인간과 동물에게 적용된 가장 성공적인 의약 기술 중의 하나이다. 현재 사용되고 있는 백신의 대부분은 주사용 백신으로 전신 면역을 기구를 활성화시켜 백신의 효능을 유도하고 있다 (Plotkin 2005). 하지만, 여러 병원균의 침투 경로가 점막이라는 점을 고려하면, 주사용 백신이 전신면역 반응은 잘 유도하는데 비하여 점막면역 반응의 유도는 어렵다는 점을 감안할 때 점막 백신에 대한 관심이 높아지고 있다 (Holmgren and Czerkinsky 2005). 특히, 점막으로 투여된 항원에 의한 면역반응은 점막뿐만 아니라 전신에서도 항원에 대한 효과적인 면역반응을 유도할 수 있기 때문에 투여의 수월성 및 보관의 용이성과 아울러 다양한 항원유전자 형질 전환체를 이용한 경구 점막백신에 대한 관심이 매우 커지고 있는 것이 사실이다 (Brandtzaeg 2009; Cerutti and Rescigno 2008).

신체에서 점막의 표면적은 피부의 200배에 해당하는 약 400 m²로 호흡기를 시작으로 소화기 및 비뇨생식기까지 덮고 있다 (Brandtzaeg 2009). 또한, 음식을 비롯한 여러 외부 항원 및 균들에 직접적으로 노출되어 있을 뿐 아니라, 병원체 감염의 첫 번째 침투 경로이기 때문에 점막은 병원체에 대한 방어 면역반응을 유도하기에 최적의 장소로 고려되고 있다. 이러한 장점에도 불구하고 아직 상용화된 경구 백신이 드문 이유는 점막은 병원체뿐만

S.-H. Kim · K.-W. Seo · Y.-S. Jang (✉)
전북대학교 생물과학부
(Division of Biological Sciences, Chonbuk National University,
Jeonju 561-756, Korea)
e-mail: yongsuk@jbn.ac.kr

J. Kim
전주생물소재연구소
(Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju 561-360, Korea)

아니라 음식물 및 여러 공생균에도 직접적으로 노출되어 있어 외부 항원의 유입을 철저하게 구별하고 조절하며, 유입된 항원들에 대한 면역반응보다는 면역관용을 유도하는 환경이 우세하게 확립되어 있기 때문이다 (Sun et al. 2010; Tsuji and Kosaka 2008). 따라서 효율적인 점막 경구백신의 개발을 위해서는 백신을 점막면역계로 잘 전달하여 전달된 백신에 대한 면역반응이 효과적으로 일어날 수 있도록 작용하는 면역 보조제의 사용이 필수적이라 할 수 있다 (Holmgren and Czerkinsky 2005). 이에 본 논문에서는 점막면역 보조제 개발에 대한 기반 지식과 최신 연구 정보를 정리하여 보고자 한다.

점막면역계 개요

점막은 외부 환경에 대한 방어 및 신체의 항상성을 위해 국소적 면역계가 발달되어 있다. 점막면역계가 전신 면역계와 구별된다는 개념은 1919년 Besredka의 *Shigella dysenteriae*에 대한 백신 실험에서 처음 제안되었으며, 점막면역의 주요 활동요소인 secretory IgA (SIgA)가 밝혀지기 전까지 점막면역에 대한 지식 및 기능에 대해서는 이해가 많이 부족했던 것이 사실이다. 그러나 1960년대 전신면역계에서 IgA가 발견된 이후 SIgA가 점막면역계의 주요 활동인자라는 것이 밝혀졌으며, 이후 점막면역계에 대한 많은 연구 및 이해가 이루어졌다 (Brandtzaeg 2009; Brandtzaeg and Johansen 2005).

점막 면역 조직의 구성

Immune inductive site

점막면역계의 구성 조직은 inductive site와 effector site 두 곳으로 나누어진다 (Fig. 1). 먼저, 점막으로부터 유입된 항원에 대해 B cell과 naive T cell의 면역 반응이 유도되는 inductive site는 mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)로 구성되어 있다 (Kiyono and Fukuyama 2004). MALT는 B cell follicle과 B cell follicle 사이에 있는 T cell 분포지역, 그리고 dendritic cell과 macrophage를 포함하는 다양한 antigen presenting cell (APC)로 구성 되어 있다. MALT는 M cell이라는 특수한 세포를 통하여 항원이 직접적으로 유입되기 때문에 일반 lymphoid organ들과는 다르게 수입성 림프관 (afferent lymphatics)이 없다 (McGhee et al. 2007). 이러한 특징 때문에, 점막면역계에 관여하는 mesenteric lymph node (MLN)는 MALT로 분류되지 않는다. MALT는 해부학적 위치에 따라 GALT (gut-associated lymphoid tissue), NALT (nasopharynx-associated lymphoid tissue), BALT (bronchus-associated lymphoid tissue)등으로 세분화되는데, 특히 GALT의 경우 조직으로 분포에 따라 Peyer's patch (PP), appendix, isolated lymphoid

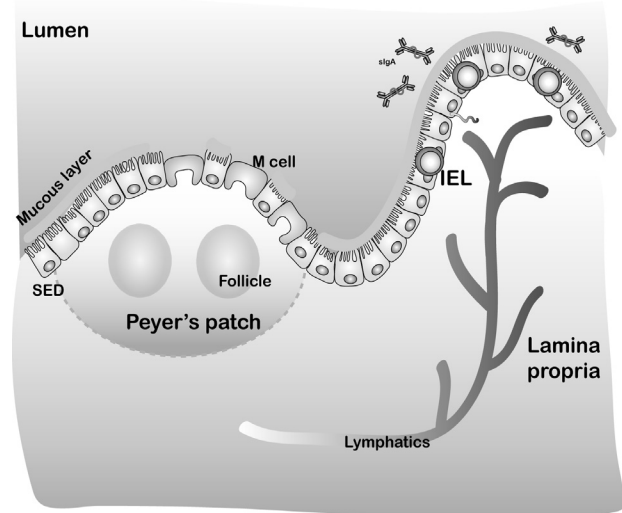


Fig. 1 Anatomy of the intestinal immune system

follicle (ILF)로 나뉜다 (Brandtzaeg et al. 2008).

1965년과 1966년 rabbit의 appendix에 있는 follicle-associated epithelium (FAE)에서 주변 enterocyte와 달리 glycocalyx 층이 얇고, microvillus가 짧고 불규칙하며, 안쪽으로는 pocket 구조가 발달해 있는 세포가 관찰되었으며, 1972년 이런 특성을 갖는 세포는 membranouse 혹은 microfold라는 의미의 M cell이라 명명하게 되었다 (Gebert et al. 1996; Keljo and Hamilton 1983). 이후 M cell이 점막의 여러 MALT에서 발견되었으나 M cell을 규정하는 marker들이 명확하지 않아 주로 형태학적 특성에 따라 분류되었다. 그러나 *in vivo* M cell 혹은 *in vitro* M-like cell culture를 통한 연구가 진행됨에 따라 M cell의 apical에서 $\beta 1$ integrin, ICAM-1, α -L-fucose, GM1 ganglioside, CCR5 receptor, IgA specific receptor 등의 발현이 알려지며, M cell의 기능에 대한 이해가 점차 확대되기 시작하였다 (Brayden et al. 2005; Jepson et al. 2004; Kuolee and Chen 2008; Mach et al. 2005). 또한, 2007년에는 Dr. Kiyono 연구팀에 의하여 UEA1⁺/WGA⁻ mouse M cell로부터 얻어진 M cell specific antibody (NKM 16-2-4)가 확립되었으며, 2009년에는 M cell specific antibody를 이용하여 분리한 M cell의 transcript로부터 M cell specific protein candidate로 선정된 glycoprotein 2 (GP2)가 mouse와 human M cell 모두에서 발현됨이 확인되어 universal M cell marker로 제안되고 있다 (Hase et al. 2009; Nochi et al. 2007).

점막면역계의 immune inductive M cell에 많은 관심을 가지는 이유는 M cell의 항원 전달능력 때문이다. M cell은 다른 APC와 달리 lysosome에 의한 항원의 분해 없이 15분 이내에 항원을 점막 내부로 전달하는 능력을 보인다 (Clark and Jepson 2003). 또한 M cell은 감염균의 좋은 침투 경로로도 사용되는데, M cell에 특이적으로 잘 부착

하는 *S. typhimurium*은 enterocyte를 통해 lamina propria (LP)로 침투하는데 2 시간 정도가 소요되는데 비하여 M cell에 부착하였을 때에는 M cell을 파괴하면서 30분 안에 follicle 안쪽으로 침투할 수 있어 M cell의 이러한 특징은 백신 혹은 치료제를 점막 안쪽으로 전달하기 위한 최적의 조건을 제공한다고 할 수 있다 (Siebers and Finlay 1996). 더욱이 M cell을 통하여 유입된 항원은 APC에 의하여 follicle로 전달되기 때문에 점막면역 반응을 보다 효율적으로 유도할 수 있는 매우 좋은 target이라 할 수 있다 (Mishra et al. 2010).

Immune effector site

점막 면역계의 두 번째 구성 조직인 effector site는 항원에 대한 effector/memory 면역세포들이 모여 마지막으로 분화되고 항체가 분비되는 지역으로 여러 점막의 lamina propria (LP)와 intraepithelial lymphocyte (IEL) compartment가 해당된다. 전체 B cell 중 SIgA⁺ B cell이 차지하는 비율은 PP에서는 2%에 불과하지만 MNL에서는 50%, 그리고 LP에서는 90%를 차지하는 것으로 보아 SIgA⁺ B cell의 life cycle에서 마지막 분화가 일어나는 지역은 LP라고 할 수 있다 (Brandtzaeg et al. 2008; Parrott 1976). 따라서 LP에 존재하는 plasmablast와 plasma cell의 대부분은 J-chain-IgA (dimer/polymer)와 IgM (pentamer)를 발현하고, 일부 세포에서만 J-chain-IgG를 발현한다.

IEL compartment는 mucosal surface를 지칭하는 것으로 polymeric Ig receptor (pIgR)를 발현하여 SIgA의 생성에 중요한 역할을 할 뿐 아니라, LP와의 network를 구성하여 점막면역계 조절 및 항상성에 관여 한다. 또한, IEL은 α/β⁺ CD8⁺ T cell과 γ/δ⁺ T cell로 구성되어 있으며, LP의 memory/effector T cell의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으나 아직 정확한 기능에 대해서는 모르고 있는 실정이다 (Brandtzaeg et al. 2008).

점막면역계의 작동

점막면역계의 주요 활동요소는 SIgA인데, SIgA는 serum의 IgA와 달리 80 kDa의 glycoprotein인 secretory component (SC)를 가진다 (Tomasi et al. 1965). SC는 epithelial membrane protein인 pIgR의 일부이며, SIgA가 protease에 대하여 강한 저항성을 갖도록 한다. 항원에 대하여 특이적이지 않은 SIgA는 약한 특이성을 가지고 마치 innate immune response 처럼 바이러스의 neutralizing을 통하여 점막과 바이러스가 접촉하는 것을 저해하고 균들의 agglutination을 유도하여 점막표면에 균의 colonization을 억제한 후 이들의 제거와 배출을 쉽게 만들어 주어 장내 항상성의 유지에 기여한다 (Abreu 2010; Cerutti and Rescigno 2008; Fagarasan et al. 2010). 만약, 백신 접종 등에 의하여 항원에 특이성을

가지는 SIgA가 생성되게 되면 항원에 대한 높은 특이성으로 인한 neutralization 반응을 통하여 항원에 대한 방어 기작을 수행할 수 있게 된다 (Takahashi et al. 2009; Tokuhara et al. 2010). 항원 특이적 SIgA의 생성은 백신 혹은 항원에 노출된 경로에 따라 지역적인 차이를 보이는데, 경구 투여의 경우 소화 및 장관계와 일부 호흡기계 점막에서 높은 SIgA 생성을 유도하지만 생식기 점막에서의 SIgA 분비는 미미한 편이다. 반면 생식기계에서의 항원 및 백신 노출은 생식기계 점막에서만 높은 SIgA를 유도특성을 보인다 (Holmgren and Czerkinsky 2005).

점막 면역반응 유도에 의한 SIgA의 생성은 점막으로 항원이 유입되면서 시작된다 (Fig. 2). 항원의 유입은 주로 M cell을 통하여 일어나며, M cell pocket의 APC에 의하여 T cell이 활성화되며, 활성화된 T cell은 germinal center로 이동하게 된다 (Cerutti 2008; Cerutti and Rescigno 2008). 점막면역계의 또 다른 항원 유입 경로로는 effector site에서 intra- 혹은 subepithelial dendritic cell (DC)이 있다. 이렇게 유입된 항원은 APC에 의하여 lymph node로 이동하거나 주변 B cell의 분화를 유도하는 것으로 알려지고 있다 (Duc et al. 2010; Iwasaki 2007; Tsuji and Kosaka 2008). 항원에 의해 활성화된 DC는 T cell과 B cell을 자극하게 되고, memory/effector 형태의 T 세포와 B 세포로 자극된 세포 중 일부는 efferent lymph를 통해 MNL로 이동하고, 일부는 thoracic duct를 통해 peripheral blood system으로 전달된다 (Mestecky et al. 2008). Effector site인 LP에 존재하는 IgA⁺ plasma cell에서 분비된 dimeric IgA는 pIgR를 통해 lumen으로 분비되어 SIgA가 되는데 (Mestecky et al. 2008), 점막으로 분비된 SIgA가 항원에 대한 neutralization 및 제거반응에 관여하여 점막면역 반응의 가장 중요한 기능을 수행하기 때문에 경구백신 개발에서 가장 중요한 target이라고 할 수 있다. 물론 SIgA의 생산에 T cell 비의존성 반

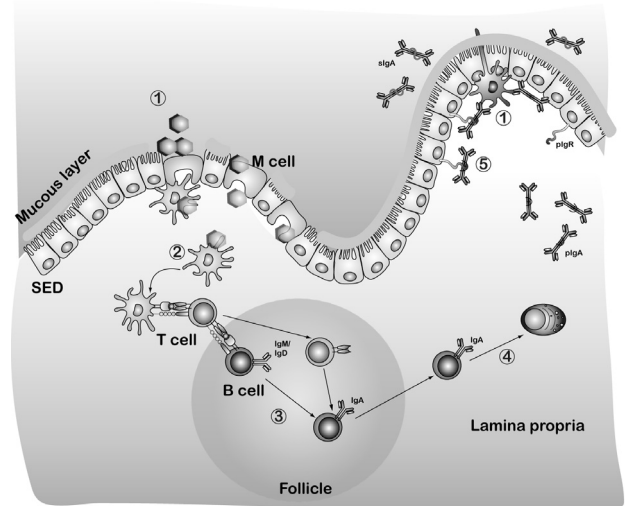


Fig. 2 Depiction of the mucosal immune system

응도 관련되어 있는 것으로 알려지고 있으나 근본적으로는 T cell 의존성 SIgA의 유도가 백신 적용에 의한 점막면역 반응에서는 주된 반응이라 할 수 있다 (Fagarasan et al. 2010).

백신 보조제

경구백신

주사용 백신은 냉장 저장이 필요하고 접종에 따른 신체적 통증 및 정신적 두려움이 수반되며, 접종을 위한 의료진이 꼭 필요하다 (Kendall 2010). 따라서 최근 국내·외 백신연구의 동향 중 가장 두드러진 특징은 백신의 안전성 및 경제성, 그리고 접종 수월성에서 주사용 백신의 문제점을 극복할 수 있는 경구백신에 대한 관심이 높아지고 있다는 점이다 (Holmgren and Czerkinsky 2005; Plotkin 2005). 경구백신은 안전성, 경제성 및 접종 수월성 외에도 매우 중요한 장점을 가지고 있다. 예컨대, 기존의 주사용 백신은 주로 전신면역을 통해서 유도되는 IgE에 의한 면역반응이 주된 효과이지만, 인플루엔자나 결핵 등과 같이 신체에 큰 위협이 되는 여러 주요 병원균은 호흡기에서 생식기까지 펼쳐져 있는 광범위한 점막조직을 통하여 감염되기 때문에 질병의 효과적인 예방을 위해서는 점막 조직에 방어 면역반응을 구축하는 것이 매우 중요하다는 것이다 (Mishra et al. 2010). 이러한 측면에서 점막조직 방어 면역반응의 구축이 가능한 점막면역계를 백신 적용의 target으로 하는 점막백신은 그 효용성이 매우 높다고 할 수 있다. 또한, 점막으로 적용된 백신은 점막면역뿐만 아니라 전신 면역계에서도 항원 특이적인 면역반응을 유도할 수 있기 때문에 다양한 감염 경로를 통하여 침입하는 병원체에 대한 포괄적인 방어가 가능한 방어 면역체계를 점막과 전신에 갖추는데 매우 유용한 system이라 할 수

있다 (Brayden et al. 2005; Kopecky-Bromberg et al. 2009).

점막백신은 여러 접종경로를 통하여 적용할 수 있으나, 점종의 수월성 때문에 경구용 백신이 가장 선호되고 있다. 그런데, 경구로 투여되는 항원은 면역반응의 유도보다는 면역관용의 유도 특성이 강하다는 문제가 있어 경구백신이 극복해야하는 가장 큰 숙제는 백신을 점막 면역반응이 잘 일어날 수 있는 면역 기관까지 전달하여 면역반응을 효과적으로 유도할 수 있게 해야 한다는 점이다 (Brandtzaeg 2009; Tsuji and Kosaka 2008). 이를 위한 방법으로 가장 선호되는 방법이 백신 보조제 (adjuvant)를 사용하는 방법인데, 이는 cholera toxin 등을 사용하여 실험적으로 그 가능성이 입증된 바 있다 (Slutter et al. 2009). 하지만, 아직 안전성과 효율성을 모두 갖추고 있는 효과적인 점막면역 보조제가 제시되고 있지 않아 효율적인 경구백신 개발에 있어서 백신 보조제에 대한 연구는 필수적인 분야라고 할 수 있다

경구백신 보조제

점막은 외부 환경에 대한 물리적 방어벽으로 항원의 출입을 제한하는 특징을 갖는다. 따라서 경구백신 보조제의 가장 중요한 기능은 immune inductive site로 백신을 효과적으로 전달하는 기능이며 (Tyrrer et al. 2007), 이러한 관점에서 볼 때 점막면역계 항원유입의 주된 기능을 할 수 있는 M cell 로의 targeting이 가장 이상적인 전략이라 할 수 있다 (Tyrrer et al. 2007). 아울러 점막은 유입되는 항원에 대한 면역반응의 유도보다는 면역관용의 유도 특성을 가진 면역계이기 때문에 경구백신 보조제는 효과적인 면역반응을 유도하기 위하여 항원에 대한 T cell 의존성 면역반응을 유도하는 immunostimulant 특성도 필요하다고 할 수 있다 (표 1, Fagarasan et al. 2010; Kuolee and Chen 2008; Mestecky et al. 2008).

Table 1 Commonly used mucosal vaccine adjuvants (Chadwick et al. 2010)

Mucosal vaccine adjuvant	Mechanism	Immune Response	Th cell response
Cholera Toxin	GM1 ganglioside receptor binding	CTL	Th2
Heat-Labile enterotoxin (LT)			
MPL-A	TLR 4 binding	CTL	Th1/2
MDP (muramyl dipeptide)	TLR 2 binding	CTL	Th1
CpG-ODN	TLR 9 binding	–	Th1
ISOCOMS	mucosal carrier/Ag presentation	CTL/Ab	Th1
Aluminum salt	carrier/depot effect	Ab	Th2
Nonionic block copolymer	Ag presentation	Ab	Th1
Cytokines	signaling cascade	CTL/Ab	Th1
Chitosam	mucoadhesive	CTL/Ab	Th2

점막면역 활성화제 (Immunostimulant)

경구로 투여되는 물질들에 대해 유도되는 경구내성은 경구로 투여되는 백신에서도 예외가 될 수 없기 때문에 경구백신은 보조제를 통해 백신 항원에 대한 경구 내성을 극복해야 한다. Immunostimulant로 사용하고자 하는 물질은 주로 선천성 (innate)과 후천성 (adaptive) 면역반응의 연결고리 물질로 Toll-like receptor (TLR)의 ligand나 antagonist들이 주로 이용되며, 이외에도 saponin, cytokine 및 bacteria 독소 등이 이용되고 있다 (Reed et al. 2009). 이들 중 점막 면역반응 유도에 응용되는 가장 잘 알려진 TLR ligand로는 CpG ODN이 있는데, CpG DNA는 TLR 9의 ligand로 Th1, Th2 및 CTL 반응들을 유도할 뿐 아니라 natural killer (NK) cell을 활성화시킨다. 한편, 또 다른 예인 lipopolysaccharide (LPS)는 TLR 4의 ligand이며, helper T cell을 활성화시키는데, 일반적으로 점막의 상피세포는 TLR 4를 발현하지 않아 LPS의 점막면역 stimulant로서의 기능에 회의적인 시각이 있었으나 M cell에서 TLR 4가 특이적으로 발현된다는 보고가 있어 이의 효용성이 인정되고 있다. Saponin은 천연 계면활성제로 Quil-A, QS-21, 그리고 ISCOM 등이 해당되는데, 이들 중 일부는 독성을 보이지만 강한 T cell 면역반응을 유도할 뿐 아니라 항원에 대한 memory 면역반응을 증진시키는 효과도 보인다 (Bevan 2004; Chwalek et al. 2006).

점막 전달 시스템 (mucosal delivery system, vehicle)

점막면역 활성화제는 항원과 같이 투여하여 점막면역 반응의 증진을 기대하는데 비하여 점막 전달 시스템은 항원을 점막면역계에 직접 전달하는 운반체의 기능을 할 수 있어 작용이 더욱 구체적이고 특이적이라 할 수 있다. 경구 백신의 효율을 높이기 위한 백신 운반체로 불활성화된 병원균을 사용하려는 연구가 시도되었으며 (Blanco et al. 2008), 최근에는 nanoparticle을 이용한 다양한 전달 시스템이 개발되고 있다 (Chadwick et al. 2010). 그 중 가장 잘 알려진 전달 시스템은 liposome 과 immunostimulation complex (ISCOM)인데 (Reed et al. 2009), 이들은 lipid를 기반으로 하는 구조로서 항원을 lipid 안쪽에 가두어 세포막의 소수성 특징을 이용하여 항원을 전달한다. 한편, biodegradable particle이나 nanoparticle 중 작은 크기의 particle은 세포막 안으로 쉽게 진입할 수 있고, particle 특성에 의하여 APC에 의하여 잘 uptake 되기 때문에 백신전달을 위한 운반체로 효과적인 기능을 수행할 수 있다고 보고 있다 (Chadwick et al. 2010). 또한, 점막면역 보조제로 알려진 chitosan은 epithelial cell에 큰 손상을 초래하는 위험 부담을 가지지만 점막 epithelial cell의 occludin과 zonula occludin protein 1에 대한 인식을 통한 tight junction opening을 통하여 백신을 전달하는 효능을 보인다 (Mishra et al. 2010).

불활성화된 병원균이나 particle과 같은 운반체에 비하여 점막을 자연 감염 경로로 사용하는 병원균은 자체적인 점막 유입 기작과 함께 자체 항원성도 있기 때문에 백신 전달 보조제로서 이용가능이 높다고 할 수 있다 (Marra and Isberg 1997; Ragnarsson et al. 2008). 그러나 이들은 안전성 측면에서 이용이 제한될 수밖에 없기 때문에 감염균에서 점막 유입에 관련하는 단백질만을 점막백신 보조제로 사용하는 방법이 개발되고 있으며, 대표적인 예가 cholera toxin (CT)와 *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT)이다. 하지만, 점막면역 보조제로 가장 잘 알려진 CT와 LT는 자체적으로도 독성을 가지고 있어 안전성에 문제가 있기 때문에 이를 보완하기 위하여 독소의 subunit 중 독성을 가지는 A subunit을 제외한 B subunit만을 이용하거나, 유전자 재조합을 통해 얻은 mutant 형태의 독소를 적용하고 있으며, 아직까지는 점막면역 보조제로 탁월한 효과를 보이고 있다 (Chen et al. 2002; Sun et al. 2010). 실제 일본의 한 연구팀에서는 식물 (rice)에서 발현한 mutant CT를 이용한 경구면역을 통해 효과적인 CT 백신의 가능성을 확인한 바 있다 (Kendall 2010; Nochi et al. 2009; Tokuhara et al. 2010). 한편, 점막의 M cell에 특이성을 보이는 reovirus의 $\sigma 1$ 단백질은 DNA vaccine에 적용되어 점막 보조제로서의 가능성을 보여 주었으며, 최근 연구에서는 *Yersinia*의 invasin이 점막 상피세포에서 발현되는 $\beta 1$ integrin과의 상호작용을 통해 invasin이 부착된 nanoparticle을 점막 내로 침투 가능하게 한다는 보고를 통해 invasin의 새로운 점막면역 보조제로서의 가능성이 제시된 바 있다 (Marra and Isberg 1997; Ragnarsson et al. 2008).

점막면역 활성화제와 점막 전달시스템을 이용한 점막면역 보조제의 영역은 완전히 구별되지 않으며, 대부분의 경우 상호 보완을 통하여 점막면역 보조제로 사용된다. 예를 들어 단순한 particle 만으로는 점막으로의 항원 targeting 및 면역반응 유도가 어렵기 때문에 최근 연구들은 particle에 점막에 부착할 수 있는 단백질, 식물의 lectin, TLR ligand (LPS나 CpG 등) 혹은 bacterial toxin (cholera toxin 등) 등과 같은 면역 활성화제를 함께 포함시켜 점막으로의 항원 targeting 및 면역 증강 효과를 동시에 유도하고자 시도하고 있다 (Misumi et al. 2009; Reed et al. 2009; Takahashi et al. 2009).

M cell targeting을 통한 점막면역 보조제의 개발

점막 내 백신 전달의 어려움을 극복하기 위한 전략으로는 시도되고 있는 또 다른 방법은 다양한 ligand를 매개로 하는 MALT M cell로의 항원 targeting이다. M cell로의 항원 targeting은 보다 효율적인 항원 전달 및 T cell 의존성 면역반응 유도에서 가장 유리한 전략으로 다양한 연구가 진행되고 있는데, 주로 M cell의 apical에서 발현하는 molecule에 반응하는 lectin (UEA-1)을 이용하거나 M

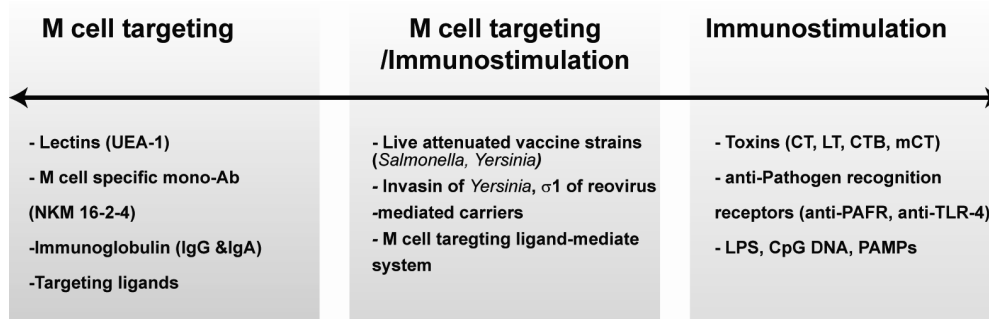


Fig. 3 Development strategy of adjuvants in oral vaccine

cell-specific monoclonal antibody, 혹은 immunoglobulin을 매개로 하는 targeting 방법들이 제시되고 있다 (Fievez et al. 2009; Tyrer et al. 2007).

UEA-1⁺/WGA⁻ 특성은 mouse M cell의 가장 잘 알려진 marker인데, 여러 연구자들은 UEA-1을 polymer particle 및 nanoparticle에 혼합시켜 경구 점막백신에 적용하고자 하였다. 그러나 UEA-1은 lectin으로 세포독성을 야기 할 수 있다는 문제점이 있다. Reovirus의 $\sigma 1$ protein은 M cell에 특이적으로 반응하는 단백질로 잘 알려져 있는데, $\sigma 1$ protein에 DNA vaccine을 적용하여 유도한 점막면역의 경우 항원에 대한 높은 면역반응을 전신과 점막에서 모두 확인할 수 있는 반면, $\sigma 1$ protein-OVA 항원을 이용한 경구 백신의 경우에는 경구내성을 유도하는 결과를 보여준 바 있어 아직은 그 효용성에 대한 확신이 부족한 형편이다 (Rynda et al. 2008; Wu et al. 2001). 또한 최근에는 mouse UEA⁺/WGA⁻ M cell을 분리하여 만든 M cell-specific antibody (NKM 16-2-4)를 이용한 항원의 M cell targeting을 통해 높은 항원 전달능력을 보여주기도 하였는데, 이와 같은 M cell targeting을 통한 항원 전달의 효율 증진은 immunostimulant와 함께 적용되었을 때 항원에 대한 높은 면역 반응을 유도할 수 있음을 보여주었다 (Nochi et al. 2007). 따라서 보다 이상적인 점막백신 보조제는 M cell targeting과 주변 면역세포들의 선천성 및 후천성 면역반응 유도를 동시에 일으킬 수 있는 특성이 같이 필요하다고 할 수 있다.

M cell을 통한 항원유입 효율을 높이기 위한 다른 연구 중 하나는 M cell의 분화유도 특성을 파악하여 이를 이용하고자 하는 시도인데, 예를 들면 mouse system에서 M cell은 RANKL에 의해 분화 유도가 증가 되고 macrophage migration inhibitory factor (MIF)에 의하여 항원 유입의 효율이 바뀌는 특성이 있어 이러한 결과를 효율적인 경구 백신 보조제 개발에 이용할 수 있을 것으로 생각되기도 한다 (Knoop et al. 2009; Man et al. 2008).

끝으로, M cell targeting 능력을 가지는 peptide를 이용한 항원전달 효율의 증진 방법인데, 아직 많은 연구자들이 사용하고 있지는 않지만 본 연구팀을 포함한 일부 연구

팀에서 그 가능성이 입증된 새로운 기법이라 할 수 있다. 본 연구팀에서는 경구 백신의 효율을 증진시키고자 M cell targeting과 주변 면역세포들의 선천성 및 후천성 면역반응 유도를 동시에 일으킬 수 있는 ligand를 개발하고자 하였다 (Fig. 4). 이를 위하여 먼저 *in vivo*에서의 M cell 이용에 어려움이 있기 때문에 이를 극복하고자 *in vitro* cultured M-like cell을 얻었으며 (Fig. 4A), 확보된 M-like cell들은 M cell specific antibody (NKM-16-2-4)와 GP2 protein의 발현을 통해 세포의 분화를 확인하였다 (Fig. 4A). 이어 phage display library를 이용한 random peptide의 biopanning으로부터 M cell의 apical에 부착이 가능한 candidate ligand를 얻었으며, 얻어진 ligand의 특성을 분석하고자 enhanced GFP (EGFP) 유전자의 C-말단에서 ligand를 발현하는 재조합 단백질을 얻었다. 이 peptide ligand의 M cell targeting 능력은 *ex vivo* loop system을 통해 mouse system과 *in vitro* human M cell에서 확인하였다 (Fig. 4B). 또한 재조합 단백질을 mouse system에서 경구 투여를 통해 항원 특이적 면역 반응을 유도 하였을 때, 다른 ligand들과 다르게 특정 ligand (Co1)에서 항원 EGFP에 대한 높은 면역반응이 점막 및 전신에서 유도됨을 확인하였고, 경구내성은 유도되지 않았음을 확인하였다 (Fig. 4C). 이 ligand가 *in vivo*에서 항원을 M cell targeting을 유도 하는지 확인하기 위하여 mouse에 ligand를 포함하는 재조합 단백질을 경구 투여 5분 후 얻은 mouse의 PP를 얻었는데, PP를 confocal laser scanning microscope에 의해 관찰한 결과 ligand가 M cell을 통해 항원을 전달하는 것을 확인하였으며, 또한 *in vitro* human M-like cell 에서도 GP2를 발현하는 세포에 특이적으로 부착하는 것을 확인하였다. Ligand의 기능을 실제 항원인 구제역 바이러스 (foot-and-mouth disease virus, FMDV)의 capsid protein인 VP1에 대하여 적용하기 위하여 VP1-Co1 재조합 항원단백질을 제조하여 mouse 경구투여 실험을 진행한 바 점막 및 전신에서 항원특이적인 면역반응의 효과적으로 유도됨을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 Co1 ligand의 sequence는 M cell binding 감염균인 *Yersinia*의 innate immune system의 C5aR의 ligand로의 작용이 알려진 outer membrane protein의 일부분과 유사성을 보

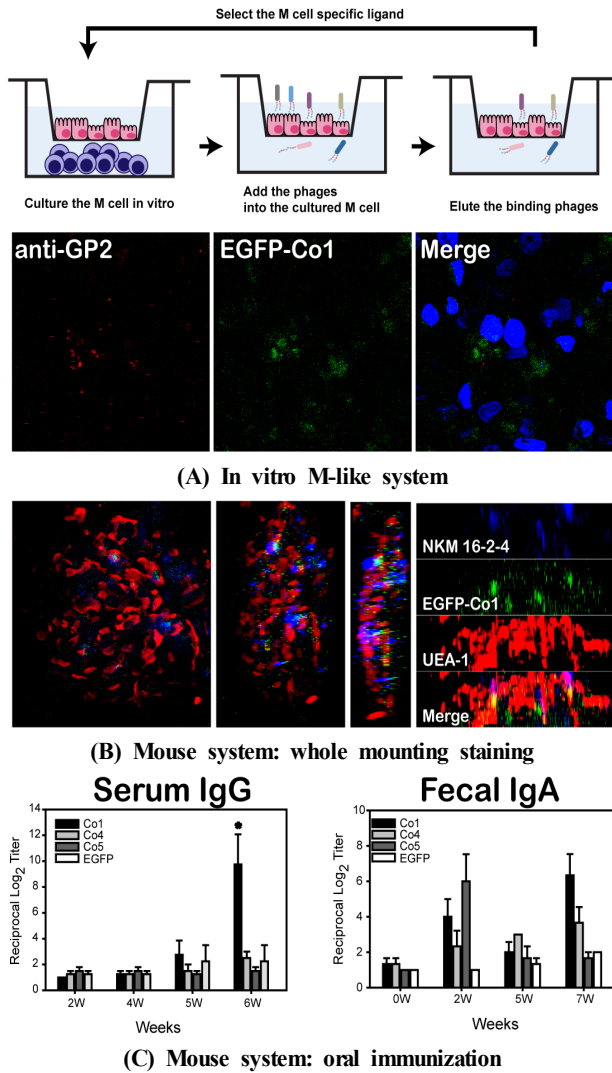


Fig. 4 Function of M cell targeting ligands as oral vaccine adjuvant

여 Co1의 면역 증강효과는 선천성 및 후천성 면역반응의 연결과 관련이 있을 것으로 예상되었다. 따라서 이러한 targeting 및 stimulating ligand의 점막백신 보조제로서의 가능성을 제시할 수 있었다.

결론

경구백신은 경제적 측면 및 투여 방법의 편리성 뿐 아니라, 점막 및 전신에서 항원 특이적 면역반응을 유도할 수 있는 장점이 있으나, 현재 상용화 되는 경구 백신은 극히 제한적이다. 이는 경구 백신이 점막이라는 환경의 장애를 극복해야 하기 때문인데, 백신이 물리·화학적 환경으로부터 유지되어야 할 뿐 아니라 면역반응의 유도를 위해 점막 안쪽으로의 진입에 성공해야만 하기 때문이다. 또한 점막의 면역세포들에 대한 활성을 높여 T cell

의존적 항원 특이적 면역반응을 유도해야 하는 어려움을 가지고 있기도 하다. 경구백신의 이러한 장애는 점막 보조제에 의해 해결될 수 있을 것으로 기대되는데, 이전에는 점막 보조제를 통한 M cell로의 targeting이 가장 중요할 것으로 생각되었으나, 최근 연구 결과들로부터 M cell targeting 및 면역 증강 효과가 점막 보조제로부터 함께 주어질 때 가장 효과적인 경구 백신의 결과를 얻을 수 있다고 결론지을 수 있겠다.

인용문헌

Abreu MT (2010) Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 10:131-144

Bevan MJ (2004) Helping the CD8 (+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 4:595-602

Blanco HM, Lacoste MG, Elicabe RJ, Di Genaro MS (2008) IgA response by oral infection with an attenuated *Yersinia enterocolitica* mutant: implications for its use as oral carrier vaccine. *Vaccine* 26:6497-6502

Brandtzaeg P (2009) Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 70:505-515

Brandtzaeg P, Johansen FE (2005) Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 206:32-63

Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW (2008) Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* 1:31-37

Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW (2005) Keynote review: intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today* 10:1145-1157

Cerutti A (2008) The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol* 8:421-434

Cerutti A, Rescigno M (2008) The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28:740-750

Chadwick S, Kriegel C, Amiji M (2010) Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Adv Drug Deliv Rev* 62:394-407

Chen D, Endres RL, Erickson CA, Maa YF, Payne LG (2002) Epidermal powder immunization using non-toxic bacterial enterotoxin adjuvants with influenza vaccine augments protective immunity. *Vaccine* 20:2671-2679

Chwalek M, Lalun N, Bobichon H, Ple K, Voutquenne-Nazabadioko L (2006) Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochim Biophys Acta* 1760:1418-1427

Clark MA, Jepson MA (2003) Intestinal M cells and their role in bacterial infection. *Int J Med Microbiol* 293:17-39

Duc M, Johansen FE, Cortes B. (2010) Antigen binding to secretory immunoglobulin A results in decreased sensitivity to intestinal proteases and increased binding to cellular Fc receptors. *J Biol Chem* 285:953-960

Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K (2010) Adap-

- tive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunol* 28:243–273
- Fievez V, Plapied L, des Rieux A, Pourcelle V, Freichels H, Wascotte V, Vanderhaeghen ML, Jérôme C, Vanderplasschen A, Marchand-Brynaert J, Schneider YJ, Pr at V (2009) Targeting nanoparticles to M cells with non-peptidic ligands for oral vaccination. *Eur J Pharm Biopharm* 73:16–24
- Gebert A, Rothkott HJ, Pabst R (1996) M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol* 167:91–159
- Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, Yabashi A, Waguri S, Nakato G, Kimura S, Murakami T, Iimura M, Hamura K, Fukuoka S, Lowe AW, Itoh K, Kiyono H, Ohno H (2009) Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462:226–230
- Holmgren J, Czerkinsky C (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11:S45–53
- Iwasaki A (2007) Mucosal dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 25:381–418
- Jepson MA, Clark MA, Hirst BH (2004) M cell targeting by lectins: a strategy for mucosal vaccination and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56:511–525
- Keljo DJ, Hamilton JR (1983) Quantitative determination of macromolecular transport rate across intestinal Peyer's patches. *Am J Physiol* 244:G637–644
- Kendall MA (2010) Needle-free vaccine injection. *Handb Exp Pharmacol* 193–219
- Kiyono H, Fukuyama S (2004) NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 4:699–710
- Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, Akiba H, Yagita H, Kiyono H, Williams IR (2009) RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol* 183:5738–5747
- Kopecky-Bromberg SA, Fraser KA, Pica N, Carnero E, Moran TM, Franck RW, Tsuji M, Palese P (2009) Alpha-C-galactosylceramide as an adjuvant for a live attenuated influenza virus vaccine. *Vaccine* 27:3766–3774
- Kuolee R, Chen W (2008) M cell-targeted delivery of vaccines and therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* 5:693–702
- Mach J, Hshieh T, Hsieh D, Grubbs N, Chervonsky A (2005) Development of intestinal M cells. *Immunol Rev* 206:177–189
- Man AL, Lodi F, Bertelli E, Regoli M, Pin C, Mulholland F, Satoskar AR, Taussig MJ, Nicoletti C (2008) Macrophage migration inhibitory factor plays a role in the regulation of microfold (M) cell-mediated transport in the gut. *J Immunol* 181:5673–5680
- Marra A, Isberg RR (1997) Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun* 65:3412–3421
- McGhee JR, Kunisawa J, Kiyono H (2007) Gut lymphocyte migration: we are halfway 'home'. *Trends Immunol* 28:150–153
- Mestecky J, Nguyen H, Czerkinsky C, Kiyono H (2008) Oral immunization: an update. *Curr Opin Gastroenterol* 24:713–719
- Mishra N, Goyal AK, Tiwari S, Paliwal R, Paliwal SR, Vaidya B, Mangal S, Gupta M, Dube D, Mehta A, Vyas SP (2010) Recent advances in mucosal delivery of vaccines: role of mucoadhesive/biodegradable polymeric carriers. *Expert Opin Ther Pat* 20:661–679
- Misumi S, Masuyama M, Takamune N, Nakayama D, Mitsumata R, Matsumoto H, Urata N, Takahashi Y, Muneoka A, Sukamoto T, Fukuzaki K, Shoji S (2009) Targeted delivery of immunogen to primate m cells with tetragalloyl lysine dendrimer. *J Immunol* 182:6061–6070
- Nochi T, Yuki Y, Katakai Y, Shibata H, Tokuhara D, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nakanishi U, Ono F, Mimuro H, Sasakawa C, Takaiwa F, Terao K, Kiyono H (2009) A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing antibodies but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J Immunol* 183:6538–6544
- Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, Kiyono H (2007) A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J Exp Med* 204:2789–2796
- Parrott DM (1976) The gut as a lymphoid organ. *Clin Gastroenterol* 5:211–228
- Plotkin SA (2005) Vaccines: past, present and future. *Nat Med* 11:S5–11
- Ragnarsson EG, Schoultz I, Gullberg E, Carlsson AH, Tafazoli F, Lerm M, Magnusson KE, Soderholm JD, Artursson P (2008) *Yersinia pseudotuberculosis* induces transcytosis of nanoparticles across human intestinal villus epithelium via invasin-dependent macropinocytosis. *Lab Invest* 88:1215–1226
- Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M (2009) New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 30:23–32
- Rynda A, Maddaloni M, Mierzejewska D, Ochoa-Rep araz J, Maslanka T, Crist K, Riccardi C, Barszczewska B, Fujihashi K, McGhee JR, Pascual DW (2008) Low-dose tolerance is mediated by the microfold cell ligand, reovirus protein sigma 1. *J Immunol* 180:5187–5200
- Siebers A, Finlay BB (1996) M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol* 4:22–29
- Slutter B, Plapied L, Fievez V, Sande MA, des Rieux A, Schneider YJ, Van Riet E, Jiskoot W, Preat V (2009) Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination. *J Control Release* 138:113–121
- Sun JB, Czerkinsky C, Holmgren J (2010) Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit. *Scand J Immunol* 71:1–11
- Takahashi I, Nochi T, Yuki Y, Kiyono H (2009) New horizon of mucosal immunity and vaccines. *Curr Opin Immunol* 21:352–258
- Tokuhara D, Yuki Y, Nochi T, Kodama T, Mejima M, Kurokawa

- S, Takahashi Y, Nanno M, Nakanishi U, Takaiwa F, Honda T, Kiyono H (2010) Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine. Proc Natl Acad Sci USA 107:8794–8799
- Tomasi Jr TB, Tan EM, Solomon A, Prendergast RA (1965) Characteristics of an immune system common to certain external secretions. J Exp Med 121:101–124
- Tsuji NM, Kosaka A (2008) Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. Trends Immunol 29:532–540
- Tyrer PC, Ruth Foxwell A, Kyd JM, Otczyk DC, Cripps AW (2007) Receptor mediated targeting of M-cells. Vaccine 25:3204–3209
- Wershil BK, Furuta GT (2008) 4. Gastrointestinal mucosal immunity. J Allergy Clin Immunol 121:S380–383
- Wu Y, Wang X, Csencsits KL, Haddad A, Walters N, Pascual DW (2001) M cell-targeted DNA vaccination. Proc Natl Acad Sci USA 98:9318–9323