

유전변형 박테리아를 이용한 항암표적치료

중앙대학교병원 비뇨기과

진수빈 · 황영미 · 장인호

Genetically Modified Bacteria as Targeted Agent for Cancer

Subin Jin, Young Mi Whang, In Ho Chang

Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, Seoul, Korea

With the emergence of microbiome as a major player in many human diseases, bacteria as therapeutics are gaining significant interest. Whole bacteria or cytotoxic or immunogenic peptides carried by them exert potent anti-tumor effects in the experimental models of cancer. The use of attenuated microorganism (s) e.g., BCG to treat human urinary bladder cancer was found to be superior compared to standard chemotherapy. While bacteria alone may not offer full therapeutic benefits, modifying them with anti-tumor agents, anti-oncogenes or immunogenic antigens, either alone or in combination, will prove to be beneficial. Vectors for delivering shRNAs that target oncogenic products, express tumor suppressor genes and immunogenic proteins have been developed. These approaches have showed promising anti-tumor activity in mouse models against various tumors. These can be potential therapeutics for humans in the future and such therapeutics may become a future alternative or adjunct regimen along with conventional chemotherapy and radiotherapy. In this review, some conceptual and practical issues on how to improve these agents for human applications are discussed. (Korean J Urol Oncol 2016;14:54-62)

Key Words: Bacteria, Genetically, Cancer

서 론

항암화학요법은 이제까지 종양치료에 널리 사용되지만, 정상 조직에도 심각한 손상을 주는 단점이 있는 반면에 항체, 펩타이드 유사체와 사이토카인 등의 생물학적 치료제는 일반적으로 표적 세포에만 주로 작용하며 비교적 인체에 안전하다. 이제까지 다양한 감염질환에서 잠재적 면역을 생성하기 위하여 약독화 바이러스 및 세균 백신이 널리 사용되었으나 종양의 치료를 위한 바이러스 및 세균의 사용은 아직 연구 중이다. 종양 치사 활성을 갖는 재조합 바이

러스는 수년 동안 개발되어 왔으나, 암세포에 대한 비특이성, 바이러스 벡터의 짧은 반감기 등은 항원제시세포, 기존의 면역반응의 증폭에 대한 장애 요인이 되고, 바이러스에 대한 항체의 발생을 유도하여 벡터로서의 기능을 상실하게 되어 그 효과가 떨어진다.

세균을 이용한 치료제 개발의 중요한 단계는 숙주에 대해 최소한의 병원성을 지닌 종과 균주를 선별하는 것이다. 이제까지 다양한 박테리아가 다양한 종양 주변에서 분리되고 확인 되어 왔으며, 이는 세포외 및 내, 그람 양성 및 음성 균으로 구분할 수 있다.¹ 그러나 실험 동물에 이식 된 종양의 주위에 군집하는 박테리아의 증명은 많지 않았다 (Table 1).² 박테리아를 투여시 대부분 종양조직 부근에 시간에 따라 군집의 수가 증가하였으며, 이는 종양의 미세 환경이 숙주의 면역체계 또는 영양소로부터 보호될 수 있기 때문으로 생각된다 (Table 1). 비록 이러한 선택적 유도에 대한 혈액학적³ 또는 화학적⁴ 정확한 메커니즘은 알려져 있지 않지

Received July 24, 2016, Revised August 4, 2016,

Accepted August 19, 2016

Corresponding Author: In Ho Chang, Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, 224-1, Heuksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 06974, Korea. Tel: 82-2-6299-1785, Fax: 82-2-6294-1406, E-mail: caucih@cau.ac.kr

Table 1. Bacteria home and replicate in tumor microenviroment

Bifidobacteria	Clostridia
B. adolescentis	C. absonum
B. animalis	C. acetobutylicum
B. bifidum	C. bifermentans
B. boum	C. difficile
B. breve	C. histolyticum
B. coryneforme	C. perfringens
B. dentium	C. novyi - exhibited extensive spreading even in poorly-vascularized tumor areas
B. indicum	C. sordellii - exhibited extensive spreading even in poorly-vascularized tumor areas
B. infantis	
B. longum	
B. magnum	
B. pseudolongum	
Lactobacilli	
L. bifidus	
L. delbrueckii	
Murine tumors	Tumor:Liver
B16 melanoma	12,000:1
M27 lung carcinoma	10,000:1
Spontaneous breast tumor	700:1
Human tumor xenografts	Tumor:Liver
MDA-MB-231 breast carcinoma	34,000:1
DU145 prostate	24,000:1
HCT 116 colon carcinoma	17,000:1
DLD1 colon carcinoma	15,000:1
HTB177 lung carcinoma	4000:1
LOX melanoma	3000:1
A549 lung carcinoma	300:1
SW-620 colon carcinoma	275:1

Base on Nallar et al.⁵⁵ with minor modification.

만, 종양조직 안에 들어간 박테리아의 생존과 성장은 종양 조직 내 산소의 정도와 박테리아의 운동성에 의하여 결정 될 것으로 생각된다.

감마프로테오 박테리아의 일종인 살모넬라 (*Salmonella*) 균은, 이중 즉 *bongori* 및 *enterica*로 표시되며, *enterica*는 편모, 캡슐, 탄수화물 및 lipopolysaccharide (LPS)의 생화학적 구조를 기반으로 장티푸스 혈청형과 비장티푸스 혈청형 (non-typhical serovers: NTS)으로 분류된다. 자연환경에서, NTS가 많은 포유 동물에서 유행하는 비특이적 장염의 원인이 되며, 장티푸스 혈청형은 주로 인간에서 장티푸스의 원인균이 된다. 현재, 장티푸스 혈청형 균에 상업적으로 이용 가능한 두 백신 (경구 약제 및 주사제)은 일반적으로 가금류와 돼지에서 사용되고 있으며, 이러한 백신들은 인간에게 안전하게 사용할 수 있지만, 효과적인 면역을 유지하기 위해 정기적 재접종을 필요로 한다. 살모넬라에 대한 많은 경험과 유전자 조작의 용이성은 마우스 모델에서 다양한 종양을 대상으로 적용되고 있으며, 약독성으로 변형균주는,

정맥 투여했을 때 원거리의 종양에 대한 표적치료제로의 가능성이 보인다.

그람 음성 박테리아의 주요 세포벽 성분으로, LPS는 감염 시에 병원체가 숙주 조직에서 군집화 하는데 필요 요소이며, 생화학적으로 인산당지질로 구성되어 있다. 일반적으로 세균을 이용한 치료제 개발의 공통적인 특징은 경정맥으로 고농도의 세균을 투여하기 때문에 독성이 적어야 하며, 정상 숙주세포에 대한 관용성을 유지하는 것이 중요하다. 이를 위하여 직접적으로 LPS의 결합에 역할을 하는 효소를 유전자 코딩의 불활성화 하거나 간접적인 방법으로 LPS의 결합을 조절하는 방법으로 이를 유지한다. 이러한 전략에서, 박테리아는 숙주의 조직 즉, 종양에 정착할 수 있는 능력을 유지하고, 감염질환을 일으키지 않는 박테리아로 조작된다.

S. Typhimurium strain VNP20009는 유전자조작 박테리아로 LPS를 합성하지 못해서, 인체에서 면역원성이 적어 환경의 감지, 적응 및 생존에 용이하다 (Table 2).⁵ 약독화 혈청

Table 2. Bacteria tested in controlling experimental tumors

Species (Strain)	Host	Tumor	Site	Route	Outcome (s) ^a	Effector (s)
<i>S. Typhimurium</i> (VNP20009) ^b	Mice (Nude)	Melanoma, breast, lung, colorectal cancer cell lines - Allo/Xenografts	s.c.	i.v.	Tumor growth reduced ⁵⁶ and ⁵⁷	Independent of T or B cells
<i>S. Typhimurium</i> (LH430) ^c	BALB/c nude	SiHa (CC - Xenograft)	s.c.	i.v.	Tumor growth reduced ⁵⁸	Apoptosis
	BALB/c	CMS5 (Sarcoma - Syngeneic)	s.c.	p.o.	Only NY-ESO-1-positive tumors are eliminated ²³	CD8+ cell mediated
	C57BL/6	expressing human NY-ESO-1 H22 (HCC - Syngeneic)	Orthotopic	p.o.	Tumor growth reduced ³⁴	CD8+ cell mediated
<i>S. Typhimurium</i> (amino acid (s) auxotroph (s)) ^d	C57BL/6	RM1 (PC - Syngeneic)	Orthotopic	i.v.	Tumor growth reduced ³³	Apoptosis
	C57BL/6	RM1 (PC - Syngeneic)	s.c.	i.v.	Tumor growth reduced ³⁶	Apoptosis
	BALB/c	CT-26 (CRC - Syngeneic)	s.c.	i.v.	Tumor growth reduced ⁴¹	Not reported
	DBA/2	P815 (Mastocytoma - Syngeneic)	s.c.	p.o.	Tumor growth reduced ¹⁰	CD8+ cell mediated
	Nude mice	MARY-X (BC - Xenograft)	Orthotopic	i.v.	Tumor growth reduced ⁵⁹	Not reported
	C57BL/6	B16G3.26 (Melanoma - Syngeneic)	s.c.	p.o.	Tumor growth and metastases reduced ²⁶	CD8+ cell mediated
	BALB/c	CT-26 (CRC - Syngeneic)	i.v.	p.o.		

^aWith respect to control (s).

^bA purine auxotroph (Δpur) lacking the secondary myristyl chain ($\Delta msbB$) in LPS.

^cA two-component system mutant ($\Delta phoP \Delta phoQ$).

^dAmino acid auxotrophs ($\Delta laro$, Δhis , Δarg , Δleu etc) - single or double mutants. Base on Nallar et al.⁵⁵ with minor modification.

Table 3. Bacterial therapy for controlling tumor growth - a summary of pre-clinical and clinical trials

Species (strain) ^a	Identifier	Tumor (sample size)	Outcome (s)	Effector (s)	
<i>S. Typhimurium</i> (VNP20009)	NCT00004216	Metastatic melanoma (24)	Focal tumor colonization in 3 patients	No tumor shrinkage ⁸	Not applicable
	NCT00004988	Metastatic melanoma (4)	Tumor biopsy culture positive in 1 patient	No tumor shrinkage ⁶	Not applicable
	NCT00006254	Squamous cell carcinoma (3)	Tumor colonization in 2 patients	No tumor shrinkage ⁸	Not applicable
	Pre-clinical Dog	7 types (35)	Responders: 4 (complete), 2 (partial), 2 (stable)	Overall survival was better in complete responders ⁹	Not reported
<i>S. Typhimurium</i> (χ 4550) ^b	NCT01099631	Hepatocellular carcinoma (22)	Terminated - reason (s) not disclosed	-	
<i>S. Typhi</i> (VXNM01) ^c	NCT01486329	Pancreatic cancer (72)	Reduction in tumor perfusion after vaccination. Fate of tumors not disclosed ⁶⁰	Teffector cells?	

^aA gram-positive soil-dwelling spore-forming obligate anaerobic non-pathogenic bacterium.

^bA triple mutant (*asd*, *crp*, *cya*) secreting human IL2.

^cA Ty21a host carrying mammalian expression plasmid for full-length human VEGFR2. See⁶¹ for details about Ty21a. Base on Nallar et al.⁵⁵ with minor modification.

형 *S. Typhimurium* strain VNP20009 개발은 인체에서 전임상 1상 시험과 동물에서 전임상시험을 하는 동안 강한 면역 및 독성의 부작용을 나타내지 않고,^{6,8} 마우스 종양 모델에서 종양 조직 내에 군집화하는 것이 보고되었다.⁹ 이 실험의 결과를 바탕으로 하여 현재 정위성 (orthotopic) 및 이소성 (heterotopic) 동물모델에서 이를 이용한 종양억제 효과를 입증하는 실험이 다양한 방법으로 진행 중에 있는데, 주로 세균의 기본 독성, 면역인자의 전달, cytotoxin의 발현, 호스트 항원, 성장조절제, 유전자 침묵 에이전트, 전구 약물의 활성화 (Bacterial Type-1 Secretion System: T1SS, Type-3 Secretion System: T3SS), mammalian expression cassettes의 세포 내 분비 등을 이용하며 본문에서는 이에 대한 설명을 할 예정이다.

항암기전

T1SS는 hly와 tol 유전자에서 유래된 chaperone-dependent machinery utilizing 단백질들로 구성되어 있으며 박테리아는 일반적으로 생존을 위하여 T1SS를 통해 외독소를 분비한다. 예를 들어 a-hemolysin (HlyA)는 uropathogenic *E. coli*에서 분비하는 외독소로 숙주 세포에서 구멍을 생성하여 혈액 세포뿐만 아니라 종양 세포를 용해시킬 수 있는 능력을 갖는다. 항암치료에서 T1SS는 전립선 특이항원 (PSA)을 발현하는 유전적 동계 마우스 비만세포 중에 대해 CD8+ 임파구 매개 반응을 유발하는 연구에서 인간 PSA를 전달하는 전달체로 사용되었다.¹⁰ 또한 arabinose-inducible¹¹과 hypoxia-inducible 박테리아 프로모터¹²를 사용한 재조합 *S. Typhimurium*에서 T1SS에 의하여 분비된 HlyE가 CD8+ 임파구에 의존하지 않고 종양 억제효과를 유발하여 종양성장의 감소함을 보고하였다. 최근에는 산성의 pH에 의하여 종양 괴사를 유도하는 시가독소 (Stx2)를 분비하는 프로모터를 장착한 재조합 *S. Typhimurium*가 개발되었다.¹³ 결과적으로 세균을 이용한 항암효과를 유발하는 기전은 크게 면역반응을 유발하는 방법과 면역방법과는 독립적인 방법으로 나눌 수 있으며, 세균에 대한 유전자조작기술을 이용하여 이들 방법으로 항암효과를 극대화시킬 수 있다.

1. 세포 사멸 유도체

종양세포를 감소시키는 가장 이상적인 방법은 내인성 세포 사멸 유도인자가 종양세포를 표적으로 하여 이를 전달하는 방법으로 *S. Typhimurium*의 자연 종양 친화성은 이에 대한 연구를 하는데 중요한 유도체가 되고 있다. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)는 종양 세포의 세포 사멸을 유도하는 사이토카인으로 death receptors (DR) 4와

DR5가 결합하여 caspase-8을 활성화하고 세포 사멸로 이어지는 하위 작용인자인 caspase (-3, -6 및 -7)를 활성화한다.¹⁴ 방사선-유도 recA 프로모터의 조절 하에 TRAIL을 발현하는 재조합 *S. Typhimurium*는 BALB/c 마우스에서 유방암의 성장을 억제하였다.¹⁵ TNF 연관 사이토카인인 FASL은 세포막에 존재하는 수용체인 FAS에 결합하여 세포사멸을 유도하고 암의 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁶ 삼투압에 의하여 조절되는 ompC 프로모터 하에서 Fasl을 분비하는 재조합 *S. Typhimurium*는 BALB/c 마우스에서 유방암과 대장 종양의 성장을 감소시켰다.¹⁷

2. 면역증강효과

인체의 면역 시스템은 사이토카인을 이용하여 악성 세포를 조절하는 것으로 생각되나, 사이토카인 요법은 전신독성을 유발하므로 항암치료에 잘 사용되지는 않는다. 그러나, *S. Typhimurium*의 종양 친화성을 이용하여 종양을 표적으로 면역 반응과 사이토카인의 전달은 전신독성을 일으키지 않고 항암면역효과를 유발할 수 있다. Interleukin (IL)-2, IL-4, IL-18, CC chemokine-21 (CCL21), TNFSF14 등이 항암효과를 유발하는 사이토카인으로 알려져 있으며, 이들 항암 사이토카인의 발현은 종양환경에서 다른 사이토카인의 합성을 유도하고, 면역세포의 유도체 역할을 한다. 특히 IL-2는 주로 세포독성 T 임파구를 활성화하여 항암효과를 유발하는데, 전이성 신세포암 및 흑색종에 대한 치료제로 임상에서 사용이 되고 있다. 재조합 *S. Typhimurium*에 의한 IL-2의 합성은 NK 세포의 활성을 유도하고 전이성 간암의 크기 감소를 유발하며,¹⁸ 최근 골육종 마우스 모델에서 폐전을 억제하는 것으로 보고되었다.¹⁹ CCL21과 TNFSF14를 발현하는 재조합 *S. Typhimurium*는 종양주변에 백혈구 및 호중구의 침착을 유도하여 암세포의 성장을 억제한다고 보고하였다.^{20,21}

3. 항암면역

최근 연구에서 효율적인 후천적 항암 면역반응을 유지하기 위해서 적당한 선천면역체계를 자극하는 중요성에 대한 연구가 보고되었는데, 이는 종양이 생체 내에서 발전함에 따라 'immunoediting' 과정을 유발하는 것으로 알려져 있다.²² 이 과정은 세단계, 즉 elimination, equilibrium, escape로 구성되는데, elimination은 항암면역을 통하여 종양의 크기를 감소시킨다. Elimination 후, 잔류 종양세포 및 항암면역인자들은 equilibrium 단계로 존재하는데, 이때는 종양의 성장도 항암면역도 일어나지 않는다. Equilibrium 단계에서 암세포는 종양항원을 발현하지 않거나 항암면역에 저항하는 암세포로의 변이를 유발할 수 있으며, 이 단계는 몇 년간

유지될 수 있다. 노화에 따른 면역체계의 약화는 결국 암세포의 escape을 유발하여 종양의 성장을 유발한다. 따라서 elimination에서 equilibrium 단계로 진행되는 동안 항원의 공급은 지속적인 항암면역을 유지하게 한다.

T3SS는 강력한 면역반응을 유도하는 항원전달체로 사용할 수 있는데, T3SS는 약 30가지 단백질로 구성되어 있고, 그 구조는 주사기의 바늘과 형태가 유사하다. 병원성 박테리아는 T3SS를 사용하여 독성인자를 세포 내로 주입하는데, 예를 들어 살모넬라 균에 의한 sop/sip 유전체의 전달 및 장내 유해 대장균에 의한 시가독소가 T3SS를 통한 다. *S. Typhimurium* T3SS를 통해 sopE-NY-ESO-1 융합 단백질을 전달하도록 설계하였을 때, 흑색종 발현항원 (NYESO-1)에 대한 세포 매개성 면역 (CD8+)이 증가함이 보고되었다.²³ 역으로, 암세포주가 *S. Typhimurium*의 T3SS 단백질의 일부분을 발현하도록 재조합하였을 때 CD8+ 세포 반응의 증가를 보고하였으며, 이는 종양 특이 CD8+ 세포가 종양환경에 존재하지만 활성화 되지 않기 때문으로 생각된다.²⁴ *S. Typhimurium*를 통해 전달된 항원이 발현하여 면역 시스템이 활성화 되었을 때, 종양은 CD8+와 CD4+ 세포의 작용에 의해 억제된다.

4. 종양 성장억제를 위한 박테리아 유전자 전달 시스템

대식세포에서 *S. Typhimurium*은 세포질 안으로 플라스미드를 유도하는 능력을 가지는데, 약독화된 *S. Typhimurium*의 종양친화성을 함께 이용하여 종양 내에 재조합 DNA를 삽입한다.²⁵ 대부분의 종양은 성장과 다른 조직으로의 확산을 위하여 혈액 공급을 필요로 하기 때문에 혈관 신생을 예방하는 것이 중요하다. VEGFR2는 VEGF 결합시 활성화되는 티로신 키나제 수용체로 내피세포 증식과 새로운 모세혈관을 위해서, VEGFR2의 활성화가 필요하며, 이 수용체를 이용하여 종양의 성장과 다른 조직으로의 확산은 조절할 수 있다. VEGFR2 (Flk-1) 유전자를 포함한 플라스미드를 가진 *S. Typhimurium*를 마우스에 경구 투여 시에 종양 세포 뿐만 아니라 종양 내 기질세포에서도 발현이 되므로 종양 내 모든 세포에 대하여 면역효과를 유발할 수 있다.²⁶ VEGFR2에 특이적인 비장에서 유래된 세포독성임파구의 존재는 면역효과의 유발을 나타냄을 보고하였으며, 최근 VEGFR2의 미니 유전자 주입이 T 세포에 매개된 종양 억제 및 혈관생성의 억제하는 결과가 보고되었다.²⁷

또한 최근에 종양의 종류나 병기에 상관없이 적용할 수 있는 텔로머레이즈 프로모터의 발현에 관여하는 pro-apoptotic 단백질, CASP8과 CASP9을 각각 활성화하는 TNFSF10 (TRAIL)와 DIABLO (SMAC)에 대한 연구가 진행되고 있다. SMAC로 알려진 DIABLO는 cytochrome-c와 함께 cas-

pase의 활성화를 촉진하는 미토콘드리아 단백질로 caspase를 억제하는 inhibitor of apoptosis proteins (IAP)의 억제를 통하여 세포사멸을 증가시킨다.²⁸ 종양의 성장억제의 시너지 효과가 개별제제와 비교하여 human telomerase reverse transcriptase (hTERT) 프로모터로부터 공동 발현되는 TRAIL와 DIABLO가 동시 발현 시에 상승하는 것으로 보고되고 있다.²⁹

최근에 전사 인자인 STAT3가 연구 주제로 각광 받고 있는데 STAT3은 사이토카인 수용체를 통한 신호의 전달에 중요한 역할을 하는 세포질 전사인자이다. 사이토카인 자극 경로에서 예를 들면, 핵에서 IL-6, JAK로 유도 되는 STAT3의 인산화는 Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) 같은 억제인자를 포함한 여러 표적유전자의 전위 및 전사를 유도한다.³⁰ 같은 기간 동안, SOCS 단백질은 JAK에 결합하고 재자극으로부터 STAT을 억제하나 악성세포에서 STAT3의 지속적인 활성화는 JAK에 의해 독립적으로 일어나는 것으로 생각된다. 다수의 활성화된 tyrosine kinase oncoproteins, 예를 들어 Src family,³¹ p56Lck, ETK, Eyk, Ros와 등은 tyrosine kinases 수용체를³² 활성화하여 STAT3 활성화를 촉진하고 세포성장 관련 유전자 발현, 면역억제 및 전이의 원인이 되며, STAT3에 반응하는 유전자는 세포성장의 자극에 관여하는 cyclin D1 또는 세포사멸을 저해하는 Bcl-XL 등이 있다. 전립선암 세포주 (RM1)의 성장은 정위성 동물모델에서 *S. Typhimurium*로 유도된 RNAi에 의해서 STAT3가 고갈 되었을 때 억제된다.³³ Bcl2, Ccnd1 그리고 Vegf 와 같은 STAT3에 의한 전사 증가 유전자의 억제로 새로운 혈관형성이 억제되고, 생체 내에서 성장한 RM1 세포는 STAT3의 고갈과 함께 Myc 단백질의 감소로 세포사멸을 유발한다.³³ Hif-1a와 Mmp2는 STAT3가 억제되었을 때, 정위성 동물모델 내 간암세포주 (H22)에서 억제되고 NK와 CD8+T세포의 증가와 함께 조절 T 세포 (CD25+Foxp3+)의 감소가 비장에서 관찰되었다.³⁴ BCL2의 직접적인 억제는 마우스의 생존 연장과 함께 종양 크기의 감소를 유발하는 것으로 보고되었다.³⁵ 앞서 언급한 이중사멸 유도 단백질의 발현과 유사하게, 성장 억제 단백질은 개별 유전자 산물 중에 하나에 비해 상승된 종양 성장 효과 억제와 함께 발암성 생산물을 대상으로 shRNA를 코딩하는 *S. Typhimurium*으로 유도되는 이중 발현 카세트다. 단독 또는 endostatin 발현과 함께하는 STAT3 단백질 억제는 정위성 전립선 암세포 (RM1) 종양을 제어하는데 도움이 될 것으로 보고되었다.³⁶

실험종양의 사멸에서 엄청난 성공에도 불구하고, 종양을 조절하기 위하여 박테리아를 단독으로 사용한 전임상과 1상실험은 실패하였다. 암을 조절하기 위해 박테리아 치료를 사용하는 임상시험에 대한 문헌 조사는 그들 중 누구도

연구의 결과를 제시하지 못하고 일부는 종료되었다. 심지어 *S. Typhimurium*의 종양 내 주입은 종양의 위축 결과 없이 단기적으로 종양에 군집을 이루는 것으로 보고하였다 (Table 3).⁷ 이 장벽은 종양 조절제로 *S. Typhimurium*의 가능성에 대한 추가적인 연구를 필요로 한다. 마지막으로, 재조합 유전자 전달 시스템 (shRNA와 종양 억제제)의 가능성은 충분히 임상연구에 활용되지 않았으나, 전 임상실험의 결과는 기대가 되며, 임상실험이 진행되도록 추가적인 연구가 필요하다.

현재까지의 제한점 및 과제

예방접종 전략은 면역관용을 깨 수 있도록 하는데 있으며, 자가항원 발달 또는 *S. Typhimurium*에 의한 항원 발현 종양 세포에 대한 대식세포/항원제시 세포에 의해 순환 CD8+T 임파구의 활성화가 일어나고, 항암면역반응이 일어난다. 종양의 혈관 신생과 같이 특정 상황에서 발현하는 항원은 VEGFR2 (Fik-1)의 세포외 도메인이 종양 성장을 억제하고 폐암의 전이를 억제하는 것에 의해 증명된 것처럼 이 방법을 사용하는 대상으로 할 수 있다.³⁷ 면역 시스템의 발현 또는 DNA 백신 같은 화학요법의 상승 작용은 경우는 종양에 대한 숙주의 반응을 촉진한다.¹⁰

자연 환경에서 살모넬라균은 하부 위장관의 세포를 통해 인체로 침입하는데, 주로 파이어스 패치의 microfold 세포에서 침입이 일어난다. 하부 위장관은 수많은 미생물이 풍부한 곳이기 때문에, 인체는 박테리아와 장내 세균총을 구별하는 여러가지 방법을 사용하는데 IgA에 의해 제공되는 점막 면역은 장내 병원균을 제어하는 방어체계이다. 또한 인체에서, 선천면역은 점막에 상주하는 세포 즉, 수지상 세포와 대식 세포에서 리소좀을 이용하여 침입한 살모넬라균을 제거하며, 심한 경우에는 호중구까지 이용된다.³⁸ 그러나 장티푸스 혈청형 변이주는 이것을 회피하고 점막 면역을 자극을 최소화 함으로써 더 깊은 조직에 접근 하는 것으로 알려져 있다.³⁹ SPI에 의해 코딩된 독성 인자들의 T3SS를 매개 전달이 광범위 하게 연구되었으나, 이는 다양한 임상상황이나 인체인자에 의하여 영향을 많이 받는다.⁴⁰ 드문 경우, *S. Typhimurium*가 장에 오랜 시간 있으며, 종종 무증상이 나타나는데, 이는 장내 세균총으로 의하여 유발되는 것으로 생각된다. 일정하게 유전자를 전달할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요하다.

앞에서 언급한 바와 같이 *S. Typhimurium*은 전신순환으로 들어가는 것처럼 마우스에서 장티푸스 같은 질병을 유발할 수 있는데, 전신 순환을 통해 *S. Typhimurium*이 비 통상적 위치에 군집 하였을 때 호중구와 림프구의 활성이 보다 빠

르게 증가하게 된다.⁴¹ 이 과정에서 분비된 사이토카인은 종양 근처에서 혈관 파괴를 강력하게 유도하는 것이 보고되었다.⁴² 면역세포가 도착하기 전 몇 시간 동안 박테리아 군집이 있던 곳이 괴사되고 암세포의 괴사도 같이 일어나게 되는데, 종양의 가장자리의 종양세포는 생존하여 추후에 재발하게 된다.⁴³ 마우스에서 연구의 대부분은 자연에서 단기간이기 때문에, 하나는 종양 크기에서 초기 감소 설명일 가능성이 있으며, 오직 동계 CT26 대장암세포를 사용한 BALB/c 에서만 입증 되었다.⁴³ 따라서 향후 연구에서 종양에서 반응과 특정세포유형의 특징을 확인 하고 관련이 된 경우 장기간의 연구를 할 필요가 있다. 암세포주를 이용한 실험에서 주입된 *S. Typhimurium*이 세포 내에서 분리 및 배양이 되지만, 실제 동물실험에서 괴사 영역,⁴⁴ 세포간 공간^{34,41} 및 세포 내에서 분리된 배양 보고는 매우 드물다. 대식세포가 생체 내에서 세균의 숙주역할을 하는 것으로 알려져 있지만 인간의 종양세포 안에 살아있는 *S. Typhimurium*의 존재는 증명되지 않았다.

1상 임상실험에서 나타난 문제점은 투여 6시간 후에도 혈액에서 약독화된 *S. Typhimurium* VNP20009가 남아있는 것이다. 이 돌연변이는 인간에서 혈성쇼크를 유발하지 않을 정도의 소량의 TLR4 작용제인 LPS를 합성하고,⁴⁵ 인간의 TLR4-MD2-CD14복합체는 LPS를 인지한다.⁴⁶ 그러므로, 인간의 면역 시스템 및 혈액 성분은 약독화된 *S. Typhimurium* VNP20009에 대해 면역 작업을 할 가능성이 있다. 감염시 호중구는 neutrophil extracellular trap (NETs)이라고 불리는 세포구조에서 식균 작용 과 병원균을 제어하는 선천면역계의 첫번째 세포이다.^{47,48} 만성 육아 종성 질환은 과립 식세포의 산화 버스트 능력의 결함으로 인해 카탈라아제 양성 미생물이 재발성 감염을 일으킬 조건이다. *S. Typhimurium*의 카탈라아제 양성에도 불구하고, 숙주의 생존은 독립적으로 나타난다.⁴¹ 마우스의 실험 종양에서 종양주변 호중구와 유사하게 인간에서도 종양주변 호중구가 나타나며,⁴⁹ 인간에서, *S. Typhimurium*은 HIV 또는 활성화된 말라리아 감염처럼 특별히 면역으로 손상된 개인의 혈류로 들어갈 수 있는 것으로 알려져 있다. 비록 *S. Typhimurium*의 효과적인 제어를 증명하고 있는 마우스의 대체 전달 실험은 CD8+에 의존적이거나, 감염의 초기 단계에서 CD4+세포의 기능과의 간섭은 빈번한 재감염의 결과를 나타낸다.⁵⁰

이 외에도 생체 또는 특정 다른 *S. Typhimurium* 성장 특징은 의미 있는 결론을 도출하기에 부족하다. 체질량의 혈액량은 인간과 생쥐 사이에서 비교 할 경우에도 유효한 박테리아 농도는 *S. Typhimurium*에 투여량을 위해 혈액량에 의존한다. 따라서, 적정 양으로 순환하는 박테리아는 효과적인 종양 정착을 위한 전제 조건이다. 이 외에도, 마우스와

인간의 면역세포 사이에서 종 특이적인 차이가 있는데, 마우스의 혈액이 호중구가 풍부한 상태에서 인간의 면역세포는 일산화 질소로 유도될 수 없는 상태에서도 마우스 대식세포는 유도된다. 마우스는 혈중 사이토카인의 높은 농도에서도 내성이 있는 것으로 알려져 있는데, 인간의 경우에는 심각한 진신 독성 효과 및 급성 이상 반응의 원인이 된다. 따라서 치료를 위한 세균의 용량 결정은 중요하며, 이 용량의 평가를 위한 이상적인 시스템은 인간이 될 것이다.⁵¹ 최소한 사용할 수 있는 *S. Typhimurium* 백신균주는 정맥으로 안전하게 투여할 수 있다. 대안적으로, 인간의 줄기세포를 개체로 이식한 마우스 모델은 향후의 연구에 중요한 모델이 되고 있다.⁵²

적극적으로 환자의 생존에 영향을 미칠 것으로 알려진 미생물에 대해 유일하게 연구가 많이 된 분야가 squamous cell carcinoma (SCC)에서 human papilloma virus (HPV)이다. 고위험 HPV가 SCC의 발생을 증가시키지만, 암의 치료 및 생존에 대하여 긍정적인 예후인자이다. 또한 p53과 p16, GRIM-19 등과 같은 항암유전자의 유전자적 변형을 가진 HPV 음성의 SCC에 비교했을 때 p53, p16, GRIM 19이 wild type을 가진 HPV 양성 종양은 정상적인 미토콘드리아 단백질 조성을 가진다. 비면역세포에서, GRIM-19 단백질은 살모넬라에 의해서 상승하며, 이는 NOD2 신호 축을 통해 NF- κ B를 활성화 하여 선천면역반응에 기여한다.⁵³ 최근, Grim-19+/- 수컷 마우스는 대부분 황색 포도상 구균에 의해, 자연적으로 요로 감염이 발생하기 쉬운 것으로 보고되었고 면역반응의 손상을 가지고 있다.⁵⁴ GRIM-19로 유도된 선천 반응은, 종양성장을 촉진하는 내인성 STAT3에 의존적인 유전자 발현에 대한 조절로서 기능을 할 수 있다.

결 론

많은 인간의 질병의 주요 플레이어와 같은 마이크로 바이옴의 출현과 함께, 치료제로서 박테리아는 상당한 관심을 얻고 있다. 박테리아 혼자 전체적인 치료가 되지 않을 수도 있지만, 항암제로의 변화, 항종양 유전자 또는 면역 원성 항원을 단독 또는 조합하여 치료효과를 높이는 방향으로 연구가 되고 있으며, 이러한 치료제는 기존의 화학요법과 방사선 치료와 함께 미래의 대체 또는 보조 요법이 될 수 있다. 항암제로서의 박테리아의 성공은 억제 할 수 있는 종양의 크기 및 안정성에 의존 할 것으로 보인다. 향후 분석에서, 혈액을 매개로 하는 박테리아는 간 및 비장에서 자연적으로 존재하는 것처럼 종양을 표적으로 한 박테리아의 개발이 중요하다. 또한 아직 생체 내 분포와 박테리아 산물의 독성에 대해 중요한 문제가 남아있으며, 이는 치료제의

캐리어로서 박테리아의 향후 개발에서 고려되어야 한다.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology, Republic of Korea (2015R1A1A1A0500110), and (2015R1A2A1A15054364).

REFERENCES

- Cummins J, Tangney M. Bacteria and tumours: causative agents or opportunistic inhabitants? *Infect Agents Cancer* 2013;8
- Dang LH, Bettgowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:15155-60
- Liu F, Zhang L, Hoffman RM, Zhao M. Vessel destruction by tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R is enhanced by high tumor vascularity. *Cell Cycle* 2010;9:4518-24
- Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro. *Biotechnology and Bioengineering* 2006;94:710-21
- Miller SI, Loomis WP, Alpuchearanda C, Behlau I, Hohmann E. The Phop Virulence Regulon and Live Oral *Salmonella* Vaccines. *Vaccine* 1993;11:122-5
- Heimann DM, Rosenberg SA. Continuous intravenous administration of live genetically modified *Salmonella typhimurium* in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 2003;26:179-80
- Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the E-coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther* 2003;10:737-44
- Toso JF, Gill VJ, Hwu P, et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2002;20:142-52
- Thamm DH, Kurzman ID, King I, et al. Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting *Salmonella typhimurium* to dogs with spontaneous neoplasia: Phase I evaluation. *Clin Cancer Res* 2005;11:4827-34
- Fensterle J, Bergmann B, Yone CLRP, et al. Cancer immunotherapy based on recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B. *Cancer Gene Ther* 2008;15:85-93
- Nguyen VH, Kim HS, Ha JM, Hong YJ, Choy HE, Min JJ.

- Genetically Engineered Salmonella typhimurium as an Imageable Therapeutic Probe for Cancer. *Cancer Res* 2010;70:18-23
12. Ryan RM, Green J, Williams PJ, et al. Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors. *Gene Ther* 2009;16:329-39
 13. Flentie K, Kocher B, Gammon ST, Novack DV, McKinney JS, Piwnica-Worms D. A Bioluminescent Transposon Reporter-Trap Identifies Tumor-Specific Microenvironment-Induced Promoters in Salmonella for Conditional Bacterial-Based Tumor Therapy. *Cancer Discov* 2012;2:624-37
 14. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-82
 15. Ganai S, Arenas RB, Forbes NS. Tumour-targeted delivery of TRAIL using Salmonella typhimurium enhances breast cancer survival in mice. *Brit J Cancer* 2009;101:1683-91
 16. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* 2015;22:549-59
 17. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. Inhibition of tumor growth using Salmonella expressing Fas ligand. *J Natl Cancer I* 2008;100:1113-6
 18. Saltzman DA, Heise CP, Hasz DE, et al. Attenuated Salmonella typhimurium containing interleukin-2 decreases MC-38 hepatic metastases: A novel anti-tumor agent. *Cancer Biother Radio* 1996;11:145-53
 19. Sorenson BS, Banton KL, Frykman NL, Leonard AS, Saltzman DA. Attenuated salmonella typhimurium with IL-2 gene reduces pulmonary metastases in murine osteosarcoma. *Clin Orthop Relat R* 2008;466:1285-91
 20. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:12879-83
 21. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. Salmonella typhimurium engineered to produce CCL21 inhibit tumor growth. *Cancer Immunol Immun* 2009;58:769-75
 22. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329-60
 23. Nishikawa H, Sato E, Briones G, et al. In vivo antigen delivery by a Salmonella typhimurium type III secretion system for therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest* 2006;116:1946-54
 24. Panthel K, Meinel KA, Domenech VES, et al. Prophylactic anti-tumor immunity against a murine fibrosarcoma triggered by the Salmonella type III secretion system. *Microbes Infect* 2006;8:2539-46
 25. Darji A, Guzman CA, Gerstel B, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated S-typhimurium. *Cell* 1997;91:765-75
 26. Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, et al. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat Med* 2002;8:1369-75
 27. Diaz LA, Cheong I, Foss CA, et al. Pharmacologic and toxicologic evaluation of C-novyi-NT spores. *Toxicol Sci* 2005;88:562-75
 28. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000;102:43-53
 29. Fu W, Chu L, Han XW, Liu XY, Ren DM. Synergistic anti-tumoral effects of human telomerase reverse transcriptase-mediated dual-apoptosis-related gene vector delivered by orally attenuated Salmonella enterica Serovar Typhimurium in murine tumor models. *J Gene Med*. 2008;10:690-701
 30. Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 2006;6:602-12
 31. Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metast Rev* 2003;22:337-58
 32. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. Timeline - The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:361-70
 33. Zhang L, Gao LF, Zhao LJ, et al. Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs. *Cancer Res* 2007;67:5859-64
 34. Tian Y, Guo B, Jia H, et al. Targeted therapy via oral administration of attenuated Salmonella expression plasmid-vectored Stat3-shRNA cures orthotopically transplanted mouse HCC. *Cancer Gene Ther* 2012;19:393-401
 35. Yang N, Zhu XY, Chen LS, Li SH, Ren DM. Oral administration of attenuated S-typhimurium carrying shRNA-expressing vectors as a cancer therapeutic. *Cancer Biol Ther* 2008;7:147-52
 36. Li X, Li Y, Wang B, et al. Delivery of the co-expression plasmid pEndo-Si-Stat3 by attenuated Salmonella serovar typhimurium for prostate cancer treatment. *J Cancer Res Clin* 2013;139:971-80
 37. Xiang R, Luo YP, Niethammer AG, Reisfeld RA. Oral DNA vaccines target the tumor vasculature and microenvironment and suppress tumor growth and metastasis. *Immunol Rev* 2008;222:117-28
 38. Santos RL. Pathobiology of Salmonella, intestinal microbiota, and the host innate immune response. *Front Immunol* 2014;5
 39. Gal-Mor O, Boyle EC, Grassl GA. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal Salmonella enterica serovars differ. *Front Microbiol* 2014;5
 40. Hurley D, McCusker MP, Fanning S, Martins M. Salmonella-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol* 2014;5
 41. Westphal K, Leschner S, Jablonska J, Loessner H, Weiss S. Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. *Cancer Res* 2008;68:2952-60

42. Leschner S, Westphal K, Dietrich N, et al. Tumor Invasion of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is Accompanied by Strong Hemorrhage Promoted by TNF- α . *Plos One* 2009;4
43. Agrawal N, Bettgowda C, Cheong I, et al. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:15172-7
44. Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer Res* 2007;67:3201-9
45. Kong QK, Six DA, Liu Q, et al. Palmitoylation State Impacts Induction of Innate and Acquired Immunity by the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium msbB Mutant. *Infect Immun* 2011;79:5027-38
46. Akashi S, Nagai Y, Ogata H, et al. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int Immunol* 2001;13:1595-9
47. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:577-82
48. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007;176:231-41
49. Feasey NA, Dougan G, Kingsley RA, Heyderman RS, Gordon MA. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet* 2012;379:2489-99
50. Griffin AJ, McSorley SJ. Development of protective immunity to *Salmonella*, a mucosal pathogen with a systemic agenda. *Mucosal Immunol* 2011;4:371-82
51. Jones C, Darton TC, Pollard AJ. Why the development of effective typhoid control measures requires the use of human challenge studies. *Front Microbiol* 2014;5
52. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* 2012;12:786-98
53. Barnich N, Hisamatsu T, Aguirre JE, Xavier R, Reinecker HC, Podolsky DK. GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280:19021-6
54. Bartholomay LC, Cho WL, Rocheleau TA, et al. Description of the transcriptomes of immune response-activated Hemocytes from the mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. *Infect Immun* 2004;72:4114-26
55. Nallar SC, Xu DQ, Kalvakolanu DV. Bacteria and genetically modified bacteria as cancer therapeutics: Current advances and challenges. *Cytokine* 2016
56. Luo X, Li ZJ, Lin S, et al. Antitumor effect of VNP20009, an attenuated *Salmonella*, in murine tumor models. *Oncol Res* 2001;12:501-8
57. Sznol M, Lin SL, Bermudes D, Zheng LM, King I. Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *J Clin Invest* 2000;105:1027-30
58. Li X, Li Y, Hu JD, et al. Plasmid-based E6-specific siRNA and co-expression of wild-type p53 suppresses the growth of cervical cancer in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2013;335:242-50
59. Zhao M, Yang M, Ma HY, et al. Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer Res* 2006;66:7647-52
60. Schmitz-Winnenthal FH, Hohmann N, Niethammer AG, et al. Anti-angiogenic activity of VXM01, an oral T-cell vaccine against VEGF receptor 2, in patients with advanced pancreatic cancer: A randomized, placebo-controlled, phase 1 trial. *Oncoimmunology* 2015;4
61. Kopecko DJ, Sieber H, Ures JA, et al. Genetic stability of vaccine strain *Salmonella Typhi* Ty21a over 25 years. *Int J Med Microbiol* 2009;299:233-46