

## 크론병 환자와 그 친척들에서 장내 세균 조성의 이상

서울대학교 의과대학 내과학교실

강승주 · 임종필

### Dysbiosis of the Faecal Microbiota in Patients with Crohn's Disease and Their Unaffected Relatives (Gut 2011;60:631-637)

Seung Joo Kang, M.D., Jong Pil Im, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

#### 요 약

크론병의 병인에서 장내 세균이 중요한 역할을 함은 이미 잘 알려져 있다. 이 연구는 크론병 환자들의 대변에서 세균 조성을 살펴보고 정상인과 어떻게 다른지, 또 환자들의 가까운 친척들에서도 정상인과는 다른 microbiota의 이상 소견이 있는지를 알아보기 위해 시행되었다. 대상이 된 환자군은 벨기에의 세 명 이상의 크론병 환자가 포함되어 있는 가계(family)를 중심으로 하였다. 3명 이상의 크론병 환자를 포함한 21개의 가계와 1명의 환자만을 포함한 4개의 가계에서 68명의 크론병 환자와 84명의 정상인 크론병 환자의 친척, 그리고 환자군 가계와 연령, 성별이 matching된 크론병 환자들이 포함되지 않은 정상 가계 10개에서 55명의 정상 성인이 분석 대상이었다.

각 대상의 장내세균 분석을 위해서 16S rRNA의 유전자의 증폭 후 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis를 이용하였다. 이는 군집 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 위해서 미생물에서 공통적으로 가지고 있는 16S rRNA 유전자의 hypervariable V3 region을 대상으로 증폭을 시행한 후 DGGE gel에 영동시켜 각 개인의 주요한 분변 장내세균을 프로파일링하는 방법이다. 각 밴드의 강도를 분석하여 환자군, 환자의 친척군, 일반인군에서

유의한 차이를 보이는 밴드를 잘라내어 그 안의 DNA를 추출해 RT-PCR로 sequencing을 시행하고 그 결과를 clustering analysis를 통해 미생물 종을 알아내는 방법을 이용하였다.

크론병 환자군과 정상군(정상 친척들 및 대조군)을 비교하였을 때 양군의 DGGE profiling 중에 207개의 밴드 중 차이를 보인 75개의 밴드에 대해 Bonferroni 보정을 시행한 후 유의한 6개의 밴드를 분리해서 RT-PCR을 통해 정량적 염기 서열 분석을 시행하였다. 각 밴드의 염기서열 분석 결과를 BLAST analysis에서 얻어진 GenBank 염기서열과 그 일치도를 바탕으로 각각의 종을 분석한 결과 *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*), unknown species of Clostridium cluster XIVa, *Ruminococcus gnavus* (*R. gnavus*), *Dialister invisus* (*D. invisus*), *Bifidobacterium adolescentis* (*B. adolescentis*)와 일치되었다. 정량적인 PCR 결과를 보면 *D. invisus* ( $P=0.04$ ), unknown species of Clostridium cluster XIV1 ( $P=0.03$ ), *F. prausnitzii* ( $P<1.3\times 10^{-5}$ )로 나타났으며, *B. adolescentis* ( $P=5.4\times 10^{-6}$ )의 경우에는 크론병 환자군에서 정상군에 비해 감소되었고 *R. gnavus* ( $P=2.1\times 10^{-7}$ )의 경우에는 증가되었다.

이 논문에서는 특징적으로 크론병 환자의 정상인 친척들과 정상인의 장내 세균 조성을 비교하였다. 그 결과 세 개의 세균의 조성이 틀렸는데 *R. torque*

접수 : 2011년 7월 18일 승인 : 2011년 7월 29일  
 • 연락처 : 임종필, 서울시 종로구 연건동 28 (110-744)  
 서울대학교 의과대학 내과학교실, 간연구소  
 Tel: 02) 740-8112, Fax: 02) 743-6701  
 E-mail : jp-im@hanmail.net

Received July 18, 2011. Accepted July 29, 2011.  
 • Correspondence to : Jong Pil Im, M.D., Department of Internal Medicine, Liver Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, Korea  
 Tel: +82-2-740-8112, Fax: 82-2-743-6701  
 E-mail: jp-im@hanmail.net

( $P=0.02$ )는 정상인에 비해 크론병 환자의 친척에서 많았고 unspecified member of the *Escherichia coli-Shigella* group ( $P=0.01$ )과 *Coprococcus aerofaciens* ( $P=0.004$ )는 정상인에 비해 크론병 환자의 친척에서 적었다.

## 해설

Pyrosequencing과 같은 염기서열 분석 방법의 발전으로 인체의 곳곳에 존재하는 세균들을 염기 분석을 통해 각 개인이나 집단별로 그 유사성과 차이점을 밝혀낼 수 있게 되었다.<sup>1</sup> Metagenomics 연구들에 의하면 장내에는 500개 이상 종의  $10^{14}$ 개 이상의 세균들이 존재하며 장내 세균 조성의 이상(dysbiosis)이 비만과 대사증후군, 2형 당뇨병과 같은 질환들과 연관되어 있다는 연구들이 나오고 있다.<sup>2</sup>

크론병의 발생에 있어서 장내 세균이 중요한 역할을 한다는 사실을 뒷받침해 주는 임상적 또는 유전학적 증거들은 많이 있다. 크론병이 호발하는 부위가 회장과 대장으로 장내 세균이 주로 존재하는 곳이고 항생제 치료가 효과가 있으며 동물 모델에서도 세균이 없는 상태(germfree)에서는 장염이 잘 유발되지 않는다. 또한 유전체 전장 연관 분석(genome wide association study, GWAS)을 통해 크론병의 감수성과 연관이 있는 것으로 밝혀진 유전자들은 NOD2와 autophagy pathway와 관련된 유전자들로 이들은 모두 세균에 대한 인식 및 이에 대한 방어기전과 관련이 있다.<sup>3</sup>

만성 염증성 장질환 환자에서는 장내 세균의 다양성이 정상인에 비해 떨어지는 반면 점막에 붙어 있는 세균들의 숫자는 증가한다.<sup>4</sup> 또한 항염증 성향을 가지고 있는 세균들은 감소하며 염증을 유발하는 세균들의 숫자는 증가하는데 염증을 감소시키는 역할을 하며 만성 염증성 장질환에서 감소하는 대표적인 세균들은 Bacteroidetes 문(phyla)과 Firmicutes 문이다. *B. fragilis*는 장내 유해 세균에 대해 보호 효과를 가지는 것으로 알려져 있으며 *F. prausnitzii*도 항염증효과를 보여주며 회장부 크론병에서 수술 뒤 재발의 위험과 관련있다.<sup>5,6</sup> 이와는 반대로 *Escherichia coli* (*E. coli*)가 속해 있는 Enterobacteriaceae 문의 경우에는 크론병 환자에서 그 비율이 증가되어 있으며 특히 점막에 붙어 있는 *E. coli*의 숫자가 증가되어 있어 *F. prausnitzii*/*E. coli*의 ratio를 이용해 크론병 환자에서 재발의 고위험군을 예측할 수 있다는 보고도 있다.<sup>7</sup> 만성 염증성 장질환 환자의 장내 세균의 점막 내로의 침투(penetration)는 일반인에 비해 10배 정도 많은데 이는

*R. gnavus*와 *R. torque*와 같은 점막 용해성 세균의 비율이 증가되어 있는 것과 연관있다.<sup>8</sup>

이 논문에서는 pyrosequencing과 같은 high-throughput technique을 사용하지 않고 DGGE fingerprinting을 사용해 크론병 환자에서 *F. prausnitzii*, *B. adolescentis*, *R. gnavus* 등 기존에 익히 크론병에서 변화가 있다고 알려진 세균 종들을 찾아내어 DGGE fingerprinting 기법이 환자군과 대조군의 dysbiosis를 증명하는데 어느 정도 신뢰도가 있는 기법임을 보여 주었다. *D. invisus*의 감소는 처음으로 보고된 이상 소견으로 크론병에서의 역할은 향후 규명되어야 할 것으로 생각된다. 이 논문에서 주목할 만한 결과는 크론병 환자뿐 아니라 환자의 친척들도 역시 일반인과는 다른 장내세균 조성을 보인다는 것이다. 크론병 환자의 친척들의 경우 *R. torques*가 증가되어 있는데 이 세균은 *R. gnavus*와 함께 Clostridium cluster XIVa에 속해 있으며 위장관의 mucin을 분해하는 작용을 가지고 있다. 위장관 점막이 분해되면 장내 세균의 전이(translocation)를 촉진하게 되고 이는 장점막의 투과성(permeability)의 증가를 가져온다.

이 논문에서 대상이 된 가계를 살펴보면 3명 이상의 크론병 환자를 보유한 가계가 대부분으로 비교적 유전적 영향이 클 것으로 생각되는 크론병 환자들과 그 친척을 대상으로 한 연구이다. 유전체 전장 연관 분석(genome-wide association study) 결과 크론병 환자의 경우 *NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM*, *XBP1*의 돌연변이가 위험 요소임이 알려져 있으며 이 중 *NOD2*나 *ATG16L1*의 변형이 있는 경우 Paneth cell에서 antimicrobial peptide의 분비가 떨어지며 *XBP1*의 변형은 ER (endoplasmic reticulum) stress 반응과 Paneth cell의 기능 이상과 연관이 있다.<sup>9,10</sup> 따라서 상기된 위험 유전자에 돌연변이가 있는 경우 defensin 분비 이상을 초래하고 이로 인해 장내 세균 조성의 변화가 나타나게 되며 이는 이번 논문에서도 알 수 있듯이 어느 정도 유전적 소인을 공유한 그 친척들에게도 나타나는 현상으로 생각된다.

장내 세균의 조성은 유전적 요인과 환경적 요인의 결합에 의해 좌우되며 우리나라 크론병 환자들의 경우 dysbiosis 양상이 서구와는 다를 것으로 생각된다. 이는 우리나라 크론병이 서구와는 다른 중증도와 진행 경과를 가지는 이유를 일부 설명해 줄 수 있는 단서가 될 수 있을 것이며 우리나라에서도 이에 대한 연구가 필요하다. 향후 microbiome과 이에 대한 숙주의 면역 반응에 관한 연구가 진행되어 만성 염증성 장질환의 발병기전에 대한 더 명확한 이해를 할 수 있게

되고 이에 따라 새로운 치료법이 나오길 기대해본다.

## REFERENCES

1. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;326:1694-1697.
  2. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest* 2011;121:2126-2132.
  3. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011;140:1704-1712.
  4. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.
  5. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005;122:107-118.
  6. 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.
  7. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1720-1728.
  8. Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:2420-2428.
  9. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606.
  10. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg1611 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008;456:259-263.
-