creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

Innate lymphoid cell proportion in pediatric inflammatory bowel disease

- comparative cellular analysis of intestinal mucosa in human-

소아 염증성장질환의 선천림프구 세포 분포

-사람 장 점막 세포 비교분석 -

2022년 2월

서울대학교 대학원

의학과 소아과학 전공

김 주 휘

Innate lymphoid cell proportion in pediatric inflammatory bowel disease

- comparative cellular analysis of intestinal mucosa in human-

지도교수 고 재 성

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2021년 10월

서울대학교 대학원

의학과 소아과학 전공

김 주 휘

김주휘의 박사 학위논문을 인준함

2021년 12월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

연구 배경: 염증성장질환 환자의 장 염증의 병인의 하나로 선천면역과 적응면역 체계의 조절 이상에 대해 연구가 이뤄지고 있다. 선천성 림프구세포(Innate lymphoid cell, ILC)는 선천면역을 담당하고 있지만 선천면역과 적응 면역 계통의 조율에도 관여하며 장점막 조직에 분포하고 있다. 최근 수년간의 연구는 동물과 성인 염증성장질환 환자를 대상으로 장 염증에서의 ILC의 중요성을 밝히고 있다. 본 연구에서 소아청소년 장점막에서 ILC의 분포를 ILC1, ILC2, Natural cytotoxicity receptor (NCR)$^{+}$ILC3, NCR^{-}ILC3 아형에 따라 조사하고 염증성장질환 환자의 발현에 미치는 영향을 조사하며, 임상양상과의 연관성에 대한 요인 분석, 연령과 성별에 따른 차이를 대조군과 비교해서 구명하고자 한다.

연구 방법: 서울대학교 어린이병원에서 염증성장질환을 의심하여 위장관 내시경 조직검사 후 크론병 및 궤양성 대장염을 진단받은 7세에서 19세 환자를 대상군으로 선정하고, 위장관 증상을 주소로 위장관 내시경 조직검사를 시행받은 뒤 염증성장질환을 포함한 만성 장질환이 없는 것으로 확인된 환자를 대조군으로 하여 장점막 ILC의 분포를 조사하였다. 내시경적 생검을 통해 채취한 장점막 조직으로부터 세포를 분리하여 monoclonal antibody로 면역형광 염색을 시행 후 flow cytometry 분석을 통해 데이터를 수집하였다. 염증성장질환 환자의 ILC의 분포를 대조군과 비교 분석하여 면역학적 특성을 확인한다. 염증성장질환 환자의 임상 정보를 수집하여 ILC의 subclass의 특징을 요인으로 임상 양상와의 연관성에 대한 분석을 시행한다. 임상증상에 따른 차이와 내시경적 소견

의 차이에 따른 ILC의 분포를 비교하고, 연령과 성별에 따른 차이점을 분석한다. 크론병 및 궤양성 대장염 환자 각 그룹에 따른 차이를 분석하고, 환자의 중증도와의 관계에 대한 연구를 진행하였다.

결과: 78명의 염증성장질환 환자와 30명의 대조군이 분석 대상에 포함되었다. 대장 점막 조직의 ILCs 아형을 염증성장질환 질환군, 질병에 따라 활성기 상태와 휴지기 상태로 구분하여 대조군과 비교하였을 때 NCR^{+}ILC3s는 모든 질환군에서 감소해 있었고 ($P<0.001$) NCR^{-}ILC3s는 증가해 있었으며($P<0.001$), ILC1s 또한 모든 경우에 질환군에서 증가되어 있었다(크론병: $P<0.001$, 궤양성 대장염: $P=0.004$). 소장 점막의 경우 크론병 환자군에서만 NCR^{+}ILC3s의 대조군과 유의한 차이를 보였다($P=0.021$). 치료력이 없는 신환의 경우에도 동일한 분포 양상을 보였다. 로지스틱 회귀분석에서 소장의 NCR^{-}ILC3s는 로지스틱 회귀분석 결과 활성기 소아염증성장질환의 독립적인 위험인자였다(Adjusted odds ratio 1.076, $P=0.011$). NCR^{+}ILC3s는 크론병에서 Pediatric Crohn's disease activity index 점수(r=-0.537, $P=0.015$), ESR(r=-0.504, $P=0.023$), 현미경적 염증 점수와(r=-0.382, $P<0.001$) 상관관계를 보였다. 약물치료를 시행하며 전향적으로 추적 검사를 시행한 집단에서 짝지은 분석을 시행하였을 때 소장의 전체 ILCs 비율이 감소하였다($P=0.007$). 비염증 대조군을 대상으로 분석하였을 때 ILCs 아형 간의 상관관계와 성별에 따른 차이를 확인하였다.

결론: 염증성장질환에서 선천 면역이 발병기전에 중요한 역할을 함이 밝혀지고 anti-TNF 제제가 개발되었음에도 불구하고 아직까지 다수의 환자들이 약물치료의 실패로 수술적 치료가 필요하다.

본 연구는 염증성장질환의 병태생리에 대한 새로운 정보를 제시하였고 질환군, 중증도, 내시경 소견 등의 임상적인 정보와 ILC 간의 관계에 대해 구명함으로써, 염증성장질환의 치료 및 예방에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

주요어: 선천성 림프구 세포, 염증성장질환, 크론병, 궤양성 대장염, 소아, 청소년

학 번 : 2017-39552

목 차

요약 ····· i
목차 ····· iv
표 목록 ····· v
그림 목록 ····· vi

제 1 장 서론 ····· 1

제 2 장 연구 재료 및 방법 ····· 5

제 3 장 연구 결과 ····· 11

제 4 장 고찰 ····· 37

제 5 장 결론 ····· 45

참고문헌 ····· 46
영문초록 ····· 56

표 목 록

[Table 1] Demographics and Paris classification of all patients with IBD and Control ····· 12
[Table 2] Innate lymphoid cell subsets distribution by proportion in intestine of pediatric inflammatory bowel disease and of control 14
[Table 3] Disease activity and Clinical characteristics of all patients with IBD and Control ····· 18
[Table 4] Logistic regression analysis by disease activity in pediatric inflammatory bowel disease ····· 21
[Table 5] Logistic regression analysis by disease activity in patient with Crohn's disease ····· 22
[Table 6] Simplified pathological score of all patients with inflamatory bowel disease, and control ····· 27
[Table 7] Characteristic of inflammatory bowel disease patient in paired analysis ····· 30
[Table 8] Baseline characteristics of inflammatory bowel disease patient in paired analysis stratified by treatment ····· 31
[Table 9] Correlations between innate lymphoid cell subsets in intestinal mucosa of non-inflamed female controls. ····· 34
[Table 10] Correlations between innate lymphoid cell subsets in intestinal mucosa of non-inflamed male controls. ····· 35
[Table 11] Summary of innate lymphoid cell subsets distribution in intestine of pediatric inflammatory bowel disease and of control 36

그 림 목 록

[Figure 1] Gating strategy for innate lymphoid cells. Representative flow cytometry plots of ILC subsets in colonoscopic biopsies 9
[Figure 2] Flow chart of study population. ····· 11
[Figure 3] The proportion of ILC subsets in human intestine of pediatric inflammatory bowel disease patient, and of control. 13
[Figure 4] The difference of ILC subsets distribution in human intestine of pediatric inflammatory bowel disease patient and of control. ····· 15
[Figure 5] Comparison of ILC subsets proportion in colonic mucosa of IBD patients stratified by gender. ····· 16
[Figure 6] The differences of ILC subsets distribution in human intestine of treatment-naive pediatric inflammatory bowel disease patient and of control. ····· 17
[Figure 7] Comparison of distribution of ILCs in colonic mucosa among study group stratified by clinical activity. ····· 19
[Figure 8] Comparison of distribution of ILCs in small bowel mucosa among study group stratified by clinical activity. ····· 20
[Figure 9] Heat map of correlation matrix in Crohn's disease patients by PCDAI score ····· 23
[Figure 10] Correlation ILCs with CRP, ESR and fecal calprotectin in patient with pediatric inflammatory bowel disease. ····· 24
[Figure 11] Comparison of distribution of ILCs in colonic mucosa among study group stratified by gross endoscopic finding. ··· 25
[Figure 12] Paired-comparison of distribution of ILCs by gross endoscopic finding on the patient with inflamed and non-ionflamed mucosa. ····· 26
[Figure 13] Correlation matrix of simplified pathological score with

innate lymphoid cell subsets in inflammatory bowel disease. 27
[Figure 14] Comparison of ILC subsets proportion in IBD patients stratified by Paris classification. ····· 28
[Figure 15] Paired analysis of ILCs between baseline and follow-up point in IBD patients with medical treatment. ····· 29
[Figure 16] Correlation matrix among innate lymphoid cell subsets in non IBD control group. ····· 33

제 1 장 서 론

염증성장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 장의 만성 염증성에 의한 질환으로 크론병(Crohn's disease, CD), 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC), 미분류 염증성장질환(IBD unclassified, IBDu) 포함하고 있다. 염증성장질환의 원인은 명확히 밝혀지지 않았으나 장관 세균총, 음식물, 약물 등에 대한 비정상적 면역 반응으로 인해 유전적으로 감수성이 있는 개인에게서 질환이 발생한다는 근거가 제시되고 있다(1-4).

IBD 환자의 25%는 20세 이전 소아청소년 연령에서 증상이 발생하며 이러한 소아 염증성장질환과 성인기에 발병하는 IBD의 차이 및 유사점이 발표되고 있으나 그 기전에 대하여는 아직까지 잘 알려진 바가 없다(1, 5). 성인 IBD의 경우 CD 환자보다 UC 환자가 상대적으로 더 많으나 소아에서는 CD 환자가 더 많다. 성인 CD의 경우 남녀 비가 비슷하거나 다소 여자가 많은 반면 소아에서는 남아에서 유병률이 높다. 또한 소아 UC의 경우 성인에 비해 병변 부위가 넓고, 중증이며 치료가 더 어렵다. 연령과 성별에 따른 이러한 차이가 왜 존재하는지, 그리고 이러한 점이 성인과 구분된 소아 IBD의 기전이 있고, 차별화된 치료, 예방이 필요할지에 대하여는 연구된 바가 드물다(6, 7).

선천성 림프구 세포(Innate lymphoid cell, ILCs)는 2,010년도에 새롭게 분류되었으며 선천 면역을 담당하고 있는 세포군으로 그 특성과 기능에 대한 연구가 최근 진행되고 있다. ILCs의 특징은 T세포 수용체나 B

세포 수용체를 가지고 있지 않아 항원 특이적인 방식으로 반응하지 않는 골수유래 세포로서, 림프구 전구체(common lymphoid progenitor cell)에서 분화된다. ILC는 주로 인체의 피부, 장, 폐 등의 장벽 표면에 위치해 있으며 병원체로부터의 보호와 장기의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하고 있으며 ILC1s, ILC2s, ILC3s 3개의 그룹으로 분류된다. ILC3s의 경우 NKp44 발현에 따라 Natural cytotoxicity receptor (NCR)$^{+}$ILC3s와 NCR^{-}ILC3s로 세분된다. 각 그룹의 부적절한 활성화는 다양한 염증성 질환 및 자가면역질환의 발병과 연관되어 있다(8, 9).

최근의 장염 동물 모델과 성인 대상 연구의 결과는 ILCs가 염증성장질환의 만성 장염증 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 제시하고 있다. 하지만 알레르기, 천식, 자가면역질환 등 다른 질환에 비해 아직까지 밝혀진 질병과의 연관성이 적은 상태이다. 지금까지 밝혀진 ILCs와 위장관 질환과의 연관성들은 ILCs 아형에 따라 구분되고 있으며, ILC1s는 Helper T cell과 유사한 기능으로 IL-12에 반응하여 IFN-r를 생성할수 있으며 ILC3s로부터 변화될 수 있고 염증반응이 심한 크론병 환자에서 분포가 높았다(10). ILC2s의 경우 IL-5,13을 생산하고 위장관 기생충에 관여하며, ILC3s의 경우 IL-23에 반응 하여 IL-17, IL-22를 생산하고, 점막치유 및 장벽의 유지를 촉진함이 밝혀졌다(11).

소아 염증성장질환의 경우 식습관이나 환경에 의한 영향은 상대적으로 적고 유전적 또는 면역학적 요인에 대한 영향이 더 클 것으로 예상할 수 있으나 ILCs와 관련된 연구는 아직 많이 진행되고 있지 않으며 명확한 연구결과 또한 현재까지 없다(12).

염증성장질환의 병인은 아직까지 명확하지 않지만, 면역계 조절이상의 경우 선천면역체계와 후천면역체계 두 가지 모두 위장관 염증의 병인이 되는 근거가 있다. 염증성장질환의 초기 연구의 경우 후천 면역체계와 관련된 T cell 반응에 대해 주로 초점을 두고 진행되었다. 특히 UC보다는 CD에서 IL-12에 의존적인 T-helper1 반응에 주로 연구되어 왔다. 이후 GWAS 연구에서 IL-23에 대한 Th17의 반응이 병인에서 중요한 역할을 함이 밝혀졌다. 그리고 유전적 연구로부터의 발전에 의해 IBD의 병인론 연구는 점막 선천 면역 방향 쪽으로 진행되게 되었다.

B-cell과 T-cell이 없는 mice에서 세균을 통해 유발하기 위해서 IL-23에 반응하는 IL-3가 필요함이 밝혀졌으며, 장염은 IL-1β에 의한 반응으로 장점막에 모인 ILCs에서 IL-23에 의한 반응을 통해 생산되는 IL-17, IFNɣ에 의존적이었다 Buonocore (13). Pearson 등의 연구에서는 ILCs의 cryptopatch로의 이동을 확인하였으며 이러한 이동이 염증반응을 활성화하는 초기단계일 가능성을 제시하였다. 또한, 동일 연구에서 ILCs는 GM-CSF를 분비하여 염증을 더욱 촉진시킬 수 있는 myeloid cell을 모이게 할 수 있었다(14).

ILC1s의 경우 UC보다는 CD에서 상대적으로 증가하여 있었으며 특히 INFɣ를 생산하는 ILC1s이 환자의 장병변에 증가하여 있었다. ILC1s은 NK cell과 유사하게 IL-12, IL-18에 반응하여 IFNɣ를 생산하지만, NK cell의 세포독성 역할과 관련된 granzyme B나 perforin을 발현하지 않는 차이가 있다(10).

ILC2의 경우 IL-25에 의존적인 방법으로 장염증에 관여함이 제시되

고 있다. IL-5, IL-13을 생산하는 ILC2s의 경우 주로 호산구성 식도염, 만성부비동염, 아토피 피부염 등과 주로 연구가 되어 왔다. UC의 경우 IL-13 유도와 점막 염증의 연관성이 있음이 제시되어 왔으나 현재까지 UC에서의 ILC2s 증가소견에 대한 보고는 없는 상태이다(15).

상기 연구결과들을 토대로 본 연구에서는 소아 염증성장질환 장점막에서 ILCs의 아형에 따른 분포를 조사하여 염증성장질환 환자의 발현에 미치는 영향 분석하고, 임상경과와의 연관성에 대한 요인 분석, 치료 반응에 따른 변화를 대조군과 비교해서 구명하고자 한다.

제 2 장 연구 재료 및 방법

제 1 절 연구대상

2016년 1월부터 2017년 12월까지 서울대학교 어린이병원에서 염증성장질환을 의심하여 위장관 내시경적 조직검사 후 크론병 및 궤양성 대장염을 진단받은 7세에서 19세 환자 중 환자와 보호자의 동의하에 장점막 조직을 수집한 환자를 연구 대상으로 하였다. 염증성장질환의 진단은 임상 양상, 내시경 소견, 영상의학적, 조직학적 검사결과를 근거로 하였다(16). 각 환자의 의무기록을 후향적으로 검토하여 임상 양상에 대한 정보를 수집하였고 분석을 위해 성별, Paris 분류법에 따른 나이, 병변의 위치, 침범 양상을 조사하였다(17). 발병 연령이 6세 미만(very early onset IBD), 미분류 염증성장질환(IBDu), 유전학적인 문제 또는 다른 전신질환과 연관되어 있는 경우 연구대상에서 제외하였다. 대조군은 서울대학교 어린이병원에 위장관 증상을 주소로 내원하여 내시경 조직검사를 받은 뒤에 염증성장질환을 포함한 만성 장질환이 없는 것으로 확인된 7세에서 19세 환자를 대상으로 하였다.

제 2 절 연구방법

1) 임상 정보 수집

연구대상자의 의무기록을 후향적으로 검토하여 임상 양상에 대한 정보를 수집하였다. 질병의 활성도 지표로 크론병 환자의 경우 Pediatric Crohn's Disease Activity Index (PCDAI), 궤양성 대장염 환자의 경우

Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI)를 수집하였으며 (18,19), 이와 함께 내시경 당시 담당 의사의 임상적 판단에 따라 환자의 질환을 활성기 상태과 휴지기 상태로 이분 범주화하여 분류하였다. 환자의 인구통계학적 정보로 성별, 검체 수집 시점의 나이, 진단 당시 나이 및 이를 통해 계산된 유병 기간을 수집하였다. 염증과 관련된 검사실 결과로 혈청 C반응단백질(c-reactive protein, CRP)과 적혈구침강속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR), 대변 칼프로텍틴 (Calprotectin) 농도를 수집하였다.

크론병 환자의 경우 Paris 분류에 따라 병변의 위치, 상부위장관 침범 유무, 침범 양상으로 비협착비관통형(B1), 협착형(Stricturing, B2), 관통형(penetrating, B3) 분류, 그리고 항문 누공의 유무를 추가로 확인하였다. 궤양성 대장염 환자의 경우 병변의 침범 범위와 중증도를 Paris 분류에 따라 조사하였다.

2) 대장내시경 및 조직학적 검사

대장내시경 검사는 말단회장까지 시행했으며 진입이 어려운 경우 진입 가능한 부위까지 관찰했다. 진단 및 평가를 위한 조직검사를 시행함과 동시에 세포분리를 위한 점막 조직 생검을 시행하였다. 생검은 육안적으로 염증이 있는 점막, 육안적으로 염증이 없는 소장 및 대장 점막에서 시행하였다. 검사 직후 확보한 검체를 저온상태로 유지하여 세포분리를 위한 실험실로 이송하였다. 검체의 염증 상태는 육안적 내시경 소견을 기반으로 염증 점막과 정상 점막으로 구분하였다. 점막의 조직학적

소견은 병리조직 현미경 소견의 선와농양(Crypt abscesses) 소견(1점), 점막 표면의 미란/궤양(erosions/ulcerations) 소견(1점), 고유판의 호중구(neutrophils in the lamina propria) 소견(1점), 그리고 회장말단, 우측결장, 가로결장, 좌측결장, 직장 중 해당 소견이 있는 해부학적 부위(5점)로 구성된 'Simplified pathological score'를 기반으로 분석하였다(20).

3) 생검 조직으로부터 세포 분리

대장내시경을 통해 확보해 실험실로 이송된 검체를 차가운 PBS에 옮기고 페트리 접시에서 블레이드를 사용하여 잘게 잘랐다. 조직을 type IV collagenase(Worthington, New Jersey, USA)와 DNase I(Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 이 포함된 5mL의 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 배지에서 37℃ shaking incubator에서 1시간 동안 인큐베이션 했다. 파이펫으로 세포를 분산시킨 후 100μm 세포 스트레이너를 사용하여 필터링했다. 적혈구 용해 완충액 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)으로 적혈구를 용해한 후 PBS로 세척한다. 세포를 2% FBS가 포함된 PBS 약 3mL에 재현탁시켰다. 유세포 분석을 위한 세포 수가 적절한지 현미경으로 확인했다.

4) 유세포 분석

대장내시경 생검 조직에서 분리한 단일 세포들(single cells)을 Zombie AquaTM Fixable Viability Kit(BioLegend, San Diego, CA, USA)를 사용하여 실온에서 10분 동안 인큐베이션 후 anti-human CD16/CD32 (BD

Biosciences, New Jersey, USA)로 4°C에서 15분 동안 Fc Blocking 했다. 다음으로 단일 세포들을 다음과 같은 단일 클론 항체로 염색했다: PerCP/Cy5.5 anti-human CD45, fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-lineage Cocktail (anti-human CD3, anti-human CD14, anti-human CD19, anti-mouse/human CD11b, anti-human CD11c, anti-human CD49b, anti-human FcεRIα), PE/Cy7 anti-human CD127, PE anti-human CRTH2, Brilliant Violet (BV)421 anti-human c-kit, allophycocyanin (APC) anti-human NKp44, PE/Cy7 anti-human CD15, PE anti-human Siglec-8, BV421 anti-human CD11c, APC anti-human HLA-DR, FITC anti-human (BioLegend, San Diego, CA, USA). 세포들을 BD LSRFortessaTM X-20 유세포 분석기 및 FACSDiva 소프트웨어(BD Biosciences, New Jersey, USA)를 사용하여 분석했다. FlowJo 분석 소프트웨어(Treestar, Ashland, OR, USA)를 사용하여 유세포 분석 결과 데이터를 분석했다(Figure 1)(21).

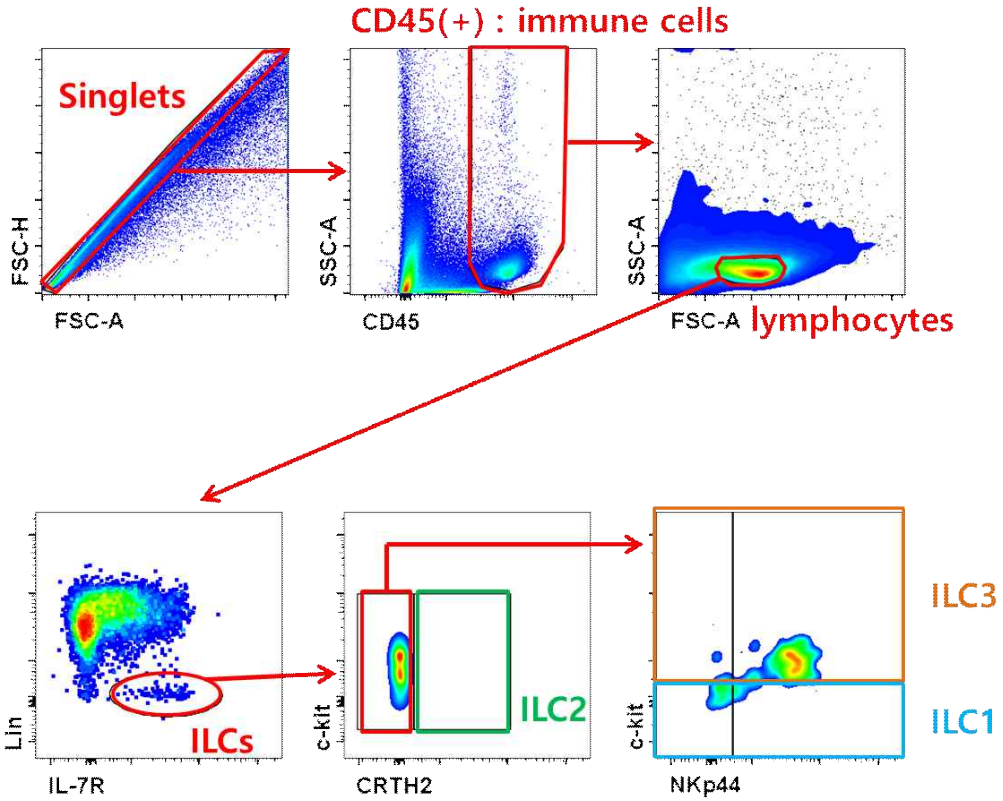

Figure 1. Gating strategy for innate lymphoid cells. Representative flow cytometry plots of ILC subsets in colonoscopic biopsies: ILC1s (CD45^{+}Lin-CD127^{+}CRTH2-c-kit-NKp44-), ILC2s (CD45^{+}Lin-CD127^{+}CRTH2^{+}), NCR^{+}ILC3s (CD45^{+}Lin-CD127^{+}CRTH2-c-kit^{+}NKp44^{+}), and NCR^{-}ILC3s (CD45^{+}Lin-CD127^{+}CRTH2-c-kit^{+}NKp44-)[21]

5) 통계분석

환자군과 대조군에서 검체의 해부학적 위치와 내시경 소견에 따라 ILC 아형을 ILC1, ILC2, NCR^{+}ILC3, NCR^{-}ILC3 비율과 임상적 요인의 상관관계를 분석하였으며 모수 검정의 경우 Pearson의 상관분석을, 비모수 검정의 경우 Spearman 상관분석을 사용하였다. 그룹 간 분석을 위하

여 크론병과 궤양성 대장염, 염증 점막과 비염증 점막, 질환 활성도, 성별, 임상적 표현형에 따라 이분 범주화하여 분석하였으며 모수 검정의 경우 Student's T검정, 미모수 검정의 경우 Mann-Whitney U 검정을 사용하였다. 3개 이상의 군을 비교 분석할 경우 모수 검정의 경우 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)과 Tukey 사후 분석을, 비모수 검정의 경우 Kruskal-Wallis 검정과 Dunn 사후 분석을 사용하였다. 질환 활성도와 ILC의 독립적인 관계를 확인하기 위하여 PCDAI/PUCAI 점수 10점을 기준으로 이분화하여 각 임상 변수들을 다변량으로 로지스틱 회귀분석을 시행하였다. 통계 분석은 SPSS Statistics software, version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)과 GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)를 이용하였으며, 통계적 유의수준은 양측검정에서 P값이 0.05 미만으로 하였다. 목표 대상자 수 산출의 경우 소아에서 유사한 연구가 없으나 선행연구인 염증장조직 내 ILC1s에 대한 연구(Bernink JH 2013 Nature immunology)를 참조로 하였다. G^{+}power 프로그램을 사용하여 medium effect size를 갖고, 유의수준 0.05 파워 0.8인 T test를 기준으로 102명 산출하였고 Drop rate를 고려하여 0.9로 나누어 산출된 113명을 근거로 120명을 목표 대상자로 하였다.

6) 윤리적 고려

본 연구는 연구를 시행하기 전, 서울대학교병원 의학연구윤리심의위원회의 승인을 받았다(IRB No. H-1511-078-720).

제 3 장 연구결과

1. 분석 연구대상

대장내시경을 통한 조직검사가 91명의 염증성장질환 환자의 코호트와 40명의 대조군을 포함한 131명에게 진행되었다(Figure 2). 검체의 문제로 분리를 시행하지 못하거나, 분리과정 이후 세포수가 부족한 경우 분석에서 제외하였으며 최종적으로 80명의 염증성장질환 환자와 30명의 대조군이 분석 대상에 포함되었다. 최종 분석 대상집단의 특징은 Table 1에 제시하였다.

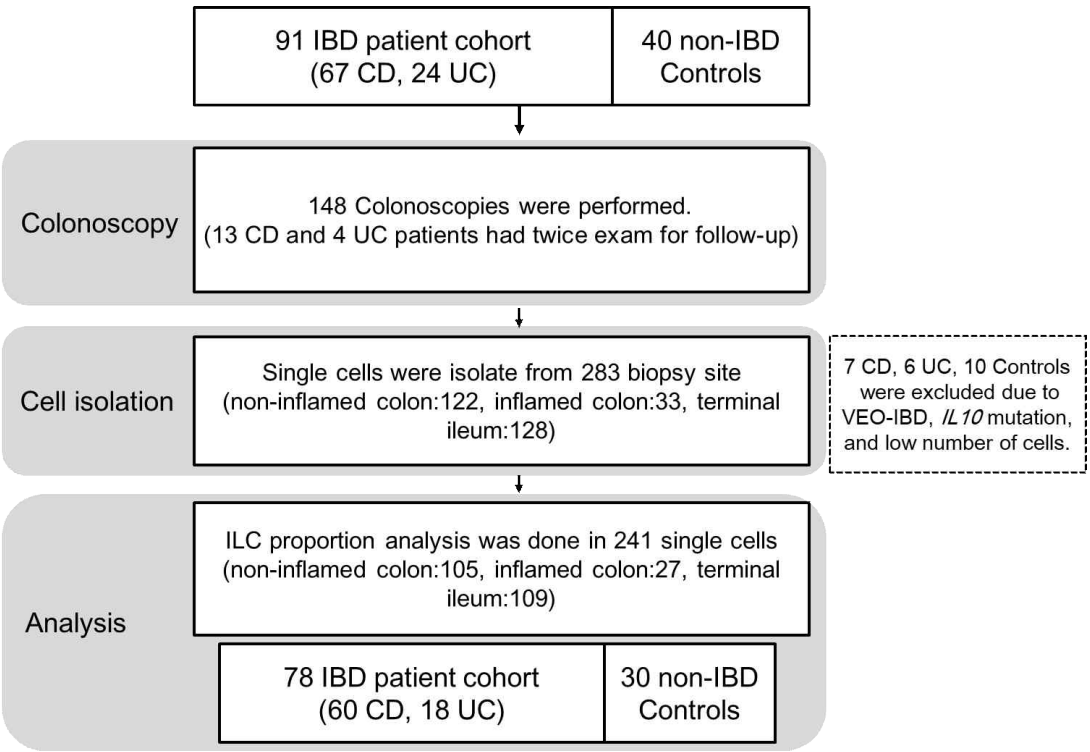

Figure 2. Flow chart of study population (CD: Crohn's disease, IBD: inflammatory bowel disease, ILC: innate lymphoid cell, UC: ulcerative colitis, VEO-IBD: very early onset IBD).

Table 1. Demographics and Paris classification of all patients with IBD and Control

	CD	UC	Control
Sex (male/female)	42 / 18	12 / 6	17 / 13
Age, Mean(SD)	15.8 (2.5)	15.0 (2.9)	13.1 (2.7)
Age at diagnosis (number of patient)			
A1a	4		
A1b	55		
A2	2		
Location (number of patient)			
L1 distal 1/3 ileum	1		
L2 Colonic	5		
L3 Ileocolonic	55		
L4a upper disease proximal to ligament of Treitz	20		
L4b upper disease distal to ligament of Treitz and proximal to distal 1/3 ileum	8		
L4a and L4b	3		
Behavior (number of patient)			
Nonstricturing, nonpenetrating (B1)	48		
Stricturing (B2)	8		
Penetrating (B3)	5		
perianal disease modifier	25		
Extent			
E1: ulcerative proctitis		1	
E2: left-sided UC (distal to splenic flexure)		5	
E3: Extensive (hepatic flexure distally)		1	
E4: Pancolitis (proximal to hepatic flexure)		12	
Severity			
S0 never severe		4	
S1 ever severe		15	

2. 염증성장질환과 대조군간의 비교분석

분리된 single cells를 해부학적 위치에 따라 아형 평균 분포를 분석하였다(Table 2, Figure 3). 대장의 경우 질환군은 대조군에 비해 ILC1s, NCR⁻ILC3s가 증가했고 NCR⁺ILC3s는 감소해 있으며, 이중 궤양성 대장염에서 NCR⁻ILC3s의 증가가 가장 컸다. 소장에서 염증성장질환 군은 대장에서와 유사한 변화를 보이고 있었으나 크론병에서 가장 차이를 보이고 궤양성 대장염의 경우 대조군과 큰 차이가 없었다. 검사한 모든 위장관 부위에서 ILC2s는 상대적으로 적게 분포했다.

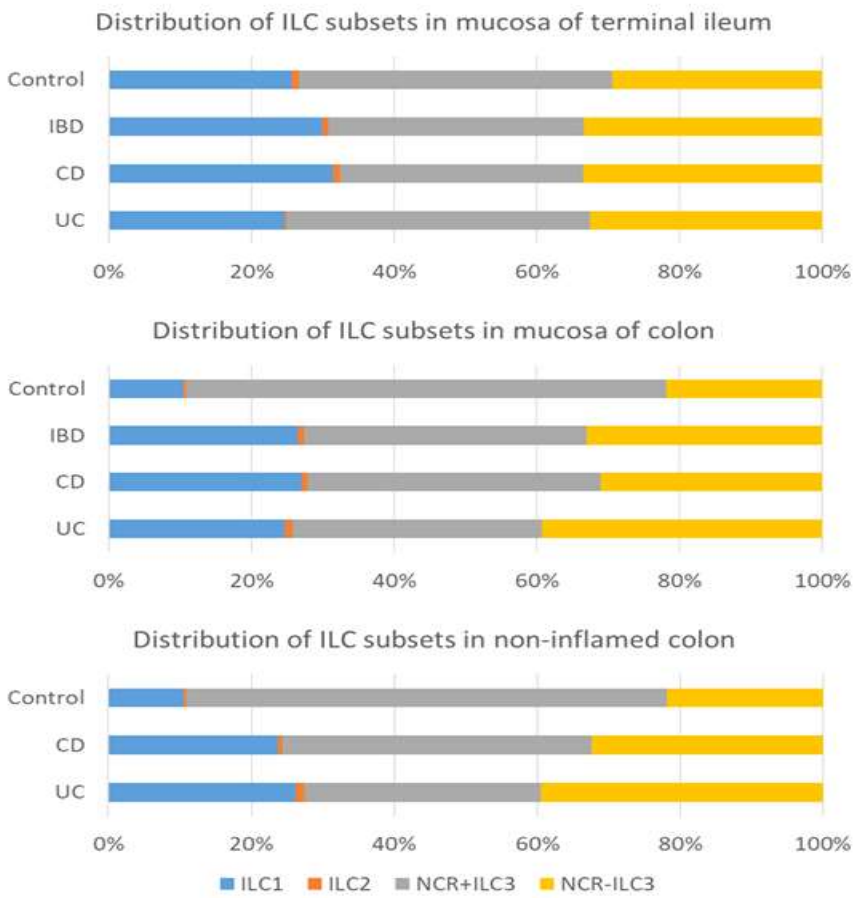

Figure 3. The proportion of ILC subsets in human intestine of pediatric inflammatory bowel disease patient, and of control.

Table 2. Innate lymphoid cell subsets distribution by proportion in intestine of pediatric inflammatory bowel disease and of control

mean (95% CI)	CD	UC	Control
Colon			
Total ILCs	0.392 (0.327 - 0.456)	0.309 (0.220 - 0.397)	0.323 (0.260 - 0.386)
ILC1s	26.12 (22.07 - 30.18)	23.51 (18.45 - 28.58)	9.930 (7.098 - 12.77)
ILC2s	0.784 (0.477 - 1.090)	1.022 (-0.024 - 2.067)	0.326 (0.124 - 0.529)
NCR^{+}ILC3s	35.63 (35.02 – 44.24)	33.40 (26.66 - 40.15)	63.91 (58.12 - 59.69)
NCR^{-}ILC3s	30.04 (26.64 – 33.44)	37.42 (30.35 – 44.48)	20.73 17.61 – 23.86)
Terminal ileum			
Total ILCs	0.249 (0.203 – 0.294)	0.210 (0.160 – 0.260)	0.190 (0.138 – 0.243)
ILC1s	30.35 (25.73 – 34.97)	23.66 (16.72 – 30.60)	22.29 (16.70 – 27.88)
ILC2s	1.001 (0.394 – 1.608)	0.292 (-0.100 – 0.685)	0.953 (-0.116 – 2.022)
NCR^{+}ILC3s	32.88 (27.98 – 37.78)	40.81 (32.35 – 49.26)	44.36 37.40 – 51.33)
NCR^{-}ILC3s	32.42 (28.63 – 36.21)	31.29 (24.89 – 37.69)	29.65 (22.36-36.93

대장에서 각 집단 간의 차이를 분석하였을 때 크론병과 궤양성 대장염 모두 대조군보다 ILC1s와 NCR^{-}ILC3s는 증가하고, NCR^{+}ILC3s는 감소하였으며 ILC2s의 차이, 및 질병군 내의 차이는 없었다. 소장의 ILCs 아형의 경우 크론병과 대조군이 NCR^{+}ILC3s의 유의한 분포의 차이를 보

였으며 이외의 다른 차이는 관찰되지 않았다(Figure 4).

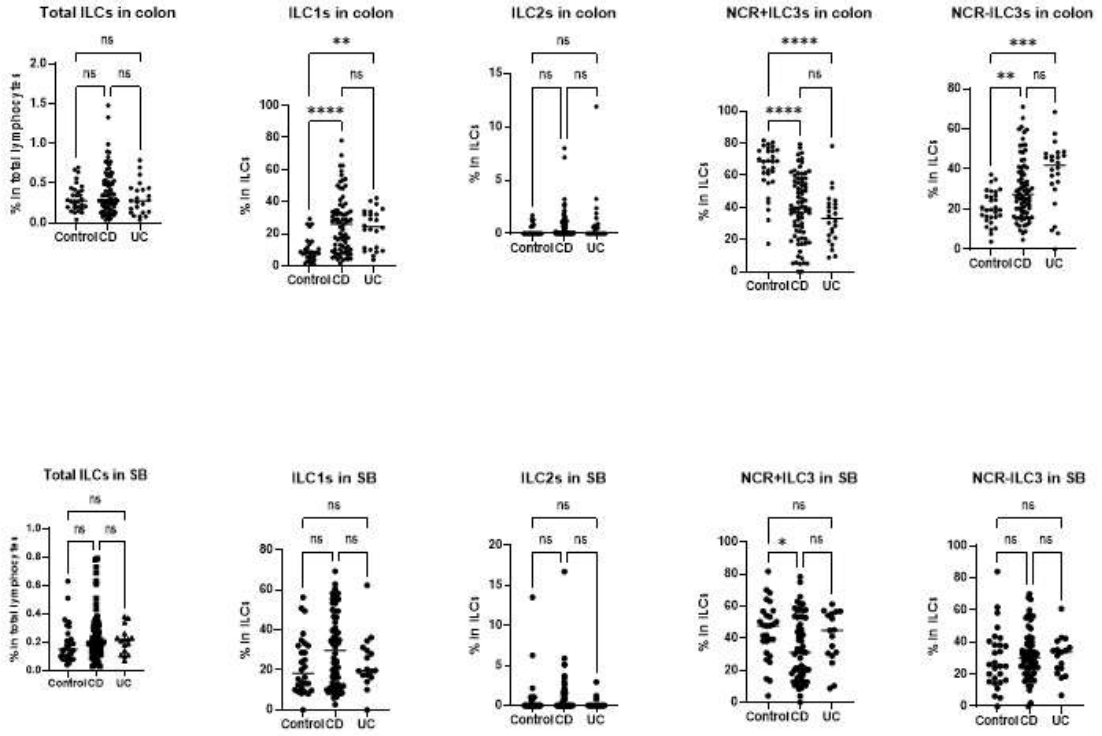

Figure 4 The difference of ILC subsets distribution in human intestine of pediatric inflammatory bowel disease patient and of control. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 and ****P < 0.001, and ns, not significant (CD: Crohn's disease, ILC : innate lymphoid cell, NCR : natural cytotoxic receptor, SB: small bowel, UC: ulcerative colitis).

염증성장질환 환자군 내에서 남녀간 차이를 분석하였을 때 남자의 염증장점막에서 $NCR^{+}ILC3s$ 가 더 높고, ILC1s이 낮았으며 크론병 집단 내부 분석에서도 동일한 소견이 확인되었다 (Figure 5).

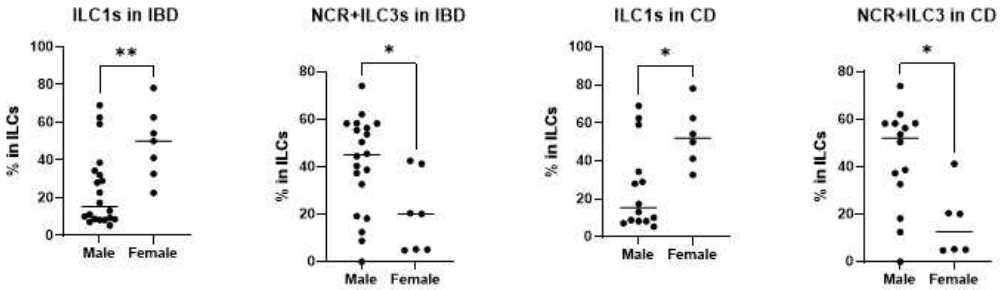

Figure 5. Comparison of ILC subsets proportion in colonic mucosa of IBD patients stratified by gender.

연구에 참여하면서 처음 진단된 치료력이 없는 염증성장질환 신환 17명을 (크론병 12명, 궤양성 대장염 5명) 대상으로 대조군과 비교하였을 때, 신환군 또한 대장의 ILC1s과 NCR^{-}ILC3s는 증가하고, NCR^{+}ILC3s는 감소하였으나 ILC2s의 차이는 없었으며, 소장의 NCR^{+}ILC3s가 대조군에 비해 감소했다 (Figure 6). 질환군 별로 집단을 나누어 동일한 분석을 하였을 때 궤양성 대장염 신환군에서는 대장의 ILC1s, 소장의 NCR^{+}ILC3s의 차이는 보이지 않았다.

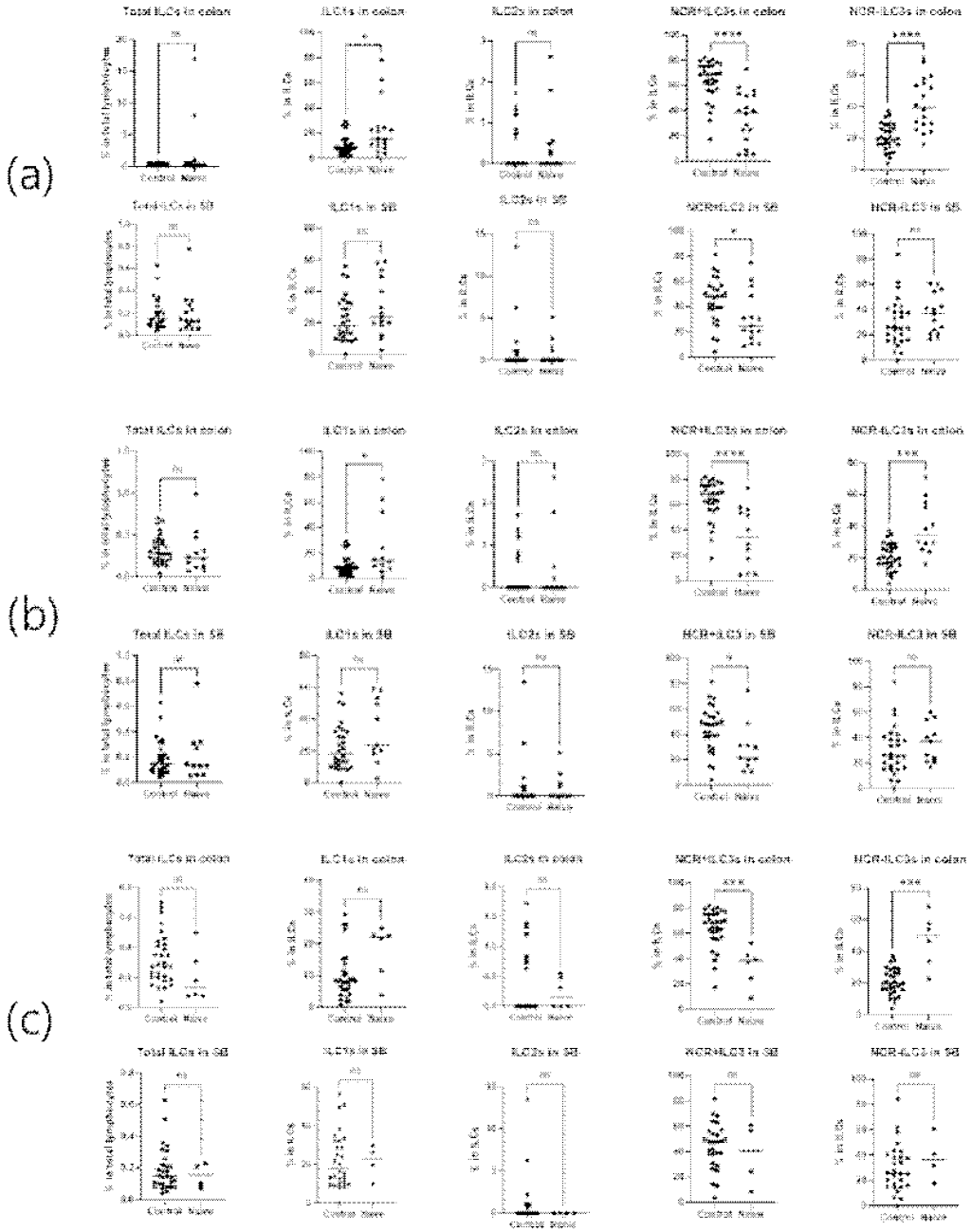

Figure 6. The differences of ILC subsets distribution in human intestine of treatment-naive pediatric inflammatory bowel disease patient and of control. (a) total IBD patient. (b) Crohn's disease. (c) ulcerative colitis. (ILC : innate lymphoid cell, NCR : natural cytotoxic receptor)

3. 활성기 질환군과 휴기기 질환군의 ILC의 차이

질병의 활성도에 따른 차이를 객관적으로 분석하기 위하여 각 환자군별로 질환활성도 점수를 사용하여 재분류하여 분석하였다(Table 3).

Table 3 Disease activity and Clinical characteristics of all patients with IBD and Control

	CD	UC
Clinically active disease*		
Active / Quiescent	38/ 30	12 / 9
PCDAI score Mean(SD)	13.2 (16.2)	
inactive disease (<10 points)	39	
mild disease (10- 30 points)	15	
moderate to severe (≥65 points)	15	
PUCAI score Mean(SD)		20.0 (26.2)
remission (<10 points) / mild (10-34 points)		12 / 4
moderate (35- 64 points) / severe (≥65 points)		4 / 3
Simplified pathological score, Mean±SD	1.7±2.0	1.9±1.8
CRP Mean±SD	1.5±2.5	0.6±1.0
ESR Mean±SD	21.5±21.1	14.6±16.0

*Eleven patients had twice exam for follow-up

대장 점막 조직의 ILCs 아형을 염증성장질환 질환군, 질병에 따라 활성기 상태와 휴지기 상태로 구분하여 비교하였을 때 ILC1s는 활성기 궤양성 대장염을 제외한 모든 경우에 대조군과 비교해 증가해있었으며 NCR^{+}ILC3s의 경우 모든 경우에 질환군에서 대조군에 비해 감소되어 있었다 (Figure 7). NCR^{-}ILC3s의 경우 휴지기 크론병을 제외한 모든 경우에 대조군에 비해 증가해있었으며 질환 간 비교시 크론병보다 궤양성 대장염의 차이는 관찰 되지 않았다.

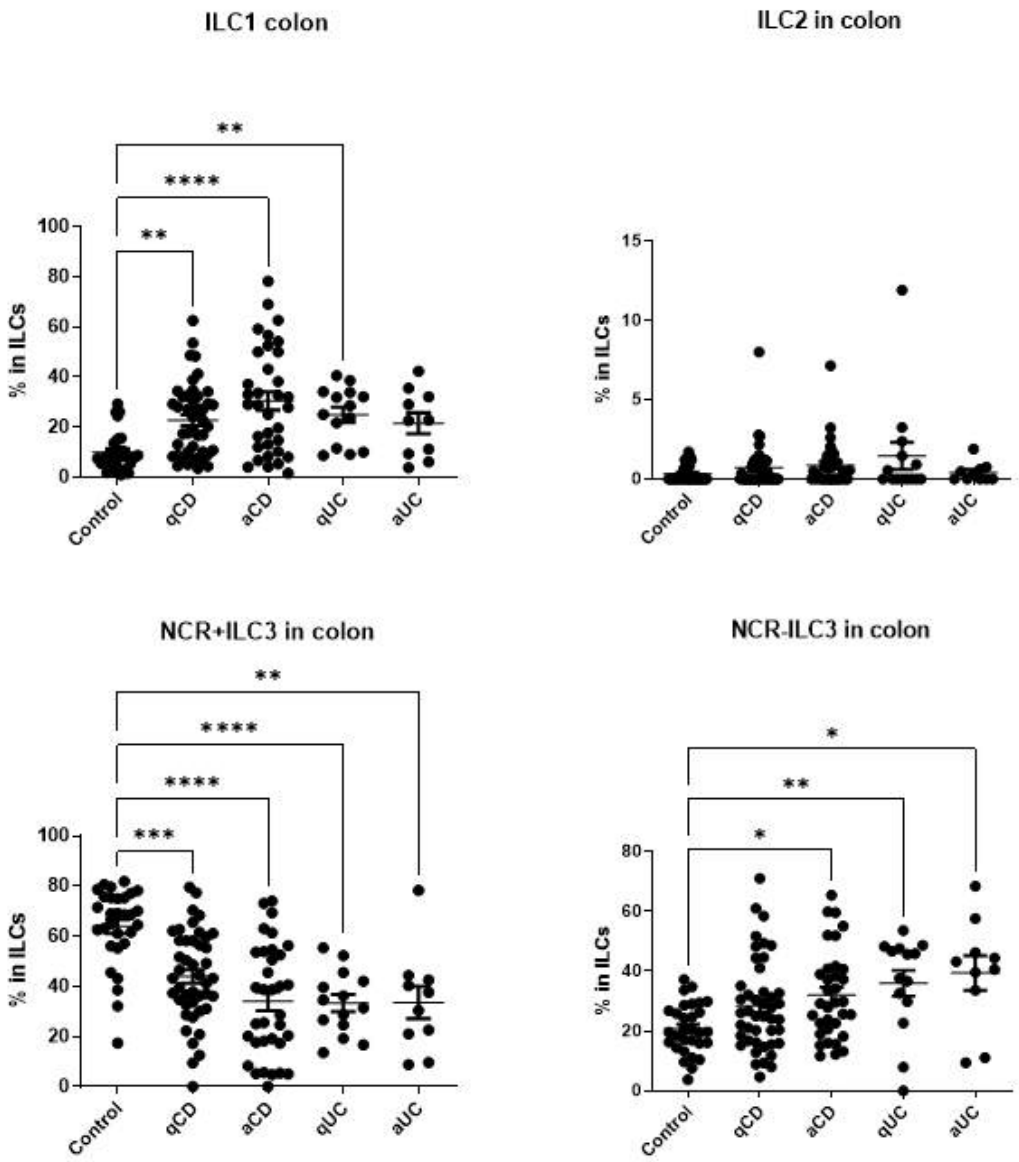

Figure 7. Comparison of distribution of ILCs in colonic mucosa among study group stratified by clinical activity. aCD: active Crohn's disease, qCD: quiescent Crohn's disease, aUC: active ulcerative colitis, qUC: quiescent lcerative colitis (one way ANOVA test with post hoc Tukey's multiple comparisons test).

소장 점막 조직의 ILC 아형을 염증성장질환 질환군, 질병에 따라 활성기 상태와 휴지기 상태로 구분하여 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Figure 8).

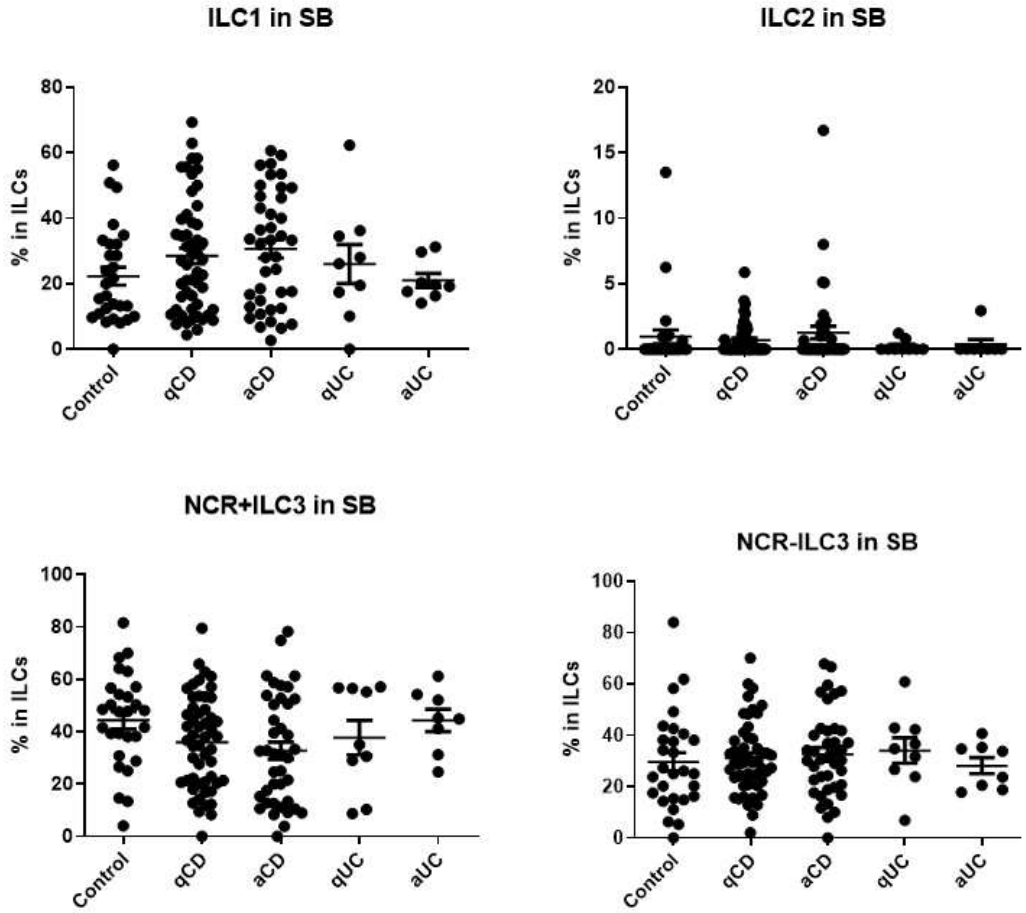

Figure 8. Comparison of distribution of ILCs in small bowel mucosa among study group stratified by clinical activity. aCD: active Crohn's disease, qCD: quiescent Crohn's disease, aUC: active ulcerative colitis, qUC: quiescent lcerative colitis (one way ANOVA test with post hoc Tukey's multiple comparisons test).

로지스틱 회귀분석을 시행한 결과 CRP, Simplified pathological score, 그리고 소장의 NCR^{-}ILC3 (Adjusted odds ratio[AOR] 1.076, P=0.011)가 최종 모델에서 활성기 소아염증성장질환의 독립적인 위험인자임을 확인하였다 (Table 4). 질환 군별 분석에서는 크론병만 소장의 NCR^{-}ILC3 (AOR=0.027),가 유의한 변수로 확인되었다 (Table 5).

Table 4 Logistic regression analysis by disease activity in pediatric inflammatory bowel disease

		Model 1		Final model	
variable		Exp(B)	P-value	Exp(B)	P-value
CRP		1.918 (0.973-3.781)	0.060	1.763 (1.078-2.883)	0.024
ESR		1.054 (0.994-1.118)	0.081	1.031 (0.994-1.069)	0.099
tSPS		1.562 (0.928-2.627)	0.093	1.511 (1.009-2.263)	0.045
Small bowel	total ILC	0.627 (0.002-220.1)	0.876	NA	
	ILC1	1.108 (0.863-1.424)	0.422	NA	
	ILC2	1.692 (0.818-3.500)	0.156	NA	
	NCR^{+}ILC3	1.118 (0.864-1.447)	0.397	NA	
	NCR^{-}ILC3	1.218 (0.917-1.617)	0.174	1.076 (1.017-1.140)	0.011
Colon	total ILC	0.686 (0.408-1.155)	0.156	NA	
	ILC1	1.106 (0.972-1.259)	0.125	1.072 (0.997-1.154)	0.060
	ILC2	0.382 (0.101-1.445)	0.156	NA	
	NCR^{+}ILC3	1.118 (0.864-1.447)	0.397	NA	
	NCR^{-}ILC3	0.989 (0.888-1.102)	0.845	NA	
Age		0.907 (0.563-1.460)	0.687	NA	
Duration of f/u		0.978 (0.534-1.789)	0.941	NA	
sex		1.046 (0.213-5.145)	0.956	NA	

Table 5. Logistic regression analysis by disease activity in patient with Crohn's disease

	Final model	
variable*	Exp(B)	P-value
CRP	1.811 (1.096-2.994)	0.021
ESR	1.041 (1.001-1.083)	0.047
NCR^-ILC3s in small bowel	1.059 (1.007-1.115)	0.027

*excluded variables: age, sex, duration of follow-up, age at diagnosis, location of disease behavior, perianal disease modifier, simplified pathological score, total ILC/ILC1s/ILC2s /NCR^+ILC3s in small bowel, total ILC/ILC1s/ILC2s/NCR^+ILC3s/NCR^-ILC3s in colon,

4. 각 질병별 활성도에 따른 ILC의 연관성

크론병의 경우 inactive 그룹과 mild to severe 두 그룹으로 나누어 비교하거나 또는 inactive disease, mild disease, moderated to severe 세 그룹으로 나누어 분석하였을 때 그룹 간 ILCs 아형의 차이는 없었다. PCDAI점수를 연속변수로 하여 상관분석 하였을 때 (Figure 9), 염증 대장점막에서의 NCR^+ILC3s과 음의 상관관계를 보이고(r=-0.537, P=0.015) 정상 대장점막에서의 전체 ILCs와 양의 상관관계를 보였다(r=0.271, P=0.040).

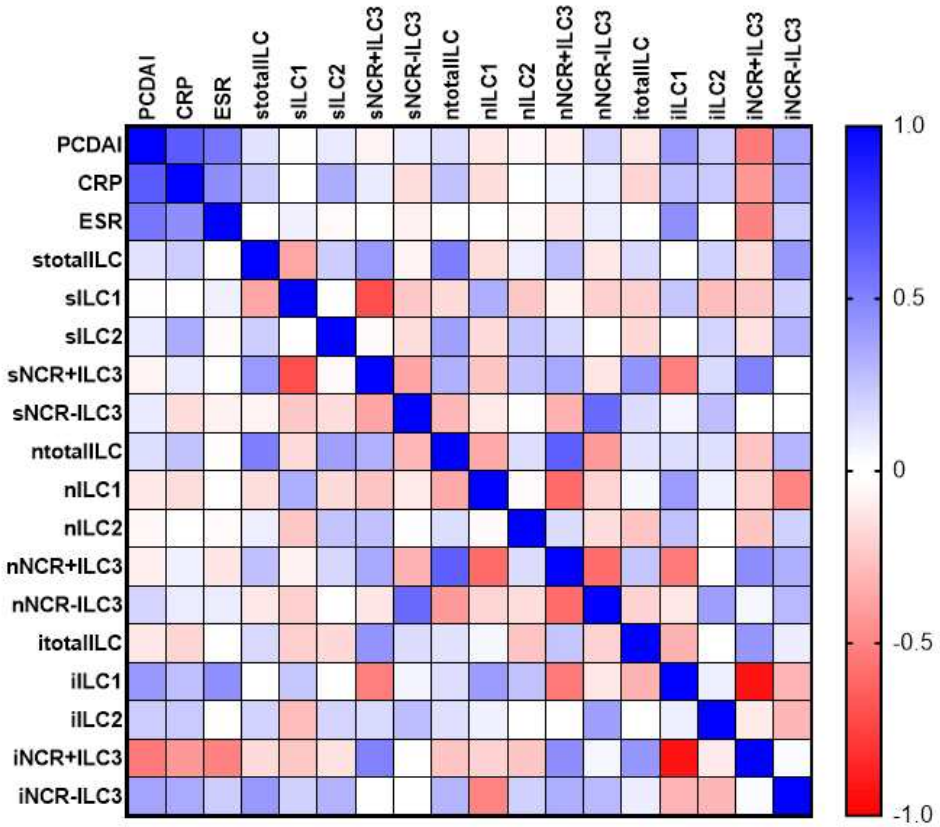

Figure 9. Heat map of correlation matrix in Crohn's disease patients by PCDAI score (Pearson's correlation test)

혈액검사 상 CRP의 경우 소장점막에서의 ILC2s와 양의 상관관계를 보이고(r=0.338, P=0.006) 정상 대장점막에서의 전체 ILCs와 양의 상관관계를 보였으며 (r=0.515, P<0.001) ESR은 염증 대장점막에서 ILC1s과 양의 상관관계를 보이고(r=0.451, P=0.046) $NCR^{+}ILC$과 음의 상관관계를 보였다(r=-0.504, P=0.023). PCDAI점수는 CRP, ESR과 강한 상관관계를 보였다. 궤양성 대장염의 경우 PUCAI점수를 연속변수로 하여 상관분석 하였을 때 ILC 아형 및 CRP, ESR과의 유의한 상관관계는 관찰되지 않았다. CRP는 유의한 상관관계를 보이지 않았으나 ESR은 정상 대장점막

에서의 NCR^{+}ILC3와 음의 상관관계를 보였다(r=-0.525, P<0.037).

대변 calprotectin의 경우 20명의 환자군에서 (크론병 16명, 궤양성 대장염 4명) 검사가 시행되었으며 소장의 ILC1s과 양의 상관관계를 보였으며 (r=0.44, P=0.049) 다른 ILCs 아형과는 유의한 관계가 없었다 (Figure 10).

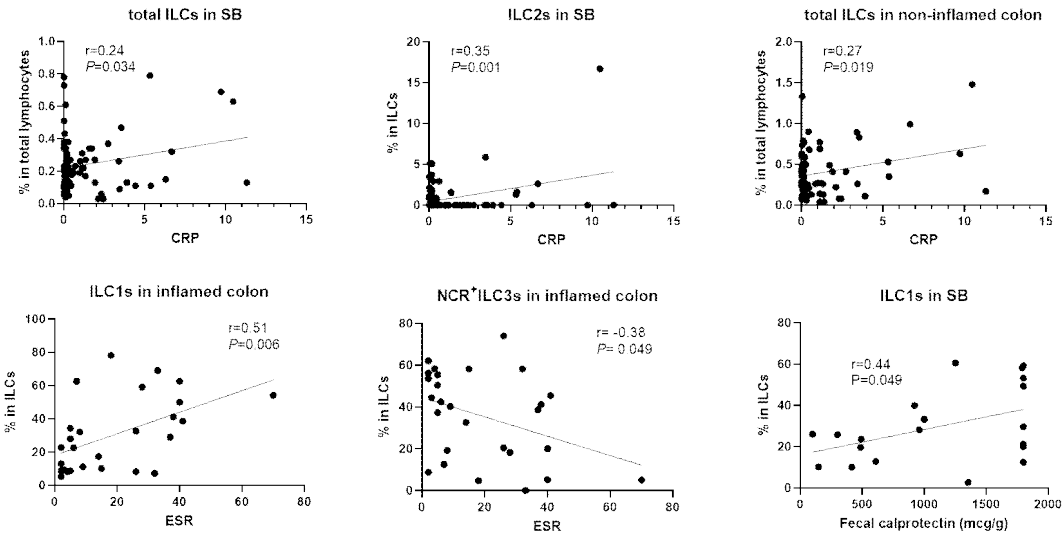

Figure 10. Correlation ILCs with CRP, ESR and fecal calprotectin in patient with pediatric inflammatory bowel disease.

5. 육안적 내시경 소견에 따른 ILC의 연관성

대장 육안적 내시경 소견을 기준으로 염증성장질환의 점막을 채취부위의 육안적으로 염증소견이 있는 조직과 육안적 염증소견이 없는 조직으로 각 질환별 분류하여 비교하였을 때, 대조군에 비해 ILC1s은 질환군에 비해 증가, NCR^{+}ILC3s는 질환군에서 감소, NCR^{-}ILC3s는 질환군에 비해 증가하였으며 ILC2s의 경우 집단 간 차이가 관찰되지 않았다. 각

질환 내, 질환 간 비교시 통계적으로 유의한 ILCs 아형 분포의 차이는 관찰되지 않았다 (Figure 11).

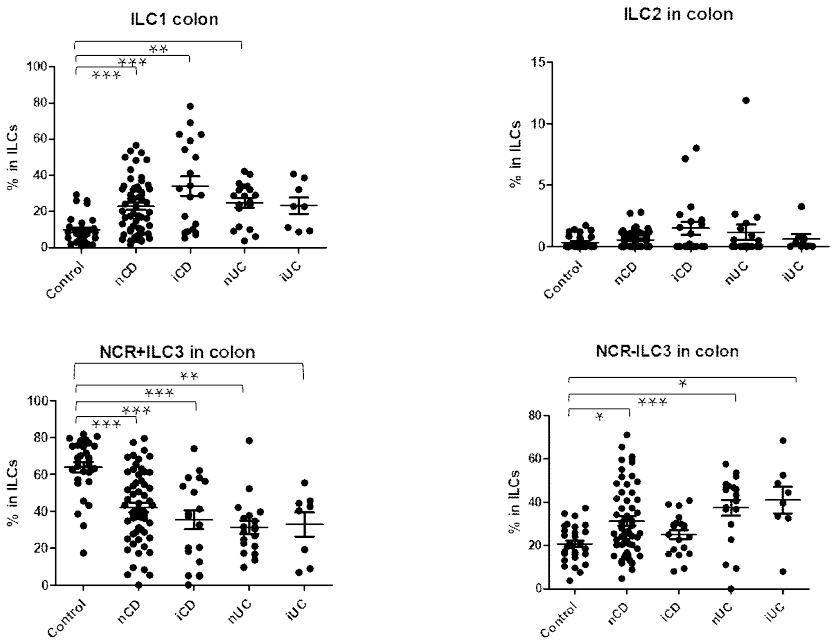

Figure 11. Comparison of distribution of ILCs in colonic mucosa among study group stratified by gross endoscopic finding. nCD: non-inflamed mucosa of Crohn's disease, iCD: inflamed mucosa of Crohn's disease, nUC: non-inflamed mucosa of ulcerative colitis, iUC:inflamed mucosa of ulcerative colitis (one way ANOVA test with post hoc Tucey's comparison test).

내시경 시행 시 한 환자에서 동시에 염증 점막조직과 비염증 점막 조직을 수집된 14개의 single cells pair를 대상으로 짝지은 통계분석을 시행하였다. 염증 점막 조직은 비염증 점막 조직과 비교해 ILCs가 전반적으로 감소해 있었고 ILC1s, NCR^{-}ILC3s가 증가해있었으며 NCR^{+}ILC3s는 감소했다(Figure 12).

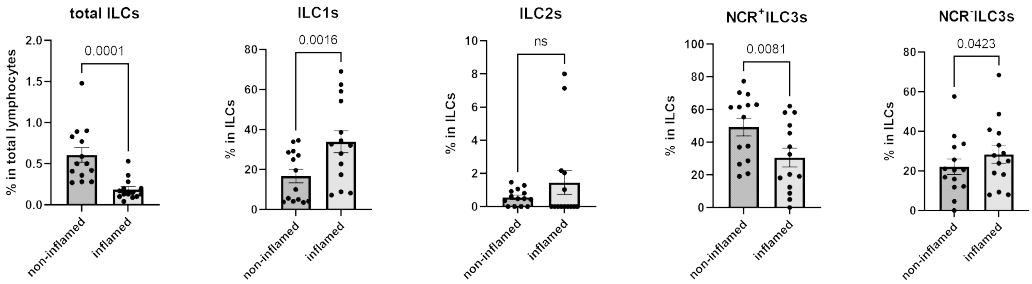

Figure 12 Paired-comparison of distribution of ILCs by gross endoscopic finding on the patient with inflamed and non-ionflamed mucosa (paired t test and Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

6. 현미경적 병리조직학 소견에 따른 ILC의 연관성

모든 IBD 환자군에서 병리조직학 판독을 기반으로 한 Simplified pathological score결과를 계산하고 (Table 6) 그 결과를 ILC 아형분포와 상관분석하였다 (Figure 13). 현미경적 병리조직학 소견은 정상 대장점막에서의 $NCR^{+}ILC3$과 음의 상관관계를 보이고(r=-0.382, P<0.001) $NCR^{-}ILC3$과 양의 상관관계를 보였다(r=0.362, P<0.001). 또한 CRP, ESR 와는 유의한 상관관계를 보이지 않았으며, 크론병에서 PCDAI점수와는 유의한 양의 상관관계를 보였으나(r=0.309 P=0.010) 궤양성 대장염의 PUCAI와는 상관관계가 확인되지 않았다.

Table 6 Simplified pathological score of all patients with IBD, and control

	number (%)	CD	UC
Simplified pathological score,			
crypt abscesses (presence of neutrophils aggressive)		25 (36.8%)	12 (57.1%)
erosions/ulcerations (presence of granulation tissue):		25 (36.8%)	1 (4.8%)
neutrophils in the lamina propria:		0	0
site(s) of involvement, Mean (SD)		0.99 (1.3)	1.23 (1.41)
Total, Mean (SD)		1.72 (1.97)	1.85 (1.88)

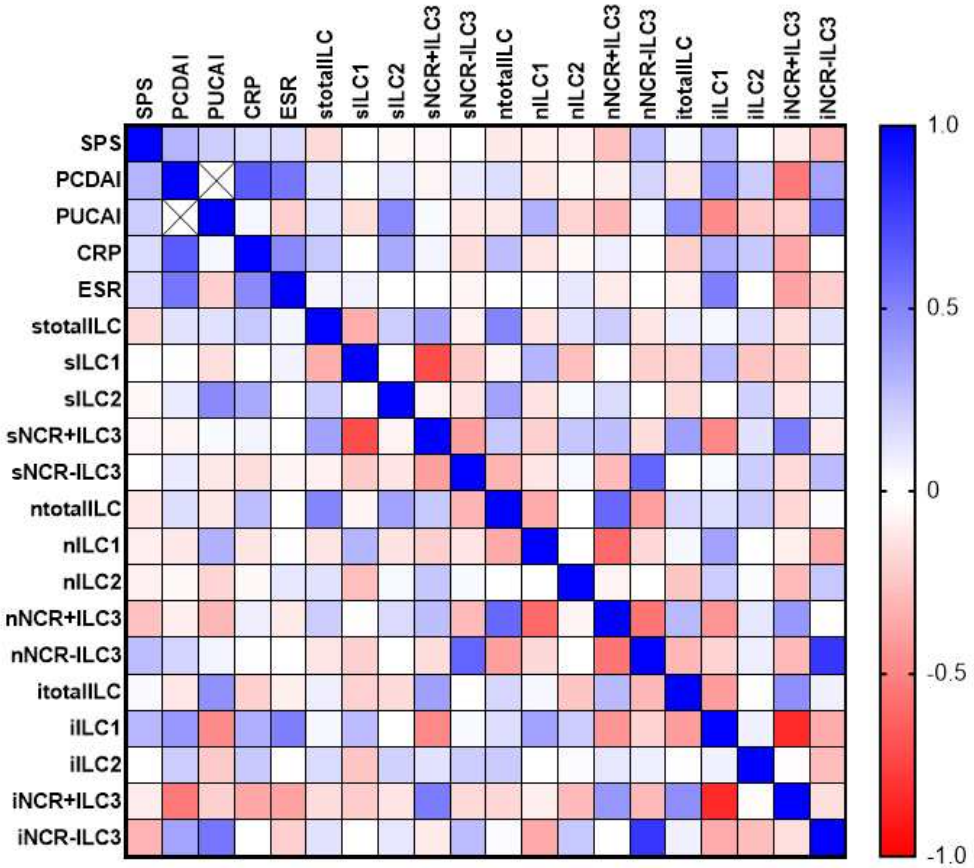

그림 13. Correlation matrix of simplified pathological score with innate lymphoid cell subsets in inflammatory bowel disease (Pearson's correlation test).

7. 질병 양상에 따른 ILC의 연관성

Paris classification을 기반으로 한 염증성장질환의 양상에 따른 세부 그룹간 ILCs의 변화를 분석하였다. 발병연령, 병변의 위치에 따른 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 크론병에서 B2의 특성을 보이는 경우 대장의 NCR^{+}ILC3s가 증가했고, 궤양성대장염에서 S1인 경우 대장의 ILC1s이 증가했다 (Figure 14).

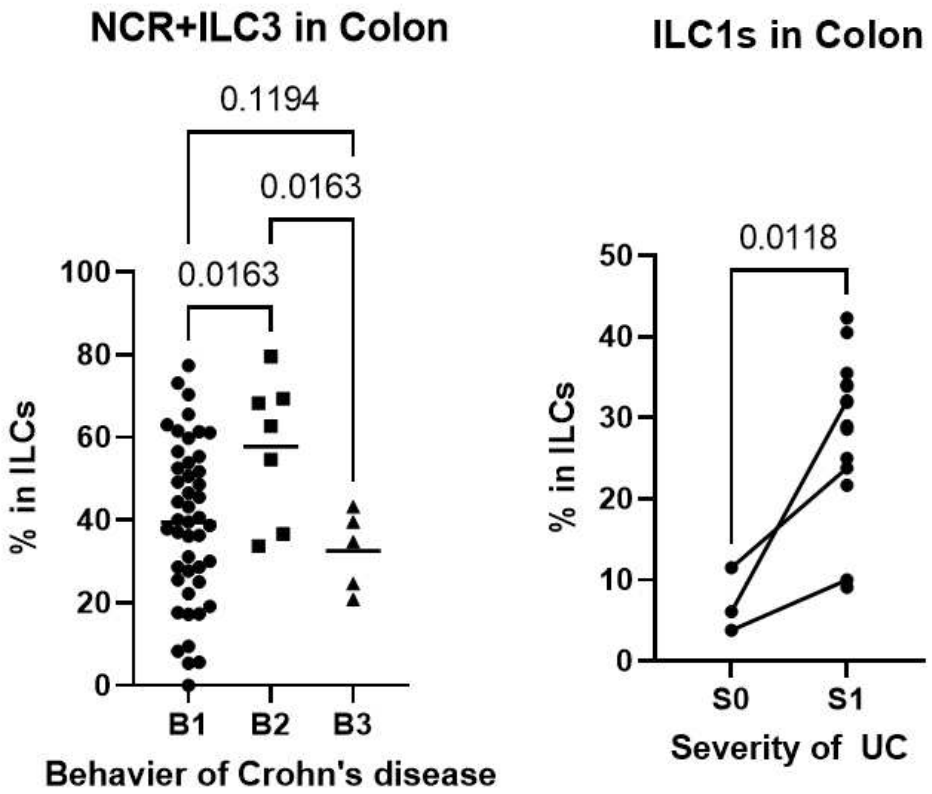

Figure 14. Comparision of ILC subsets proportion in IBD patients stratified by Paris classification.

8. 치료반응에 따른 ILC 분포 변화의 분석

추적관찰 검사가 시행된 11명의 염증성장질환 환자를 대상으로 치료반응에 따른 ILC분포의 변화를 분석하였다 (Figure 15). 여섯 명의 환자가 TNFa blocker를 사용하고 있었으며 다섯 명은 면역조절제, 항염증제를 사용하였다 (Table 7). 추적관찰 시 소장에서 전체 ILCs의 비율이 기저상태보다 감소하였으며(P=0.007) 이러한 반응은 항TNF-α 사용 그룹에서 확인되었었으나(P=0.046) 다른 치료제를 사용한 그룹에서는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P=0.125). 대장에서의 ILCs 아형의 변화는 관찰되지 않았다.

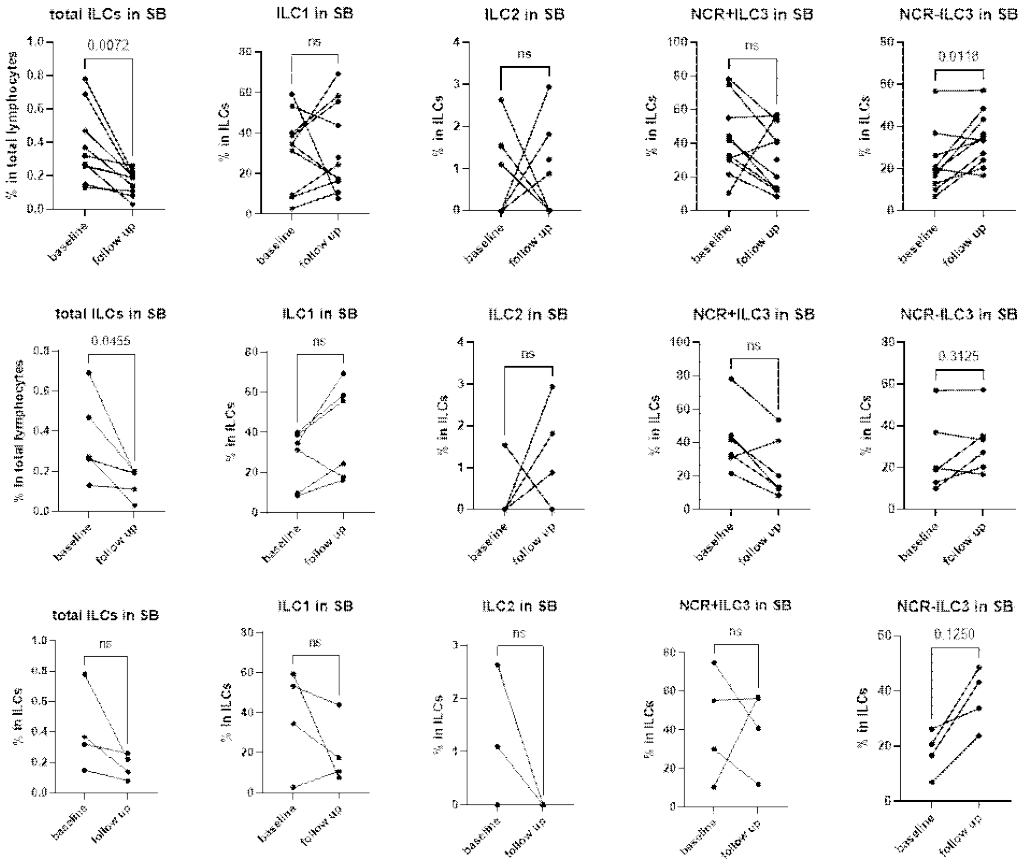

Figure 15. Paired analysis of ILCs between baseline and follow-up point in IBD patients with medical treatment.

추적관찰 검사가 시행된 환자를 항TNF-α 사용 그룹과 다른 치료제를 사용한 그룹으로 분류하여 초기 상태를 비교하였을 때 두 그룹 간의 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (Table 8).

Table 7 Characteristic of inflammatory bowel disease patient in paired analysis

	Number (%)	
Number of patient		
Crohn's disease	8 (72.7%)	
Ulcerative colitis	3 (27.3%)	
Number of single cells by biopsy site		
small bowel	10	
colon	10 (inflamed 7, inflamed 3)	
Interval between exam (days,mean±SD)	399.7 (41.3)	
Treatment at follow-up		
Mesalazine	1 (9.1%)	
Azathioprine	4 (36.4%)	
Methotrexate (co-use with infliximab)	1 (9.1%)	
Infliximab	5 (45.5%)	
Adalimumab	1 (9.1%)	
Clinical characteristics	baseline	follow-up
Active disease*	8	3
CRP*	3.1	0.48
ESR*	26.7	6.6

*$P<0.05$

Table 8. Baseline characteristics of inflammatory bowel disease patient in paired analysis stratified by treatment.

%	AntiTNF Tx		Non-AntiTNF Tx		
year	mean	SD	mean	SD	P-value
Age	15.0	2.7	13.0	3.2	0.307
Age at Dx	12.3	2.0	11.6	1.3	0.519
Duration of f/u	2.7	2.5	1.5	2.8	0.456
CRP (mg/dL)	3.0	3.6	3.2	3.2	0.465
ESR(mm/hr)	30.8	26.1	21.8	18.0	0.855
simplified pathological score	1.8	1.0	3.0	2.4	0.272
total ILC in small bowel	0.003	0.002	0.004	0.003	1.000
ILC1 in small bowel	0.27	0.14	0.37	0.25	0.286
ILC2 in small bowel	0.00	0.01	0.01	0.01	0.190
NCR^{+}ILC3 in small bowel	0.42	0.20	0.43	0.28	0.670
NCR^{-}ILC3 in small bowel	0.26	0.18	0.18	0.08	0.670
total ILC in non-inflamed colon	0.006	0.003	0.007	0.003	0.881
ILC1 in non-inflamed colon	0.15	0.14	0.13	0.14	0.881
ILC2 in non-inflamed colon	0.01	0.01	0.01	0.01	0.294
NCR^{+}ILC3 in non-inflamed colon	0.54	0.11	0.46	0.24	0.456
NCR^{-}ILC3 in non-inflamed colon	0.29	0.16	0.24	0.23	1.000

8. 대조군의 ILC 분포 분석

대조군 그룹 30명에서 정상 대장 점막조직 30개, 정상 소장 점막조직 29개의 분석을 시행하였다. 연령에 따른 점막의 ILCs 아형분포의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 소장 점막의 전체 ILC 비율과 대장 점막의 전체 ILCs비율은 양의 상관관계를 (r=0.519, P=0.004) , 그리고, 소장 점막 내에서 ILC1s와 NCR^{+}ILC3s(r=-0.581, P=0.001), ILC1s과 NCR^{-}ILC3s가 (r=-0.534, P=0.006) 음의 상관관계를 보였다. 대장에서는 전체 ILCs 비율이 NCR^{+}ILC3s와 양의 상관관계를(r=0.470, P=0.009), ILC1s과 음의 상관관계를 보였으며 아형간 분석시 NCR^{+}ILC3s는 ILC1s(r=-0.759, P<0.001), NCR^{-}ILC3s(r=-0.490, P=0.006)와 음의 상관관계를 보였다 (Figure 16).

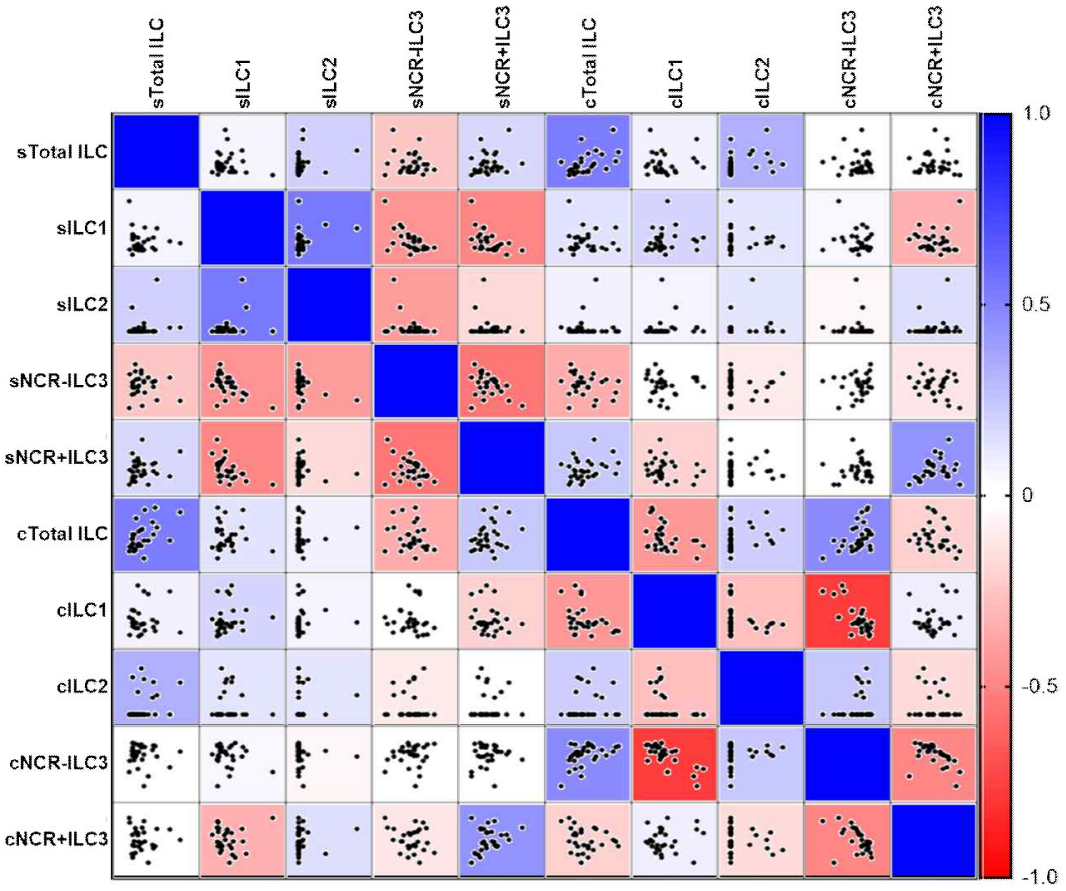

Figure 16. Correlation matrix among innate lymphoid cell subsets in non IBD control group (Pearson's correlation test)

성별 집단을 나누어 분석하였을 때 여성에서 남성보다 소장의 ILC2s가 높았으며 (P=0.418) 다른 ILC 아형의 두 군간 차이는 없었다. 여자 대조군에서 소장 점막 ILC2s와 대장 점막 NCR^{+}ILC3s, NCR^{-}ILC3s와 유의한 상관관계가 특징적이었으며(Table 9) 남자 대조군에서는 소장의 ILC1s과 NCR^{-}ILC3s, 소장의 전체 ILCs와 대장의 전체 ILCs의 상관관계가 특징적이었다 (Table 10). 각 집단의 장기에 따른 ILCs 아형별 분석에 대한 주요 결과를 Table 11에 요약 기술하였다.

Table 9. Spearman correlations between innate lymphoid cell subsets in intestinal mucosa of non-inflamed female contols (n=13)

			Small bowel					Colon				
			total ILC	ILC1	ILC2	NCR^{+}ILC3	NCR^{-}ILC3	total ILC	ILC1	ILC2	NCR^{+}ILC3	NCR^{-}ILC3
Age		r	0.463	−0.286	−0.078	0.063	0.544	0.188	−0.549	0.050	0.187	0.049
		P	0.111	0.344	0.801	0.837	0.055	0.539	0.052	0.871	0.541	0.873
Small bowel	total ILC	r		−0.171	0.407	−0.079	0.301	0.491	−0.353	0.516	−0.185	0.408
		P		0.576	0.167	0.798	0.318	0.088	0.237	0.071	0.546	0.166
	ILC1	r			0.117	−0.718**	−0.379	0.177	0.104	0.232	0.000	−0.055
		P			0.704	0.006	0.201	0.563	0.734	0.446	1.000	0.859
	ILC2	r				−0.313	0.275	−0.202	0.467	0.208	−.820**	0.715**
		P				0.298	0.363	0.509	0.108	0.495	0.001	0.006
	NCR^{+}ILC	r					−0.272	−0.277	−0.231	−0.028	0.267	−0.132
		P					0.368	0.360	0.447	0.927	0.378	0.667
	NCR^{-}ILC3	r						0.044	0.165	−0.185	−0.451	0.302
		P						0.886	0.590	0.546	0.122	0.316
Colon	total ILC	r							−0.497	0.394	0.359	−0.287
		P							0.084	0.183	0.228	0.341
	ILC1	r								−0.291	−0.681*	0.214
		P								0.334	0.010	0.482
	ILC2	r									−0.019	0.003
		P									0.951	0.992
	NCR^{+}ILC3	r										−0.758**
		P										0.003
	NCR^{-}ILC3	r										1.000
		P										

Table. 10 Spearman correlations between innate lymphoid cell subsets in intestinal mucosa of non-inflamed male contols (n=16)

			Small bowel					Colon				
			total ILC	ILC1	ILC2	NCR^{+}ILC3	NCR^{-}ILC3	total ILC	ILC1	ILC2	NCR^{+}ILC3	NCR^{-}ILC3
Age		r	-0.337	0.043	-0.161	0.244	-0.309	0.029	-0.304	-0.221	-0.096	0.248
		P	0.201	0.875	0.551	0.362	0.244	0.911	0.236	0.395	0.715	0.338
Small bowel	total ILC	r		-0.074	0.049	0.124	0.246	0.622*	0.082	0.095	0.054	-0.234
		P		0.784	0.858	0.648	0.358	0.010	0.761	0.726	0.841	0.383
	ILC1	r			0.340	-0.375	-0.708**	-0.038	0.425	0.162	-0.196	-0.272
		P			0.197	0.152	0.002	0.890	0.101	0.549	0.468	0.308
	ILC2	r				-0.105	-0.253	0.147	0.445	-0.180	-0.020	-0.105
		P				0.699	0.344	0.586	0.084	0.505	0.940	0.699
	NCR^{+}ILC	r					-0.203	-0.224	-0.141	-0.125	0.062	-0.144
		P					0.451	0.405	0.602	0.644	0.820	0.594
	NCR^{-}ILC3	r						-0.224	-0.141	-0.125	0.062	-0.144
		P						0.405	0.602	0.644	0.820	0.594
Colon	total ILC	r							-0.252	0.178	0.364	-0.292
		P							0.330	0.494	0.150	0.255
	ILC1	r								-0.231	-0.610**	-0.027
		P								0.373	0.009	0.918
	ILC2	r									0.364	-0.292
		P									0.150	0.255
	NCR^{+}ILC3	r										-0.451
		P										0.069
	NCR^{-}ILC3	r										
		P										

Table 11. Summary of innate lymphoid cell subsets distribution in intestine of pediatric inflammatory bowel disease and of control

	IBD		Control
	CD	UC	
Colon			
ILC1s	Increased Male < Female	Increased	-
ILC2s	-	-	-
$NCR^{+}ILC3s$	Decreased, negative correlation with PCDAI score ESR, and histologic score Male > Female	Decreased	Negative correlation with ILC2s of small bowel in female
$NCR^{-}ILC3s$	Increased	Increased positive correlation with histologic score	Positive correlation with ILC2s of small bowel in female
Total ILCs	In non-inflamed mucosa, positive correlation with PCDAI score and CRP	-	Positive correlation with $NCR^{+}ILC3s$. Negative correlation with ILC1s.
	Decreased in inflamed mucosa compared with non-inflamed mucosa		
Small bowel	Decreased $NCR^{+}ILC3s$ Decreased in Paris B2 than other groups Decreased Total ILCs after treatment	-	Positive correlation between ILC1s & $NCR^{+}ILC3$. Negative correlation between ILC1s & $NCR^{-}ILC3$

제 4 장 고 찰

본 연구에서는 2016년부터 2017년까지 서울대학교 어린이병원에 염증성장질환 환자와 대조군의 장점막 조직에서 유세포 분석 기법을 사용하여 확인한 각 아형의 선천 림프구 세포의 분포를 밝히고 임상적, 역학적 특징에 따른 관계를 밝히고자 하였다. 소아 염증성장질환 환자 대장 점막의 $NCR^{+}ILC3$는 비염증 대조군에 비해 감소되어 있었으며 이는 치료받지 않은 발병시기부터 관찰되었고, 특히 크론병환자에서 PCDAI 점수, ESR 수치와 유의한 음의 상관관계가 있었다. 내시경 소견 상 육안적 염증이 있는 부위에서 감소하였으며, 육안적으로 염증이 없는 점막의 현미경적 염증의 조직학적 점수와도 유의한 음의 상관관계를 보였다. $NCR^{-}ILC3$는 발병 시부터 질환군에서 증가되어 있었으며 PCDAI, PUCAI 점수와는 및 CRP, ESR 등 염증 지표와는 상관관계를 보이지 않았지만 육안적으로 염증이 있는 조직에서 증가하였으며, 현미경적 염증의 점수와도 유의한 양의 상관관계를 보였다. 또한 소장의 $NCR^{-}ILC3$는 로지스틱 회귀분석 결과 활성기 소아염증성장질환의 독립적인 위험인자였으며, 크론병 환자그룹만을 대상으로한 분석에서도 유의한 변수로 확인되었다. 대장의 ILC1은 $NCR^{-}ILC3$와 유사한 변화를 보였으며 특이사항으로 크론병과 궤양성 대장염 모두에서 ESR과 유의한 양의 상관관계를 보였다. 대장의 ILC2는 ESR과 양의 상관관계를 보였으며 이외에 다른 관련성은 없었다. 소장의 ILC 분포는 크론병에서만 $NCR^{+}ILC3$가 감소하였으며 염증지표 중 ILC1이 대변 Calprotectin과, ILC2가 CRP와 양

의 상관관계를 보였다. 궤양성대장염에서는 소장 ILC 분포에 특이소견이 없었다. 평균 약 400일 간격으로 두 번의 검사를 시행한 염증성장질환 치료군을 분석하였을 때 치료 전후로 소장 전체 ILC의 통계적으로 유의한 감소를 확인하였으며 이러한 변화는 특히 항TNF-α 사용 환자에서 확인되었다. 비염증 대조군의 정상 대장 점막조직에서 관찰한 ILCs 분포는 NCR^{+}ILC3가 가장 많은 부분을 차지하고 있었다. 소장 점막 전체 ILC 비율과 대장 전체 ILC 비율은 양의 상관관계를 보이며, 소장과 대장 점막 내에서 NCR^{+}ILC3와 ILC1이 음의 상관관계를 보였다. 대조군 내에서 여성과 남성의 소장 점막 ILC2 분포의 차이가 있었으며 ILCs 아형 간 다른 상관관계를 보였다.

ILCs 아형 중 ILC3s는 소아 염증성장질환 대장과 소장에서 점막 염증, 질환의 활성도와 가장 상관관계가 높았으며 대조군에서도 위장관에 존재하는 ILCs의 가장 많은 부분을 차지하는 등 성인 연구와 부합하는 결과를 확인했다(22). 질병 상태에서 NCR^{+}ILC3s와 NCR^{-}ILC3s의 분포 변화의 강한 연관성을 확인했지만 이러한 분포 변화가 점막내 ILCs 아형 간의 이동(transition), 다른 조직으로 부터의 이동(migration) 또는 새롭게 분화하는 ILCs에 기인하는지 여부는 본 연구에서 밝혀지지 않았다. 특히 NCR^{+}ILC3s와 NCR^{-}ILC3s간의 역상관관계의 경우 유세포분석 결과의 ILC3s을 분모로 하는 비율을 기반으로 하기 때문에 해석상 과대평가될 위험성이 있다. 그럼에도 불구하고 Transforming growth factor-β (TGF-β)에 의해 NCR^{+}ILC3s로부터의 NCR^{-}ILC3s로 전환 등 실험실 환경에서 보고 된 최근의 결과들은 장점막 염증에서의 역상관관계가 가진

중요성을 시사한다(23). ILC3의 염증성장질환에서 역할을 IL-17, IL-22, GM-CSF 생산과 결부지어 자가면역에 기여할 수 있다는 연구들이 있지만 현재까지 그 역할은 불명확하다(24). 본 연구의 다변량 로지스틱회귀분석에서 소아염증성장질환, 특히 크론병 활성질환에서 소장의 NCR⁻ILC3s가 독립적인 위험 인자로 확인되었다. 절대적인 ILCs의 숫자는 적음에도 불구하고 여러 다른 변수들과 독립적으로 그 분율의 변화가 염증의 활성도와 연관되어 있음을 밝혀냄으로써 면역 항상성을 유지할 때 뿐만 아니라 위장관 점막의 만성염증의 병태생리에도 소장의 NCR⁻ILC3s 가장 중요한 역할을 하고 있음을 보였다. 이러한 독립된 연관성은 위장관 염증활성도의 marker로 NCR⁻ILC3s 및 관련 cytokine등 biomarker을 활용의 근거가 될 수 있을 것이다. 염증성 장질환의 염증이 주로 대장에서 문제를 일으킴에도 불구하고 소장의 ILC 분율 변화에서 유의미한 결과가 도출이 된 것은 예상하지 못한 결과이며 대부분의 염증성장질환 환자의 ILCs 연구가 대장 조직을 기반으로 하고 있기 때문에 향후 소장에서의 ILCs 연구가 더 필요할 것으로 판단된다.

ILC1s 염증 장점막에서의 증가는 본 연구에서도 확인되었으며 이러한 증가는 ILC3s로부터의 분화와도 연관이 있을 것으로 추정된다(25). 또한, 말초 혈액의 ILCs를 함께 분석한 연구에서 ILC1s의 말초 빈도가 감소한 결과가 있으며 이는 염증조직으로의 이동을 시사한다(26). 염증성장질환 성인환자와 건강 대조군의 말초 혈액 ILC를 분석한 연구에서 순환하는 ILCs precursors에서 ILC3s을 활성화시키는 marker들이 크론병에서만 증가했고 IBD 연관 SLAMF1 단백 생산이 증가된 ILC2가 질병 활성도

와 음의 상관관계를 갖고 있었다(27). 본 연구에서 밝혀진 ILCs 분포의 특성을 기반으로 접근성이 더 높은 말초혈액 샘플을 후속 ILC 연구에 사용하여 진단적 및 치료적 가치를 높일 필요성이 있다. ILC2s는 기존의 연구들에서처럼 장 점막 분포 비율이 가장 낮았으나, 통계분석에서 크론병 환자의 CRP와 궤양성 대장염환자의 ESR과 양의 상관관계를 확인할 수 있었다. 그러나 유사한 염증성 질환인 류마티스관절염에서 말초혈액의 ILC2s는 증가되어 있었으나 ESR과 음의 상관관계를 보였으며(28), 뇌신경계 연구에서도 뇌수막 ILC2s는 항상성을 유지하는 역할을 하고 있어 결과의 차이를 보인다. ILC2s는 비록 분포비율이 작지만 최근 동물연구에서 위장관내 IL-10 생산을 가장 많이 담당하고 있는 것으로 밝혀졌다(29). 세포 분리에서 검출된 비율이 상당히 낮았기 때문에 ILC2s와 관련된 결론을 본 연구에서 도출하기는 어려울 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 본 연구에서는 해부학적 위치가 다른 소장의 ILCs와 대장의 ILCs간의 상관관계들을 확인할 수 있었다. 최근 동물연구를 통한 실험결과에 따르면 장점막의 ILCs들은 인근 림프 조직으로 이동할 수 있으며 장간말 림프절로 이동하여 Cytokine들을 분비할 수 있는 것으로 밝혀졌다(30). 대장과 소장간의 전체 ILCs비율의 양의 상관관계, 소장을 침범하지 않는 궤양성 대장염에서의 소장 ILCs와의 상관관계 등은 사람 위장관 ILCs 이동 및 분화 연구의 기반이 될 것이다.

본 연구에서 ILCs의 분포는 점막의 염증과 강한 연관성을 가지고 있었으며 기존의 염증지표들과 질병활성도 점수체계와 상관관계 또한 확인할 수 있었다. 염증성장질환의 진단 및 치료 반응을 평가하기 위해 다양한

방법이 사용되고 있으나 PCDAI, PUCAI 점수는 임상 의사가 관찰하고 계산한 정보를 기반으로 하며 질병 활성도를 측정에 있어 제한점이 있다(31). 또한 이러한 점수 체계는 질환의 병태생리 기전인 점막의 염증 또는 치료의 목표인 내시경적 관해(mucosal healing)를 반영하고 있지 않고 있다(32). 이전 성인 연구에서 점막의 염증과 점수체계와의 상관관계가 불량함이 보고되었으며 본 연구에서도 크론병의 PCDAI 점수, 대장점막의 NCR^{+}ILC3s 감소, Simplified pathological score는 상관관계가 있으나 PUCIA 점수의 경우 ILCs 아형 분포 및 현미경적 염증과 상관관계가 없었다(33). NCR^{+}ILC3s 등 ILCs아형 분포의 평가는 내시경적 관해 그리고 나아가 현미경적 관해를 평가하는데 도움이 되는 지표가 될 수 있을 것이다.

전향적으로 추적관찰 검사가 이루어진 11명의 환아에서 소장 점막의 전체 ILCs비율의 감소와 NCR^{-}ILC3s 비율의 증가를 확인하였고 대장점막은 차이가 없었다. 이는 소아를 대상으로 한 첫 추적관찰 연구이며 최근 성인을 대상으로 한 생물학적제제 치료 전후 연구에서 점막의 ILCs 아형의 분포간 차이를 확인하지 못했던 부분과 달리 소장의 점막 ILCs분포에서 유의한 차이를 발견한 새로운 사실이며 말초혈액 NCR^{-}ILC3s 비율이 증가된 부분 또한 유사하다(34). 항 TNFa 약제 그룹에서 소장 전체 ILCs의 변화가 유의하고 기저상태에 통계적으로 유의한 차이가 없던 다른 치료제 그룹에서는 이러한 변화가 관찰되지 않음은 비록 분석 대상 환자수가 적은 제한점이 있음에도 인과성을 시사하고 있다. 소아염증성 장질환의 효과적인 치료제로 항 TNFa 약제를 사용 중이지만 그 치료

기전은 불명확하고 무반응환자, 치료반응 소실환자 등 문제점이 남아 있다. 만성염증상태 장점막에서 dysregulation된 ILCs를 항 TNFa 약제를 포함한 생물학적제제(biologics)가 항상성 상태에 가깝게 회복시킬수 있다는 성인에서의 연구보고가 있다(34). 치료 이후에 염증과 연관성이 높은 NCR^{-}ILC3s 비율이 오히려 증가한 부분은 해석하기 어려운 부분이며 위장관에서 TGF-β가 항 염증 작용에 중요한 역할을 하고 있지만 오히려 NCR^{+}ILC3s를 NCR^{-}ILC3s로의 전환에 기여하는 것과 마찬가지로 ILC가 갖는 복잡한 조절기전에 의한 것으로 생각된다(23, 35). 아직까지 제한적인 치료 옵션을 가지고 있는 소아 청소년장질환의 새로운 치료방법 개발, 기존 치료에 대한 추적관찰, 치료반응의 예측 등 향후 다양한 측면에서 ILCs에 대한 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서 성별에 따른 ILCs 분포의 차이가 질환군과 비염증 대조군 모두에서 확인되었다. 성별에 따른 IBD의 차이는 아직 그 기전이 밝혀지지 않았으며 최근 관심이 증가하고 있다. 현재까지 알려진 바로 역학적으로 크론병의 경우 유럽과 미국에서는 여성이, 아시아 권에서는 남성이 더 발병률이 높으며 유전적 특징, 질환의 표현형, 활성도, 질환 합병증, 치료 반응 등 다양한 측면에서 성별의 차이가 존재한다(36). 특히 크론병에서 차이를 보이며 소아 크론병의 경우 남아에서 그 발병률이 높다(37). 현재까지 알려진 바로 *DLG5* pR30Q 변이형이 크론병에서 여성 특이 보호요인으로, *IL-23R* L310P 변이형이 궤양성 대장염에서 여성 특이 보호요인, 그리고 *IL-10* promotor 부위 단일염기변형이 궤양성 대장염의 여성 위험요인이다(38-40). ILC2s의 경우 성별과의 연관성이 다양한 측

면에서 보고되었다. 천식환자에서 Testosterone에 의한 ILC2s의 억제로 인해 남성에서 여성보다 증상이 경하다는 연구와(41), 동물실험에서 난소 절제를 하거나 estrogen 수용체에 문제가 있는 자궁에서 ILC2s가 감소한 연구가 보고되었다. 이러한 최근 연구는 ILC2s가 항상성 유지 또는 질환에서 성별에 따른 차이에 기여 한다는 근거이며 본 연구에서 대조군 여성에서만 ILC2s와 ILC3 subsets이 유의한 상관관계를 보임은 남성호르몬 또는 여성호르몬에 의한 ILC2 조절이 소아염증성장질환의 역학과 관계가 있을 가능성을 시사한다(42). 동물 호흡기 연구에서도 IL-33에 대한 ILC2s의 IL-5, IL-13의 생산이 남성보다 여성에서 많았으며 말초에 순환하는 ILC2s 수치는 차이가 없고 testosterone 치료시 ILC2s가 분비하는 cytokine이 감소했다(43, 44). 정상군 여성에서 관찰된 ILC2s와 ILC3의 음의 상관관계는 뇌손상 동물모델 뇌막에서 IL-33 자극을 통한 ILC2의 활성으로 ILC3 가 억제되는 결과와 유사하다(45). 관절, 호흡기, 뇌신경계 등 다양한 기관에서 ILCs와 연관된 성별에 따른 차이가 보고되고 있으며 본 연구를 통해 소아 염증성장질환의 성별에 따른 차이와 관련된 새로운 상관관계를 확인했다.

본 연구는 조직학적 점수를 Simplified pathological score를 사용하여 계산하였다. Villanacci 등이 보다 객관적이고 간편한 현미경 소견 분류를 위해 2015년 개발한 점수 체계이며, 성인 염증성장질환 환자를 대상으로 사용 중인 Geboes, ECAP, Robarts, Nancy 등의 다른 점수체계와 비교 연구가 이뤄졌으며 소아를 대상으로 처음 적용하였다는 제한점이 있다

(46). Geboes점수 등 조직학적 중증도 점수 경우 소아청소년 UC환자에서 적용할 수 있는 것으로 연구가 이루어진 바 있으나 내시경 염증 소견과 차이를 보이고 판독의에 의존적인 단점이 있어 이에 대한 해석에는 주의가 필요할 것으로 생각된다(47). 소아청소년 IBD에서 validation이 이루어진 'Inflammatory Bowel Disease-Distribution, Chronicity, Activity (IBD-DCA)' 점수 등을 사용한 전향적으로 계획된 병리조직학적 염증소견 분류 연구를 통해 이러한 제한점을 극복하고 ILCs와의 관계를 정확하게 밝혀낼 수 있을 것이다(48).

본 연구는 대조군 내 분석을 통해 소아청소년 장점막의 ILCs 분포 및 상관관계를 밝혀내었다. 비 질환군 사람 조직의 ILCs 분포 연구는 수행에 있어 제한점이 많다. 최근 44명의 건강한 대조군을 대상으로 ILCs의 공간적 시간적 분포가 보고되었다 (49). 쥐의 ILCs분포와 달리 사람의 ILCs는 덜 엄격하게 구획화되어 있고, ILCs 아형은 조직의 위치에 따라 차등적으로 영향을 받았다. 특히 ILC1s이 점막조직과 림프조직 간의 전사 이질성 (transcriptional heterogeneity)이 컸다. ILCs 분포의 연령과 성별에 따른 차이에 대한 동물실험과 사람을 대상으로 한 연구는 시작단계에 있다 (50-52) 본 연구에서는 연령에 따른 유의한 차이는 확인하지 못했지만 성별 간 ILCs분포의 차이를 질환군과 대조군 모두에서 확인할 수 있었으며 이에 대한 후속 연구가 필요하겠다.

본 연구의 제한점으로 첫째, 상대적으로 샘플수가 부족했던 점이 있다. 예상했던 것보다 세포 분리 과정에서 분석에 적합하지 않은 조직이 많았

다는 부분이다. 둘째, 대부분 ILCs분포를 단면적으로 분석했기 때문에 인과관계가 아닌 상관관계만 분석이 가능하였다. 그러나 소수의 연구대상은 추적관찰 검사가 이루어졌고 의미있는 결과를 도출 할 수 있었다. 마지막으로 모집 연령이 비염증 대조군의 연령이 염증성장질환 환자보다 다소 낮은 것이다. 그러나 질환군과 대조군 내에서 모두 연령은 ILCs의 분포와 상관관계가 없었기 때문에 모집이 어려운 소아청소년 대조군이기 때문에 가능한 한 설계단계에서 정한 기준으로 대조군을 구성하였다.

제 5 장 결 론

본 연구는 단일 인종으로는 적지 않은 수의 소아청소년을 대상으로 장점막 ILCs의 분포와 임상적 의의를 밝히고자 하였다. 위장관 점막 ILCs의 분포는 소아 염증성장질환과 유의한 관계가 있음을 확인하였으며 질병활성도, 점막치유, 현미경적 관해 등 임상적인 측면에서 중요한 연관성을 확인하였다. 치료효과에 대한 최근 많은 연구 결과들이 ILC세포군의 다양성과 기능을 이해하는데 도움을 주고 있다. 절대적인 ILC의 숫자는 적지만 정상조직에서의 면역항상성, 만성염증질환에서의 염증 유발 등 ILC의 기능을 조절할 수 있는 방법을 찾아내는 연구들이 필요할 것이며 ILC를 기반으로 하는 새로운 치료법을 기대하며 후속 연구의 필요성을 제시한다.

참 고 문 헌

1. Rosen MJ, Dhawan A, Saeed SA. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. JAMA Pediatr. 2015 Nov;169(11):1053-60.
2. Jostins L, Ripke S, Weersma RK et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature 2012; 491: 119 - 124.
3. Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH et al. Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. Gut 2013; 62: 630 - 649.
4. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature 2011 Jun 15;474(7351):307-17
5. Henderson P, van Limbergen JE, Wilson DC, Satsangi J, Russell RK. Genetics of childhood-onset inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2011 Jan;17(1):346-61.
6. Benchimol EI, Fortinsky KJ, Gozdyra P, Van den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths AM. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. Inflamm Bowel Dis 2011; 17: 423-39.
7. Ng SC, Tsoi KK, Kamm MA, Xia B, Wu J, Chan FK, Sung JJ.

Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: systematic review and meta-analysis. Inflamm Bowel Dis 2012; 18: 1164-76.

8. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. Nat Rev Immunol 2013;13:145-9.

9. Goldberg R, Prescott N, Lord GM, MacDonald TT, Powell N. The unusual suspects - innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2015; 12: 271 - 283.

10. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, te Velde AA, Meijer SL, Weijer K, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues . Nat Immunol. 2013;14(3):221-9

11. Longman RS, Diehl GE, Victorio DA, Huh JR, Galan C, Miraldi ER. CX_3 $CR1^+$ mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. J Exp Med. 2014;211(8):1571-83.

12. Geremia A and Arancibia-Cárcamo CV. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. Front Imminol 2017;8:1296

13. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent

innate intestinal pathology. Nature (2010) 464:1371 - 5.

14. Pearson C, Thornton EE, McKenzie B, Schaupp A-L, Huskens N, Griseri T, et al. ILC3 GM-CSF production and mobilisation orchestrate acute intestinal inflammation. Elife (2016) 5:e10066.

15. Camelo A, Barlow JL, Drynan LF, Neill DR, Ballantyne SJ, Wong SH, et al. Blocking IL-25 signalling protects against gut inflammation in a type-2 model of colitis by suppressing nuocyte and NKT derived IL-13. J Gastroenterol (2012) 47:1198 - 211.

16. Levine A, Koletzko S, Turner D, Escher JC, Cucchiara S, de Ridder L, et al. ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014 Jun;58(6):795-806.

17. Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. Inflamm Bowel Dis. 2011 Jun;17(6):1314-21

18. Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1991;12(4):439-47.

19. Turner D, Otley AR, Mack D, et al. Development and evaluation

of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI): a prospective multicenter study. Gastroenterology. 2007;133:423 - 432.

20. Villanacci V, Antonelli E, Salemme M, Bassotti G. Assessing mucosal healing in ulcerative colitis: the simpler, the better. Endoscopy. 2015;47:759.

21. Chang Y, Kim JW, Yang S, Chung DH, Ko JS, Moon JS, Kim HY. Increased GM-CSF-producing NCR(-) ILC3s and neutrophils in the intestinal mucosa exacerbate inflammatory bowel disease. Clin Transl Immunology. 2021 Jul 8;10(7):e1311.

22 Viant C, Rankin LC, Girard-Madoux MJ, Seillet C, Shi W, Smyth MJ, et al. Transforming growth factor-beta and Notch ligands act as opposing environmental cues in regulating the plasticity of type 3 innate lymphoid cells. Sci Signal. 2016;9(426):ra46

23. Forkel M, van Tol S, Höög C, Michaëlsson J, Almer S, Mjösberg J. Distinct Alterations in the Composition of Mucosal Innate Lymphoid Cells in Newly Diagnosed and Established Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. J Crohns Colitis (IF: 9.07; Q1). 2019 Jan 1;13(1):67-78.

24. Panda SK, Colonna M. Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. Front Immunol. 2019 May 7;10:861.

25. Bernink JH, Krabbendam L, Germar K, de Jong E, Gronke K,

Kofoed-Nielsen M, et al. Interleukin-12 and-23 control plasticity of CD127(+) group 1 and group 3 innate lymphoid cells in the intestinal lamina propria. Immunity. (2015) 43:146 - 60.

26. Gwela A, Siddhanathi P, Chapman RW, Travis S, Powrie F, Arancibia-Carcamo CV, et al. Th1 and innate lymphoid cells accumulate in primary sclerosing cholangitis-associated inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis. (2017) 11:1124 - 34.

27. Mazzurana L, Bonfiglio F, Forkel M, D'Amato M, Halfvarson J, Mjösberg J. Crohn's Disease Is Associated With Activation of Circulating Innate Lymphoid Cells. Inflamm Bowel Dis. 2021 Jun 15;27(7):1128-1138.

28. Omata Y, Frech M, Primbs T, Lucas S, Andreev D, Scholtysek C, et al. Group 2 Innate Lymphoid Cells Attenuate Inflammatory Arthritis and Protect from Bone Destruction in Mice. Cell Rep. 2018 Jul 3;24(1):169-180.

29. Bando JK, Gilfillan S, Di Luccia B, Fachi JL, Sécca C, Cella M, et al. ILC2s are the predominant source of intestinal ILC-derived IL-10. J Exp Med. 2020 Feb 3;217(2):e20191520.

30. Kästele V, Mayer J, Lee ES, Papazian N, Cole JJ, Cerovic V, et al. Intestinal-derived ILCs migrating in lymph increase

IFNgamma production in response to Salmonella Typhimurium infection. Mucosal Immunol. 2021 May;14(3):717-727.

31. Sun H, Lee JJ, Papadopoulos EJ, Lee CS, Nelson RM, Sachs HC, Rodriguez WJ, et al. Alternate endpoints and clinical outcome assessments in pediatric ulcerative colitis registration trials. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014;58:12 - 17.

32. Kerur B, Litman HJ, Stern JB, Weber S, Lightdale JR, Rufo PA, et al. Correlation of endoscopic disease severity with pediatric ulcerative colitis activity index score in children and young adults with ulcerative colitis. World J Gastroenterol. 2017 May 14;23(18):3322-3329.

33. Regueiro M, Rodemann J, Kip KE, Saul M, Swoger J, Baidoo L, et al. Physician assessment of ulcerative colitis activity correlates poorly with endoscopic disease activity. Inflamm Bowel Dis. 2011;17:1008 - 1014.

34. Creyns B, Jacobs I, Verstockt B, Cremer J, Ballet V, Vandecasteele R, et al. Biological Therapy in Inflammatory Bowel Disease Patients Partly Restores Intestinal Innate Lymphoid Cell Subtype Equilibrium. Front Immunol. 2020 Aug 27;11:1847.

35. Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. The role of transforming growth factor

(TGF)-β in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. Cytokine Growth Factor Rev. 2014;25:45 - 55.

36. Greuter T, Manser C, Pittet V, Vavricka SR, Biedermann L. Gender Differences in Inflammatory Bowel Disease. Digestion 2020;101(suppl 1):98 - 104.

37. Severs M, Spekhorst LM, Mangen MJ, Dijkstra G, Löwenberg M, Hoentjen F, et al. Sex-Related Differences in Patients With Inflammatory Bowel Disease: Results of 2 Prospective Cohort Studies. Inflamm Bowel Dis. 2018 May;24(6):1298 - 306.

38. Browning BL, Annese V, Barclay ML, Bingham SA, Brand S, Büning C, et al. Gender-stratified analysis of DLG5 R30Q in 4707 patients with Crohn disease and 4973 controls from 12 Caucasian cohorts. J Med Genet. 2008 Jan;45(1):36 - 42.

39. Lin Z, Poritz L, Franke A, Li TY, Ruether A, Byrnes KA, et al. Genetic association of nonsynonymous variants of the IL23R with familial and sporadic inflammatory bowel disease in women. Dig Dis Sci. 2010 Mar;55(3):739 - 46.

40. Tedde A, Laura Putignano A, Bagnoli S, Congregati C, Milla M, Sorbi S, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms influence susceptibility to ulcerative colitis in a gender-specific manner. Scand J Gastroenterol. 2008;43(6):712 - 8.

41. Cephus JY, Stier MT, Fuseini H, Yung JA, Toki S, Bloodworth

MH, Zhou W, et al. Testosterone Attenuates Group 2 Innate Lymphoid Cell-Mediated Airway Inflammation. Cell Rep. 2017;21(9):2487-2499.

42. Bartemes K, Chen CC, Iijima K, Drake L, Kita H. IL-33-Responsive Group 2 Innate Lymphoid Cells Are Regulated by Female Sex Hormones in the Uterus. J Immunol. 2018;200(1):229-236.

43. Wang C, Xu ZB, Peng YQ, Zhang HY, Yu QN, Guo YB, et al. Sex differences in group 2 innate lymphoid cell-dominant allergic airway inflammation. Mol Immunol. 2020 Dec;128:89-97.

44. Mathä L, Shim H, Steer CA, Yin YH, Martinez-Gonzalez I, et al. Female and male mouse lung group 2 innate lymphoid cells differ in gene expression profiles and cytokine production. PLoS One 2019 Mar 26;14(3):e0214286.

45. Baban B, Braun M, Khodadadi H, Ward A, Alverson K, Malik A, et al. AMPK induces regulatory innate lymphoid cells after traumatic brain injury. JCI Insight. 2021 Jan 11;6(1):e126766.

46. Villanacci V, Antonelli E, Lanzarotto F, Bozzola A, Cadei M, Bassotti G. Usefulness of Different Pathological Scores to Assess Healing of the Mucosa in Inflammatory Bowel

Diseases: A Real Life Study. Sci Rep. 2017 Jul 28;7(1):6839.

47. Kovach AE, Moulton DE, Plummer WD Jr, Dupont WD, Pacheco MC. Correlation of Endoscopic and Histologic Severity Scores in Pediatric Ulcerative Colitis at First Presentation. Pediatr Dev Pathol. 2019 Mar-Apr;22(2):106-111.

48. Lang-Schwarz C, Angeloni M, Agaimy A, Atreya R, Becker C, Dregelies T, et al. Validation of the 'Inflammatory Bowel Disease-Distribution, Chronicity, Activity [IBD-DCA] Score' for Ulcerative Colitis and Crohns Disease. J Crohns Colitis. 2021 Oct 7;15(10):1621-1630.

49. Yudanin NA, Schmitz F, Flamar AL, Thome JJC, Tait Wojno E, Moeller JB, et al. Spatial and Temporal Mapping of Human Innate Lymphoid Cells Reveals Elements of Tissue Specificity. Immunity. 2019 Feb 19;50(2):505-519.e4.

50. Darboe A, Nielsen CM, Wolf AS, Wildfire J, Danso E, Sonko B, et al. Age-Related Dynamics of Circulating Innate Lymphoid Cells in an African Population. Front Immunol. 2020 Dec 2;11:594107.

51. Loering S, Cameron GJ, Bhatt NP, Belz GT, Foster PS, Hansbro PM, et al. Differences in pulmonary group 2 innate lymphoid cells are dependent on mouse age, sex and strain. Immunol Cell Biol. 2021 May;99(5):542-551.

52. Schneider, C, Lee, J, Koga, S, Ricardo-Gonzalez, RR, Nussbaum, JC, Smith, LK, et al. Tissue-resident group 2 innate lymphoid cells differentiate by layered ontogeny and in situ perinatal priming. Immunity. 2019; 50: 1425- 1438.

Abstract

Innate lymphoid cell proportion in pediatric inflammatory bowel disease

- comparative cellular analysis of intestinal mucosa in human-

Ju Whi Kim
Department of Pediatrics
The Graduate School
Seoul National University

Background: Dysregulated innate and adaptive immune pathways have been implicated in the pathogenesis of intestinal inflammation in patients with inflammatory bowel disease (IBD). Innate lymphoid cellls (ILC) are effectors of innate which bridge the innate and adaptive immune systems. In recent years, various studies in murine

colitis model and adult IBD patients demonstrated the importance of ILCs in intestinal inflammation. The purpose of this study was to investigate the distribution of ILC in intestinal mucosa of pediatric IBD patients, compare with pediatric control group.

Methods: Mucosal tissue samples were obtained from inflammatory bowel disease patients and control aged between 7 and 19 years, undergoing endoscopy for assessment of disease activity or diagnosis. Children without IBD who had macroscopically and histologically normal mucosa served as the non-disease control group. Single-cell suspensions were isolated from intestinal biopsies of patients with inflammatory bowel disease and controls aged between 7 and 19 years, undergoing endoscopy for assessment of disease activity or diagnosis. Cell-surface fluorescence intensity was assessed by flow cytometric analysis for sorting ILC subpopulation. We analyzed the correlation of proportion of ILC with mucosal inflammation, disease activity, compartment, age and gender.

Results: A cohort of 78 children with the diagnosis of IBD (Crohn disease,CD: n=60, ulcerative colitis, UC: n=18), along with non-inflammatory 30 control children, was recruited. 148 Colonoscopy were performed and biopsy specimens from 23 patients were excluded, due to low percentage of living cells. In colonic mucosa of IBD patients, the frequency of natural cytotoxicity receptors $(NCR)^+$ ILC3s was decreased ($P<0.001$ for CD and UC). Simultaneously the

proportion of ILC1 was increased in both disease, CD (P<0.001) and UC (P=0.004). The frequency of natural cytotoxicity receptors NCR^- ILC3s was increased in colonic mucosa of IBD patient (P<0.001 for CD and UC). And in patients with CD a decrease in NCR^+ILC3s of small bowel was observed (P=0.021). Patients with naive treatment had same trend with established patient. NCR^+ILC3 were correlated with PCDAI activity score (r=-0.537, P=0.015), ESR (r=-0.504, P=0.023), microscopic inflammation (r=-0.382, P<0.001) and mucosal inflammation. Therapy with biologicals increased total ILCs proportion in small bowel (P=0.007). Logistic regression analysis showed that NCR^-ILC3s subset in small bowel mucosa predicted a greater likelihood of active IBD (adjusted odds ratio 1.076 P<0.011). In non-inflammatory control group, correlation among ILCs subgroup and gender differences were observed.

Conclusions: The proportion of the ILC1 and NCR^-ILC3s subset was higher in inflamed intestinal mucosa and associated with disease activity, mucosal inflammation and treatment response. Our results further support the general importance of ILC in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

keywords : inflammatory bowel disease, innate lymphoid cell, Crohn's disease, ulcerative colitis, child, adolescent

Student Number : 2017-39552