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

블레오마이신 유도 폐섬유증 모델에서 중간엽 줄기세포치료의 효과

2022년 8월

서울대학교 대학원

의학과 내과학 전공

최 선 미

블레오마이신 유도 폐섬유증 모델에서 중간엽 줄기세포치료의 효과

지도교수 임 재 준

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함
2022년 4월

서울대학교 대학원
의학과 내과학 전공
최 선 미

최선미의 의학박사 학위논문을 인준함
2022년 7월

위 원 장 _____ 전윤경 _____ (인)

부위원장 _____ 임재준 _____ (인)

위 원 _____ 이은영 _____ (인)

위 원 _____ 김혜영 _____ (인)

위 원 _____ 이은주 _____ (인)

초 록

블레오마이신 유도 폐섬유증 모델에서 중간엽 줄기세포치료의 효과

최 선 미
의학과 내과학 전공
서울대학교 대학원

서론: 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)은 아직까지 호전시키는 치료제가 개발되지 않은 난치성 질환이다. 폐섬유증 동물모델에서 폐의 염증과 섬유화를 개선시키는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)의 효과가 보고되었으나 아직까지 그 작용 기전에 대한 연구는 많이 부족하다. 본 연구에서는 폐섬유증의 면역학적 변화를 단핵구 및 대식세포를 중심으로 살펴보고, MSC 치료가 이러한 면역세포들에 어떠한 효과를 보이는지 확인하고자 하였다.

방법: 폐이식을 시행 받은 IPF 환자의 적출 폐 조직과 혈액을 수집하여 단핵구와 대식세포를 분석하였다. 생체실험(*in vivo* experiment)을 위해 블레오마이신(bleomycin, BLM)을 8주령 C57BL/6 마우스의 기관 내로 투여하여 폐섬유증 모델을 확립한 후 인간 제대혈 유래 MSC를 10일째 정맥 또는 기관 내로 투여하고 14일째 비교 분석하였다. 면역세포에 대한 분석을 위해 유세포분석을 시행하였고 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 유전자 발현 정도를 분석하였다.

결과: IPF 환자의 폐 조직에서 대식세포 및 단핵구, 특히 고전적 단핵구가 유의하게 증가함을 확인하였다. IPF 환자의 단핵구에서 분화시킨 대

식세포(monocyte-derived macrophage, MoM)들을 IL-13으로 자극하였을 때, 고전적 단핵구 유래 대식세포에서 2형 대식세포(type 2 macrophage, M2)의 유의한 활성화가 관찰되었고, 이 배양 상청액은 인간 폐 섬유아세포의 섬유화 특성을 유도하였으나 이 효과는 MSC에 의해 유의하게 억제되었다. BLM 그룹에서 증가하였던 염증세포 및 섬유화 지표들 역시 MSC 투여 시 감소하였으며, 기도 내 투여보다 정맥 내 투여 시 좀더 유의한 결과를 보였다. 폐대식세포에 대한 추가 분석 결과, BLM 투여 시 $SiglecF^{-}CD11b^{+}CD11c^{-}$대식세포 즉 MoM에서 M1, M2 모두 그 비율이 증가하였는데, MSC 투여는 그 중 M2를 유의하게 감소시켰다. M2 아형에 대한 분석 결과 MSC 정맥 투여 시 M2c만 유의하게 감소하였다. 또한 BLM 그룹에서 증가하였던 $Ly6c^{+}$ MoM은 정맥 투여된 MSC에 의해 유의하게 감소하였으며, 특히 M2 $Ly6c^{+}$ MoM이 유의하게 감소하였다.

결론: MSC 투여가 BLM 유도 폐섬유화를 감소시키는 기전에는 여러 면역세포들이 관여하며 특히 염증성 대식세포를 선택적으로 감소시켰는데, 특히 M2, 그 중 M2c를 유의하게 감소시켰다. 이러한 MSC의 효과는 고전적 MoM에서 유의하게 관찰되었고, 기관 내 투여보다 정맥 투여 시 더 효과적이었다.

주요어 : 폐섬유증; 블레오마이신; 중간엽 줄기세포; 대식세포; 단핵구

학 번 : 2013-30573

이 연구는 한국 정부(과기부)에서 지원하는 국립 연구재단의 바이오 및 의료 기술 개발 프로그램의 지원을 받아 진행되었음 (No. NRF-2017M3A9B4061887).

목 차

초록 i

목차 iii

표 목차 v

그림 목차 vi

I. 서 론 1

1. 특발성 폐섬유증 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)의 역학 및 예후 2

2. IPF에서 면역세포의 역할 3

3. 중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cell, MSC)의 특징 9

4. 제대혈 유래 MSC의 특징 11

5. MSC의 면역세포 억제능의 기전 및 항섬유화 효과 12

6. MSC 임상시험 결과 13

7. 연구의 필요성과 목적 14

II. 연구 방법 16

1. 환자 시료 수집 16

2. 폐섬유증 마우스 모델 16

3. 폐의 염증 반응 및 조직학적 분석 17

4. 유세포분석 19

5. 인간 말초 혈액 단핵세포 분리 및 단핵구 분류 32

6. *Ex vivo* 면역세포 배양 32
7. *In vitro* 섬유화 모델 33
8. 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응.....33
9. 인간 제대혈 유래 MSC 준비 및 투여.....38
10. 통계 분석.....39

III. 결 과.....40
1. IPF 환자 폐의 조직학적 분석 40
2. IPF 환자 폐의 유세포 분석.....44
3. IPF 환자 혈액의 단핵구 분석 47
4. 폐섬유증 모델에서 MSC에 의한 폐 염증반응의 완화.....50
5. 폐섬유증 모델에서 T 세포 및 선천 림프구 세포(innate lymphoid cell, ILC)에 대한 MSC의 조절 효과.....55
6. 폐섬유증 모델에서 MSC에 의한 폐 조직 mRNA 발현의 변화59
7. 폐섬유증 모델에서 선천 면역세포에 대한 MSC의 효과 63
8. 폐섬유증 모델에서 $Ly6c^{+/-}$ 대식세포에 대한 MSC의 효과 ...68

IV. 고 찰.....75

V. 결 론.....89

참고문헌.....90
Abstract 107

표 목차

[표 1] 조직의 염증 및 섬유화 점수 지표 18

[표 2] 유세포분석에 사용된 염색 30

[표 3] 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응 증폭에 사용된 프라이머 서열 35

그림 목차

[그림 1] 인간 대식세포와 단핵구에 대한 게이팅 전략 20
[그림 2] 마우스 T 세포 및 ILC에 대한 게이팅 전략 23
[그림 3] 마우스 대식세포에 대한 게이팅 전략 26
[그림 4] IPF 환자 폐조직 분석 41
[그림 5] IPF 환자 폐에서 단핵구 및 대식구 아형의 변화 44
[그림 6] 기원 단핵구 아형에 따른 대식세포의 폐 섬유화 유도능 48
[그림 7] 폐섬유증 모델에서 MSC의 기도 염증 조절 효과 51
[그림 8] 폐섬유증 모델에서 폐의 periodic acid-Schiff 염색 분석 54
[그림 9] 폐섬유증 모델에서 ILC및 T 세포 활성화에 대한 MSC의 조절 효과 56
[그림 10] 폐섬유증 모델에서 폐의 mRNA 발현에 대한 MSC의 효과 60
[그림 11] 폐섬유증 모델에서 수지상세포의 아형 활성화에 대한 MSC의 효과 65
[그림 12] 폐섬유증 모델에서 MSC에 의한 대식세포 아형 활성화의 변화 66
[그림 13] *In vivo*와 *ex vivo* 의 Ly6c$^{+/-}$ 대식세포 활성화에 대한 MSC의 조절 효과 70

I. 서 론

특발성 폐섬유증 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)은 아직까지 그 발병 원인이 명확하게 밝혀지지 않은 질환으로 현재까지 진행된 여러 연구들을 바탕으로 제시되는 병태생리는 다음과 같다. 유전적 감수성이 있는 사람에서 노화된 폐포의 상피세포에 반복적으로 미세 손상이 가해지면 상피세포가 활성화되고 기저막이 손상되면서 신호전달체계의 조절에 문제가 생기고 면역계가 활성화되어 여러 섬유화 인자들을 분비하게 된다. 이로 인해 여러 가지 원천으로부터 폐포로 섬유아세포(fibroblast)가 모집되어 활성화하게 되며, 결국 근섬유아세포들(myofibroblast)의 침착, 세포 외 기질의 조성 변화, 이로 인한 생체 역학적 경직(biomechanical stiffness)의 항진으로 섬유화가 진행된다. 이는 양성되먹임회로를 통해 지속적인 섬유아세포의 증식에 기여하며 결국 정상적인 수복과정을 담당하는 폐포 줄기세포의 소진, 기저세포 기능 장애와 함께 폐포 구조의 비정상적 개형(aberrant remodeling)이 발생하여 정상 폐포가 소실되고 벌집양 낭포(honeycomb cyst)와 같은 병적인 구조 변화가 발생하여 호흡 부전에 이르게 된다(1).

1. IPF의 역학 및 예후

IPF 는 희귀 질환 중 하나로 그 발생율은 지역에 따라 차이가 있는데 아시아태평양 국가들에서는 10,000 명 당 0.35-1.5 명, 유럽에서는 0.09-0.49 명, 북미 지역에서는 0.75-0.93 명으로 보고되었다(2). IPF 는 고령 및 남성에서 높은 유병율을 보이는데, 고령화 사회로의 진행에 따라 유병률 및 발생률이 지속적으로 증가하고 있으며(3) 국내에서는 2020 년 한 해 동안 약 4000 여명의 신규 환자가 발생하였다(4).

IPF 는 수 년 전까지도 진단 후 중앙 생존 기간이 약 3-5 년 정도로 보고되었던 예후가 매우 나쁜 질환이다. 비교적 최근까지도 이 질환에 대해 효과가 입증된 약물이 전무하였으나 여러 임상시험 끝에 2014 년 nintedanib 과 pirfenidone 이라는 약제들이 질환의 진행 속도를 유의하게 늦출 수 있음이 발표되면서 IPF 의 표준 치료로 사용되기 시작하였다(3, 4). 그러나 이러한 항섬유화 약제 역시 질병의 진행을 완전히 멈추거나 진행된 섬유화를 회복시켜주지는 못하기 때문에, 아직까지도 IPF 에 대한 치료 방법은 매우 제한적이라고 할 수 있다. 이에 효과적인 치료법 개발을 위한 여러 연구가 여전히 활발하게 진행되고 있다.

2. IPF에서 면역세포의 역할

1990 년대 여러 연구들에서 IPF 환자 및 폐섬유증 동물모델의 폐에 면역세포들의 침윤 및 tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-8 과 같은 염증성 사이토카인들의 발현이 증가되어 있다는 결과들이 발표되면서(5-7), 2010 년대 초반까지 IPF 의 치료제로 염증 및 면역반응을 억제하는 약물이 널리 사용되었다(8). 그러나 IPF 환자에서 TNF-α 중화항체인 etanercept 를 사용한 임상시험에서 그 효과를 입증하는데 실패하였고(9), 이어 2012 년 IPF 환자에게 prednisone, azathioprine, N-acetylcysteine 을 투여하였던 PANTHER-IPF 임상시험에서 위약군에 비해 시험군의 입원 및 사망률이 유의하게 높다는 결과가 보고되면서(10) IPF 의 병태생리에서 염증 및 면역반응이 중요한 기전이라는 가설에 대한 의문이 제기되었다. 이후 2014 년 2 가지 항섬유화제의 효과가 대규모 임상시험에서 입증됨에 따라 IPF 치료 전략의 방향이 항염증 및 면역억제에서 항섬유화제로 크게 전환되었다(3, 4). 그러나 앞선 연구들의 실패가 곧 IPF 의 병태생리에 염증 및 면역 반응이 중요하지 않다는 것을 의미하지는 않으며, 다만 각 연구에서 사용된 약제의 선택 및 조합이 효과가 없었다고 해석되어야 할 것이다(11).

이후 연구 기법이 발전되고 유전학 및 면역학 분야에 대한 이해가 깊어지면서 면역 반응과 관련된 여러 유전자들, 즉 *Toll-like receptor 3* (*TLR3*), *Toll-interacting protein* (*TOLLIP*), *IL-1 receptor*

antagonist (*IL-1RA*)와 같은 유전자들의 다형성(polymorphism)이 IPF 의 발생 위험 및 중증도와 유의한 관련이 있다는 연구 결과들이 보고되었다(12-15). 이를 바탕으로 IPF 의 병태생리에서 염증 및 면역반응에 대한 중요성이 다시 대두되기 시작되었고, IPF 의 병태생리에서 가장 중요한 세포 중 하나인 섬유아세포의 활성화 및 그 기능의 조절에 면역계가 중요하게 관여한다는 것이 밝혀지면서 IPF 에서 면역 반응의 조절에 대한 관심이 다시 증가하기 시작하였다(16).

IPF 의 발생 및 병태생리에는 여러 면역세포들이 관여를 하는데, 특히 여러 폐섬유증 동물 모델 실험들에서 단핵구 및 단핵구 유래 대식세포(monocyte-derived macrophage, MoM)의 중요성이 제시되었다(17-19). 더하여 최근 진행되었던 임상 시험들에서 IPF 환자의 혈액 내 단핵구 수의 증가가 질환의 진행 및 사망 등 나쁜 예후와 유의하게 관련이 있음이 발표되어 단핵구에 대한 관심이 더욱 커지고 있다 (20-22). 2019 년 발굴 코호트(discovery cohort)와 독립된 2 개의 검증 코호트(validation 1n cohort) 및 대규모 공단 자료를 사용하여 IPF 환자들의 혈액 내 단핵구와 예후와의 관련성을 분석한 연구에서는 0.95×10^9 cells/L 이상의 단핵구 수가 환자의 나쁜 예후와 유의한 관련성이 있다는 것을 보여주었다(20). 이후 2020 년 Australian IPF Registry 를 사용한 분석에서도 동일한 결과를 보고하였으며(21) 2021 년 4 개의 3 상 IPF 임상시험들의 통합 분석에서는 혈액 내 단핵구 수가 0.60 cells/L 이상 0.95×10^9 cells/L 미만 또는 0.95×10^9

cells/L 이상인 환자들이 단핵구 수가 0.60 × 10^9 cells/L 미만인 환자들에 비해 질환의 진행, 입원, 사망 모두 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(22).

단핵구는 고전적 단핵구와 비고전적 단핵구로 분류하며, 순환하는 단핵구의 다수는 고전적 단핵구이다. 폐의 염증이나 손상이 발생할 경우 혈관 내의 고전적 단핵구가 C-C Motif Chemokine Receptor 2(CCR2) 의존 방식으로 폐에 침윤하여 대식세포로 분화하게 된다. 이러한 폐의 대식세포는 위치, 생성 기원과 아형에 따라 여러 방법으로 분류할 수 있다.

첫 번째 분류방법은 대식세포의 위치에 따른 분류로, 폐포에 위치하는 폐포대식세포(alveolar macrophage, AM)와 간질에 위치하는 간질대식세포(interstitial macrophage, IM)이다. AM는 폐포 내에 머물며 미생물과 죽은 세포들을 제거하고 표면물질들을 대사시킴으로써 외부 물질에 의한 염증과 면역 반응 혹은 면역관용(immune tolerance)을 유도하고, 암피레귤린(amphiregulin)을 통해 폐포 재생에 관여한다. IM는 AM에 비하여 상대적으로 연구된 바가 적어 잘 밝혀져 있지 않으나 최근 혈관 주위 및 폐포 간질에 위치하는 두 아형이 존재한다고 보고되었다(23, 24).

두 번째 분류방법은 대식세포의 기원에 따른 분류로, 태아의 간이나 난환낭에서 유래하여 각 장기의 조직에 상주하는 조직 상주 대식세포(tissue resident macrophage, TRM)와 혈액 내 단핵구에서

유래한 MoM으로 분류할 수 있다. 그 중 MoM는 염증이나 감염이 발생하였을 때 백혈구가 유입된 후 급격히 유입되는 단핵구에서 분화된 대식세포이다. 사람의 발생 초기 AM는 대부분 TR-AM으로, 이들 세포는 자가증식(self-renewal)이 가능하여 조직에서 수년 이상 오랜 기간 상주를 하게 된다. 이후 감염 또는 염증으로 인해 TR-AM의 일부가 소실되는데, 소실 정도가 경미할 경우 자가증식을 통해 수를 유지할 수 있지만 심각한 감염이나 염증으로 인해 TR-AM의 소실이 심하게 발생할 경우 TR-AM의 증식만으로는 AM의 수를 유지하기가 어렵다. 이 때 감염이나 염증으로 혈액에서 유입되었던 MoM의 일부가 폐포대식세포로 전환이 되어(monocyte-derived alveolar macrophage, Mo-AM) 부족한 TR-AM의 수를 채우며 조직에 상주하게 된다(25). 따라서 사람이 나이가 들수록 AM 중 원조 TR-AM은 줄어들고 Mo-AM의 비율이 점차 증가한다(26).

마지막 전통적 분류방법은 기능에 따라 1 형 대식세포(type 1 macrophage, M1)와 2 형 대식세포(type 2 macrophage, M2)로 분류하는 것이다. M1 은 고전적 활성화 대식세포(classically activated macrophage)로 염증성 사이토카인들을 분비하고 병원체 제거에 관여하는 세포이다. M2 는 M1 과는 다른 대체 활성화를 보이는 대식세포(alternatively activated macrophage)로 항염증성 사이토카인들을 분비, 염증 반응을 종결하는 역할을 하고 조직의 개형(remodeling)에 관여한다고 알려져 있다. 이전 문헌들에서는 M1 과 M2 를 구분하여 두 아형의 차이를 비교 분석하는 연구들이 많았으나

최근에는 실제 인간이나 동물에서는 대식세포가 이렇게 이분화된 표현형으로 존재하는 것이 아니라 M1 부터 M2 까지의 특성을 발현하는 정도에 따라 하나의 스펙트럼을 이루고 있다고 이해되고 있다(25).

이렇게 다양한 형태와 기능을 가지는 대식세포가 IPF의 발생 및 진행에 있어 관여하는 기전에 대해서는 여러 가설들이 제시되고 있다. 먼저 대식세포는 섬유화에서 중요한 역할을 하는 전환 성장 인자-β (transforming growth factor-β, TGF-β)의 주요 원천이며, 여러 성장인자들과 사이토카인들을 생산함으로써 섬유아세포의 증식과 콜라겐 생성을 증진시키는 역할을 한다(27-30). 또한 실제 폐 조직에서 폐섬유화에서 중요한 역할을 하는 근섬유아세포에 가깝게 자리잡아 위치하면서 이러한 병적인 섬유화 반응을 조절하는 세포로서 주목을 받고 있다(29). 반면 대식세포는 섬유화에 억제 효과를 가지고 있는 matrix metalloproteinases (MMPs)를 생산하는 등 항섬유화 효과를 보이기도 한다(28).

이와 같이 대식세포는 미세환경에 따라 다양한 기능을 발현하고 때로는 상반되는 효과를 보이기 때문에 폐섬유증의 연구에 있어서도 각 대식세포의 아형에 따른 영향 및 효과를 밝혀내는 것이 중요하다. 그 중에서도 활성화된 M2는 TGF-β나 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor, PDGF)와 같은 섬유화 매개물질을 분비함으로써 섬유아세포의 활성화를 유발할 수 있어, 이러한 M1/M2 표현형의 조절의 변화 및 M2의 침윤이 폐섬유증의 발생 및 진행에 기여한다고 여겨지고 있다(31).

비교적 최근 여러 연구들에서 이러한 M2를 억제하는 것이 폐섬유증의 호전을 유도한다는 결과들이 보고됨으로써, IPF의 새로운 치료제로서의 가능성을 제시하고 있다. 2020년 발표된 한 연구에서는 Schsandra라는 물질이 M2로의 분극화를 억제함으로써 레트(rat)의 폐섬유화를 호전시켰다(32). 같은 해 발표된 다른 연구에서는 Microcystin-leucine arginine이 $CD206^{+}$ 대식세포로의 분극화를 약화시킴으로써 상피세포 혹은 섬유아세포의 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 혹은 섬유아세포-근섬유아세포 전이(fibroblast to myofibroblast transition, FMT) 신호전달을 억제하여, 블레오마이신(bleomycin, BLM) 유도 폐섬유화를 약화시킴을 보고하였다(33). 또한 SiRNA-loaded liposome을 사용하여 *Spliceosome associated factor 1*(*SART1*)의 발현을 억제시켰을 때 폐의 M2 침윤을 저해함으로써 BLM 유도 폐섬유증을 약화시킨다는 결과도 보고되었다.

대식 세포 이외에도 다양한 선천면역세포와 후천면역세포가 섬유아세포 생리 및 섬유화에 중요하게 관여한다(16). T 세포의 경우 그 역할이 다양하며 하위 유형에 따라 폐섬유화에 미치는 영향이 다르다고 보고되고 있다(34, 35). 도움 T 세포 (helper T cell, Th) 중 Th1, Th2, Th9, Th17 및 T 여포 보조 세포는 섬유화 촉진 효과가 있는 반면 Th22에는 항섬유화 효과가 있다고 알려졌다(36). 한편, 조절 T 세포 (regulatory T cell, Treg)는 섬유화 및 항섬유화 효과를 모두 가질 수 있는데, 여러 다양한 요인에 의해 결정되게 된다(37).

선천성 림프구 세포(Innate lymphoid cell, ILC)는 2010년에 새롭게 발견 및 정의된 세포군으로, 최근 면역 시스템에서 많은 관심을 받고 있는 세포이다. 형태학적으로 림프구 계열 세포와 비슷한 외형을 가졌으나 T 세포 수용체나 B 세포 수용체로 대표되는 수용체를 발현하지 않는, 즉 항원특이성을 가지고 있지 않은 세포이다. 이 세포들은 크게 3 군으로 나뉘며, 선천 면역세포에 가깝지만 Th에 상응하는 역할을 담당하여 ILC1, ILC2, IL3는 각각 Th1, Th2, Th17 및 Th22에 상응하는 효과를 보인다(38).

ILC는 감염을 조절하고 항성성을 유지하는 기능을 가지고 있으나, 이러한 ILC 조절에 문제가 발생할 경우 기도의 과민성이나 점액의 과분비, 콜라겐 침착, 폐포의 손상에 기여함으로써 여러 질환의 발생에 기여할 수 있다(39). 폐질환에서 ILC에 대한 연구는 주로 천식에서 시행되었으며 특발성 폐섬유증과 관련된 연구는 매우 부족하다. 2014년 발표된 한 연구에서 IPF 환자의 기관지폐포세척액 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 및 폐조직에서 ILC2 및 IL-25의 발현이 증가해 있어 이들을 표적으로 하는 치료법이 IPF 치료제로서 가능성이 있지 않을까 하는 제안이 있었다(40).

3. 중간엽줄기세포의 특징

줄기세포는 줄기세포능(stemness)과 자기재생능(self-renewal)을 유지하고 다양한 간엽조직으로 분화할 수 있는 능력(plasticity)이 있는

세포로, 항염증 및 항섬유 효과, 이동하는 특성, 그리고 면역관용의 특성을 가지고 있어 여러 질환의 치료에서 활발하게 연구되고 있는 치료방법이다. 그 중 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell, MSC)는 중배엽으로부터 유래된 조직인 연골, 뼈, 지방, 골수의 기질 등에 존재하는 다분화능을 가진 기질 세포이다. MSC 는 특정한 조건하에서 지속적으로 증식하고 분화하여 인간의 조직과 장기를 구성하는 여러 종류의 세포로 분화할 수 있다. MSC 는 약 10 여년 전부터 여러 질환의 치료제로서 연구되기 시작하였으며, 치료제로 시도되는 MSC 의 종류는 다양하다.

다수의 연구결과에서 MSC 는 낮은 면역원성을 가지며 면역관용능을 가지기 때문에 동종 간에 이식거부반응이 일어나지 않음이 잘 알려져 있다(41). 또한 자가줄기세포는 채취의 효용성으로 인해 지방유래의 줄기세포에 한정된 경우가 많으나 동종유래줄기세포의 경우 다양한 장기로부터 유래한 줄기세포를 이용하여 세포치료제를 만들 수 있는 장점을 가지기 때문에 실제 임상에서도 골수, 탯줄/태반, 지방조직 등 다양한 기원에서 유래된 줄기세포를 사용하여 연구가 진행되고 있다.

MSC 는 그 출처에 따라 조금씩 다른 특징을 가지는데, 그 중에서도 임상에서 사용되고 있는 MSC 는 크게 세 가지이다. 첫번째로 골수 유래 MSC 로, 동물모델에서 BLM 유도 폐섬유증을 호전시켰으며 이외의 여러 지표들도 호전됨이 보고되었다. 최근 IPF 환자에게서 얻은 골수 유래 MSC 가 미토콘드리아의 기능 이상과 DNA 손상으로 노화되었음이

보고된 바 있다(42). 두번째는 지방조직 유래 MSC 이다. 지방조직 유래 MSC 는 지방 조직에서 쉽게 얻을 수 있다는 장점이 있으며 여러 생리활성인자(bioactive factor)를 분비함으로써 세포 치료에서 좋은 결과를 보여준다고 알려져 있다. 세번째는 제대혈 및 태반 유래 MSC 이다. 제대혈 및 태반 유래 줄기세포는 줄기세포의 가소성(plasticity)이 좋고 면역원성이 낮은 장점을 가지고 있다(43). BLM 유도 폐섬유증 모델에서 항염증성 조절 기전을 높이고 사이토카인 발현은 감소시킴으로써 폐의 염증과 섬유화를 낮추는 결과를 보여주었다(44, 45). 특히 태반유래 MSC 는 면역조절능이 있어 폐의 수복과 재생에 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다.

4. 제대혈 유래 MSC의 특징

제대혈 유래 MSC는 치료적 사용에 유리한 여러 특성을 가지고 있다. 제대혈 유래 MSC에 의해 분화 및 생성된 세포들은 조직의 재생과 기능을 촉진하는 특성을 보이고(46, 47), 여러 면역세포들의 증식 억제 및 대식세포의 분화에 관여하여 염증을 억제하는 표현형으로의 분화를 유도하며, IL-10, IL-4을 분비함으로써 염증을 억제하는 등 여러 면역 반응의 조절을 통하여 조직의 수복을 가능하게 한다(47). 또한 여러 종류의 RNA의 발현을 조절함으로써 표적 유전자의 조절에 관여하고 (48, 49) 케라틴세포 성장인자(keratinocyte growth factor, KGF)나

간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF), 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF)와 같은 여러 사이토카인들을 분비하여 조직의 재생을 촉진한다(47, 50, 51). 더하여 IL-1β, TNF-α, IL-8과 같은 염증성 사이토카인들의 분비를 억제함으로써 염증과 산화스트레스를 감소시키고 세포자연사(apoptosis)를 억제하는 항염증 효과를 가지고 있다(48, 52). 마지막으로 섬유화와 관련된 세포들의 세포자연사를 촉진시키고 관련된 신호전달 체계를 조절하고 혈관의 개형(remodeling)을 촉진시킴으로써 항섬유화 효과를 가진다 (53).

5. MSC의 면역세포 억제능의 기전 및 항섬유화 효과

MSC는 폐섬유증의 병인론과 관련된 대식세포, T 세포 등 여러 면역세포의 활성을 조절한다고 알려져 있다(54). 특히 다양한 기전을 통해 대식세포를 조절하는데, 직접 세포에 접촉하거나, 프로스타글란딘 E_2(prostaglandin E_2, PGE2), TGF-β, 인돌아민 이산소화효소(indoleamine dioxygenase, IDO), TNF 자극유전자-6 (TNF stimulating gene-6, TSG-6), C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2), C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12)와 같은 수용성 인자 및 세포 외 소수포(extracellular vesicles, EV)를 분비하거나, 미토콘드리아전달 등의 기전을 통해 조절하게 된다(55).

폐 질환에서 MSC의 효과는 특발성폐섬유증, 기관지폐 형성장애

(bronchopulonary dysplasia), 천식, 급성 폐손상, 만성폐쇄성폐질환 등의 다양한 질환에서 동물 모델을 통해 연구되었다(56). 특히 폐섬유증 동물모델을 사용한 연구들에서 일관되게 MSC 치료가 염증과 섬유화를 호전시키는 결과를 보여주었다. BLM 유도 폐섬유증 모델에서 MSC 치료는 IL-10, INF-γ, TNF-α의 발현을 감소시키고 TGF-β1의 농도를 감소시켜 콜라겐 발현을 감소시키는 결과를 보여주었으며(44), MMP-2, MMP-9, MMP-13의 발현을 감소시켰다(57). BALF에서 염증 세포와 대식세포를 감소시키고 조직에서 섬유화된 범위를 감소시키며 1형 콜라겐과 α-smooth muscle actin (α-SMA) 농도를 감소시키는 결과도 보고되었다(58). 이 외에도 여러 연구들에서 BALF에서 염증 세포와 대식 세포를 감소시키고 IL-6와 TNF-α를 감소시켰으며 폐 조직에서 섬유화병소의 감소 및 IL-1β, TGF-β, 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 등을 감소시키는 것을 보고하였다(59, 60).

6. MSC 임상시험 결과

여러 동물 실험의 긍정적 결과들을 바탕으로 IPF 환자에서 MSC 치료에 대한 임상시험들이 진행되었다. 우선 1상 임상시험 결과들을 살펴보면, 2013년 발표된 연구에서는 환자 자신의 지방세포유래 MSC를 총 14명의 IPF 환자에게 투약하였고, 치료와 관련된 심각한 부작용 및 폐기능의 저하는 보고되지 않았다(61). 2014년 발표된 연구에서는 타인의

태반 유래 MSC를 8명의 IPF 환자에게 투약하였고, 6개월 간 추적관찰을 시행하였다. 치료와 관련된 심각한 부작용은 없었으며, 폐기능과 6분 도보검사 거리도 치료시점과 비교하여 악화되지 않음을 보고하였다(62). 2017년 보고된 한 연구에서는 골수 유래 MSC를 9명의 IPF 환자에게 투약하였고 치료와 관련된 심각한 부작용은 없었다. MSC로 치료받지 않은 환자 중 2명이 IPF의 진행으로 사망하였고, 투약 60주 후 MSC 치료군에서는 3%의 강제폐활량(forced vital capacity, FVC) 감소 및 5.4%의 폐확산능 (diffusing capacity of lung for carbon monoxide, DLCO)의 감소를 보여주어, 질환 진행을 안정화되는 결과를 보고하였다(63).

2020년 무작위 배정, 개방 표지, 위약 대조군, 1/2A상 임상시험 결과가 발표되었는데, FVC와 DLCO가 1년간 10% 넘게 감소한 10명의 환자를 치료군과 위약군에 각각 배정하여 투약군에서는 12주 간격으로 4사이클의 골수 유래 MSC를 투약하였다. 각 사이클 마다 1주 간경으로 2차례 정주하였다. 이 연구에서도 MSC치료와 관련된 심각한 부작용은 없었으며, 2차 평가지표였던 FVC, DLCO, 6분도보거리 모두 투약군에서 유의하게 좋은 결과를 보여주었다(64).

7. 연구의 필요성과 목적

이와 같이 MSC 치료가 폐섬유화를 감소시키는 효과를 보인다는 전임상 및 임상 연구 결과들이 보고되고 있으나, 아직까지 MSC 가

어떠한 세포에 어떠한 효과를 보이는지, 특히 대식세포 중 각 아형에 대한 효과는 어떠한 지, 어떤 경로로 투약하는 것이 효과적인지에 대한 연구는 매우 부족하다. 따라서 본 저자들은 BLM 을 이용한 폐섬유증 마우스모델에서 기관 내 및 정맥 내로 MSC 를 투여하여 각 치료가 단핵구, 대식세포를 포함하는 면역세포들에 어떠한 영향을 끼치는지 확인하고 섬유화에 미치는 영향을 확인함으로써 그 기전을 좀더 이해하고자 연구를 시행하였다

II. 연구 방법

1. 환자 시료 수집

IPF로 폐이식을 시행 받은 환자들에게서 수집된 적출 폐 조직과 혈액을 사용하여 연구를 시행하였다. 폐 조직은 육안상 섬유화 되지 않은 정상에 가까운 부위와 섬유화가 심하게 진행된 부위의 조직을 각각 수집하였다. 본 연구는 서울대학교병원의 의학연구윤리심의위원회로부터 승인을 받았다(IRB No. H02204-146-1319). 이미 수집된 인체 유래물에 대한 연구로 추가적인 동의는 면제되었다. 본 연구는 헬싱키 선언에 근거한 윤리규정 등에 따라 수행되었다.

2. 폐섬유증 마우스 모델

Orient Bio(Anyang, Korea)에서 구입한 암컷 8주령 C57BL/6 마우스를 사용하여 폐섬유증 모델을 구축하였다. BLM의 기관내 투여를 위해 마우스를 3% isoflurane으로 마취하고 바닥과 수직으로 고정시킨 후 집게로 마우스의 혓바닥을 밖으로 유출하여 식도를 막는 동시에 기도를 확장시켰다. 이후 마우스 기도 근처에서 파이펫을 이용하여 BLM (NIPPON KAYAKU, Tokyo, Japan) 3 mg/kg를 기관 내로 투여하였고, 대조군에는 동일한 양의 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 기관 내로 투여하였다. 본 연구는 서울대학교

실험동물자원관리원 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다. (IRB No. SNU-200327-1-3)

3. 폐의 염증 반응 및 조직학적 분석

폐의 염증 반응을 분석하기 위해 마우스의 BALF을 수집하였다. 마취 후 카테터를 마우스의 상기도에 삽관한 후 0.9ml의 PBS를 2번 투여하여 BAL을 시행하였고, 얻어진 BALF의 세포들을 Diff-Quik (Systmex, Kobe, Japan)으로 염색하고 계수하여 대식세포, 호중구, 호산구, 림프구를 포함한 면역세포의 수를 확인하였다

폐의 조직학적 변화를 확인하기 위해 파라핀으로 고정 후 hematoxylin and eosin (H&E), periodic acid-Schiff (PAS) 및 Masson's trichrome (MT) 염색을 시행하여 분석하였다. 관찰되는 폐의 염증 및 섬유화 정도는 문헌을 참고하여 정량화하여 평가하였다(표 1)(65-67)

표 1. 조직의 염증 및 섬유화 점수 지표

(A) 염증 점수 체계

점수	기준
0	정상
1	Few cells
2	A ring of inflammatory cells 1 cell layer deep
3	A ring of inflammatory cells 2−4 cell layer deep
4	A ring of inflammatory cells of > 4 cells

(B) PAS 점수 체계

점수	기준
0	<0.5% PAS 양성 세포
1	<25% PAS 양성 세포
2	25−50% PAS 양성 세포
3	50−75% PAS 양성 세포
4	>75% PAS 양성 세포

(C) MT 섬유화 점수 체계

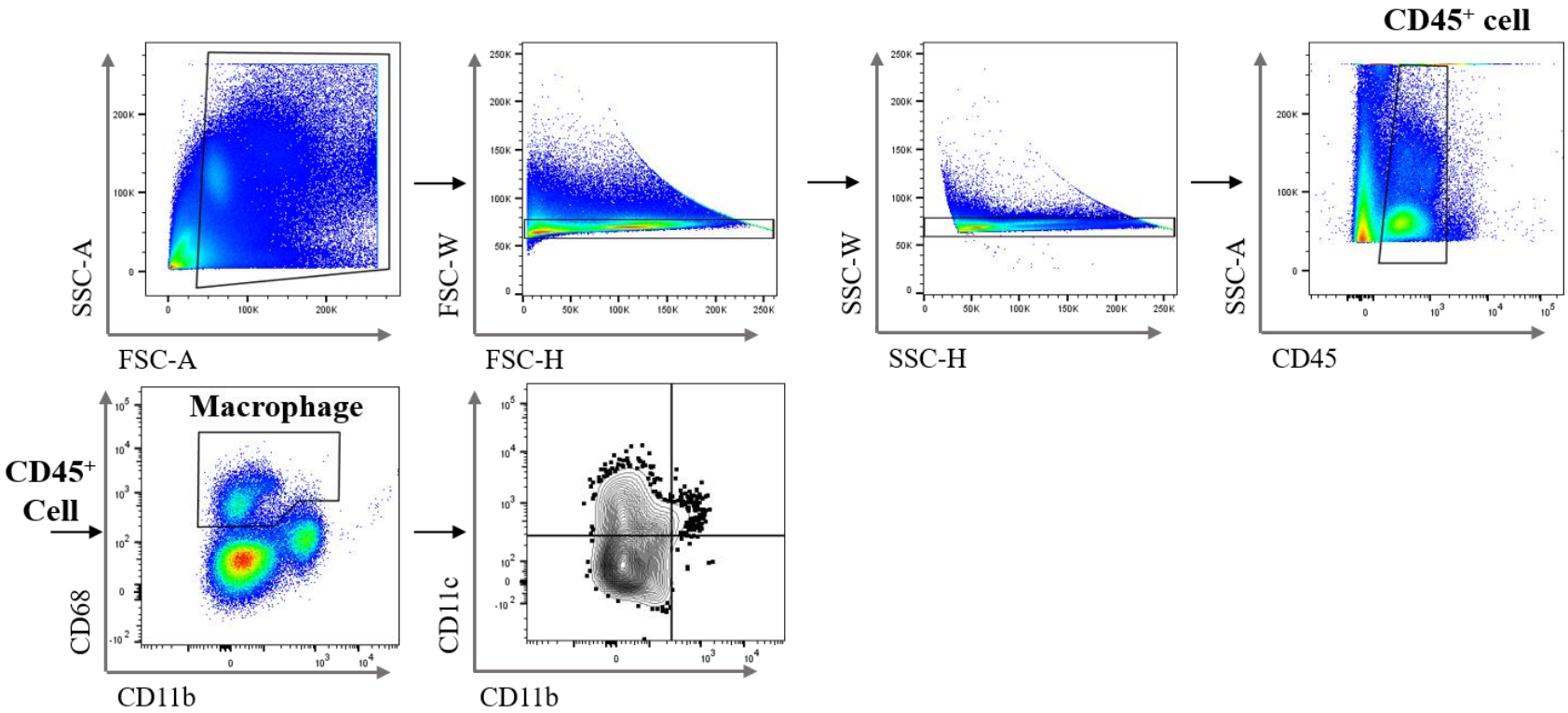
점수	기준
0	섬유화 없음
1	경증 섬유화: 폐의 20% 미만의 국소적 섬유화. 폐포 구조의 약한 왜곡과 함께 흉막과 흉막 하 실질의 간질을 포함하는 섬유화
2	중등도 섬유화: 폐의 20~50%를 침범하는 섬유화. 흉막 안쪽으로 확장되지만 여전히 국소적인 섬유화
3	중증 섬유화: 폐의 50% 이상을 차지하는 광범위한 섬유화. 입방 상피로 둘러싸인 낭포성 공기 공간을 포함한 실질 구조의 광범위한 변화.

4. 유세포분석

잘게 자른 IPF 환자의 폐 조직을 4형 콜라겐 분해효소(Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ, USA)와 함께 37℃ 배지에서 30분 동안 배양하였다. 잘게 자른 마우스 폐 조직도 마찬가지로 4형 콜라겐 분해효소(Worthington Biochemical Corporation)와 함께 37℃ 배지에서 90분 동안 배양하였다. 그 후 분리된 세포들을 멸균된 40㎛ 스트레이너를 통해 여과시키고 적혈구 용해 완충액(Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA)을 사용하여 적혈구를 제거하였다.

그 다음, 여과된 폐 단일 세포 현탁액을 FcγR-차단 단일클론 항체(BD Biosciences)로 처리하여 세포 표면, 세포 내 사이토카인 및 전사 인자를 염색하고 각 면역세포를 게이팅하였다(그림 1-3, 표 2).

(A)


CD45+ cell
SSC-A
FSC-A
FSC-W
FSC-H
SSC-W
SSC-H
SSC-A
CD45
CD45+
Cell
Macrophage
CD68
CD11b
CD11c
CD11b

(B)

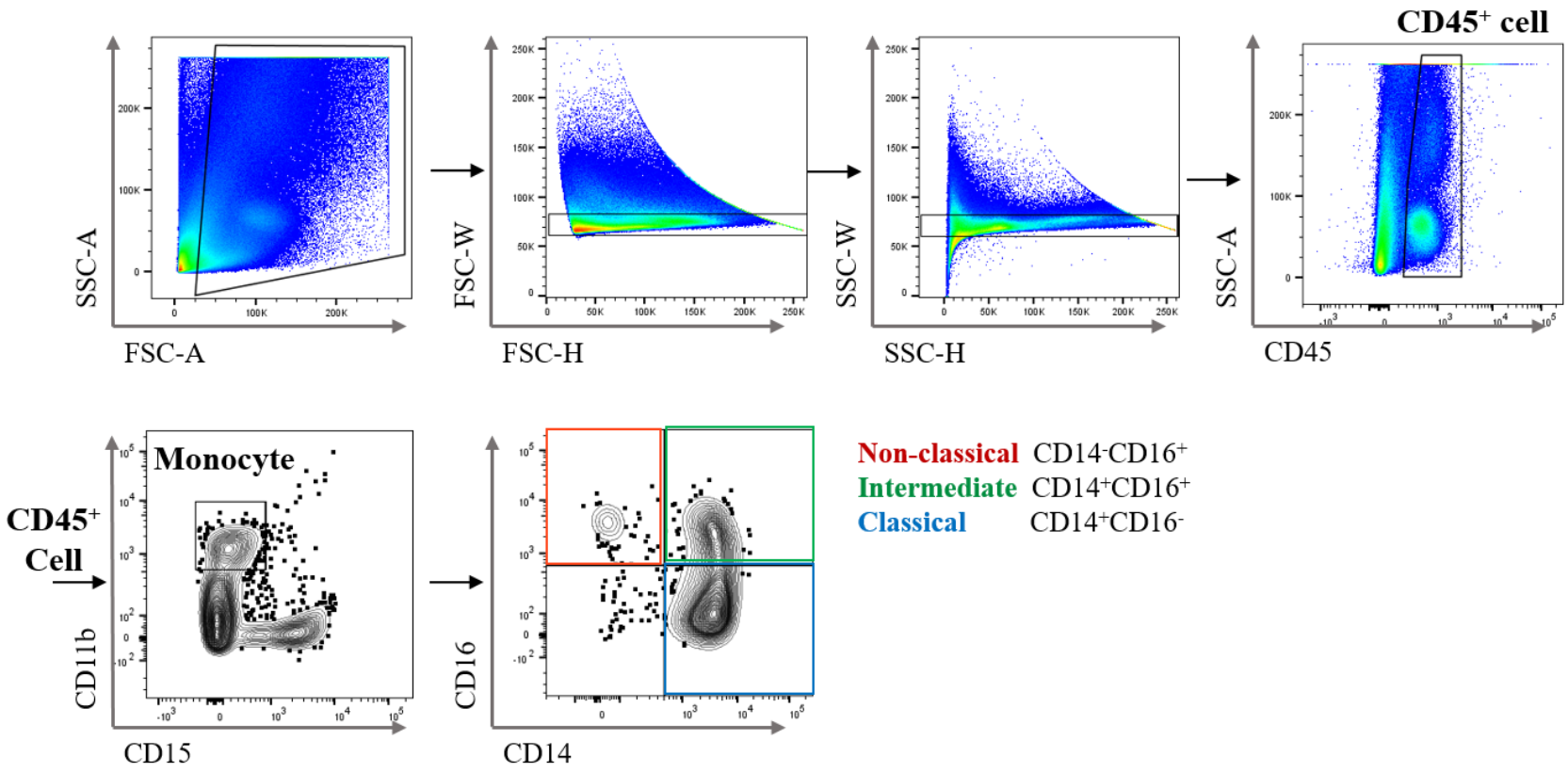
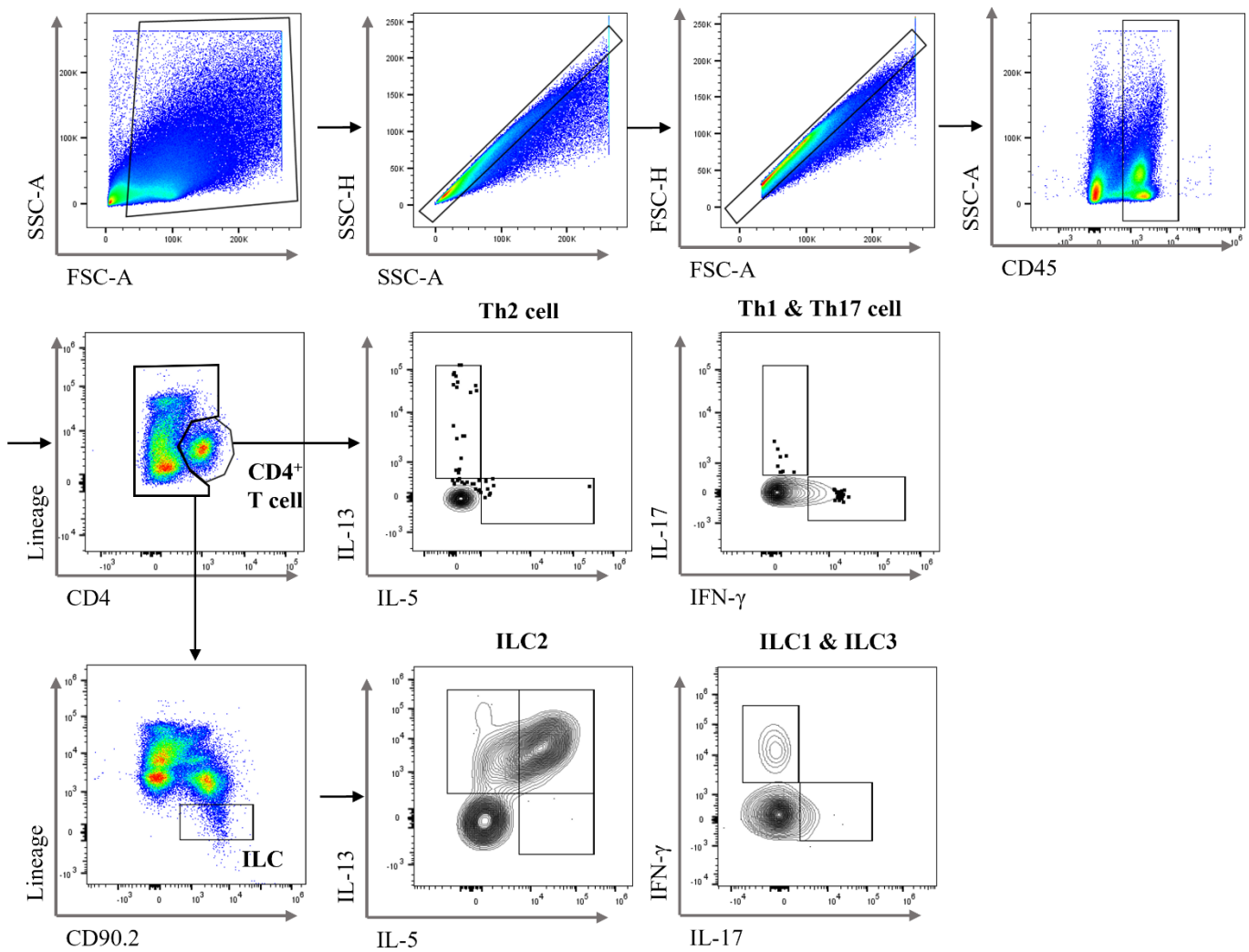

CD45+ cell
SSC-A
FSC-A
FSC-W
FSC-H
SSC-W
SSC-H
SSC-A
CD45
Monocyte
CD45+
Cell
CD11b
CD15
CD16
CD14
Non-classical CD14-CD16+
Intermediate CD14+CD16+
Classical CD14+CD16-

그림 1. 인간 대식세포와 단핵구에 대한 게이팅 전략

(A)인간 대식세포: SSC 및 FSC를 사용하여 살아있는 세포 집단을 선택하였다. 그 중 $CD45^+$ 세포를 선택하여 CD68 및 CD11b 표지자를 사용하여 대식세포를 분류하였다. 이 세포들을 CD11c 및 CD11b를 사용하여 각 대식세포 아형으로 분류하였다 (B)인간 단핵구: $CD45^+$ 세포는 대식세포와 동일한 방식으로 결정하였다. 그 다음 CD11b 및 CD15 표지자를 사용하여 단핵구 집단을 선택한 후, CD16 및 CD14 표지자를 사용하여 각 단핵구 아형으로 분류하였다. SSC, side scatter; FSC, forward scatter

(A)


SSC-A
FSC-A
SSC-H
SSC-A
FSC-H
FSC-A
SSC-A
CD45
Lineage
CD4
CD4+
T cell
Th2 cell
IL-13
IL-5
Th1 & Th17 cell
IL-17
IFN-γ
Lineage
CD90.2
ILC
ILC2
IL-13
IL-5
ILC1 & ILC3
IFN-γ
IL-17

(B)

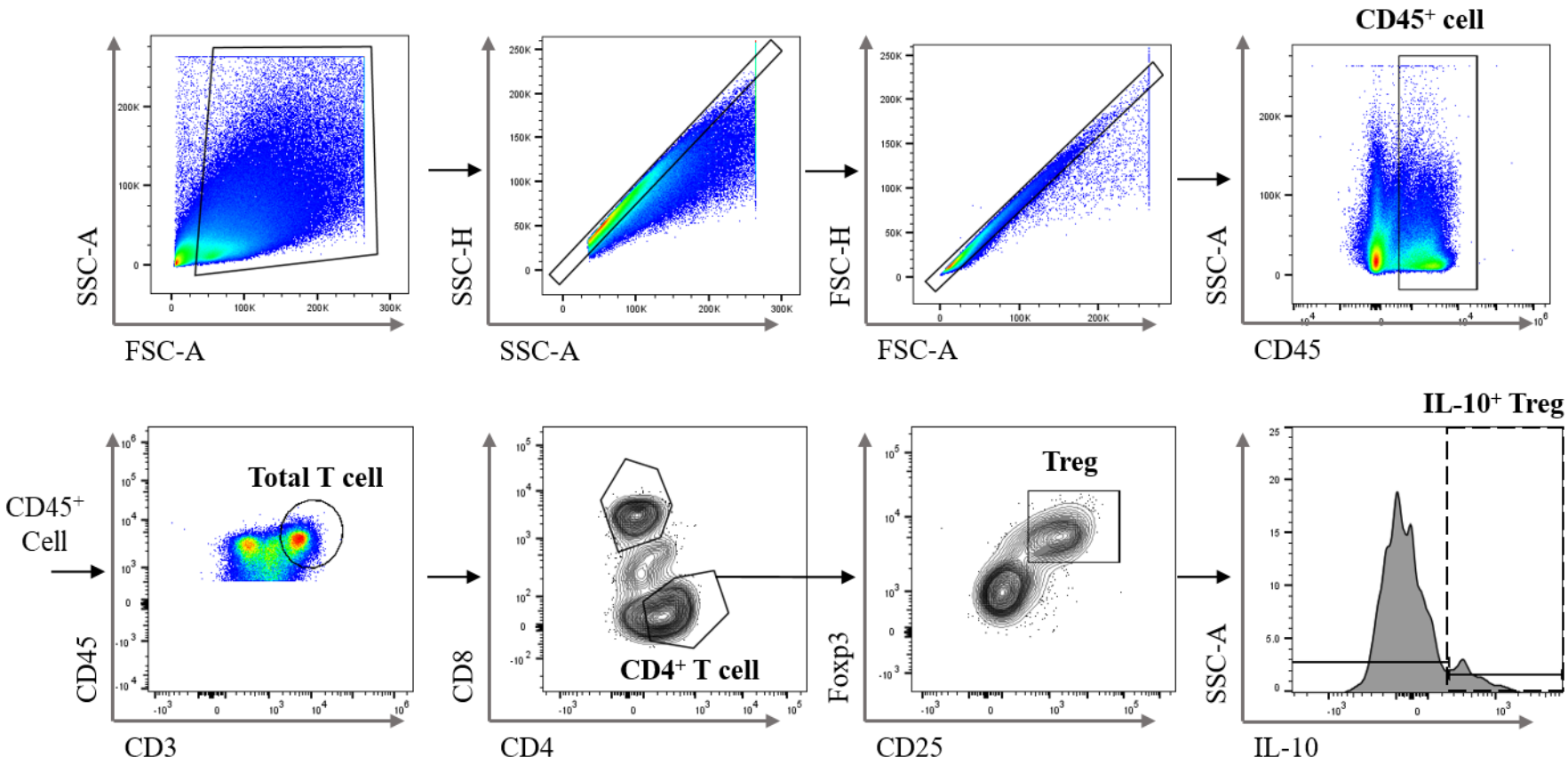
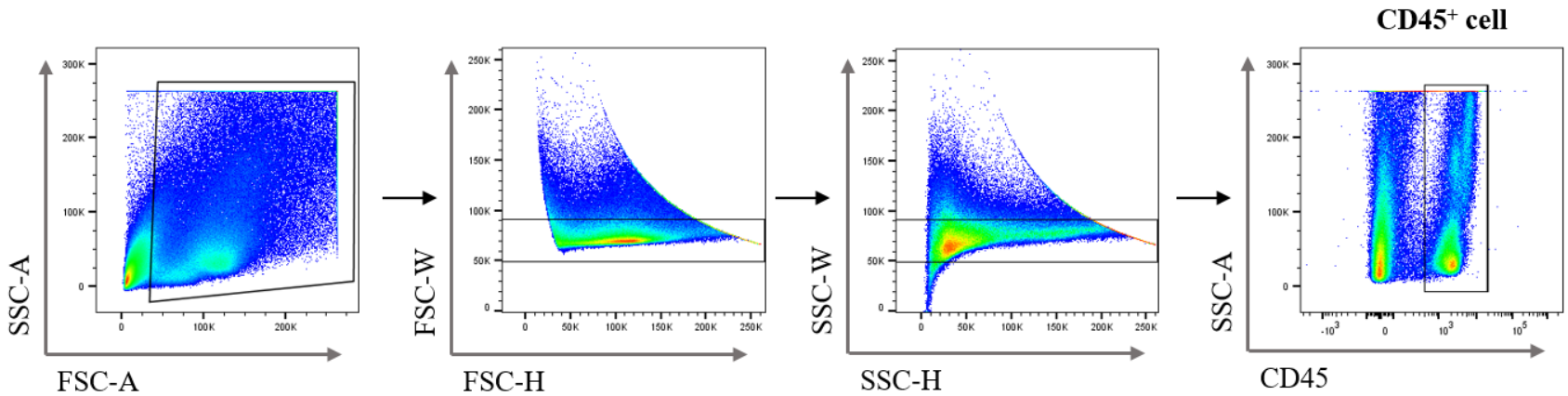

CD45+ cell
SSC-A
FSC-A
SSC-H
SSC-A
FSC-H
FSC-A
SSC-A
CD45
IL-10+ Treg
CD45+
Cell
Total T cell
CD45
CD3
CD4+ T cell
CD8
CD4
Treg
Foxp3
CD25
SSC-A
IL-10

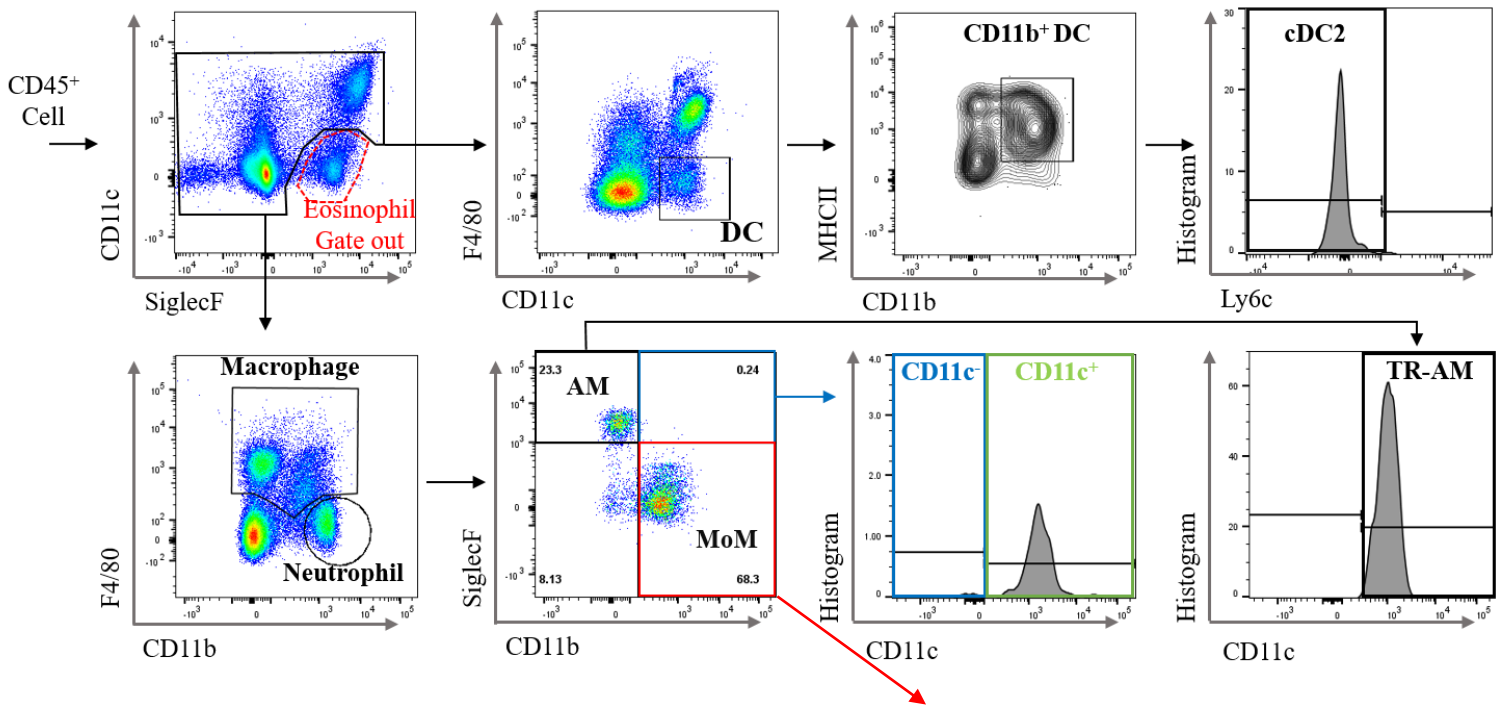
그림 2. 마우스 T 세포 및 ILC에 대한 게이팅 전략

(A) 마우스 도움 T 세포와 ILC: SSC 및 FSC를 사용하여 폐 단일 세포에서 살아있는 세포들을 선택한 후 $CD45^+$ 세포를 림프구로 정의하였다. 그 다음, $CD4^+$ T 세포는 lineage 대 CD4 산점도로 결정하였으며 ILC는 lineage 대 CD90.2 산점도로 결정하였다. IL-5, IL-13, IL-17 및 IFN-γ를 포함한 사이토카인에 따라 $CD4^+$ T 세포 및 ILC의 각 아형으로 분류하였다. (B)마우스 조절 T세포: 동일하게 살아있는 세포에서 림프구를 선택한 후 게이트된 $CD45^+$ 세포에서 CD3 표지자를 사용하여 T 세포를 선택하였다. 선택된 T 세포들을 $CD4^+$ T 세포와 $CD8^+$ T 세포로 분류하였고 그 후 CD4 대 CD8 산점도의 $CD4^+$ 세포에서 $Foxp3^+CD25^+$ 세포를 조절 T 세포로 정의하였다. 사이토카인 분비 세포의 게이팅은 형광대조군을 사용하여 결정하였다. ILC, innate lymphoid cell; IL, interleukin; IFN, interferon; Treg, regulatory T cells

(A)



(B)


CD45+
Cell
CD11c
SiglecF
Eosinophil
Gate out
F4/80
CD11c
DC
MHCII
CD11b
CD11b+ DC
Histogram
Ly6c
cDC2
F4/80
CD11b
Macrophage
Neutrophil
SiglecF
CD11b
23.3
AM
0.24
MoM
8.13
68.3
Histogram
CD11c
CD11c-
CD11c+
Histogram
CD11c
TR-AM

(앞페이지에 연속)

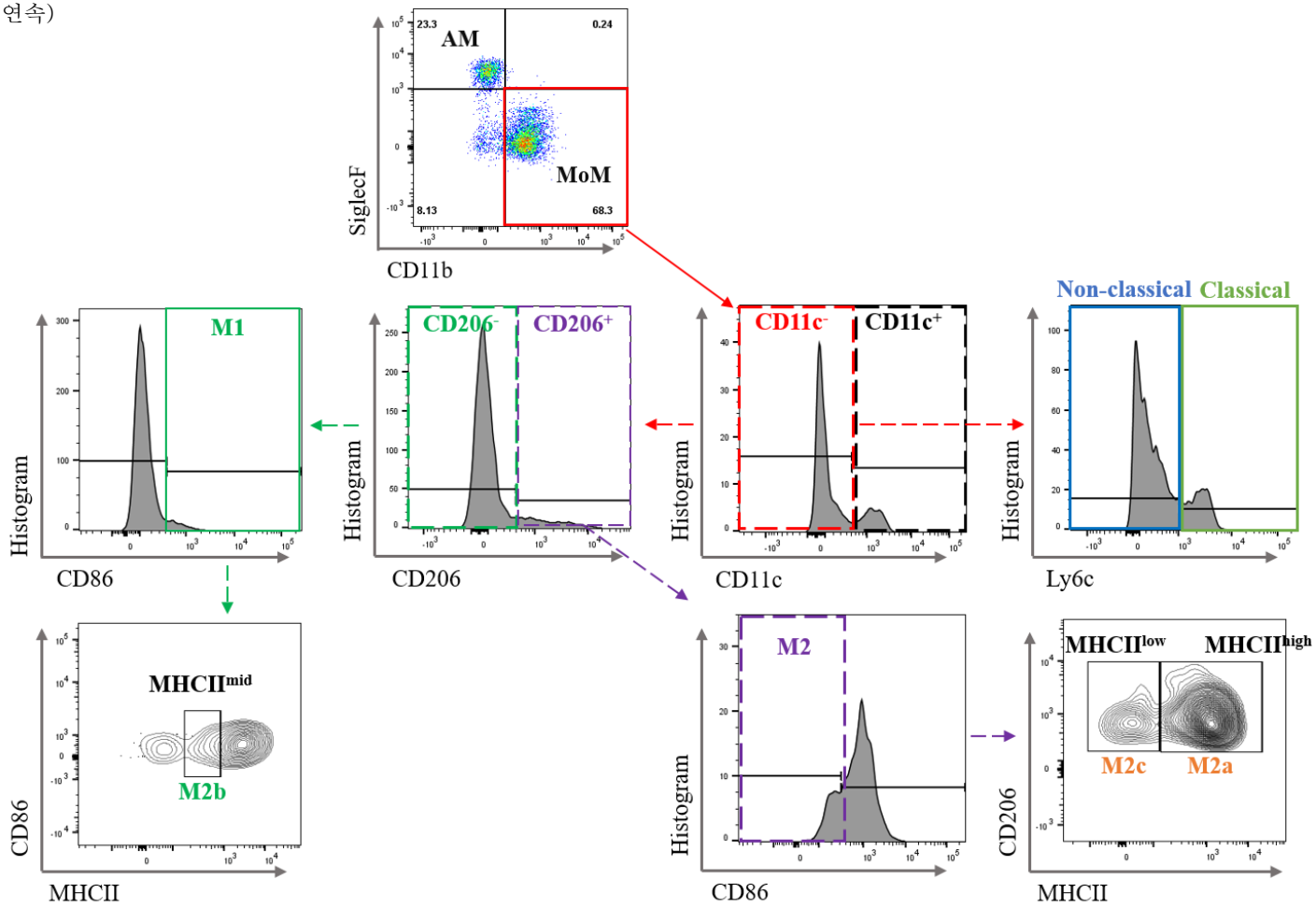

AM
MoM
23.3
0.24
8.13
68.3
SiglecF
CD11b
M1
CD86
CD206⁻
CD206⁺
CD206
CD11c⁻
CD11c⁺
CD11c
Non-classical
Classical
Ly6c
Histogram
MHCIImid
M2b
MHCII
M2
MHCIIlow
MHCIIhigh
M2c
M2a

그림 3. 마우스 대식세포에 대한 게이팅 전략

(A) 마우스 단일세포와 CD45 세포: 림프구 게이팅도 T 세포 및 ILC 게이팅과 동일한 방식으로 시행되었다. (B) 마우스 호산구, DC 및 대식세포 아형 분리: CD11c 대 SiglecF 산점도에서 호산구를 제외하였다. 그 다음 F4/80, CD11c 및 CD11b 표지자를 사용하여 DC 와 대식세포를 분류하였다. DC 는 MHCII, CD11b, Ly6c 가 있는 $CD11b^{+}$ DC 및 cDC2 로 세분화하였다. CD11c 및 CD11b 표지자는 대식세포에서 AM 및 MoM 을 분류하는 데 사용되었다. AM 에서 SiglecF 발현이 있는 세포군은 TR-AM 으로 분류하였다. MoM 에서 CD11c 및 SiglecF 표지자를 사용하여 여러 하위 유형을 나누고 분석을 시행하였다. 특히, MoM 의 추가적 분석을 위해 Ly6c, CD11c, CD86 및 CD206 표지자를 사용하였다. $CD86^{+}CD206^{-}CD11c^{+}$ MoM 은 M1 MoM 으로 정의하였다. M2 MoM 은 $CD86^{-}CD206^{+}CD11c^{-}$ MoM 으로 정의하였다. M2 하위유형은 다음과 같이 정의하였다. CD206 및 CD86 히스토그램 플롯의 $MHCII^{hi}CD206^{+}CD86^{-}$ 세포, $MHCII^{mid}CD206^{-}CD86^{+}$ 세포 및 $MHCII^{low}CD206^{+}CD86^{-}$ 세포를 각각 M2a, M2b 및 M2c 로 정의하였다. 모든 대식세포 아형은 전체 대식세포에 대한 비율로 나타내었다. 대식세포 아형 게이팅은 형광대조군을 사용하여 결정하였다. SSC, side scatter; FSC, forward scatter; DC, dendritic cells; cDC2; type 2 conventional DCs; AM, alveolar macrophages; MoM, monocyte-derived macrophage; TR-AM, tissue resident-alveolar macrophage; M1, type 1 macrophage; M2, type 2 macrophage; MHCII, major histocompatibility complex II

표 2. 유세포 분석에 사용된 염색

(1) 마우스용

FcγR block 염색	
이름	회사명
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32	BD Biosiences

대식세포 염색		
이름	형광	회사명
MHCII(I-Ad)	APC	eBioscience (eBioscience, San Diego, CA, USA)
CD45	BV650	Biolegend (Biolegend, San Diego, CA, USA)
SiglecF	BV421	
Ly6c	BV510	
CD11c	BV711	
CD11b	BV785	
CD86	FITC	
F4/80	PE	
CD206	PE-Cy7	

$CD8^+$ T 세포 & 조절 T 세포 염색		
이름	형광	회사명
CD45	BV650	Biolegend
IL-10	APC	
CD25	BV421	
CD4	BV785	
CD3	FITC	
CD8	PE	
Foxp3	PerCP-Cy5.5	

$CD4^+$ T 세포 & ILC 염색		
이름	형광	회사명
CD45	BV650	Biolegend
IL-5	APC	
IL-17	BV421	
IFN-γ	PerCP-Cy5.5	
CD4	BV785	
Lineage	FITC	

IL-13	PE	
CD90.2	PE-Cy7	

(2) 인간용

Fc γ R block staining	
이름	회사명
Human BD Fc Block™	BD Biosiences

대식세포 염색		
이름	형광	회사명
MHCII(I-Ad)	APC	eBiosience
CD45	BV650	Biolegend
CD11c	BV421	
CD11b	BV785	
CD68	FITC	
CD206	BV711	
CD15	PE-Cy7	

단핵구 염색		
이름	형광	회사명
CD45	BV650	Biolegend
CD11b	APC	
CD14	FITC	
CD16	PE	
CD15	PerCP-Cy5.5	

5. 인간 말초 혈액 단핵세포 분리 및 단핵구 분류

IPF 환자의 혈액을 PBS로 희석한 후 Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)를 사용하여 원심분리하여 말초 혈액 단핵세포 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 추출하였다. 추출된 PBMC를 BD AriaIII (BD Biosciences)를 사용하여 각 단핵구 아형으로 분류한 후 MSC와 함께 재조합 인간 대식세포 집락자극인자 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)(Biolegend)를 처리하여 5일동안 대식세포로 분화시켰다. 이후 분화된 대식세포에 재조합 마우스 IL-13 (Biolegend)을 하루 동안 처리하였다.

6. *Ex vivo* 면역세포 배양

마우스의 $CD4^+$ T 세포 분리를 위해 여과된 비장 세포 현탁액에서 MojoSort™ Mouse CD4 Naive T Cell Isolation Kit (Biolegend) 음성을 보이는 세포들을 선택하였다. Th17 면역 반응 조절에 대한 MSC의 효과를 확인하기 위해, 마우스 비장에서 분리된 $CD4^+$ T 세포를 24웰 트랜스웰 플레이트의 하부 챔버에서 MSC와 함께 CellXVivo 마우스 Th17 세포 분화 키트(RnD systems, Minneapolis, MN, USA)로 분화시켰다.

마우스의 단핵구 분리를 위해 BLM 모델의 골수 단일 세포 현탁액을 여과한 후 MojoSort™ Mouse Monocyte Isolation Kit (Biolegend) 음성을 보이는 세포들을 선택하였다. 음성으로 분리된 단핵구는 피코에리드린(phycoerythrin, PE)-conjugated Ly6c 항체로 염색한 뒤, MojoSort Mouse anti-PE nanobeads (Biolegend)를 사용하여 $Ly6c^{+}$ 또는 $Ly6c^{-}$ 단핵구로 분류하였다.

7. *In vitro* 섬유화 모델

인간과 마우스 폐섬유화의 *in vitro* 모델을 확립하기 위해 CCL-117 세포(인간 폐 섬유아세포)과 MLg 세포(마우스 폐 섬유아세포)를 한국세포주은행에서 구입하였다. 모든 세포주는 Dulbecco′s Modified Eagle′s Medium (DMEM)에 10% FBS를 첨가하여 37℃에서 배양하였고, 배지는 3일에 1회 교체하였다. 재조합 TGF-β와 함께 2 x 10^4 조건으로 파종된 섬유아세포에 인간 또는 마우스 유래 MoM의 배양 배지를 투여하여 섬유화 유도능을 분석하였다.

8. 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-qPCR)

동결된 인간 및 마우스 폐 조직을 균질화한 후 Trizol (Thermo

Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 및 클로로포름을 사용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 SensiFAST cDNA Synthesis Kit(Bioline, London, UK)로 역전사하여 cDNA를 합성하였다. RT-qPCR은 SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit(Bioline)을 이용하여 수행하였고, 목표 유전자의 발현은 house keeping 유전자를 이용한 ⊿⊿Ct 방법으로 확인하였다(표 3).

표 3. 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응 증폭에 사용된 프라이머 서열

(1) 마우스용

Gene	Mouse primer sequence
Gapdh	Forward primer: 5' -AGACTCCACGACATACTCAG-3' Reverse primer: 5' -ACGGCAAATTCAACGGCACA-3'
Hprt	Forward primer: 5' -CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG-3' Reverse primer: 5' -CCAGTTTCACTAATGACACAAACG-3'
Il13	Forward primer: 5' -GATCTGTGTCTCTCCCTCTGA-3' Reverse primer: 5' -GTCCACACTCCATACCATGC-3'
Fn1	Forward primer: 5' -TACCAAGGTCAATCCACACCCC-3' Reverse primer: 5' -CAGATGGCAAAAGAAAGCAGAGG-3'
Gata3	Forward primer: 5' -CCAGCTCACAGTATGGG-3' Reverse primer: 5' -CCAGCTCACAGTATGGG-3'
Rorc	Forward primer: 5' -CCGCTGAGAGGGCTTCAC-3' Reverse primer: 5' -TGCAGGAGTAGGCCACATTACA-3'
Fgf1	Forward primer: 5' -GGGAGATCACAACCTTCGCA-3' Reverse primer: 5' -CTGTCCCTTGTCCCATCCAC-3'
Ccl11	Forward primer: 5' -CCATGAAACCCACTGCCAT-3' Reverse primer: 5' -GGAAGCTCTTTCTTCAAGGTG-3'
Il17a	Forward primer: 5' -GAAGGCAGGAATCACAATC-3' Reverse primer: 5' -GCCTCCCAGATCACAGA-3'
Cd86	Forward primer: 5' -CAGACTCCTGTAGACGTGTTC-3' Reverse primer: 5' -AACAGCATCTGAGATCAGCA-3'
Mrc1	Forward primer: 5' -TATCTCTGTCATCCCTGTCTCT-3' Reverse primer: 5' -CAAGTTGCCGTCTGAACTGA-3'
Mmp9	Forward primer: 5' -CTTCTGGCGTGTGAGTTTCCA-3' Reverse primer: 5' -ACTGCACGGTTGAAGCAAAGA-3'
Tbx-21	Forward primer: 5' -AGCAAGGACGGCGAATGTT-3' Reverse primer: 5' -GGGTGGACATATAAGCGGTTC-3'
Itgam	Forward primer: 5' -ACGTCAGTACAAGGAGATGTTGGA-3' Reverse primer: 5' -TCCCCATTCACGTCTCCCA-3'
IL10	Forward primer: 5' -GGGTTGCCAAGCCTTATCG-3' Reverse primer: 5' -TCTCACCCAGGGAATTCAAATG-3'
Il5	Forward primer: 5' -GCCTCCCAGATCACAGA-3' Reverse primer: 5' -CAGGAACAGGAATCCTCAGA-3'

Ym1	Forward primer: 5’ −AGAAGGGAGTTTCAAACCTGGT−3’ Reverse primer: 5’ −GTCTTGCTCATGTGTGTAAGTGA−3’
Cxcl1	Forward primer: 5’ −CTGGCCACAGGGGCGCCTATC−3’ Reverse primer: 5’ −GGACACCTTTTAGCATCTTT−3’
Cxcl2	Forward primer: 5’ −CCAACCACCAGGCTACAGG−3’ Reverse primer: 5’ −GCGTCACACTCAAGCTCTG−3’
Ifng	Forward primer: 5’ −GGCCATCAGCAACAACATAAGCGT−3’ Reverse primer: 5’ −TGGGTTGTTGACCTCAAACTTGGC−3’
Cd163	Forward primer: 5’ −ACTCTGAAGCGACGACAGATT−3’ Reverse primer: 5’ −TGAATGACCCCCGAGGATTT−3’
Ccl22	Forward primer: 5’ −TACATCCGTCACCCTCTGCC−3’ Reverse primer: 5’ −CGGTTATCAAAACAACGCCAG−3’
Foxp3	Forward primer: 5’ −CACCCAGGAAAGACAGCAACC−3’ Reverse primer: 5’ −GCAAGAGCTCTTGTCCATTGA−3’
Tgfb	Forward primer: 5’ −AGGAGACGGAATACAGGGCT−3’ Reverse primer: 5’ −CCACGTAGTAGACGATGGGC−3’
Col4a1	Forward primer: 5’ −GTCTGGCTTCTGCTGCTCTTC−3’ Reverse primer: 5’ −CCTTCACGCCATGACAGTCA−3’
Il1b	Forward primer: 5’ −GCAACTGTTCCTGAACTCAACT−3’ Reverse primer: 5’ −ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT−3’
Fgf2	Forward primer: 5’ −GCGACCCACACGTCAAACTA−3’ Reverse primer: 5’ −CCGTCCATCTTCCTTCATAGC−3’
Itgax	Forward primer: 5’ −ACGTCAGTACAAGGAGATGTTGGA−3’ Reverse primer: 5’ −ATCCTATTGCAGAATGCTTCTTTACC−3’

(2) 인간용

Gene	Human primer sequence
HPRT	Forward primer: 5' -TGGTCAGGCAGTATAATCCAAAGA-3' Reverse primer: 5' -GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC-3'
HLA-DR	Forward primer: 5' -TTTCCGCAAGTTCCACTATCTCCC-3' Reverse primer: 5' -AATAATGATGCCCACCAGACCCAC-3'
RORC	Forward primer: 5' -GCAGCGCTCCAACATCTTCT-3' Reverse primer: 5' -ACGTACTGAATGGCCTCGGT-3'
CCR2	Forward primer: 5' -ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCG-3' Reverse primer: 5' -TTATAAACCAGCCGAGACTTCCTG C-3'
FN1	Forward primer: 5' -TCTGTGCCTCCTATCTATGTGC-3' Reverse primer: 5' -GAGGGACCACGACAACTCTTC-3'
ACTA2	Forward primer: 5' -GACAATGGCTCTGGGCTCTGTAA-3' Reverse primer: 5' -ATGCCATGTTCTATCGGGTACTT-3'
TGFB1	Forward primer: 5' -CCCAGCATCTGCAAAGCTC-3' Reverse primer: 5' -GTCAATGTACAGCTGCCGCA-3'
CCL2	Forward primer: 5' -GAGAGGCTGAGACTAACCCAGA-3' Reverse primer: 5' -ATCACAGCTTCTTTGGGACACT-3'
CD163	Forward primer: 5' -CAGCCTTTGACCTTATGTCATGG-3' Reverse primer: 5' -CCTGTGCTGTAGTCGCACT-3'
ITGAX	Forward primer: 5' -CGTTCGACACATCCGTGTA-3' Reverse primer: 5' -TTTGCCTCCTCCATCATTTC-3'
ITGAM	Forward primer: 5' -CAGCCTTTGACCTTATGTCATGG-3' Reverse primer: 5' -CCTGTGCTGTAGTCGCACT-3'
MRC1	Forward primer: 5' -GCAAAGTGGATTACGTGTCTTG-3' Reverse primer: 5' -CTGTTATGTCGCTGGCAAATG-3'
IL13	Forward primer: 5' -TGAGGAGCTGGTCAACATCA-3' Reverse primer: 5' -CAGGTTGATGCTCCATACCAT-3'
IL5	Forward primer: 5' -AGCTGCCTACGTGTATGCCA-3' Reverse primer: 5' -GCAGTGCCAAGGTCTCTTTCA-3'
IL17	Forward primer: 5' -GGACTGTGATGGTCAACCTGA-3' Reverse primer: 5' -TCATGTGGTAGTCCACGTTCC-3'
CD86	Forward primer: 5' -TGCTCATCTATACACGGTTAC-3' Reverse primer: 5' -TTTCTTGGTCTGTTCACTCTC-3'
COL1A1	Forward primer: 5' -ATGTCTAGGGTCTAGACATGTTCA-3' Reverse primer: 5' -CCTTGCCGTTGTCGCAGACG-3'

9. 인간 제대혈 유래 MSC 준비 및 투여

인간 제대혈 및 인간 제대혈 유래 MSC를 사용하는 모든 절차는 서울대학교 의과대학 및 병원기관심사위원회(IRB No. C-1708-083-878)의 지침에 따라 수행되었다.

인간 탯줄 조직은 사전 동의를 얻은 만삭의 산모에서 제왕 절개로 출산 시 수집되었다. 먼저 탯줄 내의 혈관과 양막을 제거하기 위해 PBS로 세척 후 탯줄 내의 와튼 제대 교질(Wharton's jelly) 조직을 분리하고 잘게 썰어서 효소 혼합물(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, NRW, Germany)로 37℃에서 3시간 동안 소화시켰다. 이후 100μm 세포 여과기(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 통해 여과하고 200 × g에서 10분간 펠렛화 하였다. 분리된 MSC를 가습 조건의 37℃ 인큐베이터에서 5% CO_2와 함께 배양하였는데, 배지는 2% 인간 혈소판 용해물(StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada)이 보충된 CellCor™ CD 배지(Xcell Therapeutics, Seoul, Korea)를 사용하였다. 배양 세포들이 90% 세포 밀집도(confluence)에 도달하면 세포를 채취하였다. 살아있는 줄기세포에서 활성 산소(reactive oxygen species) 유도 글루타티온(glutathione, GSH) 변화를 모니터링할 수 있는 비율 측정 프로브인 형광 실시간 티올 추적자(fluorescent real-time thiol tracer)를 사용하여 인간 탯줄 MSC에서 높은 수준의 글루타티온을 보이는 세포들을 분리하였다(68). 4계대에서 동결보존된 hUC-MSC를 7계대까지 배양한 후 실험에

사용하였다(69).

In vivo 실험에서는 10일째 1×10^5의 MSC를 50uL와 100uL PBS에 풀어 마우스의 기관 내 및 꼬리 정맥으로 각각 투여하였으며 *in vitro* 실험에서는 1×10^4의 MSC를 각 홈(well)에 공배양하였다

10. 통계 분석

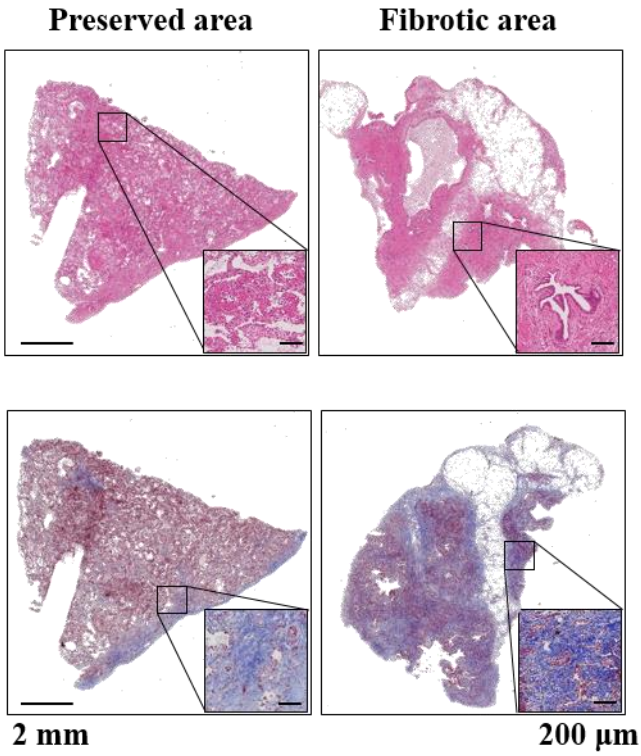
모든 통계 분석은 GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하여 시행하였다. 데이터는 mean ± standard error of the mean (SEM)으로 표시하였다. Mann-Whitney 테스트는 두 그룹을 비교하는 데 사용되었고 one-way ANOVA는 Turkey post-test 와 함께 4개 이상의 그룹을 비교하는 데 사용되었다. 0.05 미만의 유의 확률 (p-value) 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결　　과

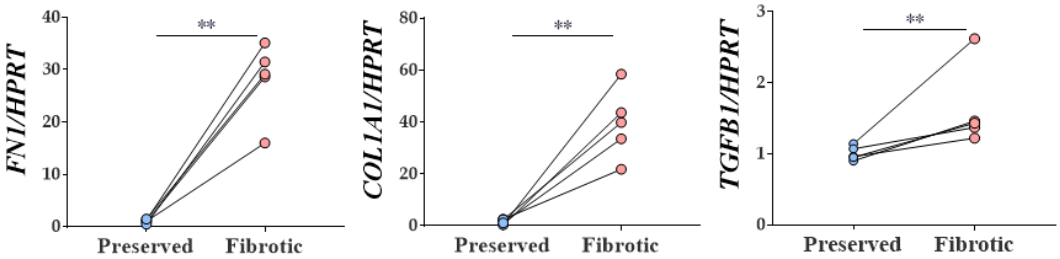
1. IPF 환자 폐의 조직학적 분석

IPF 환자의 폐 조직을 분석 결과 육안상 섬유화된 부위에서 현미경적 소견으로도 염증과 섬유화가 유의하게 심하였으며(그림 4A) 동일 부위에서 섬유화 관련 표지자의 발현이 증가함을 확인하였다(그림 4B). 다음으로 도움 T 세포 면역 반응과 관련된 사이토카인을 분석하였다. 섬유화 부위에서 *IL17A*발현 및 최종 조절자(master regulator)의 발현이 증가하였으며 Th2 사이토카인도 증가함을 확인하였다(그림 4C). 대식세포를 확인하기 위해 대식세포 표면 표지자 분석을 시행하였고, 섬유화 부위에서 대식세포 표면 표지자 *Integrin Subunit Alpha X* (*ITGAX*)와 *Integrin Subunit Alpha M* (*ITGAM*)의 발현이 증가하였으며 특히 *ITGAX*의 발현이 더욱 현저하게 증가하였다. 또한, M1 및 M2 활성화 관련 표지자도 섬유화 부위에서 증가함을 확인하였다(그림 4D). 마지막으로 단핵구 표지자를 분석하였고, 단핵구 주화성(chemotaxis) 및 그 수용체도 섬유화 부위에서 증가하였다(그림 4E).

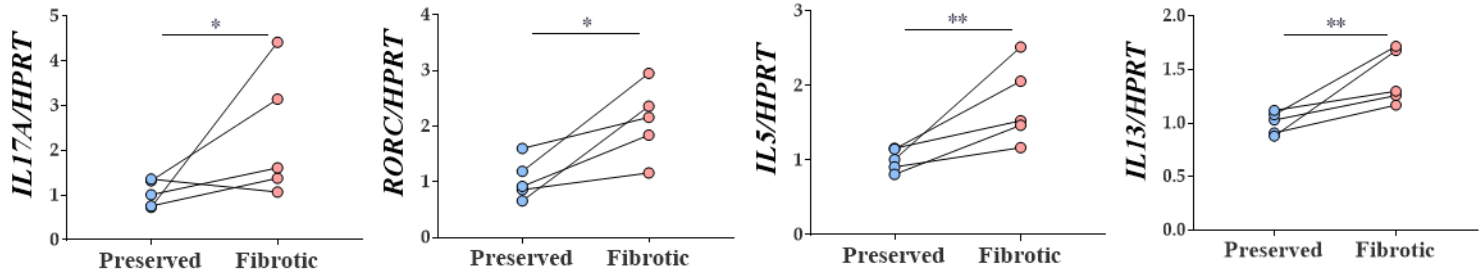
(A)


Preserved area
Fibrotic area
2 mm
200 µm

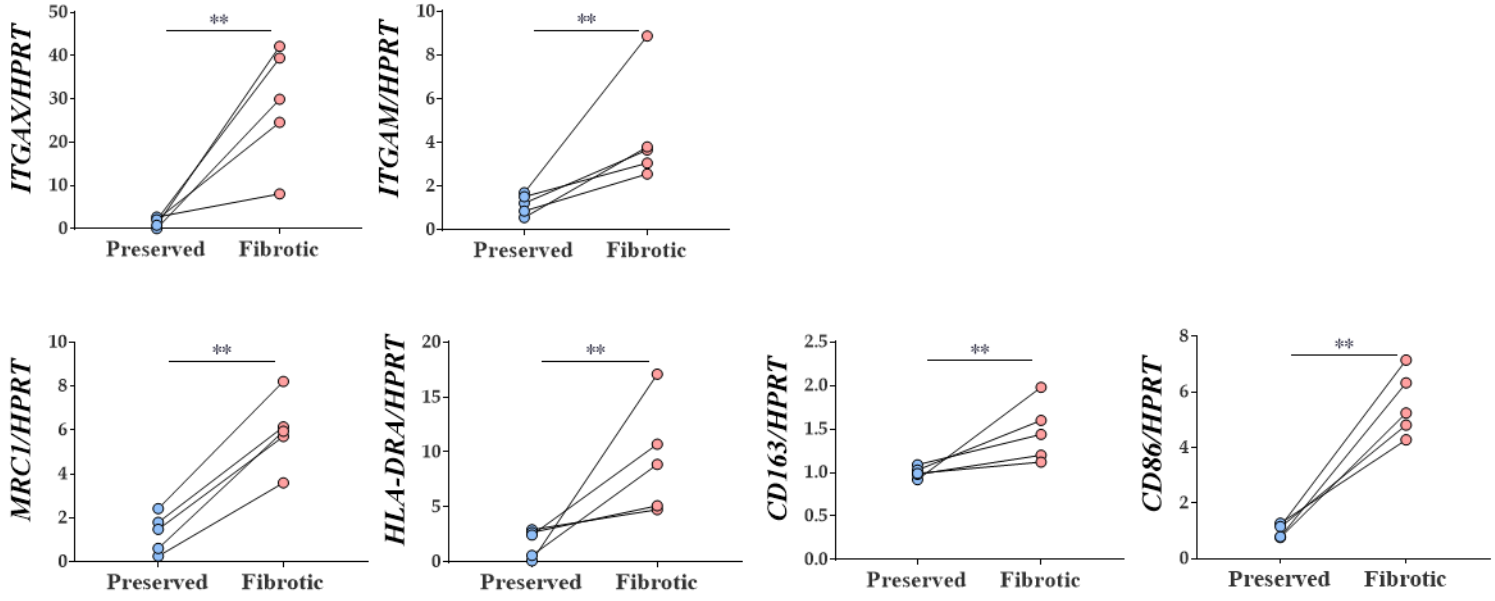
(B)


FN1/HPRT
COL1A1/HPRT
TGFB1/HPRT
**
Preserved
Fibrotic

(C)


IL17A/HPRT
RORC/HPRT
IL5/HPRT
IL13/HPRT
Preserved
Fibrotic
*
**

(D)


ITGAX/HPRT
ITGAM/HPRT
MRC1/HPRT
HLA-DRA/HPRT
CD163/HPRT
CD86/HPRT
Preserved
Fibrotic
**

(E)

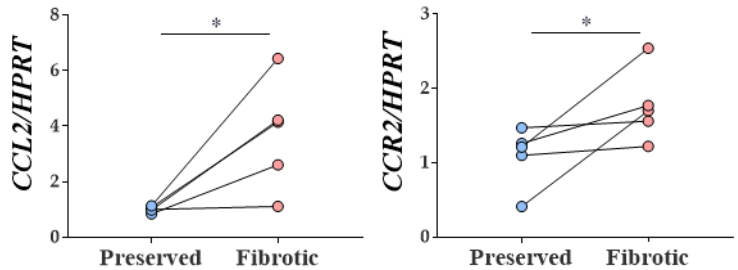


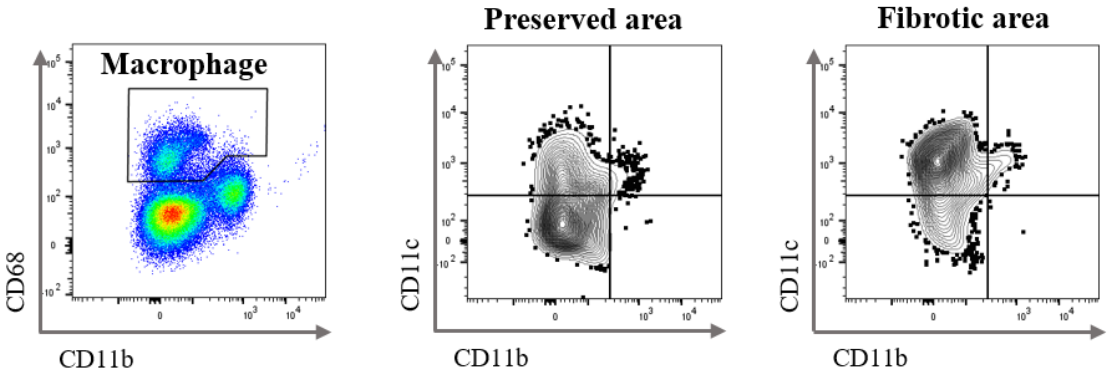
그림 4. IPF 환자 폐조직 분석

(A) IPF 환자 폐 조직학의 H&E 염색 및 MT 염색(x40 및 x100) (B) IPF 환자 폐에서 *FN1, COL1A1, TGFB1* mRNA 발현의 변화. (C) IPF 환자 폐에서 *IL17A, RORC, IL13, IL5* mRNA 발현의 변화. (D) IPF 환자 폐에서 *ITGAX, ITGAM, MRC1, CD86, HLA-DRA, CD163* mRNA 발현의 변화. (E) IPF 환자 폐에서 *CCL2, CCR2* mRNA 발현의 변화 *유의 확률 <0.05, **유의 확률 <0.01. 모든 결과는 최소 3 번의 독립적인 실험을 대표함. IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; H&E, hematoxylin and eosin; MT, Masson's trichrome; *FN1*, *fibronectin 1*; *COL1A1*, *collagen type I alpha 1 chain*; *TGFB1*, *transforming growth factor beta 1*; *IL17A*, *Interleukin 17A*; *RORC*, *RAR Related Orphan Receptor C*; *IL5*, *interleukin 5*; *IL13*, *interleukin 13*; *ITGAX*, *Integrin Subunit Alpha X*; *ITGAM*, *Integrin Subunit Alpha M*; *MRC1*, *Mannose Receptor C-Type 1*; *HLA-DR*, *Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Alpha*; *CCL2*, *C-C Motif Chemokine Ligand 2*; *CCR2*, *C-C Motif Chemokine Receptor 2*; *HPRT*, *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase.*

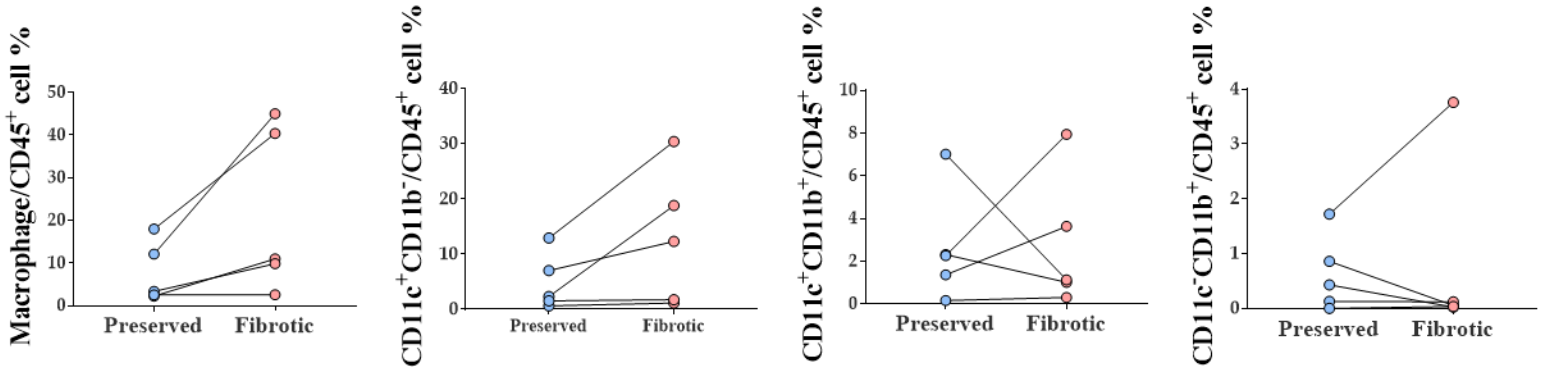
2. IPF 환자 폐의 유세포분석

유세포분석을 통해 대식세포에 대한 추가 분석을 시행한 결과(그림 5A) 섬유화가 심한 부위에서 대식세포와 그 아형 $CD11c^{+}CD11b^{-}$ 대식세포가 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(그림 5B). 반면 단핵구 분석 결과에서는 고전적 단핵구(classical monocyte)가 유의하게 증가하고(그림 5C) 비고전적 단핵구(non-classical monocyte) 가 유의하게 감소하는 것이 관찰되었다(그림 5D).

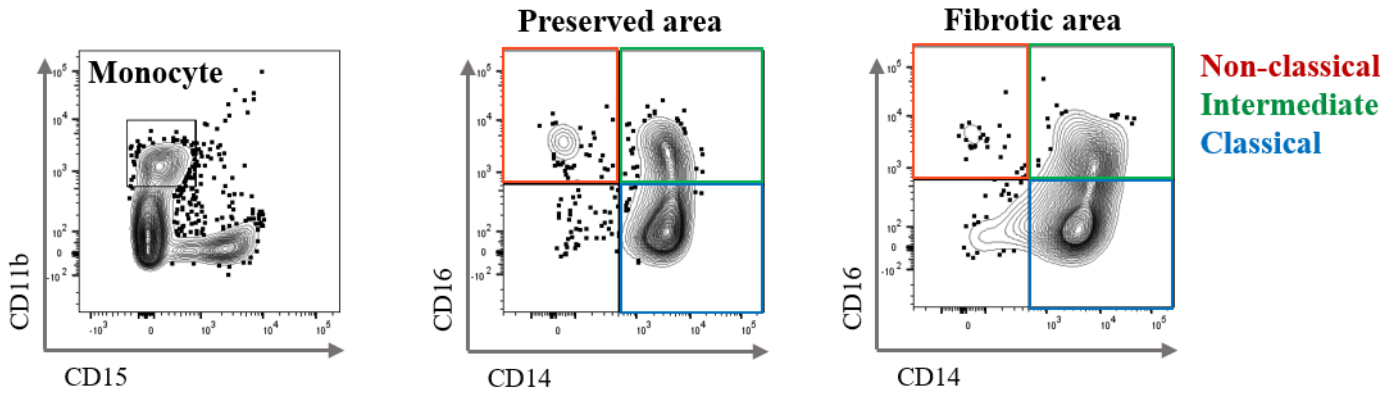
(A)



(B)


Macrophage/CD45+ cell %
CD11c+CD11b-/CD45+ cell %
CD11c+CD11b+/CD45+ cell %
CD11c-CD11b+/CD45+ cell %
Preserved
Fibrotic

(C)


Monocyte
CD11b
CD15
Preserved area
CD16
CD14
Fibrotic area
CD16
CD14
Non-classical
Intermediate
Classical

(D)

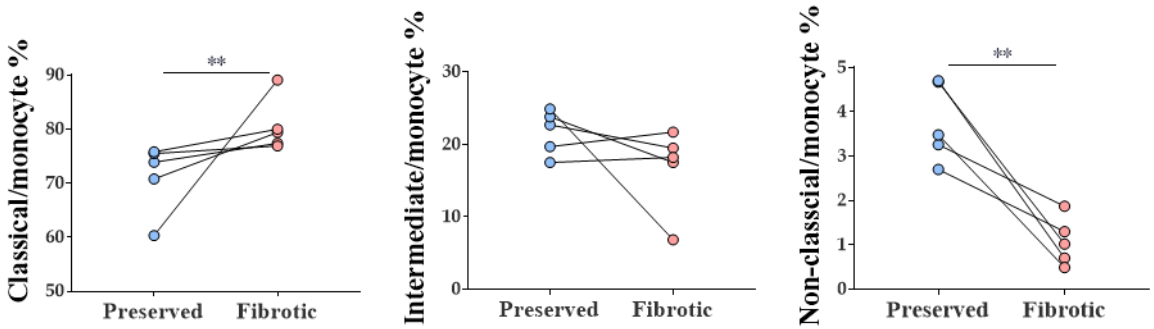


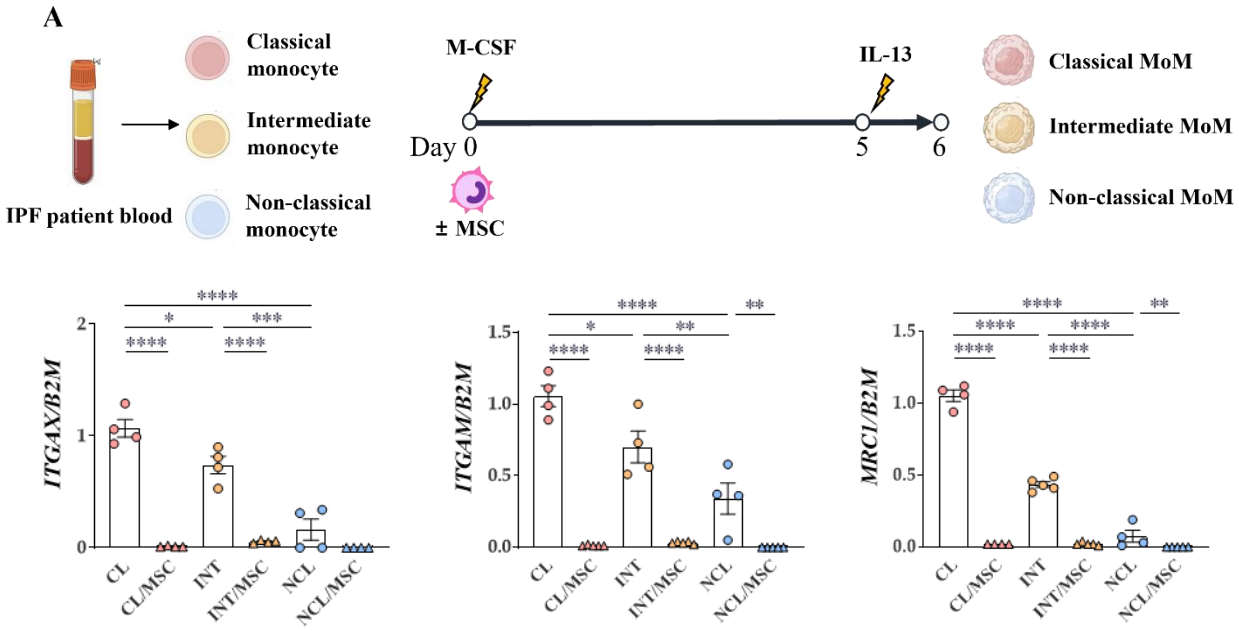
그림 5. IPF 환자 폐에서 단핵구 및 대식구 아형의 변화

(A) CD11c 대 CD11b 표지자 발현에 따른 *in vivo* 폐의 AM 및 MoM 분포를 보여주는 대식세포 게이팅 프로토콜 및 도트 플롯 (B) IPF 환자 폐에서 총 대식세포 및 그 아형의 변화 (C) 단핵구 및 그 아형의 게이팅 프로토콜 (D) IPF 환자 폐에서 단핵구 아형의 변화. 각 실험군당 n=5. **유의 확률 <0.01. 모든 결과는 최소 3 번의 독립적인 실험을 대표함. IPF, idiopathic pulmonary fibrosis

3. IPF 환자 혈액의 단핵구 분석

단핵구 아형의 추가 분석을 위해 IPF 환자의 혈액에서 고전적 단핵구, 중간형 단핵구(intermediate monocyte), 비고전적 단핵구 아형을 분리하였다. 분리된 각 단핵구 집단을 M-CSF를 사용하여 대식세포로 분화시킨 후 IL-13으로 자극하였을 때, 고전적 단핵구에서 유래된 대식세포군에서 AM의 표지자인 *ITGAX*, MoM의 표지자인 *ITGAM* 및 M2 활성화 표지자인 *Mannose Receptor C-Type 1* (*MRC1*)의 발현이 가장 뚜렷하게 관찰되었다(그림 6A). 또한, 인간 폐 섬유아세포를 각 대식세포가 배양된 상청액에서 배양하였을 때 고전적 단핵구 유래 대식세포의 상청액에서 배양한 섬유아세포에서 섬유화 표지자인 *Actin Alpha 2, Smooth Muscle* (*ACTA2*)과 *fibronectin 1* (*FN1*)의 활성이 가장 뚜렷하게 관찰되었다(그림 6B). 이러한 대식세포 분화와 M2 활성화 및 섬유화 유도능은 MSC에 의해 유의하게 억제되었다(그림 6A, B).

(A)


A
IPF patient blood
Classical monocyte
Intermediate monocyte
Non-classical monocyte
M-CSF
Day 0
± MSC
IL-13
5
6
Classical MoM
Intermediate MoM
Non-classical MoM
ITGAX/B2M
ITGAM/B2M
MRC1/B2M
CL
CL/MSC
INT
INT/MSC
NCL
NCL/MSC

(B)

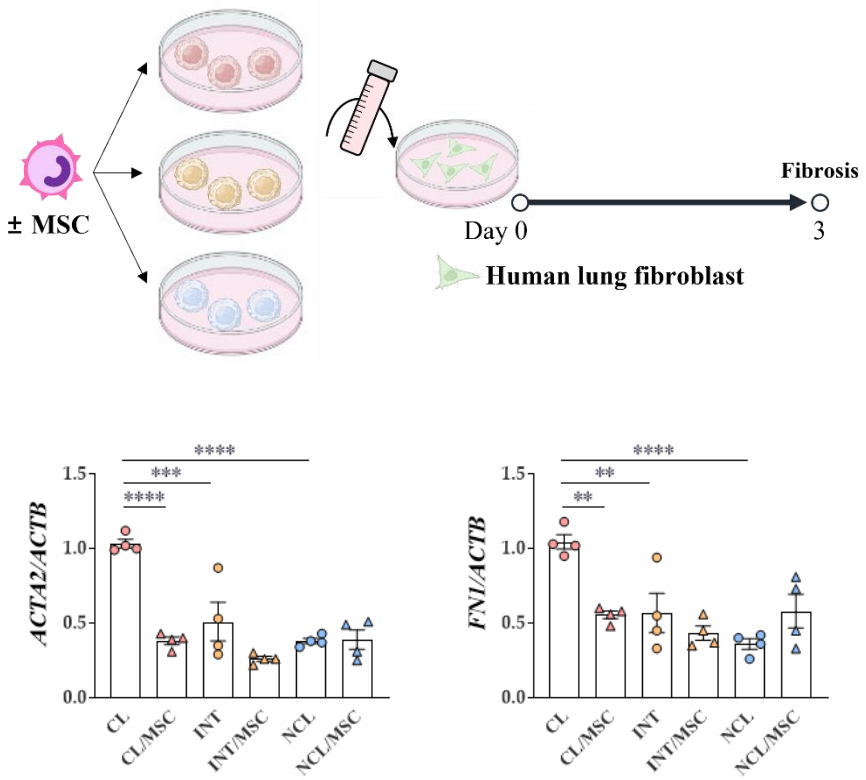

± MSC
Day 0
Fibrosis
3
Human lung fibroblast
ACTA2/ACTB
FN1/ACTB
CL
CL/MSC
INT
INT/MSC
NCL
NCL/MSC

그림 6. 기원 단핵구 아형에 따른 대식세포의 폐 섬유화 유도능

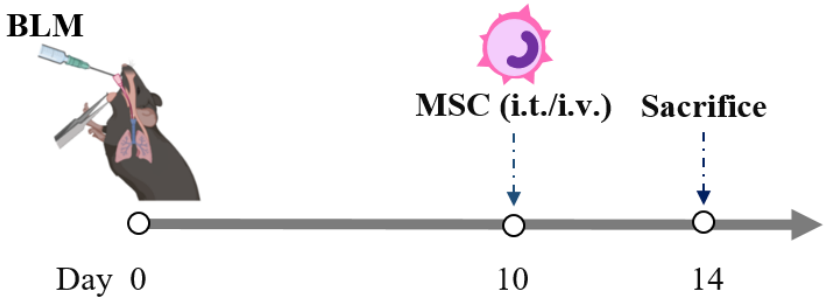
(A) 단핵구 아형 분리 및 대식세포 분화 프로토콜; 단핵구 아형에 따른 대식세포 분화 및 M2 활성화 능력 (B) 단핵구 유래 대식세포 배양 배지 전달 프로토콜; 단핵구 아형에 따른 섬유화 유도 능력. 각 실험군당 n=5, *유의 확률 <0.05, **유의 확률 <0.01, ***유의 확률 <0.001, ****유의 확률 <0.000. 모든 결과는 최소 3 번의 독립적인 실험을 대표함. IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; MSC, mesenchymal stem cell; CL, classical monocyte-derived macrophage; INT, intermediate monocyte-derived macrophage; NCL, non-classical monocyte-derived macrophage, *ITGAX*, *Integrin Subunit Alpha X*; *ITGAM*, *Integrin Subunit Alpha M*, *MRC1*, *Mannose Receptor C-Type 1*, *ACTA2*, *Actin Alpha 2 Smooth Muscle*; *FN1*, *fibronectin 1*; *B2M*, *Beta-2-Microglobulin*; *ACTB*, *Actin Beta*

4. 폐섬유증 모델에서 MSC에 의한 폐 염증반응의 완화

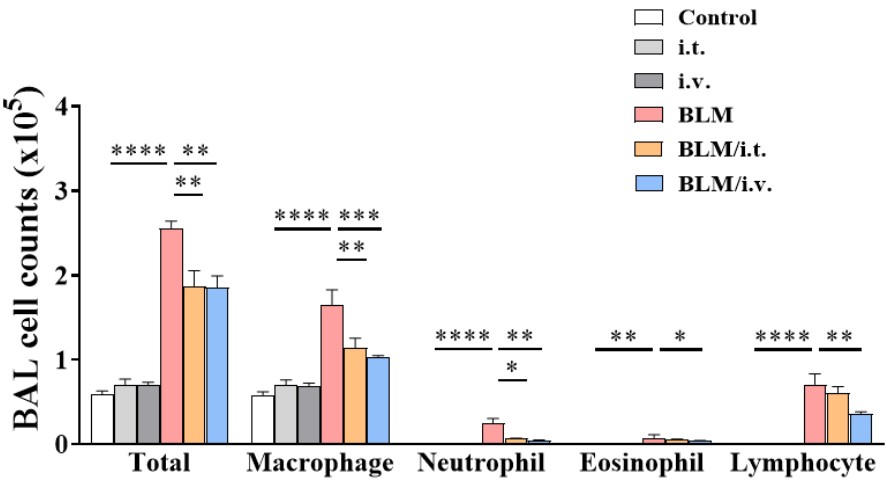
BLM 마우스 폐섬유증 모델에서 MSC의 치료 효과를 확인하기 위해 BALF 분석을 시행하였다(그림 7A). BLM 투여 후 유의하게 증가하였던 대식세포, 호중구, 호산구를 포함한 염증 세포가 MSC 투여군에서 유의하게 감소하였으며 이는 기관 내 투여보다 정맥 내 투여가 주사 시 더 유의한 결과를 보였다(그림 7B). 또한, 유세포분석 결과 BLM 투여군에서 크게 증가하였던 호중구 및 호산구가 MSC의 정맥 주사 후 감소하였다(그림 7C). 호중구 및 호산구에 대한 주화성 역시 MSC 투여 후 감소하였다(그림 7D).

다음으로 조직에서의 변화를 확인하기 위해 H&E 및 MT 염색을 시행하였고, BLM 투여군에서 증가하였던 염증과 섬유화가 MSC 투여군에서 개선됨을 확인하였다(그림 7E, F). PAS 양성 세포도 마찬가지 소견을 보였다(그림 8). 마찬가지로 섬유화와 관련된 *Fn1 (Fibronectin1), Mmp9* 의 mRNA 발현도 MSC 투여군에서 감소하였다. (그림 7G).

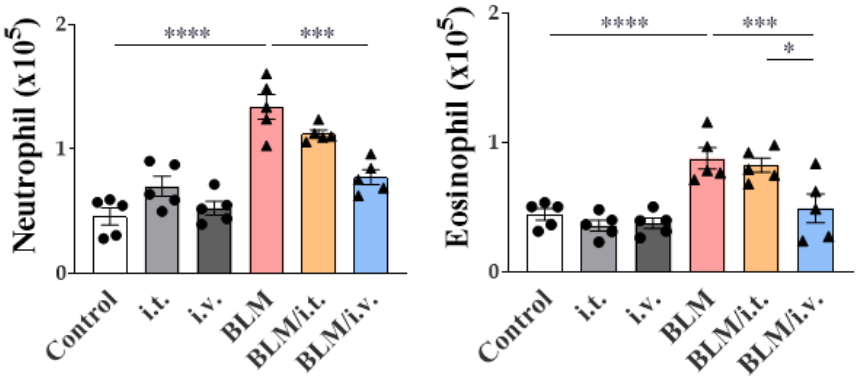
(A)


BLM
MSC (i.t./i.v.)
Sacrifice
Day 0
10
14

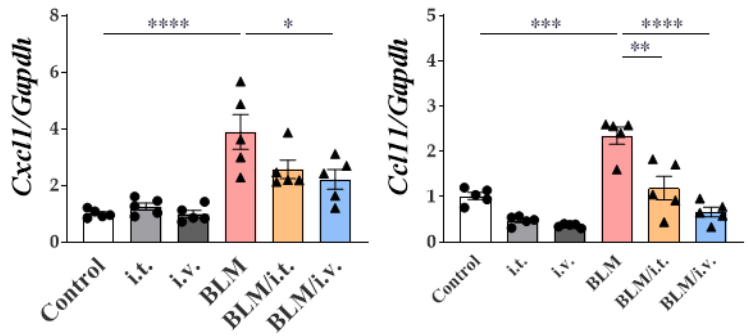
(B)


Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.
BAL cell counts (x10^5)
Total
Macrophage
Neutrophil
Eosinophil
Lymphocyte

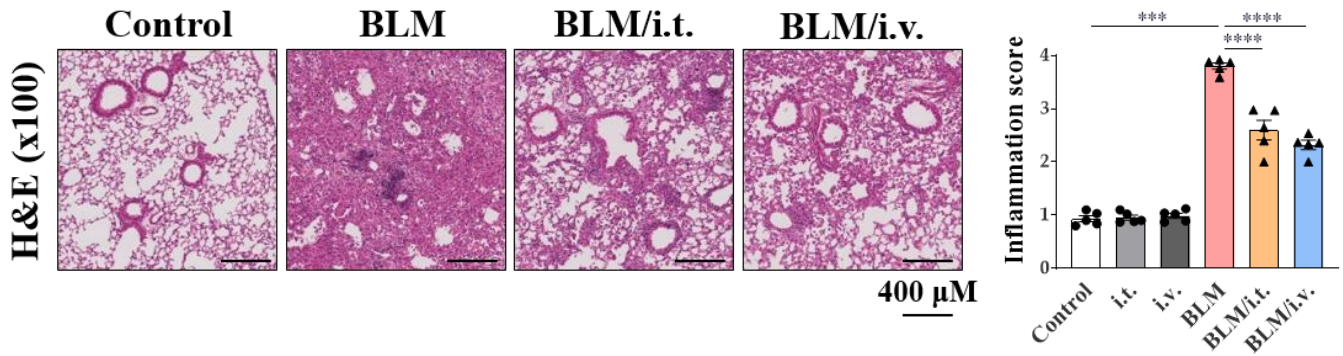
(C)


Neutrophil (x10^5)
Eosinophil (x10^5)
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

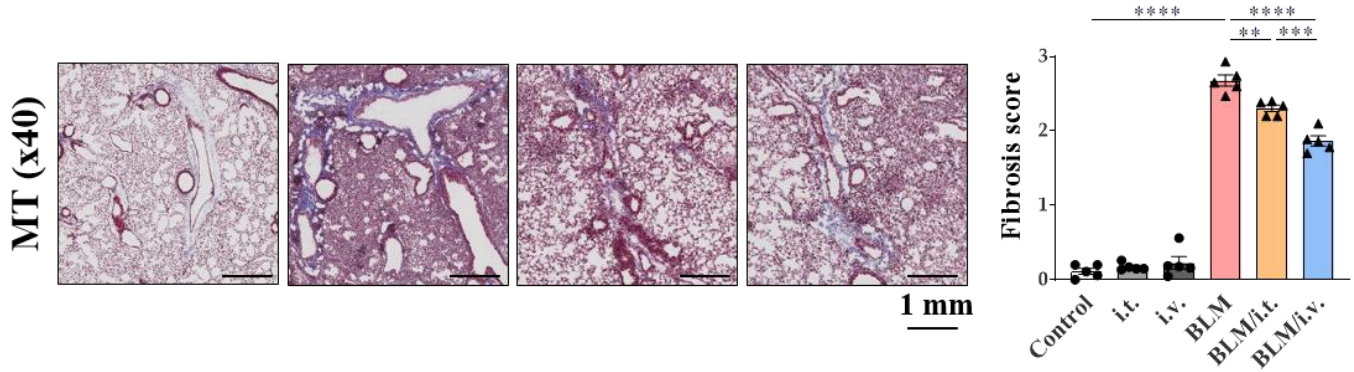
(D)


Cxcl1/Gapdh
Ccl11/Gapdh
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

(E)


Control
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.
H&E (x100)
400 μM
Inflammation score
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

(F)


MT (x40)
1 mm
Fibrosis score
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

(G)

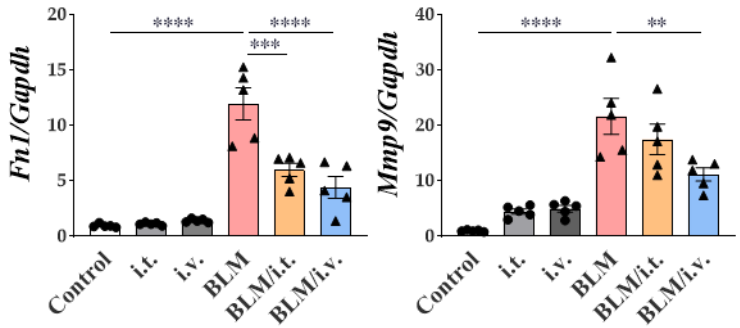


그림 7. 폐섬유증 모델에서 MSC 의 기도 염증 조절 효과

(A) 마우스 폐섬유증 모델 확립 프로토콜: 0일에 BLM 3 mg/kg을 기관 내 투여하고 10일째 MSC(10^5개 세포)를 기관 내 또는 정맥 내 투여하였다. (B) BALF의 대식세포, 호중구, 호산구, 림프구를 포함한 면역세포의 변화 (C) 폐의 호산구 및 호중구에 대한 유세포분석 (D) 폐의 호산구 및 호중구와 관련된 주화성 mRNA의 변화 (E) 폐조직의 H&E 염색(×100) 및 점수화 (F) 폐조직의 MT 염색(×40) 및 점수화 (G) 폐에서의 *Fn1* 및 *Mmp9* 발현. 각 실험군당 n=5, *유의 확률 <0.05, **유의 확률 <0.01, ***유의 확률 <0.001, ****유의 확률 < 0.0001. 모든 결과는 최소 3번의 독립적인 실험을 대표함. BLM, bleomycin; MSC, mesenchymal stem cell; i.t, intravenous; i.t, intratracheal; BAL, bronchoalveolar lavage; H&E, hematoxylin and eosin; MT, Masson's trichrome; *Fn1*, *fibronectin 1*; *Mmp9*, *Matrix metalloproteinase 9; Cxcl1*, *C-X-C Motif Chemokine Ligand 1*; *Gapdh*, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*; *Ccl11*, *C-C Motif Chemokine Ligand*, BLM, bleomycin

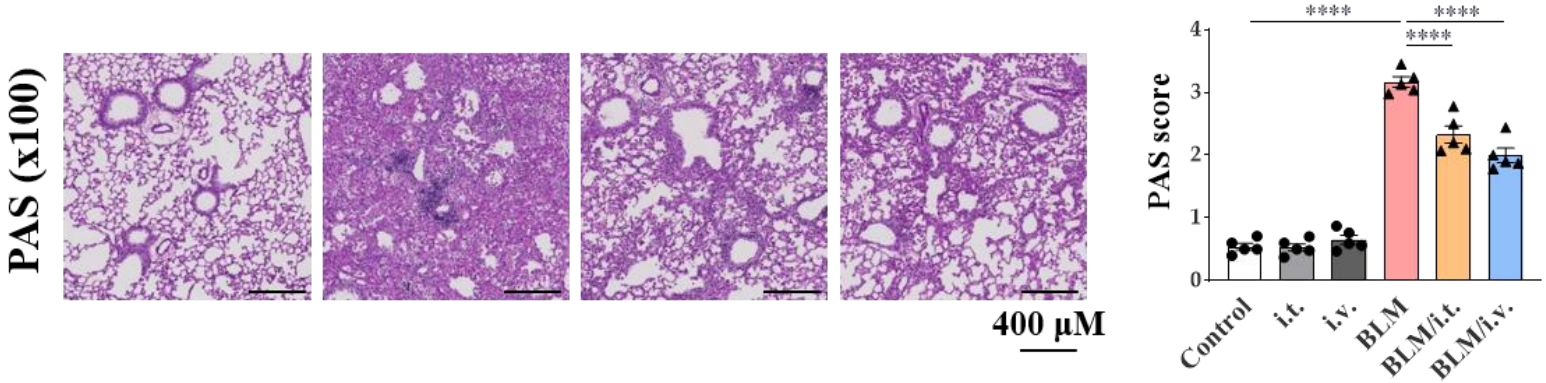


그림 8. 폐섬유증 모델에서 폐의 PAS 염색 분석.

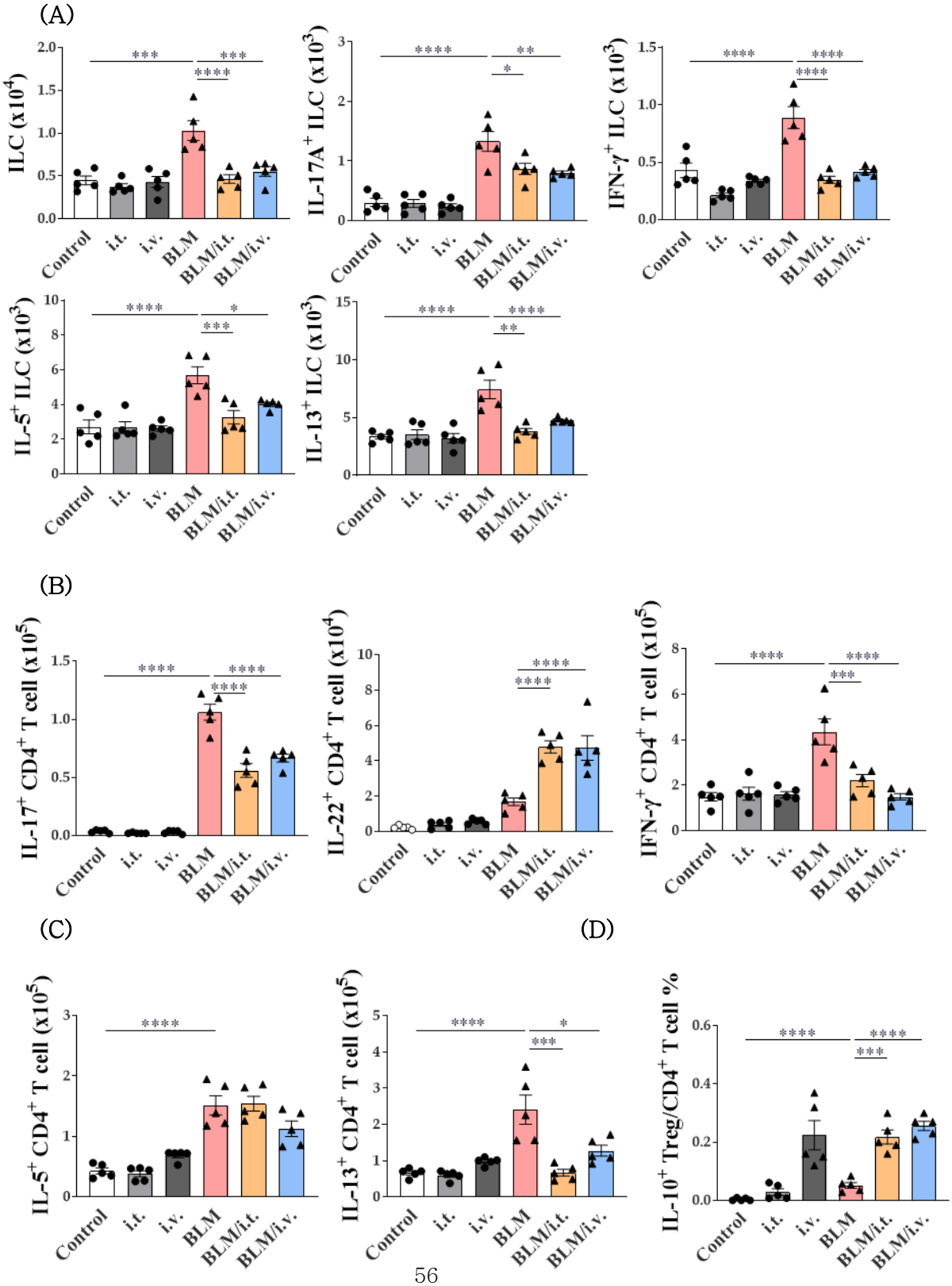
폐 조직의 PAS 염색(×100) 및 점수화. 각 실험 군당 마우스 5마리 분석함, ****유의 확률 <0.0001. 모든 결과는 최소 3번의 독립적인 실험을 대표함. PAS, Periodic acid–Schiff; i.t, intravenous; i.t, intratracheal; BLM, bleomycin

5. 폐섬유증 모델에서 T 세포 및 선천 림프구 세포에 대한 MSC의 조절 효과

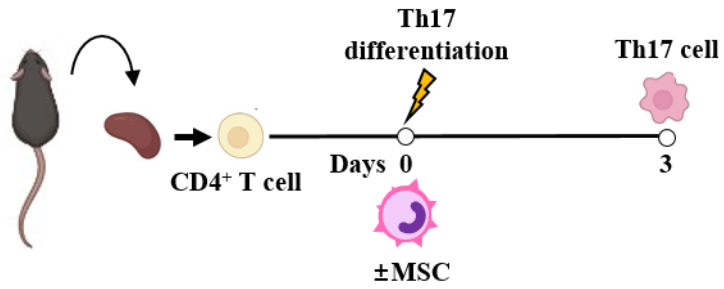
면역세포에 대한 MSC의 효과를 확인하기 위하여 T 세포, ILC와 같은 사이토카인 분비 세포를 분석하였다. BLM 모델에서 ILC의 총 숫자 및 모든 아형의 ILC가 증가하였으며, 이는 MSC 투여 시 감소하였다(그림 9A). $CD4^+$ T 세포를 분석한 결과 BLM 모델에서 $IL-17^+CD4^+$ T 세포(Th17)가 증가하였다가 마찬가지로 MSC 투여 시 감소함을 확인하였다. 반면 $IL-22^+CD4^+$ T 세포(Th22)는 MSC 투여로 인해 유의하게 증가하였다. $IFN-\gamma^+CD4^+$ T 세포(Th1)는 BLM 모델에서 현저하게 증가하였다가 MSC에 의해 감소하였다(그림 9B). 이와 유사하게, BLM 투여군에서 유의하게 증가하였던 $IL-5^+CD4^+$ T 세포 및 $IL-13^+CD4^+$ T 세포(Th2)는 MSC에 의해 감소하였고, 특히 $IL-13^+CD4^+$ T 세포는 기관 내 및 정맥 내 투여 모두에서 유의한 감소를 보였다. (그림 9C). 흥미롭게도 $IL-10^+Foxp3^+CD25^+CD4^+$ T 세포 즉 조절 T 세포(Treg)는 MSC 투여군에서만 현저하게 증가하였다(그림 9D).

BLM 모델에서 Th17 우세 면역 반응 조절에 MSC가 어떠한 영향을 미치는 지 확인하기 위하여 마우스의 비장에서 $CD4^+$ T세포를 분리하여 Th17로 분화를 유도한 후 활성화된 $CD4^+$ T세포를 24-well transwell plate의 하부 챔버에서 MSC와 함께 배양하였다(그림 9E). 이렇게 MSC와 공배양을 시행한 결과 Th17의 감소와 조절 T 세포의 증가가 관찰되었다(그림 9F). 유사하게, mRNA 수준에서 Th17 관련 표지자의

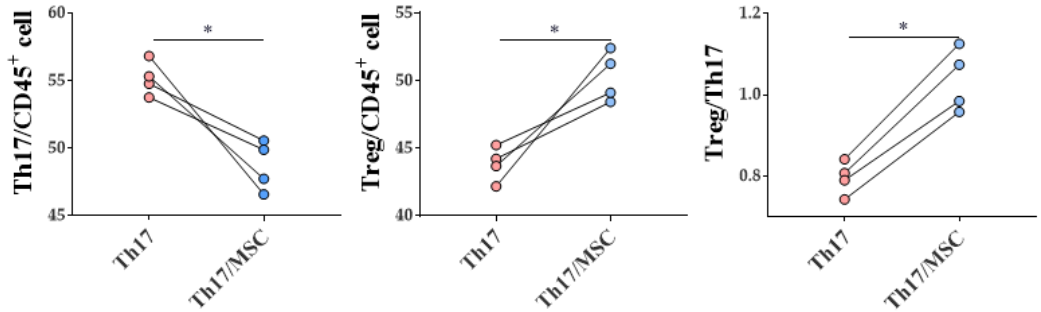
감소 및 조절 T 세포 관련 표지자의 증가가 확인되었다(그림 9G).



(E)


Th17
differentiation
Th17 cell
CD4+ T cell
Days 0
3
±MSC

(F)


Th17/CD45+ cell
Treg/CD45+ cell
Treg/Th17
Th17
Th17/MSC
*

(G)

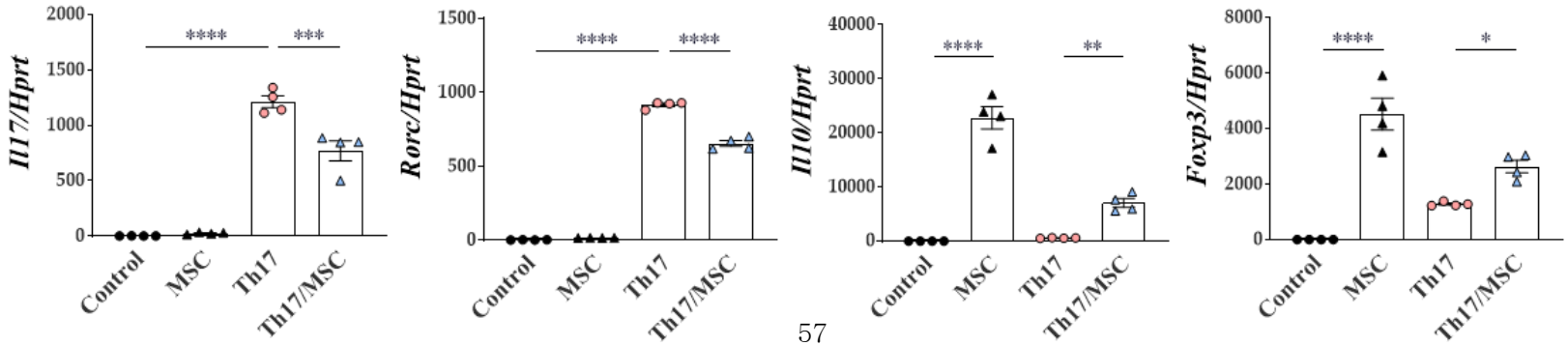

Il17/Hprt
Rorc/Hprt
Il10/Hprt
Foxp3/Hprt
Control
MSC
Th17
Th17/MSC
****
***
**
*

그림 9. 폐섬유증 모델에서 ILC 및 T 세포 활성화에 대한 MSC 의 조절 효과

(A) 폐의 총 ILC 및 IL−17A^{+} ILC(ILC3), IFN−γ^{+} ILC(ILC1), IL−5^{+} ILC 및 IL−13^{+} ILC(ILC2)의 수 (B) IL−17^{+}CD4^{+} T 세포(Th17), IL−22^{+}CD4^{+} T 세포(Th22) 및 IFN−γ^{+}CD4^{+} T 세포(Th1)의 수 (C) IL−5^{+}CD4^{+} T 세포 및 IL−13^{+}CD4^{+} T 세포(Th2)의 수 (D) IL−10^{+}Foxp3^{+}CD25^{+}CD4^{+} T 세포(Treg)의 비율 (E) Th17 분화 유도 프로토콜 (F) Th17 세포와 Treg 의 상대 비율 (G) Th17 세포에서 MSC 에 의한 *Il17, Rorc, Il10, Foxp3* mRNA 발현의 변화. 각 실험군당 n=4−5, *유의 확률 <0.05, **유의 확률 <0.01, ***유의 확률 <0.001, ****유의 확률 < 0.0001. 모든 결과는 최소한 3 번의 독립적인 실험을 대표함. i.t, intravenous; i.t, intratracheal; BLM, bleomycin; ILC, innate lymphoid cell; IL−17A, interleukin−17A; IFN, interferon; IL−5, interleukin−5; IL−13, interleukin 13; IL−17, interleukin 17; IL−22, interleukin−22; IL−10, interleukin−10; Th17, T helper 17 cell; Th22, T helper 22 cell; Th1, T helper 1 cell, Th2, T helper 2 cell, Treg, regulatory T cell; MSC, mesenchymal stem cell; *IL17*, *interleukin 17*; *Rorc*, *RAR Related Orphan Receptor C*; *IL10*, *interleukin 10*; *Foxp3*, *Forkhead Box P3, Hprt, Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*

6. 폐섬유증 모델에서 MSC에 의한 폐 조직 mRNA 발현의 변화

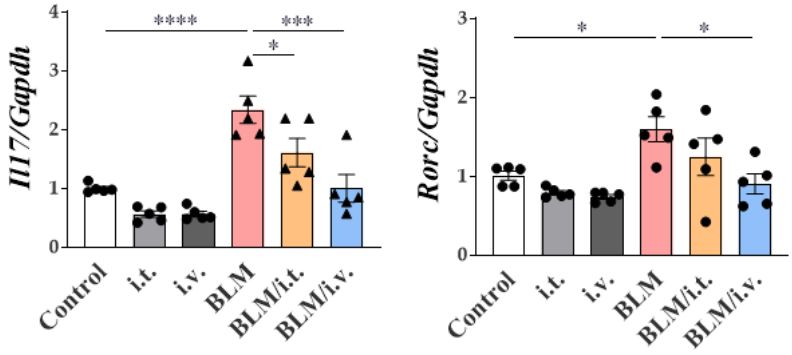
BLM 유도 폐섬유증 마우스 모델에서 폐의 유전자 발현의 변화와 이에 대한 MSC의 영향을 확인하기 위해 mRNA 발현을 분석하였다. *Il17*과 이의 최종 조절자인 *Rorc*의 발현은 BLM 모델에서 증가하였고, MSC를 정맥 내로 투여하였을 때만 BLM 모델에서 두 유전자의 발현이 모두 감소하였다(그림 10A). 반면 *Interferon gamma*(*Ifng)*의 발현은 BLM 모델에서 유의하게 증가하였지만 최종조절자인 *T-Box Transcription Factor 21*(*Tbx21*)에서는 유의한 변화가 없었고, MSC에 의한 조절 효과도 유의하지 않았다(그림 10B).

이와 상응하게 BLM 모델에서 *Il13* 및 이에 대한 최종 조절자인 *GATA binding protein 3*(*Gata3*)가 유의하게 증가하였으며, MSC 투여 시 유의하게 감소하였다. 또한 MSC 투여는 BLM 투여와 관계없이 *Il5* 발현을 조절하였는데, BLM 모델에서는 정맥 내로 투여하였을 때만 그 효과가 유의하였다. T 조절세포의 표지자인 *Il10* mRNA 발현은 BLM 모델에서 MSC에 의해 유의하게 증가하였다(그림 10C).

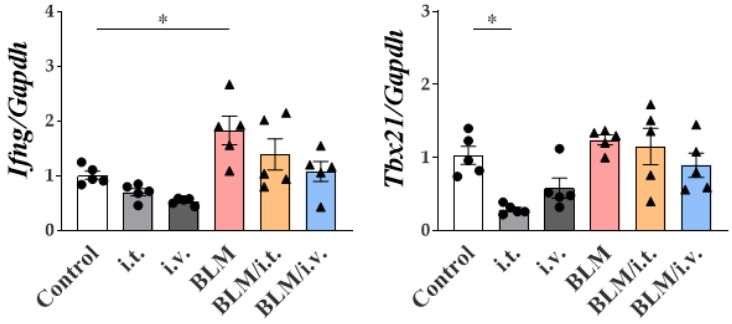
대식세포와 관련된 표지자들의 발현을 분석한 결과 BLM 투여군에서 폐포 대식세포와 단핵구 유래 대식세포 표지자인 *Itgax*와 *Itgam*의 발현이 증가하였는데 특히 *Itgax*의 발현이 유의하게 증가하였다. 이렇게 증가한 *Itgax*와 *Itgam* 발현은 MSC 투여시 유의하게 감소하였다. 이와

유사하게 M1 및 M2 대식세포 표지자인 *Cd86* 및 *Mrc1*도 BLM 투여군에서 유의하게 증가하고, MSC를 투여하였을 때 다시 유의하게 감소하였다(그림 10D).

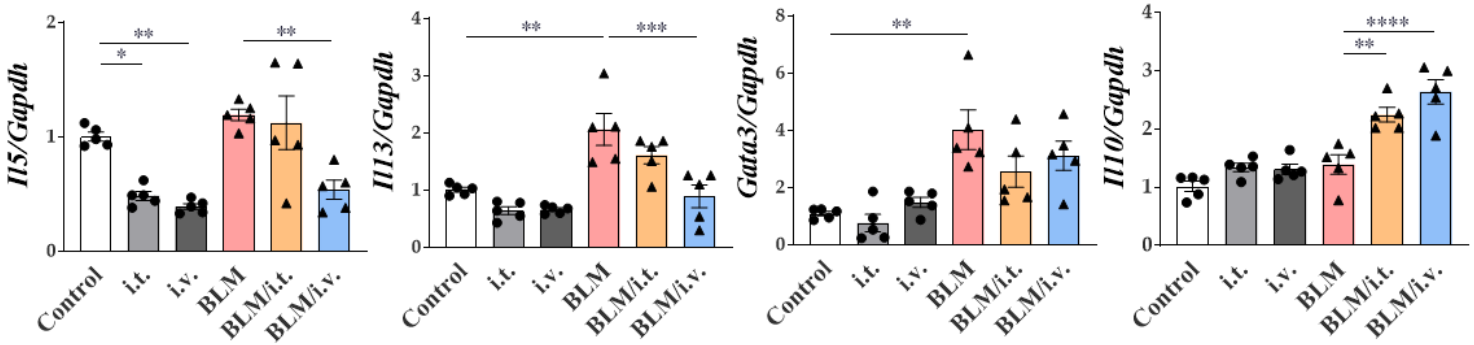
(A)



(B)



(C)


Il5/Gapdh
Il13/Gapdh
Gata3/Gapdh
Il10/Gapdh
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

(D)

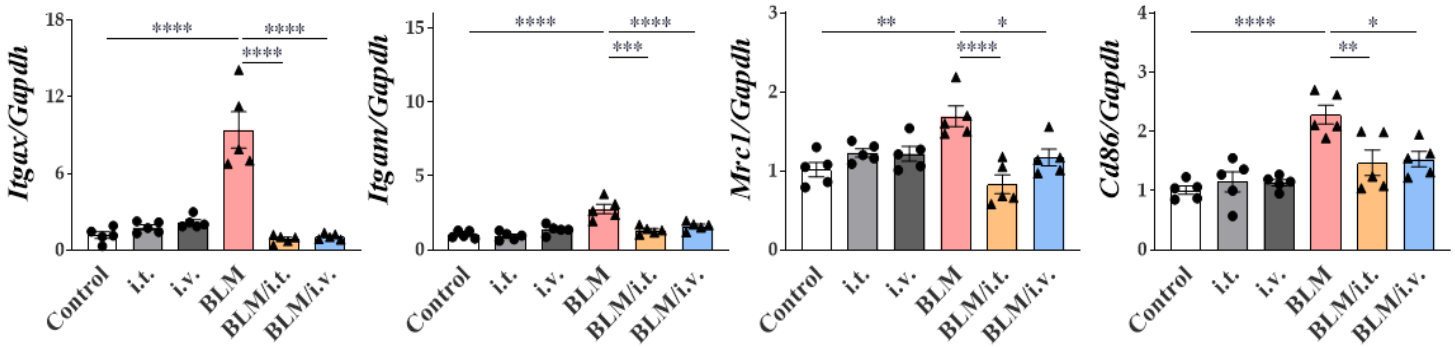

Itgax/Gapdh
Itgam/Gapdh
Mrc1/Gapdh
Cd86/Gapdh
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

그림 10. 폐섬유증 모델에서 폐의 mRNA 발현에 대한 MSC 의 효과

(A−C) 폐에서 MSC에 의한 *Il17, Rorc, Ifng, Tbx21, Il5, Il13, Gata3, Il10* mRNA 발현의 변화 (D) 폐에서 MSC에 의한 *Itgax, Igtam, Mrc1, Cd86* mRNA 발현의 변화. 모든 데이터는 실시간 정량적 PCR 분석을 통해 분석되었다. 각 실험군당 n=5, *유의 확률 <0.05, **유의 확률 <0.01, ***유의 확률 <0.001, ****유의 확률 < 0.0001. 모든 결과는 최소 3번의 독립적 실험을 대표함. i.t, intravenous; i.t, intratracheal; BLM, bleomycin; *IL17*, *Interleukin 17*; *Rorc*, *RAR Related Orphan Receptor C*; *Ifng*, *interferon gamma*; *Tbx21*, *T−Box Transcription Factor 21*; *Il5*, *interleukin 5; Il13, interleukin 13*; *Gata3*, *GATA binding protein 3*; *Il10*, *interleukin 10*; *ITGAX*, *Integrin Subunit Alpha X; ITGAM*, *Integrin Subunit Alpha M; MRC1*, *Mannose Receptor C−Type 1*; *Gapdh*, *Glyceraldehyde−3−Phosphate Dehydrogenase*

7. 폐섬유증 모델에서 선천 면역세포에 대한 MSC의 효과

BLM은 마우스 폐에서 $CD11c^+$ 수지상 세포(dendritic cell, DC) 및 2형 전통적 수지상 세포(conventional DC2, cDC)와 같은 수지상 세포들을 활성화하고 MSC 치료는 이를 감소시키는 것을 확인하였다 (그림 11).

MSC 치료는 BLM 모델에서 유의하게 증가하였던 대식세포의 수를 감소시켰으며 특히 정맥 투여 시 그 효과가 유의하였다(그림 12A). 이들 대식세포를 아형으로 나누어 분석을 시행하였는데 SiglecF와 CD11b 표지자를 기준으로 AM과 MoM으로 나누어 분석을 시행하였다 (그림 12B, 그림 3B).

모든 $SiglecF^+$ 대식 세포는 $CD11c^+$를 보였고, 대조군에서는 99.4%, BLM 투여군에서는 81.8%의 세포에서 $CD11b^-$를 보였다. 이러한 $SiglecF^+CD11c^+CD11b^-$ 대식 세포는 BLM 투여 시 유의하게 감소하였고 MSC투여는 이를 회복시키지 못하였다. 한편 소수의 $SiglecF^+CD11c^+CD11b^+$ 대식세포들은 MoM에서 유래하여 AM의 성질을 갖기 시작하는 중간 단계의 세포의 가능성이 있겠으며, 이 세포들은 BLM 그룹에서 유의하게 증가하였고 MSC는 마찬가지로 유의한 영향을 끼치지 못하였다(그림 12C).

다음으로 SiglecF 음성 대식세포를 분석하였을 때, 대조군에서는 SiglecF^{-}CD11b^{+}인 MoM이 다수를 차지하였고, 일부 SiglecF^{-}CD11b^{-}인 세포들이 확인되었다. SiglecF^{-}CD11b^{+}인 MoM을 CD11c^{+}여부에 따라 분석하였을 때, SiglecF^{-}CD11c^{+}CD11b^{+} 대식세포는 BLM 모델에서 크게 증가하였으며, 이는 정맥으로 투여된 MSC에 의해 유의하게 감소하였다. 그러나 SiglecF^{-}CD11c^{-}CD11b^{+} 는 BLM투여나 MSC 투여에 유의한 변화를 보이지 않았다(그림 12D). 이에 이 세포군에 대한 추가 분석을 시행하였고 CD86^{+}CD206^{-}(M1) 및 CD86^{-}CD206^{+}(M2) 모두 BLM 모델에서 그 비율이 증가하였으나, 정맥 내 투여된 MSC는 CD86^{-}CD206^{+} 즉 M2만 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다(그림 12E). 추가로 major histocompatibility complex (MHC)II, CD86, CD206 표지자 발현을 사용하여 MHCII^{high}CD86^{-}CD206^{+}, MHCII^{mid}CD86^{+}CD206^{-}, MHCII^{low}CD86^{-}CD206^{+} MoM을 각각 M2a, M2b, M2c로 정의하여 분석한 결과 MHCII^{low}CD86^{-}CD206^{+}(M2c) MoM과 MHCII^{mid}CD86^{+}CD206^{-}(M2b) MoM이 BLM 모델에서 증가하였으나 정맥 주사 된 MSC는 MHCII^{low}CD86^{-}CD206^{+}(M2c) MoM만 유의하게 감소시켰다(그림 12F).

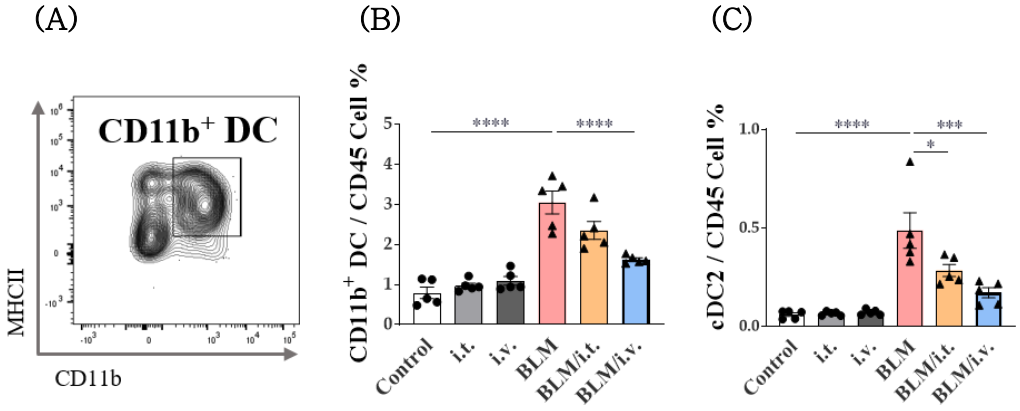
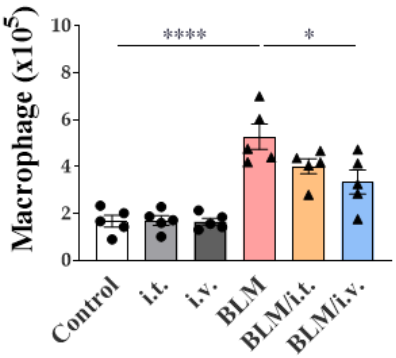


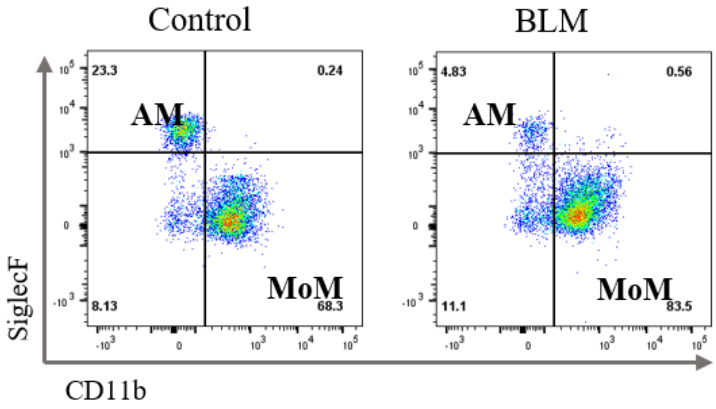
그림 11. 폐 섬유증 모델에서 DC 의 아형 활성화에 대한 MSC 의 효과

(A) 생체 내 폐 CD11b^{+} DC 세포 집단을 보여주는 도트 플롯 (B) CD11b^{+} DC 의 활성화 변화 (c) cDC2 의 활성화 변화. 각 실험군당 n=5. *유의 확률<0.05, **유의 확률<0.01, ***유의 확률<0.001, ****유의 확률<0.0001. 모든 결과는 최소 3 번의 독립적 실험을 대표함. MHCII, major histocompatibility complex II; DC, dendritic cell; cDC2; type 2 conventional DC; i.t, intravenous; i.t, intratracheal; BLM, bleomycin

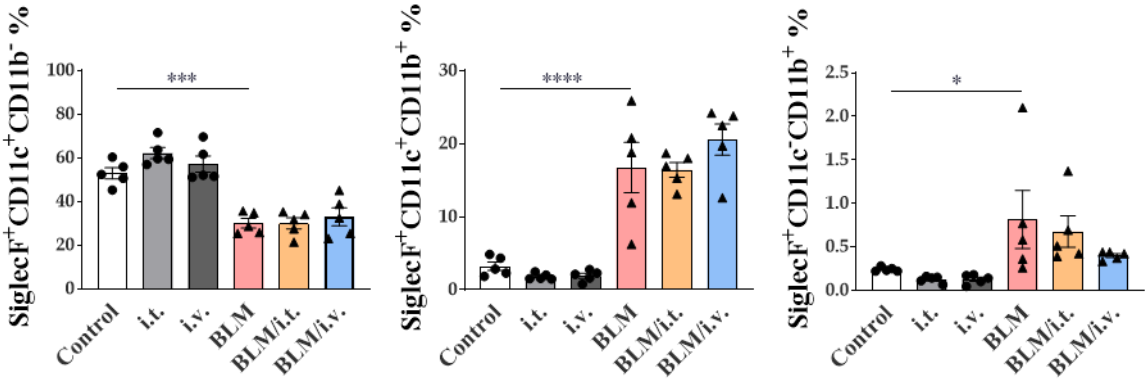
(A)


Macrophage (x10^5)
****
*
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

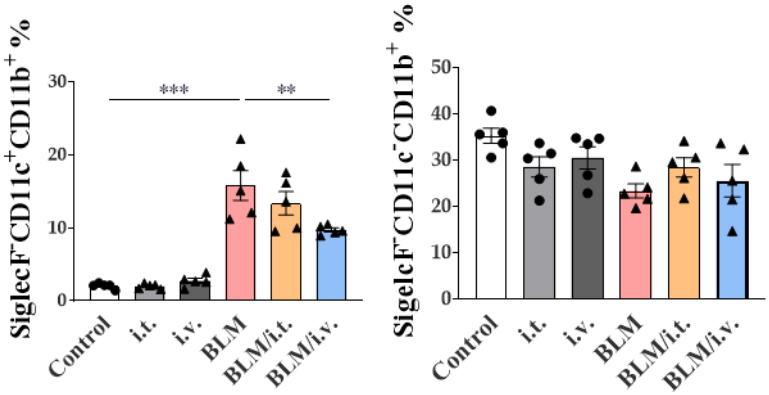
(B)


Control
BLM
AM
MoM
23.3
0.24
8.13
68.3
4.83
0.56
11.1
83.5
SiglecF
CD11b

(C)


SiglecF+CD11c+CD11b- %
SiglecF+CD11c+CD11b+ %
SiglecF+CD11c-CD11b+ %
***
****
*
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

(D)


SiglecF-CD11c+CD11b+ %
SiglecF-CD11c-CD11b+ %
***
**
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

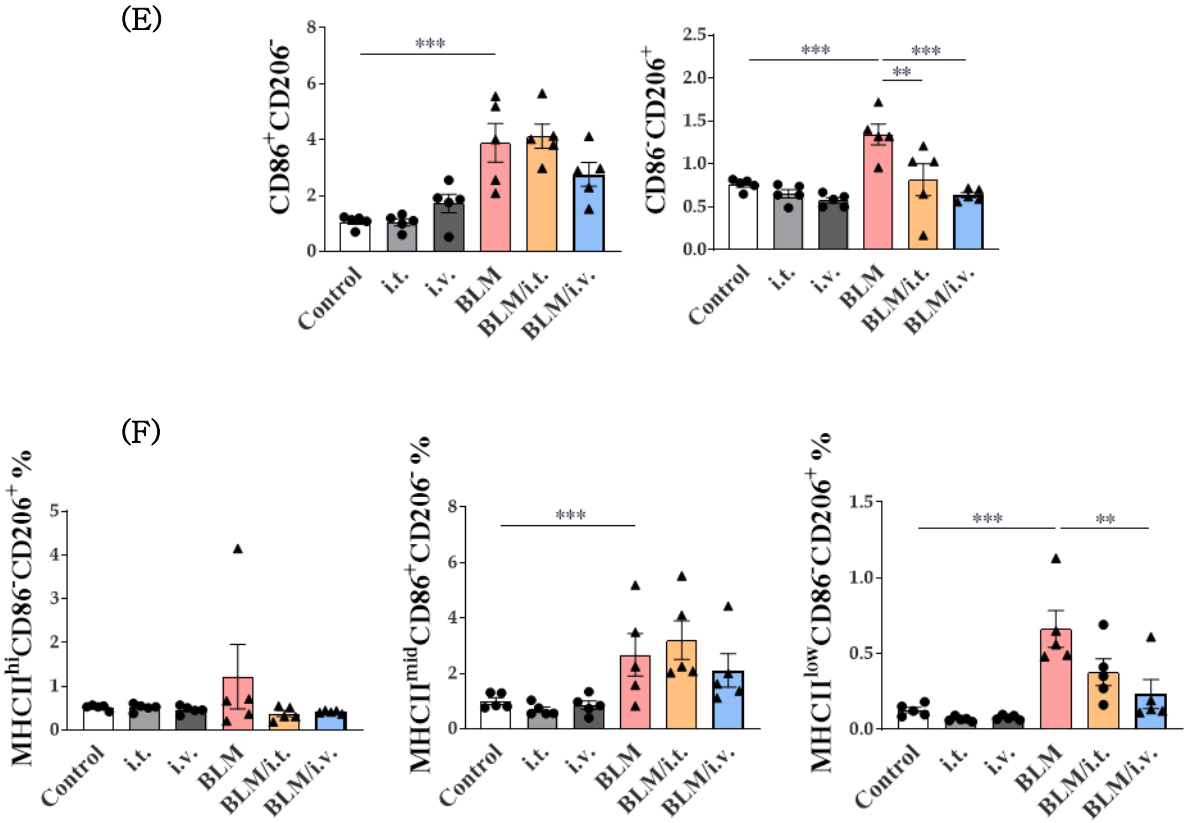


그림 12. 폐 섬유증 모델에서 MSC 에 의한 대식세포 아형 활성화의 변화

(A) 폐 대식세포의 수. (B) SiglecF 대 CD11b 표지자 발현에 따른 생체 내 폐 AM 및 MoM 분포를 보여주는 산점도 (C, D) SiglecF 발현에 따른 AM 및 MoM 의 아형 변화 (E) 폐 내 MoM 에서 CD86 및 CD206 표지자의 발현 (F) 폐에서 MHCII, CD206, CD86 표지자의 발현에 따른 M2 대식세포 아형의 변화. (E), (F)의 대식세포 하위 집단에 대한 비율은 MoM 집단 내 비율을 나타냄. 각 실험군당 n=5. *유의 확률<0.05, **유의 확률<0.01, ***유의 확률<0.001, ****유의 확률<0.0001. 모든 결과는 최소 3 번의 독립적인 실험을 대표함. i.t, intravenous; i.t, intratracheal; BLM, bleomycin; AM, alveolar macrophages; MoM, monocyte-derived macrophage; MHCII, major histocompatibility complex II

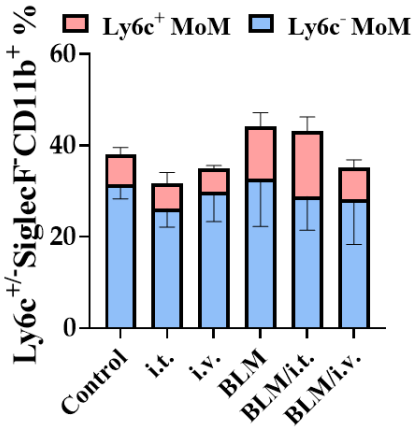
8. 폐섬유증 모델에서 Ly6c$^{+/-}$ 대식세포에 대한 MSC의 효과

MoM의 기원에 따른 차이를 확인하기 위해 Ly6c 발현 여부로 고전적 단핵구와 비고전적 단핵구 유래 대식세포로 분류하여 분석을 시행하였다. BLM 마우스 모델에서 Ly6c^{+} MoM이 유의하게 증가하였고 정맥 내 MSC 투여는 이를 유의하게 감소시킨 반면 Ly6c^{-} MoM은 BLM이나 MSC 투여에 의해 변화를 보이지 않았다(그림 13A, B). MSC가 효과를 보였던 Ly6c^{+} MoM 집단을 추가 분석하였을 때, CD86^{+}CD206^{-}은 MSC에 의해 변화가 없었으며 CD86^{-}CD206^{+}가 유의하게 감소함을 확인하여, MSC 투여는 BLM으로 인해 증가한 Ly6c^{+} MoM중 특히 M2를 유의하게 감소시킴을 확인하였다(그림 13C). 다음으로 MoM의 섬유화 유도 효과 및 M2 표현형, 그리고 이에 대한 MSC의 효과를 확인하기 위해 BLM 마우스와 대조군 마우스의 골수에서 Ly6c^{+} 및 Ly6c^{-} 단핵구를 추출한 뒤, M-CSF를 투여하여 대식세로로 분화시킨 후 5일 째 IL-13를 투여하여 섬유화 유도 및 M2 분극화를 유도하였고, MSC 투여 여부에 따른 차이를 6일째 비교 분석하였다(그림 13D, F). BLM 마우스 모델에서는 M2 활성화 표지자인 *Cd163*과 M1 활성화 표지자인 *Il1b*이 Ly6c^{-} MoM보다 Ly6c^{+} MoM에서 유의하게 증가하였고 이는 MSC 투여 시 유의하게 감소하였다. *Fibroblast growth factor 1*(*Fgf1*), *Ccl22* 및 *CxCl2*

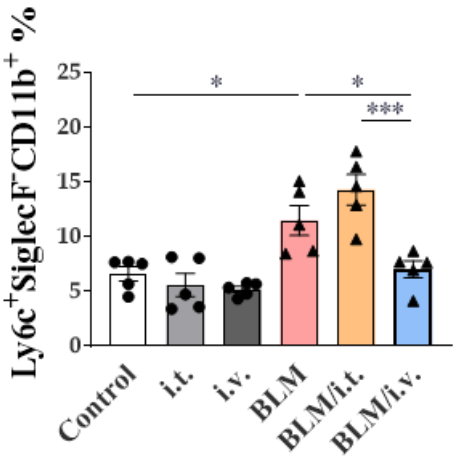
역시 Ly6c^{+} MoM에서 Ly6c^{-} MoM보다 유의하게 증가하였고, MSC 투여는 이를 유의하게 감소시켰다. 한편 *Tgf1*와 *Ccl22*의 경우, Ly6c^{-} MoM 에서도 MSC 투여에 의해 그 발현이 유의하게 감소하였다(그림 13E). 대조군 마우스 실험에서는 *Cd163, Il1b*의 경우 Ly6c$^{+/-}$ MoM 군 간 발현의 차이가 없었고 MSC 투여 역시 변화를 유발하지 않았다. *Tgf1b, Ccl22, Cxcl2*는 MSC 치료 시 Ly6c^{+} MoM에서 그 발현이 유의하게 감소하였으며 Ly6c^{-} MoM에는 효과를 보이지 못하였다(그림 13G).

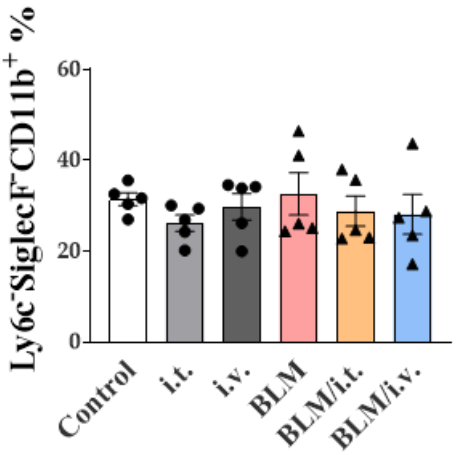
추가적으로 Ly6c^{+} 및 Ly6c^{-} MoM의 섬유화 유도능과 MSC의 효과를 평가하기 위해 BLM 마우스 유래 Ly6c^{+} 및 Ly6c^{-} MoM에 5일째 IL-13을 투여한 후 6일 째의 배지를 마우스 폐 섬유아세포에 투여하였다. MSC와 공배양된 Ly6c^{+} MoM의 배지에서만 마우스 폐 섬유아세포의 *Fn1과 Fgf2*의 발현이 유의하게 감소하였다(그림 13H).

(A)

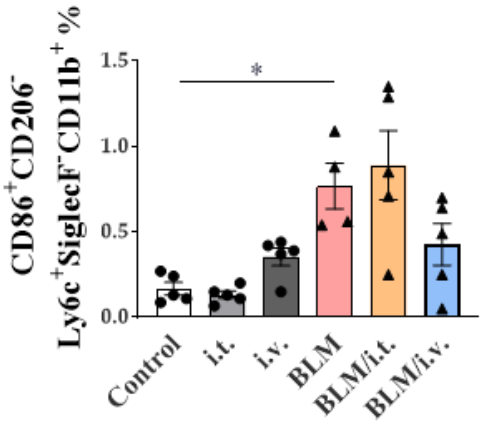

Ly6c+ MoM
Ly6c- MoM
Ly6c+/-SiglecF-CD11b+ %
60
40
20
0
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

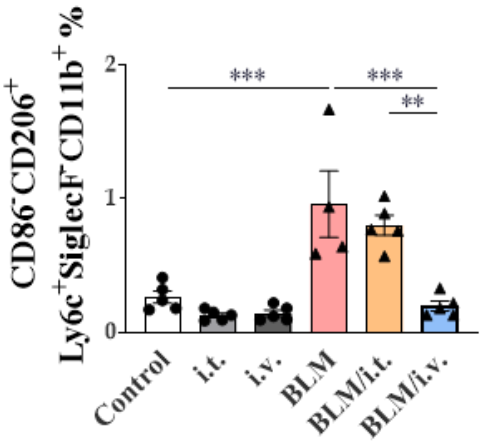
(B)


Ly6c+SiglecF-CD11b+ %
25
20
15
10
5
0
*
*
***
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

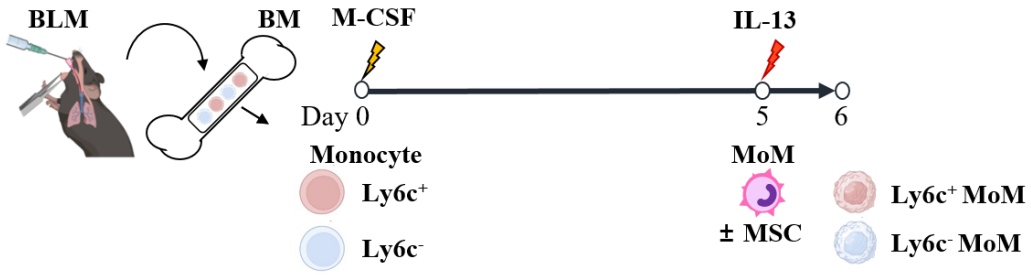

Ly6c-SiglecF-CD11b+ %
60
40
20
0
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

(C)

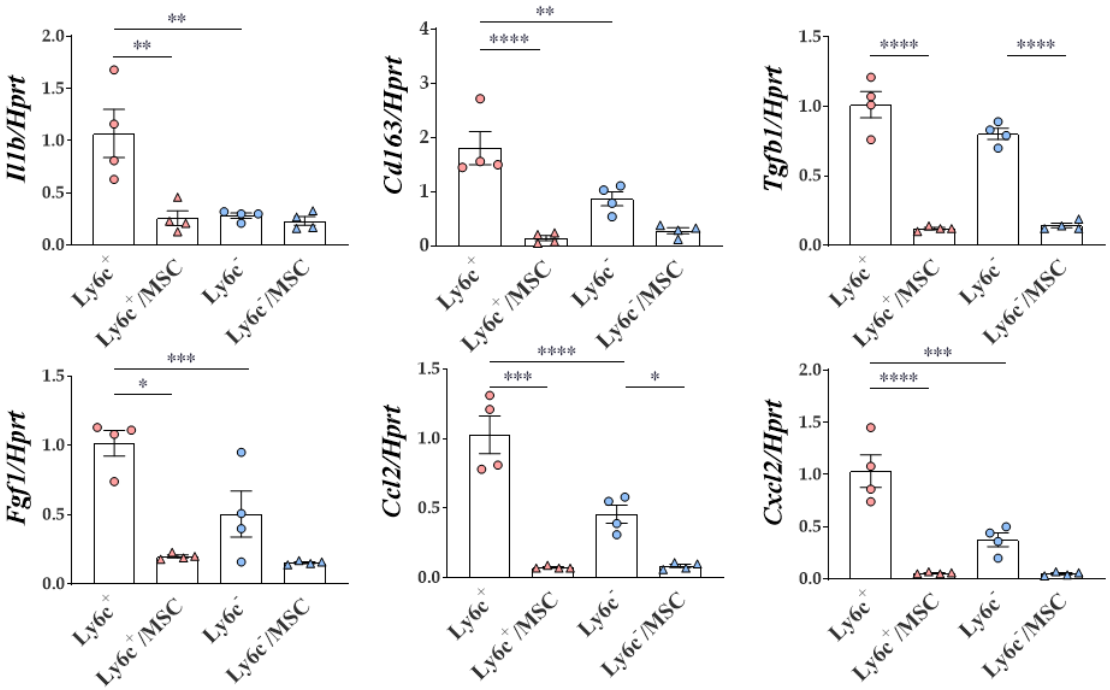

CD86+CD206-
Ly6c+SiglecF-CD11b+ %
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.


CD86-CD206+
Ly6c+SiglecF-CD11b+ %
2
1
0
***
***
**
Control
i.t.
i.v.
BLM
BLM/i.t.
BLM/i.v.

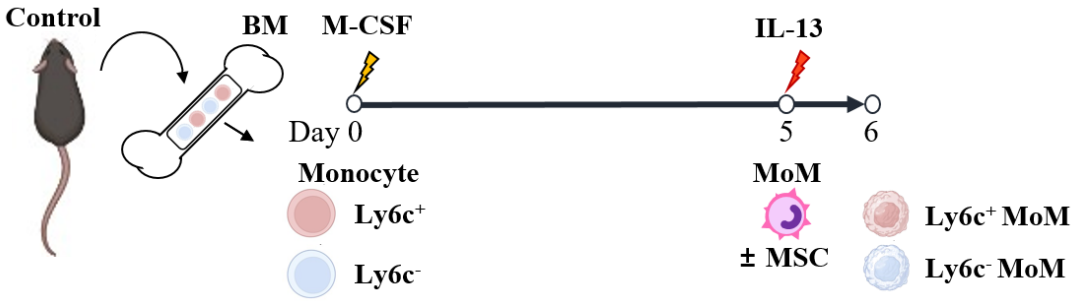
(D)


BLM
BM
M-CSF
IL-13
Day 0
5
6
Monocyte
Ly6c+
Ly6c-
MoM
± MSC
Ly6c+ MoM
Ly6c- MoM

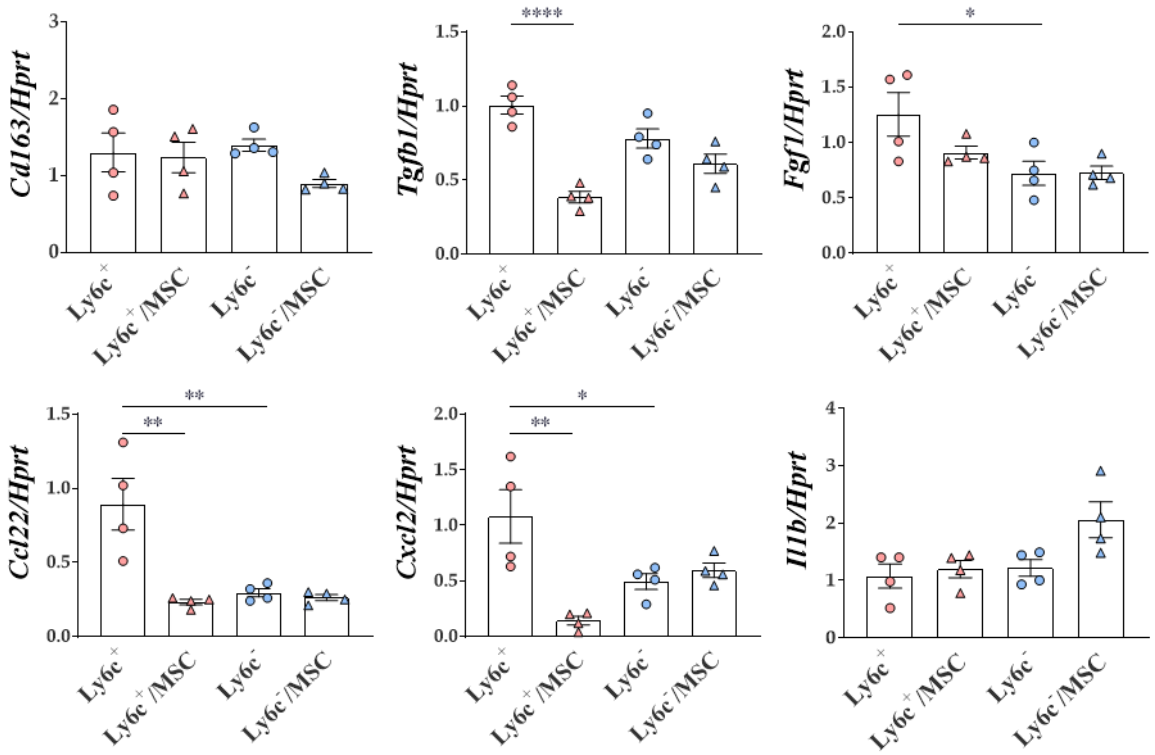
(E)


Il1b/Hprt
Cd163/Hprt
Tgfb1/Hprt
Fgf1/Hprt
Ccl2/Hprt
Cxcl2/Hprt
Ly6c-
Ly6c-/MSC
Ly6c+
Ly6c+/MSC

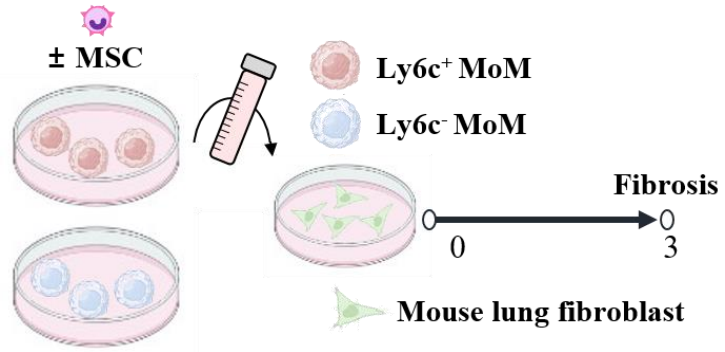
(F)


Control
BM
M-CSF
IL-13
Day 0
5
6
Monocyte
Ly6c+
Ly6c-
MoM
± MSC
Ly6c+ MoM
Ly6c- MoM

(G)


Cd163/Hprt
Tgfb1/Hprt
Fgf1/Hprt
Ccl22/Hprt
Cxcl2/Hprt
Il1b/Hprt
Ly6c+
Ly6c+/MSC
Ly6c-
Ly6c-/MSC
****
*
**

(H)



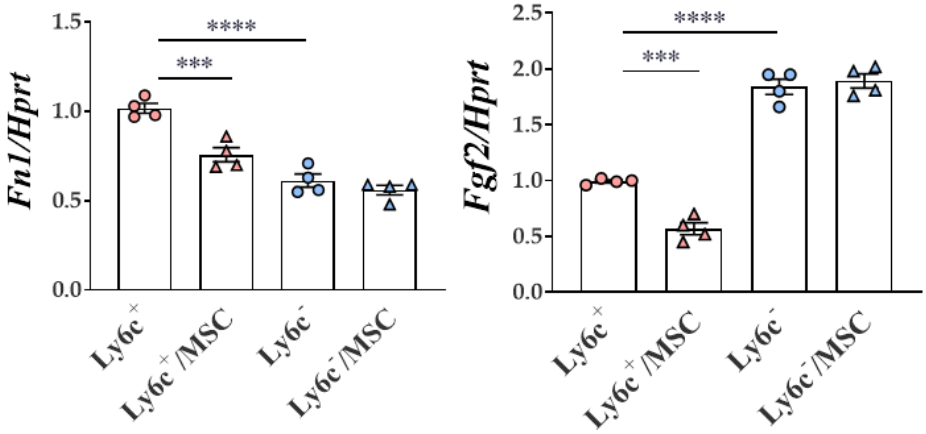


그림 13. *In vivo* 와 *ex vivo* Ly6c$^{+/-}$ 대식세포 활성화에 대한 MSC 의 조절 효과

(A, B) 폐에서 Ly6c^{+} 및 Ly6c^{-} MoM의 변화. (C) 폐에서 Ly6c^{+} MoM의 CD86 및 CD206 표지자 발현 집단의 변화. (D) BLM 모델에서 분리된 Ly6c^{+} 및 Ly6c^{-} 단핵구의 대식세포 분화 프로토콜. (E) BLM 모델에서 유래된 Ly6c^{+} 및 Ly6c^{-} MoM에서 대식세포 활성화 표지자, 섬유화 관련 표지자 및 면역 세포 주화성 표지자의 mRNA 발현 (F) 대조군 마우스에서 분리된 Ly6c^{+} 및 Ly6c^{-} 단핵구의 대식세포 분화 프로토콜. (G) 대조군 마우스에서 유래된 Ly6c^{+} 및 Ly6c^{-} MoM에서 대식세포 활성화 표지자, 섬유화 관련 표지자 및 면역 세포 주화성 표지자의 mRNA 발현. (H) Ly6c^{+} 또는 Ly6c^{-} MoM의 섬유화 유도능 및 MSC의 효과. 각 실험군당 n=4-5 *유의 확률<0.05, **유의 확률

<0.01, *** 유의 확률<0.001, ****유의 확률<0.0001. 모든 결과는 최소 3번의 독립적인 실험을 대표함. i.t, intravenous; i.t, intratracheal; Ly6c, lymphocyte antigen 6 complex; MoM, monocyte-derived macrophage; BLM, bleomycin; MSC, mesenchymal stem cell; BM, bone marrow; IL-13, interleukin-13; *Il1b*, *interleukin 1b*; *Tgfb1*, *transforming growth factor beta 1*; *Fgf1*, *fibroblast growth factor 1*; *Ccl2*, *C-C Motif Chemokine Ligand 2*; *Cxcl2*, *C-X-C Motif Chemokine Ligand 2*; *Ccl22*, *C-C Motif Chemokine Ligand 22*; *Hprt*, *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*; M-CSF, Macrophage Colony-Stimulating Factor; *Fn1*, *fibronectin 1*; *Fgf2*, *fibroblast growth factor 2*

IV. 고 찰

본 연구에서는 IPF환자의 폐조직과 혈액, 그리고 BLM 마우스 폐섬유증 모델을 사용하여 MSC 투여가 BLM 유도 폐섬유화를 유의하게 감소시키며 그 기전에 여러 면역 세포들이 관여하고, 특히 대식 세포 중 MoM, 그 중에서도 M2c를 선택적으로 감소시킴으로써 폐섬유화를 감소시킨다는 것을 확인하였다. 특히 이러한 효과는 기관 내 투여보다 정맥으로 MSC를 투여하였을 때 더 유의하게 나타났다.

IPF는 진행하는 섬유화를 특징으로 하는 질환으로, 흡연이나 환경 오염물질, 위산 역류 등으로 인해 반복적으로 폐포의 상피세포에 미세손상이 발생하면서 시작된다고 생각되고 있다(70). 이러한 반복되는 미세손상에 대한 염증 및 면역 반응은 IPF의 주요 병태생리 기전 중 하나로 인간과 동물모델들에서 연구되어 왔다. 여러 면역 세포 중 $CD4^+$ T 세포의 비정상적인 활성화가 IPF의 발생에 관여한다고 알려져 있으며, 특히 Th2 및 Th17 세포가 섬유아세포를 활성화 및 증식시키고 ECM 생성을 통해 IPF의 발생에 중요한 역할을 한다(71).

대식세포와 단핵구는 최근 폐섬유증과 관련하여 활발하게 연구되고 있는 세포군이다. 발생 초기 AM 는 대부분 태아의 간이나 난황낭에서 유래된 TR-AM 로, 자기재생능을 가지며 장기간 생존하게 된다. 이후 감염이나 염증 시 폐로 단핵구가 유입되고 이 단핵구들은 조직에서 대식세포로 분화하여 염증과 감염에 반응하게 된다. 이후 유입되었던

MoM 의 일부가 TR-AM 과 비슷하게 변화하여 Mo-AM 으로 조직에 상주하게 되는데(25) 사람이 나이가 들수록 AM 중 Mo-AM 의 비율이 점차 증가하는 것으로 알려져 있다(26). 2017 년 한 연구에서 14 개월령 정상 마우스를 분석하면 AM 의 95% 이상이 TR-AM 이지만, 8 주째 BLM 를 투여한 마우스를 10 개월 후 분석하였을 때는 약 50%의 AM 가 Mo-AM 인 것을 확인하여, AM 의 조성은 개체의 손상이나 감염 등 미세 환경에 따라 크게 변화되고, 또한 그 변화가 장기간 유지됨을 확인하였다(17).

최근 여러 연구에서 MoM 이 폐섬유증의 병태생리에 중요한 역할을 한다고 보고되었다. MoM 은 섬유아세포의 증식에 필요한 platelet-derived growth factor subunit A 를 분비하는 측분비효과(paracrine effect) 및 섬유화 병소 내에서 MoM 의 유지에 필요한 M-CSF 를 분비하는 자가분비효과(autocrine effect)를 통해 섬유화의 발생 및 유지에 중요한 역할을 한다(72, 73). 최근 계통 추적 시스템(lineage tracing system)이 개발되고 연구에 사용되면서 시간에 따른 대식세포의 변화에 대한 연구들이 발표되었다. 2017 년 Misharin 등이 보고한 연구에서는 BLM 마우스 모델에서 BLM 투여 5 일 째 분석 결과 $CD64^{+}SiglecF^{-}$ 대식세포(IM)가 증가하고 $CD64^{+}SiglecF^{+}$ 대식세포(AM)가 감소하였는데, BLM 투여 21 일 후 즉 섬유화 시기에 분석하였을 때는 IM 이 감소하고 AM 이 증가함을 확인하였다. 이에 증가한 AM 을 분석한 결과 SiglecF 를 낮게 발현하는 새로운 AM 의 출현으로 총 AM 이 증가함을 확인하였고, 계통 추적 시스템을 사용하여

이 새로운 대식세포들이 단핵구에서 유래된 MoM 임을 확인하여 이들을 Mo-AM 으로 정의하였다. 저자들은 이 연구에서 여러 유전자 재조합 마우스와 전사체 분석을 통해 폐섬유화에 TR-AM 은 거의 관여하지 않으며 Mo-AM 이 폐섬유화에 중요한 역할을 한다는 것을 제시하였다(17). 2018 년 발표된 다른 연구에서도 항 세포사멸 단백질인 cellular FADD-like IL-1β-converting enzyme-inhibitory protein (c-FLIP)을 제거하여 $CD11b^{hi}$ 대식세포의 세포사멸을 유도하면 BLM 유도 폐섬유증이 유의하게 억제됨을 확인하였다(18).

이러한 MoM 의 기원은 혈관 내에 순환하는 단핵구로, 이의 대부분은 CCR2 에 의존하여 폐에 침윤하는 고전적 단핵구이다. 이전 연구들에서 $CCR2^{-/-}$ 마우스를 사용하거나 liposomal clodronate 를 투여하여 순환하는 단핵구를 결핍시켰을 때 폐 섬유화의 정도가 감소하는 것을 보고하여, TR-AM 가 아닌 MoM, 그 중에서도 특히 고전적 단핵구에서 유래한 MoM 이 폐섬유화에 중요한 역할을 한다는 것을 제시하였다(74-77). 본 연구에서도 BLM 마우스 모델의 폐에서 대식세포와 관련된 유전자들의 발현이 유의하게 증가하였고, 유세포 분석 결과 총 대식세포 수의 유의한 증가를 확인하였다. 본 연구에서 SiglecF 은 AM 의 표지자로 사용되었는데, 정상 상태(대조군)에서 $SiglecF^{+}$ 대식 세포의 대부분을 차지하는 TR-AM 인 $SiglecF^{+}CD11c^{+}CD11b^{-}$ 대식세포는 이전 발표된 연구들과 마찬가지로 BLM 그룹에서 유의하게 감소함을 확인하였다(17). $SiglecF^{-}CD11b^{+}$

대식세포 즉 MoM 을 CD11c 의 발현에 따라 분류하였을 때 SiglecF$^-$ CD11c$^+$CD11b$^+$ 대식세포는 AM 로 변하는 단계의 MoM 일 가능성이 있겠다. SiglecF$^-$CD11c$^-$CD11bc$^+$ 대식세포는 화학주성에 의해 순환계에서 폐로 유입된 직후의 MoM 으로 간주하였다. BLM 그룹에서 SiglecF$^-$CD11c$^-$CD11b$^+$ 대식세포는 유의하게 변화가 없는 것처럼 보였으나, CD86 과 CD206 을 사용하여 M1 및 M2 로 아형을 분류하여 분석하였을 때 BLM 투여는 M1 및 M2 MoM 을 모두 증가시켰다.

추가로 Ly6c 를 사용하여 고전적 단핵구와 비고전적 단핵구를 분류하였을 때 BLM 그룹에서 Ly6c$^+$인 고전적 MoM 이 유의하게 증가하는 것을 확인하여, IPF 환자의 섬유화된 폐와 혈액에서 고전적 MoM 이 증가한 것과 부합하는 결과를 확인하였다. 인간의 시료로 시행한 이전 연구들에서도 유사한 결과를 보고하였는데, IPF 로 폐이식을 받은 환자들의 적출폐에서 기증자 폐조직에 비해 MoM 가 증가되어 있음을 보고하였다(17). 또한 전사체 분석 결과 BLM 마우스에서 확인되었던 섬유화 유전자들의 인간 상동 유전자들 중 61 개의 유전자가 IPF 환자의 폐와 기증자폐의 대식세포에서 다르게 발현됨을 확인하여, 인간과 마우스의 대식세포에서 공통된 섬유화 경로의 가능성을 제시하였다(17). 본 연구에서도 역시 IPF 환자의 섬유화된 폐에서 *ITGAM, ITGAX, MRC1, CD86*, *HLA-RDA* 와 같은 대식세포 관련 유전자들과 단핵구 화학주성 유전자들 (*CCL2, CCR2*)의 발현이 정상 부위에 비하여 유의하게 증가되어 있음을 확인하였다. 유세포

분석에서도 섬유화된 부위에서 고전적 단핵구가 유의하게 증가하고 비고전적 단핵구가 감소하였다.

대식세포의 가소성, 즉 M1/M2 분극화는 *in vitro* 연구에서는 비교적 잘 관찰되지만 *in vivo* 에서 동일하게 발생하지는 않는다. 대식세포의 기능적 표현형에 대한 연구들에서 M2 와 관련된 유전자의 결실을 만들었을 때 M2 분극화가 억제되면서 BLM 유도 폐섬유화에 대한 보호 효과를 보고하였고, 다시 M2 를 회복시켰을 때는 BLM 에 대한 감수성이 다시 증가하는 결과를 확인하였다(78, 79). 또한 IPF 환자가 급성 악화가 발생하였을 때 시행한 BALF 에서 IL-1RA 와 CCL2 와 같은 M2 사이토카인들의 상승을 확인하여, M2 와 폐섬유화의 연관성을 확인하였다(80). 본 연구에서 유세포 분석 결과 $CD86^{+}CD206^{-}$(M1) MoM 과 $CD86^{-}CD206^{+}$(M2) MoM 모두 BLM 그룹에서 상승하는 소견을 보여, 폐의 손상과 수복에 관여하는 M1/M2 의 가소성에 대한 평가를 위해 시간이 경과함에 따라 어떻게 변화하는지 추가 연구가 필요하겠다.

In vitro 실험을 위해 IPF 환자의 혈액에서 각 단핵구 아형을 분리하여 M-CSF 를 사용하여 대식세포로 분화시킨 후 IL-13 으로 자극하여 단핵구 기원에 따른 MoM 의 차이를 추가로 확인하였다. IL-13 은 잘 알려진 섬유화의 주요 매개물질로, 섬유아세포의 증식 및 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM) 침착을 활성화시키고 섬유성 사이토카인 및 fibronectin 생성을 유도하며(81) 또한 M2 로의 분극화를 유도한다.

실험 결과 고전적 단핵구에서 분화된 MoM 에서 AM 의 표지자인 *ITGAX*, MoM 의 표지자인 *ITGAM*, M2 활성화 지표인 *MRC1* 의 발현이 유의하게 관찰되었다. 또한 인간 폐 섬유아세포를 각 단핵구 집단 배양 상청액에서 배양하였을 때도 고전적 단핵구 집단의 상청액에서 섬유아세포의 섬유화 관련 유전자 발현을 유의하게 증가하였으며, MSC 는 이를 유의하게 감소시켰다.

IPF의 병태생리에는 대식세포 및 단핵구 이외의 다른 면역 세포들, 즉 T세포, 과립구, 그리고 ILC등도 관여하고 있다. 최근 도움 T 세포에 대해 정리한 한 종설에 따르면 Th22는 항섬유효과를 가지며 Th1, Th2, Th9, Th17, 여포 보조 T 세포는 섬유화 효과를 가진다고 알려졌다(36). 이전에 발표되었던 여러 연구들에서 IFN-γ(82), IL-13(81), IL-17(83-87)와 같은 Th 사이토카인들이 폐섬유화에 관여하고 있다는 것 역시 같은 맥락이라 하겠다. 또한 최근 한 연구에서 진행하는 섬유화 간질성 폐질환(progressive fibrosing interstitial lung disease) 환자들의 BALF에서 대조군에서는 관찰되지 않는 IL-13^{+}IFN-γ^{+}CD4^{+} T 세포 집단이 발견되어(88), IL-13과 IFN-γ가 폐섬유화에 중요하게 기여한다는 것을 간접적으로 제시하였다. 따라서 MSC가 이러한 T세포들의 활성을 억제함으로서 섬유성 사이토카인 분비를 억제하는 것이 MSC의 항섬유화 효과의 중요한 기전 중 하나라 할 수 있겠다. 본 연구에서도 이전 문헌들과 동일하게 BLM 마우스에서 Th22를 제외한 Th 반응들이 유의하게 증가함을 확인하였다.

한편 조절 T세포의 경우 폐섬유화에 대한 연구들에서 상반되는 효과들이 보고되면서, 조절 T 세포는 폐섬유화의 촉진 및 완화 두 가지의 효과를 모두 가진다고 이해되고 있다. 조절 T 세포가 폐섬유화를 촉진시키는 기전으로는 PDGF, TGF-β를 분비하고 상피-중간엽 전이를 촉진하며 Th1 및 Th2 균형에 영향을 주는 것 등이 알려져 있다. 폐섬유화를 억제하는 기전으로는, 손상된 상피 세포의 복구를 촉진하고 섬유아세포의 축적을 억제하며, 염증 유발 인자 및 염증 세포의 생성 및 기능을 강력하게 억제하는 것이 알려져 있다(37). 이러한 효과는 조절 T 세포의 아형, 발현하는 항원, 분비하는 물질, 섬유화 시기 등 다양한 요인에 영향을 받아 결정되게 된다. 그 중 폐섬유증 마우스 모델을 사용한 한 연구에서 염증과 섬유화의 시기에 따라 조절 T 세포의 효과가 다르다는 것을 보고하였는데, 염증이 시작되는 초기에는 염증을 악화시키는 효과를 보이지만 섬유화가 시작되는 시기(BLM 투여 9일과 16일째)에는 섬유화를 감소시키는 효과를 가진다는 것을 보고하였다(89). 본 연구에서 마우스의 분석 시점이 BLM 투여 14일째임을 고려할 때 본 연구에서의 조절 T 세포는 항섬유효과를 가질 가능성이 높겠으며, 본 연구에서 MSC 투여는 조절 T 세포를 증가시켰고, 이 결과는 이전의 여러 연구들과 일치하는 소견이다(90-93).

ILC는 비교적 최근에 활발히 연구되고 있는 면역세포로 폐질환에서 ILC의 역할에 대한 연구는 주로 기도질환에서 진행되었는데, 대표적으로 ILC2가 2형 면역 반응을 활성화함으로써 천식의 발생에 기여한다고 생각되고 있다. 한편 폐섬유증에서 ILC에 대한 연구는 상대적으로 부족

하지만, BLM 유도 폐섬유증 모델에서 ILC2에 의한 IL-13의 생성이 콜라겐 침착을 유도한다는 결과를 보여주었고(40), 인간에서도 IL-33, 흉선기질림프포이에틴(Thymic stromal lymphopoietin, TSLP), IL-25와 같은 ILC2 유도 물질들이 IPF 환자의 BALF에서 유의하게 증가됨이 보고됨에 따라 폐섬유화에도 ILC가 관여하고 있을 것이라는 관심을 받고 있다(40, 94). 또한 최근 연구에서 *Gata3* 및 *Early growth response protein 1* (*Erg1*)과 같은 섬유화 관련 유전자 조절 전사 인자를 암호화하는 mRNA를 억제하는 리보뉴클레아제인 Regnase-1의 결핍이 ILC2를 증가 및 활성화시키며 폐섬유화와 관련된 유전자발현이 증가함을 확인하여 ILC2의 섬유화 유도 기능을 확인하였다(95). ILC3 역시 섬유화에 관여하는 사이토카인 특히 IL-17을 분비함으로써 섬유화에 기여할 것으로 생각되고 있다(96). 본 연구에서는 BLM 투약 시 총 ILC 및 ILC 1, ILC2, ILC3 모두 유의하게 증가하였다.

MSC는 여러 면역 세포들을 조절하는 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있다. 폐섬유증 마우스 모델의 BALF에서 증가하였던 대식세포, 림프구, 과립구와 같은 여러 면역세포들이 MSC 투약으로 인해 유의하게 감소하였고(58, 59, 97), BLM 그룹의 폐 조직에서 증가하였던 염증 및 섬유화 역시 MSC 투여가 유의하게 감소시킴이 여러 연구들에서 보고되었다(58, 59, 98). 이러한 소견은 본 연구에서도 동일하게 관찰되었다. 또한 BLM으로 인하여 증가되었던 Th 반응들이 MSC 투여로 인해 다시 유의하게 감소하였고, 반면 BLM 그룹에서 감소하였던 Th22 반응은 MSC투여로 인해 다시 회복됨을 확인하였다. 또한 BLM 투약 시 유의하게 증

가하였던 총 ILC와 ILC1, ILC2, ILC3 모두 MSC 투여 시 유의하게 호전되는 것을 확인하였다. 현재까지 MSC가 ILC에 어떠한 영향을 끼치는지에 대한 연구는 매우 부족하며, 최근 MSC 치료가 Th2 세포와 IL2를 억제하여 중증의 천식을 호전시킨다는 것이 보고되었고(69), 다른 연구에서는 MSC로 인해 유도된 T 조절 세포가 IL-10을 분비함으로써 ILC2를 억제함을 보고하였다(99).

MSC가 이러한 세포들을 조절하고 섬유화를 조절하는 기전은 다양하며, 세포에 직접 작용하여 조절하거나 여러 성장 인자와 EV들을 포함하는 생체 내 활성 물질들을 분비하여 조절한다(100). MSC가 조절하는 여러 면역세포들 중 대표적인 세포가 대식세포이다(55). 마우스 폐섬유증 모델을 사용하여 MSC의 엑소좀(exosome)의 효과를 분석하였던 한 연구에서 폐의 유세포 분석 결과 BLM 투여 시 고전적 단핵구의 비율이 유의하게 증가하고 비고전적 단핵구의 비율이 감소하였으며, MSC의 엑소좀 투여는 이를 유의하게 회복시켰다고 보고하였다. 추가로 마우스 골수 유래 단핵구들을 추출하여 *ex vivo*에서 MSC 엑소좀으로 전처리 후 이 세포들을 BLM 마우스에 0일째, 그리고 3일 째 입양전이를 시킨 후 14일 째 분석을 시행하였을 때, 섬유화 정도 및 총 콜라겐의 유의한 감소를 확인하였다. 저자들은 이러한 효과가 TR-AM에 의한 것인지 확인하기 위해 정상 마우스의 BALF에서 AM을 분리하여 추가 실험을 시행하였다. 분리된 AM을 MSC 엑소좀으로 전처리 후 BLM 마우스 모델에 기관 내로 투여하였을

때, 앞의 단핵구 실험과는 다르게 BLM로 인한 섬유화를 호전시키지 못하였다(101). 본 연구에서도 정맥 내로 투여한 MSC는 BLM 그룹에서 유의하게 증가하였던 총 대식세포수를 유의하게 감소시켰는데 대식세포의 각 아형에 대해 추가 분석한 결과 BLM로 인해 유의하게 감소하였던 TR-AM은 MSC 치료로 호전되지 못하였고, 이는 앞선 MSC의 엑소좀이 BALF에서 분리한 AM에 효과가 없는 것과 부합하는 결과라 하겠다(101). 반면 BLM모델에서 증가하였던 SiglecF^{-} CD11c^{+}CD11b^{+} 대식세포는 정맥 주사 된 MSC에 의해 유의하게 감소하였다. SiglecF^{-}CD11c^{-}CD11b^{+} 는 BLM투여나 MSC 투여에 유의한 변화를 보이지 않았지만 이 세포군에 대한 추가 분석을 시행하였을 때 BLM에서 증가하였던 CD86^{+}CD206^{-} MoM (M1 MoM), 및 CD86^{-}CD206^{+} MoM (M2 MoM) 중 M2 MoM만이 정맥 내 투여된 MSC에 의해 유의하게 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 이전 연구들에서 MSC 치료가 주로 M1을 억제하고 M2 분극화를 유도한다고 보고되었던 것과는 다소 상반되는 결과인데(67), 이는 이전 연구들과 본 연구에서 MSC의 투여 시점 및 폐의 분석 시점이 다르기 때문으로 생각된다. 이전 연구들은 주로 MSC의 항염증 효과에 초점을 맞추었기 때문에 폐섬유증에서의 MSC의 작용 기전 역시 초기 염증을 억제함으로써 폐섬유화의 발생을 예방한다고 생각하여 BLM 투여와 동시 혹은 수시간 이내, 또는 7일 이내 즉 염증의 매우 초기에 MSC를 투여하여 효과를 입증한 반면 폐섬유화가 발생한 이후에 MSC를 투약한 경우에는 효과가 없다고 보고하였다. 본 연구에서는 BLM투여 10일

후에 MSC를 투여하고 14일 후 폐를 분석하였을 때 MSC의 효과를 확인하였는데, 이는 비교적 최근에 발표된 rat을 사용하였던 연구들에서 BLM 투여 21일 및 28일 후에 MSC를 투여하였을 때도 유의하게 섬유화를 호전시켰다고 보고한 결과와 잘 부합한다 하겠다(102, 103). MSC의 효과가 항상성의 유지 및 안정 상태로의 수복임을 고려할 때 초기 염증 시기를 지난 후기 섬유화 시기의 MSC의 작용은 섬유화를 유발하는 M2를 억제하는 효과를 보이는 것으로 설명할 수 있겠다.

최근 M2의 아형에 따른 연구들이 활발히 진행되고 있는데, 그 중 M2c는 TGF-β와 IL-10을 분비함으로써 염증을 억제하고 손상 부위의 회복 및 조직의 개형(remodeling)과 섬유화에 관여한다고 알려져 있다(104). 그러나 현재까지 MSC가 M2의 각 아형에 미치는 효과는 연구된 바가 없는 상황이다. 본 연구에서는 MHCII 발현의 정도에 따라 M2 아형을 분류하여 추가 분석을 시행하였고, 그 결과 $MHCII^{low}CD206^{+}CD86^{-}$(M2c)와 $MHCII^{mid}CD206^{-}CD86^{+}$(M2b)가 BLM 모델에서 증가하였고, 그 중 M2c만이 정맥 주사된 MSC에 의해 유의하게 감소됨을 확인하여, 이러한 M2c에 대한 효과가 MSC의 항섬유화 기전 중 하나일 가능성을 처음으로 제시하였다.

마지막으로 $Ly6c^{+}$ MoM의 섬유화 유도 효과 및 M2 표현형의 발현, 그리고 이에 대한 MSC의 효과를 확인하기 위해 *ex vivo* 실험을 시행하였고, BLM 마우스와 대조군 마우스의 골수에서 $Ly6c^{+/-}$ 단핵구를 추출하여 대식세포로 분화시킨 후 5일째 IL-13을 투여하여

섬유화 및 M2 로의 분극화를 유도하고 MSC 투여에 따른 변화를 분석하였다. 그 결과 BLM 마우스에서 MSC 투여는 Ly6c^{+} MoM 뿐 아니라 Ly6c^{-} MoM에서도 Tgfb1과 Ccl2를 유의하게 감소시키고 이외의 화학 주성 표지자들도 감소시키는 경향을 보여주었다. 또한 MSC 치료는 대조군 마우스의 Ly6c^{+} MoM 에서도 T 세포, 호산구, 호중구 등 여러 면역 세포에 대한 화학주성을 감소시키는 효과 및 섬유화 유도를 저하시키는 효과를 나타내지만 Ly6c^{-} MoM에서는 유의한 효과를 보이지 않았다. 즉 MSC 치료는 Ly6c^{+} MoM에서 뚜렷하게 효과를 보이지만 BLM 처리와 같이 염증과 손상이 발생했을 경우에는 Ly6c^{-} MoM에도 일부 효과를 보여, 항상성이 유지되는 안정상태 보다는 염증과 손상이 발생하였을 경우 이를 조절하는 MSC의 효과가 두드러지게 나타남을 확인하였다. BLM 마우스에서 유래한 Ly6c$^{+/-}$ MoM의 배지를 마우스 폐 섬유아세포에 투여하였을 때도 MSC의 효과는 Ly6c^{+}MoM 유래 배지에서 유의하게 나타났다.

여러 연구에서 MSC의 투여는 다양한 경로로 시도되었으나 폐질환에서 가장 많이 사용되는 경로는 정맥 내 투여와 기관 내 투여이다. 폐섬유증에 대한 연구들에서는 87.5%의 연구에서 정맥 내 투여를 사용하였고 기관 내로 투여한 연구는 상대적으로 매우 적었다(105). 급성 폐질환에 대한 MSC의 연구에서도 정맥 내 투여의 비율이 가장 높았으나, 폐섬유증에 대한 연구보다는 기관 내 투여의 사용 빈도가 좀더 높아서 약 30%의 연구에서 기관 내 투여를

시행하였다(106). 두 가지 투여 경로 중 어떤 경로가 더 우월한지에 대해서는 대상 질환 및 연구에 따라 상반되는 결과들이 보고되었는데, 급성 폐손상과 관련된 연구들 및 이에 대한 메타분석에서는 기관 내 투여가 정맥 내 투여보다 우월하다는 결과를 보고하였고(107-109), 폐기종 모델에서는 정맥 내로 투여한 경우 폐기능 감소를 줄여주는 효과를 보여주었다(110). 한편 폐섬유증에서는 어떠한 경로가 더 우월한지 연구된 바가 거의 없어, 두 방법 중 어느 방법이 우월하다고 결론을 내리기에는 아직까지 연구가 충분하지 않다. 본 연구에서는 MSC를 정맥 내 및 기관 내 두 가지 경로로 투여하여 그 효과를 직접 비교하였고, 통계적 유의성의 차이는 약간 있었지만 대체로 정맥 내 투여가 기관 내 투여보다 우월한 효과를 보였다. 정맥 내 MSC 투여가 더 효과적인 이유에 대해서 잘 연구된 바는 없으나 본 연구의 결과를 고려할 때 정맥 내 투여가 MoM의 기원인 혈관 내의 단핵구에 좀더 빠르고 효과적으로 작용하기 때문일 것으로 생각된다.

본 연구에는 몇 가지 제한점들이 있다. 첫째로 본 연구는 BLM 투여 후 14일 째 마우스를 분석한 연구로, 비교적 초기 섬유화 시기에 대한 연구라고 할 수 있다. 폐 대식세포의 조성 및 표현형은 시기에 따른 변화가 매우 크며, 이전 연구에서 Mo-AM의 증가가 섬유화 시기 전반에 거쳐 천천히 나타난다고 보고했던 것과 BLM투여 21일 째 AM의 확연한 증가를 관찰하였던 연구 결과들을 고려할 때, 본 연구는 Mo-AM의 본격적 증가가 나타나기 전 초기 섬유화 시기일 가능성이 높겠다. 따라서 본 연구 결과를 섬유화 과정 전반에 적용하여 일반화할 수 없겠다.

두 번째로 본 연구에서는 대식세포들의 폐 내 위치를 직접적으로 분석하지 못하고 대표적인 세포 표지자를 사용하여 간접적으로 분석하였다. 따라서 실제 생체 내의 폐 조직에서 대식세포의 위치관계를 정확하게 반영하지 못하였을 가능성이 있겠다. 또한 대식세포의 각 아형이 폐섬유증의 발생에 직접적으로 작용하는 지 확인하기 위해서는 각 대식세포 아형을 제거한 마우스 모델을 사용하여 BLM에 의해 섬유화를 유발하여 섬유화의 발생 정도를 확인하는 것이 필요하나, 본 연구에서는 이를 확인하지는 못하였다. 따라서 본 연구는 직접적 인과관계 보다는 관련성을 제시한 연구로, 이를 규명하기 위한 추가적인 연구가 필요하겠다. 세 번째로, 단핵구에서 분화시킨 대식세포에 MSC를 공배양한 배지의 섬유아세포에 대한 섬유화유도 감소 효과가 MSC가 MoM에 영향을 끼쳐 발생한 것인지, MSC에서 분비된 엑소좀이 직접 섬유아세포에 작용한 것인지, 또는 두 기전이 모두 작용한 것인지 구별하기가 어렵다. 이전 문헌들을 참고했을 때 MSC에서 분비하는 엑소좀이 직접 작용하였을 가능성도 배제할 수 없을 것으로 생각된다(101). 마지막으로 본 연구에서는 MSC의 여러 면역 세포들에 대한 효과를 확인하고 특히 대식 세포의 각 아형들에 대한 효과를 개별적으로 확인함으로써 MSC의 효과에 기여하는 특정 세포들의 가능성을 제시하였지만 추가적 신호 전달 체계에 대한 분석이나 약물을 통한 중재 등을 이용한 작용 기전에 대한 분석은 시행하지 못하여 이에 대한 추가적인 연구가 필요하겠다.

V. 결 론

본 연구에서는 IPF 환자의 폐 조직에서 대식세포 및 단핵구가 증가되어 있고 특히 고전적 단핵구가 유의하게 증가하였음을 확인하였다. BLM 마우스 폐섬유증 모델을 사용한 실험에서 MSC가 여러 면역세포들을 조절하여 폐섬유화를 호전시키며, 특히 혈액에서 유입된 고전적 단핵구 유래 대식세포(Ly6c^{+} MoM)를 선택적으로 감소시키고 특히 M2, 그 중에서도 M2c를 유의하게 감소시킴을 확인하였다. 이러한 MSC의 효과는 기관 내 투여보다 정맥으로 투여하였을 때 더 유의하게 나타났다. *Ex vivo* 실험 결과 Ly6c^{+} MoM에서 높게 발현된 M2 활성화 및 섬유화 표지자가 MSC 투여에 의해 유의하게 감소하였고, *in vitro* 실험에서도 마우스 섬유아세포를 Ly6c^{+} MoM 배양 상청액에 배양했을 때 섬유화표지자의 발현이 증가되며 MSC 투여는 이를 유의하게 감소시킴을 확인하였다. 본 연구 결과는 MSC의 항섬유화 효과를 이해하고 이를 폐섬유증 환자에게 적용하는데 있어 도움이 될 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet. 2017;389(10082):1941-52.

2. Maher TM, Bendstrup E, Dron L, Langley J, Smith G, Khalid JM, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Res. 2021;22(1):197.

3. Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. Eur Respir J. 2015;46(3):795-806.

4. KDCA. Annual report on the rare diseases patients in Korea. https://helpline.kdca.go.kr/cdchelp/ph/ptlcontents/selectPtlConSent.do?schSno=145&menu=C0400.

5. Kapanci Y, Desmouliere A, Pache JC, Redard M, Gabbiani G. Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. Am J Respir Crit Care Med. 1995;152(6 Pt 1):2163-9.

6. Carre PC, Mortenson RL, King TE, Jr., Noble PW, Sable CL, Riches DW. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential

mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. J Clin Invest. 1991;88(6):1802-10.

7. Ortiz LA, Lasky J, Hamilton RF, Jr., Holian A, Hoyle GW, Banks W, et al. Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. Exp Lung Res. 1998;24(6):721-43.

8. Amer Thoracic S, European Resp S. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment - International consensus statement. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2000;161(2):646-64.

9. Raghu G, Brown KK, Costabel U, Cottin V, du Bois RM, Lasky JA, et al. Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with etanercept: an exploratory, placebo-controlled trial. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178(9):948-55.

10. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research N, Raghu G, Anstrom KJ, King TE, Jr., Lasky JA, Martinez FJ. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 2012;366(21):1968-77.

11. Shenderov K, Collins SL, Powell JD, Horton MR. Immune dysregulation as a driver of idiopathic pulmonary fibrosis. J Clin Invest. 2021;131(2).

12. Korthagen NM, van Moorsel CH, Kazemier KM, Ruven HJ,

Grutters JC. IL1RN genetic variations and risk of IPF: a meta-analysis and mRNA expression study. Immunogenetics. 2012;64(5):371-7.

13. Noth I, Zhang Y, Ma SF, Flores C, Barber M, Huang Y, et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. Lancet Respir Med. 2013;1(4):309-17.

14. O'Dwyer DN, Armstrong ME, Trujillo G, Cooke G, Keane MP, Fallon PG, et al. The Toll-like receptor 3 L412F polymorphism and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2013;188(12):1442-50.

15. Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, Whidborne M, Eaton V, Bingle C, et al. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162(2 Pt 1):755-8.

16. Kolahian S, Fernandez IE, Eickelberg O, Hartl D. Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2016;55(3):309-22.

17. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over

the life span. J Exp Med. 2017;214(8):2387-404.

18. McCubbrey AL, Barthel L, Mohning MP, Redente EF, Mould KJ, Thomas SM, et al. Deletion of c-FLIP from CD11b(hi) Macrophages Prevents Development of Bleomycin-induced Lung Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2018;58(1):66-78.

19. Cheng P, Li S, Chen H. Macrophages in Lung Injury, Repair, and Fibrosis. Cells. 2021;10(2).

20. Scott MKD, Quinn K, Li Q, Carroll R, Warsinske H, Vallania F, et al. Increased monocyte count as a cellular biomarker for poor outcomes in fibrotic diseases: a retrospective, multicentre cohort study. Lancet Respir Med. 2019;7(6):497-508.

21. Teoh AKY, Jo HE, Chambers DC, Symons K, Walters EH, Goh NS, et al. Blood monocyte counts as a potential prognostic marker for idiopathic pulmonary fibrosis: analysis from the Australian IPF registry. Eur Respir J. 2020;55(4).

22. Kreuter M, Lee JS, Tzouvelekis A, Oldham JM, Molyneaux PL, Weycker D, et al. Monocyte Count as a Prognostic Biomarker in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2021;204(1):74-81.

23. Chakarov S, Lim HY, Tan L, Lim SY, See P, Lum J, et al. Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. Science. 2019;363(6432).

24. Schyns J, Bai Q, Ruscitti C, Radermecker C, De Schepper S, Chakarov S, et al. Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. Nat Commun. 2019;10(1):3964.

25. Watanabe S, Alexander M, Misharin AV, Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. J Clin Invest. 2019;129(7):2619-28.

26. Morales-Nebreda L, Misharin AV, Perlman H, Budinger GR. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. Eur Respir Rev. 2015;24(137):505-9.

27. Khalil N, Bereznay O, Sporn M, Greenberg AH. Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. J Exp Med. 1989;170(3):727-37.

28. Heukels P, Moor CC, von der Thusen JH, Wijsenbeek MS, Kool M. Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. Respir Med. 2019;147:79-91.

29. Laskin DL, Malaviya R, Laskin JD. Role of Macrophages in Acute Lung Injury and Chronic Fibrosis Induced by Pulmonary Toxicants. Toxicol Sci. 2019;168(2):287-301.

30. Phan THG, Paliogiannis P, Nasrallah GK, Giordo R, Eid AH, Fois AG, et al. Emerging cellular and molecular determinants of

idiopathic pulmonary fibrosis. Cell Mol Life Sci. 2021;78(5):2031-57.

31. Zhang L, Wang Y, Wu G, Xiong W, Gu W, Wang CY. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? Respir Res. 2018;19(1):170.

32. Guo Z, Li S, Zhang N, Kang Q, Zhai H. Schisandra Inhibit Bleomycin-Induced Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Rats via Suppressing M2 Macrophage Polarization. Biomed Res Int. 2020;2020:5137349.

33. Wang J, Xu L, Xiang Z, Ren Y, Zheng X, Zhao Q, et al. Microcystin-LR ameliorates pulmonary fibrosis via modulating CD206(+) M2-like macrophage polarization. Cell Death Dis. 2020;11(2):136.

34. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. J Exp Med. 2011;208(7):1339-50.

35. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. Nat Rev Immunol. 2004;4(8):583-94.

36. Zhang M, Zhang S. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. Front Immunol. 2020;11:1142.

37. Wang F, Xia H, Yao S. Regulatory T cells are a double-edged sword in pulmonary fibrosis. Int Immunopharmacol. 2020;84:106443.

38. Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. Innate

lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. Science. 2015;348(6237):aaa6566.

39. Borger JG, Lau M, Hibbs ML. The Influence of Innate Lymphoid Cells and Unconventional T Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease. Front Immunol. 2019;10:1597.

40. Hams E, Armstrong ME, Barlow JL, Saunders SP, Schwartz C, Cooke G, et al. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(1):367-72.

41. Keller CA, Gonwa TA, Hodge DO, Hei DJ, Centanni JM, Zubair AC. Feasibility, Safety, and Tolerance of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Obstructive Chronic Lung Allograft Dysfunction. Stem Cells Transl Med. 2018;7(2):161-7.

42. Cardenes N, Alvarez D, Sellares J, Peng Y, Corey C, Wecht S, et al. Senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Stem Cell Res Ther. 2018;9(1):257.

43. Xie Q, Liu R, Jiang J, Peng J, Yang C, Zhang W, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? Stem Cell Res Ther. 2020;11(1):519.

44. Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, Samuel CS, Tchongue J, Ilancheran S, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells

reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury. Am J Pathol. 2009;175(1):303-13.

45. Moroncini G, Paolini C, Orlando F, Capelli C, Grieco A, Tonnini C, et al. Mesenchymal stromal cells from human umbilical cord prevent the development of lung fibrosis in immunocompetent mice. PLoS One. 2018;13(6):e0196048.

46. Bharti D, Shivakumar SB, Park JK, Ullah I, Subbarao RB, Park JS, et al. Comparative analysis of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells derived from different parts of the same umbilical cord. Cell Tissue Res. 2018;372(1):51-65.

47. Dabrowski FA, Burdzinska A, Kulesza A, Sladowska A, Zolocinska A, Gala K, et al. Comparison of the paracrine activity of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord, amniotic membrane and adipose tissue. J Obstet Gynaecol Res. 2017;43(11):1758-68.

48. Yao J, Zheng J, Cai J, Zeng K, Zhou C, Zhang J, et al. Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate rat hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and neutrophil inflammatory response. FASEB J. 2019;33(2):1695-710.

49. Ruan ZB, Chen GC, Zhang R, Zhu L. Circular RNA expression profiles during the differentiation of human umbilical cord-derived

mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. J Cell Physiol. 2019.

50. Bi ZM, Zhou QF, Geng Y, Zhang HM. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate experimental cirrhosis through activation of keratinocyte growth factor by suppressing microRNA-199. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(23):4905-12.

51. Liu X, Ren S, Qu X, Ge C, Cheng K, Zhao RC. Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cells differentiation via IFN-gamma-mediated SOCS3 activation. Immunol Res. 2015;61(3):219-29.

52. Sun X, Hao H, Han Q, Song X, Liu J, Dong L, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate insulin resistance by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in type 2 diabetes rats. Stem Cell Res Ther. 2017;8(1):241.

53. Zhao C, Zhang L, Kong W, Liang J, Xu X, Wu H, et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Cadherin-11 Expression by Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. J Immunol Res. 2015;2015:137695.

54. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. Stem Cell Res Ther. 2010;1(1):2.

55. Lu D, Xu Y, Liu Q, Zhang Q. Mesenchymal Stem Cell-

Macrophage Crosstalk and Maintenance of Inflammatory Microenvironment Homeostasis. Front Cell Dev Biol. 2021;9:681171.

56. Behnke J, Kremer S, Shahzad T, Chao CM, Bottcher-Friebertshauser E, Morty RE, et al. MSC Based Therapies-New Perspectives for the Injured Lung. J Clin Med. 2020;9(3).

57. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(14):8407-11.

58. Choi M, Ban T, Rhim T. Therapeutic use of stem cell transplantation for cell replacement or cytoprotective effect of microvesicle released from mesenchymal stem cell. Mol Cells. 2014;37(2):133-9.

59. Lee SH, Jang AS, Kim YE, Cha JY, Kim TH, Jung S, et al. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis. Respir Res. 2010;11:16.

60. Zhao F, Zhang YF, Liu YG, Zhou JJ, Li ZK, Wu CG, et al. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats. Transplant Proc. 2008;40(5):1700-5.

61. Tzouvelekis A, Paspaliaris V, Koliakos G, Ntolios P, Bouros E, Oikonomou A, et al. A prospective, non-randomized, no placebo-

controlled, phase Ib clinical trial to study the safety of the adipose derived stromal cells-stromal vascular fraction in idiopathic pulmonary fibrosis. J Transl Med. 2013;11:171.

62. Chambers DC, Enever D, Ilic N, Sparks L, Whitelaw K, Ayres J, et al. A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respirology. 2014;19(7):1013-8.

63. Glassberg MK, Minkiewicz J, Toonkel RL, Simonet ES, Rubio GA, DiFede D, et al. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cells in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis via Intravenous Delivery (AETHER): A Phase I Safety Clinical Trial. Chest. 2017;151(5):971-81.

64. Averyanov A, Koroleva I, Konoplyannikov M, Revkova V, Lesnyak V, Kalsin V, et al. First-in-human high-cumulative-dose stem cell therapy in idiopathic pulmonary fibrosis with rapid lung function decline. Stem Cells Transl Med. 2020;9(1):6-16.

65. Zeng SL, Cui J, Hu K, Nie HX, Zhang YT. Mesenchymal stem cells alleviate airway inflammation via modulation of T-helper 17/regulatory T cells balance in mice with ovalbumin-induced asthma. Chin Med J (Engl). 2021;134(17):2116-8.

66. Semitekolou M, Alissafi T, Aggelakopoulou M, Kourepini E, Kariyawasam HH, Kay AB, et al. Activin-A induces regulatory T

cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease. J Exp Med. 2009;206(8):1769-85.

67. Luo J, Zhang T, Zhu C, Sun J, Zhu W, Ai W, et al. Asiaticoside might attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by activating cAMP and Rap1 signalling pathway assisted by A2AR. J Cell Mol Med. 2020;24(14):8248-61.

68. Jeong EM, Shin JW, Lim J, Kim JH, Kang H, Yin Y, et al. Monitoring Glutathione Dynamics and Heterogeneity in Living Stem Cells. Int J Stem Cells. 2019;12(2):367-79.

69. Shin JW, Ryu S, Ham J, Jung K, Lee S, Chung DH, et al. Mesenchymal Stem Cells Suppress Severe Asthma by Directly Regulating Th2 Cells and Type 2 Innate Lymphoid Cells. Mol Cells. 2021;44(8):580-90.

70. Selman M, King TE, Pardo A, American Thoracic S, European Respiratory S, American College of Chest P. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med. 2001;134(2):136-51.

71. Desai O, Winkler J, Minasyan M, Herzog EL. The Role of Immune and Inflammatory Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Front Med (Lausanne). 2018;5:43.

72. Aran D, Looney AP, Liu L, Wu E, Fong V, Hsu A, et al. Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a

transitional profibrotic macrophage. Nat Immunol. 2019;20(2):163-72.

73. Joshi N, Watanabe S, Verma R, Jablonski RP, Chen CI, Cheresh P, et al. A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR signalling in monocyte-derived alveolar macrophages. Eur Respir J. 2020;55(1).

74. Moore BB, Paine R, 3rd, Christensen PJ, Moore TA, Sitterding S, Ngan R, et al. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. J Immunol. 2001;167(8):4368-77.

75. Gibbings SL, Goyal R, Desch AN, Leach SM, Prabagar M, Atif SM, et al. Transcriptome analysis highlights the conserved difference between embryonic and postnatal-derived alveolar macrophages. Blood. 2015;126(11):1357-66.

76. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. Cell. 2014;159(6):1312-26.

77. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. Nat Immunol. 2012;13(11):1118-28.

78. Arizmendi N, Puttagunta L, Chung KL, Davidson C, Rey-Parra

J, Chao DV, et al. Rac2 is involved in bleomycin-induced lung inflammation leading to pulmonary fibrosis. Respir Res. 2014;15:71.

79. Joshi S, Singh AR, Wong SS, Zulcic M, Jiang M, Pardo A, et al. Rac2 is required for alternative macrophage activation and bleomycin induced pulmonary fibrosis; a macrophage autonomous phenotype. PLoS One. 2017;12(8):e0182851.

80. Schupp JC, Binder H, Jager B, Cillis G, Zissel G, Muller-Quernheim J, et al. Macrophage activation in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One. 2015;10(1):e0116775.

81. Passalacqua G, Mincarini M, Colombo D, Troisi G, Ferrari M, Bagnasco D, et al. IL-13 and idiopathic pulmonary fibrosis: Possible links and new therapeutic strategies. Pulm Pharmacol Ther. 2017;45:95-100.

82. Segel MJ, Izbicki G, Cohen PY, Or R, Christensen TG, Wallach-Dayan SB, et al. Role of interferon-gamma in the evolution of murine bleomycin lung fibrosis. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2003;285(6):L1255-62.

83. Mehrotra P, Collett JA, Gunst SJ, Basile DP. Th17 cells contribute to pulmonary fibrosis and inflammation during chronic kidney disease progression after acute ischemia. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2018;314(2):R265-R73.

84. Lei L, Zhao C, Qin F, He ZY, Wang X, Zhong XN. Th17 cells

and IL-17 promote the skin and lung inflammation and fibrosis process in a bleomycin-induced murine model of systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol. 2016;34 Suppl 100(5):14-22.

85. Mi S, Li Z, Yang HZ, Liu H, Wang JP, Ma YG, et al. Blocking IL-17A promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis via TGF-beta1-dependent and -independent mechanisms. J Immunol. 2011;187(6):3003-14.

86. Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, Lanham AK, Diaz del Valle F, Born WK, et al. Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. J Immunol. 2009;182(1):657-65.

87. Chen Y, Li C, Weng D, Song L, Tang W, Dai W, et al. Neutralization of interleukin-17A delays progression of silica-induced lung inflammation and fibrosis in C57BL/6 mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2014;275(1):62-72.

88. Sikkeland LIB, Qiao SW, Ueland T, Myrdal O, Wyrozemski L, Aukrust P, et al. Lung CD4+ T-cells in patients with lung fibrosis produce pro-fibrotic interleukin-13 together with interferon-gamma. Eur Respir J. 2021;57(3).

89. Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Takagi T, Naito M, Matsushima Y, et al. Differential role of regulatory T cells in early and late stages of pulmonary fibrosis. Immunobiology.

2013;218(2):245-54.

90. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4(+)CD25(high)FOXP3(+) regulatory T cells. Stem Cells. 2008;26(1):212-22.

91. Ge W, Jiang JF, Arp J, Liu WH, Garcia B, Wang H. Regulatory T-Cell Generation and Kidney Allograft Tolerance Induced by Mesenchymal Stem Cells Associated With Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression. Transplantation. 2010;90(12):1312-20.

92. English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E-2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4(+)CD25(High)forkhead box P3(+) regulatory T cells. Clinical and Experimental Immunology. 2009;156(1):149-60.

93. Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, et al. Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. Lupus. 2010;19(3):317-22.

94. Lee JU, Chang HS, Lee HJ, Jung CA, Bae DJ, Song HJ, et al. Upregulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin levels in the lungs of idiopathic pulmonary fibrosis. BMC Pulm Med.

2017;17(1):39.

95. Nakatsuka Y, Yaku A, Handa T, Vandenbon A, Hikichi Y, Motomura Y, et al. Profibrotic function of pulmonary group 2 innate lymphoid cells is controlled by regnase-1. Eur Respir J. 2021;57(3).

96. Zhang Y, Tang J, Tian Z, van Velkinburgh JC, Song J, Wu Y, et al. Innate Lymphoid Cells: A Promising New Regulator in Fibrotic Diseases. Int Rev Immunol. 2016;35(5):399-414.

97. Lan YW, Theng SM, Huang TT, Choo KB, Chen CM, Kuo HP, et al. Oncostatin M-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Alleviate Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis Through Paracrine Effects of the Hepatocyte Growth Factor. Stem Cells Transl Med. 2017;6(3):1006-17.

98. Lan YW, Choo KB, Chen CM, Hung TH, Chen YB, Hsieh CH, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Stem Cell Res Ther. 2015;6:97.

99. Fan XL, Xu ZB, Li CL, Zhang HY, Peng YQ, He BX, et al. Mesenchymal stem cells regulate type 2 innate lymphoid cells via regulatory T cells through ICOS-ICOSL interaction. Stem Cells. 2021.

100. Yang S, Liu P, Jiang Y, Wang Z, Dai H, Wang C. Therapeutic Applications of Mesenchymal Stem Cells in Idiopathic Pulmonary

Fibrosis. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021;9.

101. Mansouri N, Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Reis M, Nassiri S, Mitsialis SA, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes prevent and revert experimental pulmonary fibrosis through modulation of monocyte phenotypes. JCI Insight. 2019;4(21).

102. Zakaria DM, Zahran NM, Arafa SAA, Mehanna RA, Abdel-Moneim RA. Histological and Physiological Studies of the Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Bleomycin Induced Lung Fibrosis in Adult Albino Rats. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2021;18(1):127-41.

103. Chu KA, Wang SY, Yeh CC, Fu TW, Fu YY, Ko TL, et al. Reversal of bleomycin-induced rat pulmonary fibrosis by a xenograft of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly. Theranostics. 2019;9(22):6646-64.

104. Lee JW, Chun W, Lee HJ, Min JH, Kim SM, Seo JY, et al. The Role of Macrophages in the Development of Acute and Chronic Inflammatory Lung Diseases. Cells. 2021;10(4).

105. Li DY, Li RF, Sun DX, Pu DD, Zhang YH. Mesenchymal stem cell therapy in pulmonary fibrosis: a meta-analysis of preclinical studies. Stem Cell Res Ther. 2021;12(1):461.

106. Chaleshtori SS, Dezfouli MRM, Fakhr MJ. Mesenchymal stem/stromal cells: the therapeutic effects in animal models of acute

pulmonary diseases. Resp Res. 2020;21(1).

107. Devaney J, Horie S, Masterson C, Elliman S, Barry F, O'Brien T, et al. Human mesenchymal stromal cells decrease the severity of acute lung injury induced by E. coli in the rat. Thorax. 2015;70(7):625-35.

108. Mokhber Dezfouli MR, Jabbari Fakhr M, Sadeghian Chaleshtori S, Dehghan MM, Vajhi A, Mokhtari R. Intrapulmonary autologous transplant of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improves lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in rabbit. Crit Care. 2018;22(1):353.

109. McIntyre LA, Moher D, Fergusson DA, Sullivan KJ, Mei SH, Lalu M, et al. Efficacy of Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Acute Lung Injury in Preclinical Animal Models: A Systematic Review. PLoS One. 2016;11(1):e0147170.

110. Tibboel J, Keijzer R, Reiss I, de Jongste JC, Post M. Intravenous and intratracheal mesenchymal stromal cell injection in a mouse model of pulmonary emphysema. COPD. 2014;11(3):310-8.

Abstract

Effect of mesenchymal stem cell treatment in bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Sun Mi Choi

Internal Medicine Major

Graduate School of Medicine

Seoul National University

Background Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a rare and progressive fibrotic lung disease without a cure. Although mesenchymal stem cells (MSCs) have been reported to ameliorate lung inflammation and fibrosis in animal models, studies on their mechanism of action are lacking. Therefore, we aimed to determine the change of various immune cells, especially macrophages and monocytes, involved in the effect of MSC treatment on pulmonary fibrosis.

Methods We collected and analyzed explanted lung tissue and blood from IPF patients who underwent lung transplantation. After establishing a pulmonary fibrosis model by intratracheal administration of bleomycin (BLM) to 8-week-old mice, MSCs derived from human umbilical cords were administered intravenously or intratracheally on the 10th day and lungs were immunologically analyzed on the 14th day. Flow cytometry was performed to analyze immune cell characteristics, and gene expression levels were

examined through quantitative reverse transcription-polymerase chain reactions.

Results In the histologic analysis of human explanted lung tissue, the fibrotic areas contained a larger number of macrophages and monocytes in comparison to the preserved area of the lungs. When human monocyte-derived macrophages (MoMs) were stimulated with interleukin (IL)-13 *in vitro*, expression of type 2 macrophage (M2) markers was more prominent in MoMs from the classical monocyte subsets than those from the intermediate or non-classical monocyte subsets, and MSCs suppressed M2 markers independent of MoM subsets. In the murine model, the number of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage fluid and the degree of lung fibrosis observed in BLM-treated mice were significantly reduced by MSC treatment. Both M1 and M2 MoMs were upregulated in the BLM-treated mice. M2c, a macrophage subset of M2 MoM, was significantly reduced by MSC treatment. In addition, increased $Ly6c^+$ MoMs observed in BLM-treated mice were significantly reduced by MSC treatment, and the intravenous administration of MSCs significantly decreased especially M2 $Ly6c^+$ MoMs.

Conclusions Inflammatory classical monocytes may play a role in the lung fibrosis of human IPF and BLM-induced pulmonary fibrosis. Intravenous administration of MSCs may ameliorate pulmonary fibrosis by inhibiting the differentiation of monocytes into M2 MoMs.

Keyword: pulmonary fibrosis; bleomycin; mesenchymal stem cell; macrophage; monocyte

Student Number: 2013-30573