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

의학석사 학위논문

담배 연기가 정상 기도면역계에 미치는 영향: 단핵구와 대식세포 중심으로

2023년 8월

서울대학교 대학원

의학과 중개의학 전공

김 유 진

담배 연기가 정상 기도면역계에 미치는 영향: 단핵구와 대식세포 중심으로

지도 교수 강 혜 련

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2023년 4월

서울대학교 대학원

의학과 중개의학 전공

김 유 진

김유진의 의학석사 학위논문을 인준함

2023년 6월

위 원 장 _____ 김세훈 _____ **(인)**

부위원장 _____ 강혜련 _____ **(인)**

위 원 _____ 김혜영 _____ **(인)**

초 록

담배 연기는 기도 내 염증 및 조직 개형을 유발하여 만성 폐 질환의 발병에 기여하는 위험 인자이다. 담배 연기는 다양한 성분으로 이루어져 있고 면역 체계에 미치는 영향 또한 광범위하기 때문에, 담배 연기가 폐 면역계에 미치는 기전은 매우 복잡하다. 폐 대식세포는 기도 내 항상성(homeostasis)을 조절하고 외부 항원으로부터 숙주를 보호하는 역할을 한다고 알려져 있으나, 담배 연기에 노출된 폐 대식세포는 이러한 기능들에 변화가 생겨 전 염증성(pro-inflammatory) 반응이 활성화됨으로써 만성 염증 질환에 기여할 수 있다. 이에 본 연구에서는 정상 상태에서 담배 연기에 노출되었을 때, 담배 연기가 단핵구와 폐 대식세포에 미치는 영향을 분석하여 담배 연기로 인해 유발되는 기도 내 염증 반응에서 이들의 역할을 규명하고자 하였다.

8주령의 C57BL/6 마우스에 담배 연기 추출물(cigarette smoke extract, CSE)을 주 3회 총 4주 동안 비강 내로 반복 투여하여 담배 연기 만성 노출 마우스 모델을 구축하였다. CSE 노출에 따른 기도 내 염증과 면역 세포의 변화를 확인하기 위해 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid)의 면역세포 분획을 평가하였고, 폐 조직을 수득하여 조직학적 분석, 유세포 분석 및 mRNA 발현 분석을 진행하였다. 대식세포의 유세포 분석은 조직 상주 폐포대식세포(tissue resident alveolar macrophage)의 표지자인 CD11c와 이동능과 관련된 CD11b 표지자의 발현 정도에 따라 $CD11c^{+}CD11b^{-}$ 폐포 대식세포(alveolar macrophage, AM), $CD11c^{+}CD11b^{+}$ 이행 대식세포(transitional macrophage, TM), $CD11c^{-}CD11b^{+}$ 단핵구 유래 대식세포(monocyte-derived macrophage, MoM)로 분류하였고, 각 아형에서 IL-13, IL-17A, ST2 표지자의 발현으로 세부 아형을 확인하였다. 또한 $CD11b^{+}$ 대식세포에서 CD206, CD86, CD11c 표지자의 발현으로 $CD206^{+}CD86^{-}CD11c^{-}$ M2 대식세포와 $CD206^{-}CD86^{+}CD11c^{+}$ M1 대식세포로 분류하였으며, M2 대식세포의 여러 세부 아형 중 $CD206^{+}CD86^{-}MHCII^{+}$

M2a, $CD206^{-}CD86^{+}MHCII^{+}$ M2b, $CD206^{+}CD86^{-}MHCII^{-}$ M2c의 변화를 확인하였다.

4주간의 CSE 장기 노출은 폐 면역세포 분포에 두드러진 변화를 일으키지는 않았으나, CSE 노출군에서 기도 내 호중구성 염증이 확인되었다. 대식세포 유세포 분석 결과, 대조군에 비하여 CSE 노출군에서 AM과 TM이 증가했으며 MoM은 두 그룹 간의 차이가 없었다. CSE 노출은 $CD11b^{+}$ 대식세포 내에서 M2 대식세포의 분화를 유도하였는데, 특히 조직 리모델링에 기여하는 M2c가 증가하였다. 또한 AM과 TM에서는 기도 염증과 섬유화를 유발하는 핵심적인 인자인 IL-13의 발현이 증가하는 것을 관찰하였다. 위와 같은 결과를 통해 CSE가 M2 대식세포 분극화를 유도하여 조직개형에 기여할 수 있음을 보여주었다. 흥미로운 점은 CSE 노출 시 AM, TM, 그리고 MoM의 모든 아형에서 호중구성 염증에 기여하는 것으로 잘 알려진 IL-17A의 발현이 공통적으로 확인되었다. 이는 CSE에 노출된 대식세포가 IL-17A를 분비하는 주된 공급원으로 작용할 수 있으며 CSE로 인해 유발되는 호중구성 염증 반응에 기여할 수 있음을 시사한다.

CSE 노출은 대식세포의 IL-33/ST2 신호전달에 영향을 주었다. CSE 노출은 폐 조직 내 *Il33* 발현을 증가시켰는데, 이와 함께 대식세포에서 IL-33의 수용체인 ST2 발현을 상향 조절하였다. 이 때 주목할 점은 $IL\text{-}17A^{+}$ 대식세포에서 ST2 발현이 유의하게 증가한 현상이 $IL\text{-}13^{+}$ 대식세포에서는 관찰되지 않았다는 것이다. 체외 실험을 통해 CSE에 노출된 대식세포가 IL-33 자극을 받으면, *ST2*를 비롯하여 *Tnfα*, *Il1b*, *Mcp1*, *Il6*, *Il23a*와 같은 전 염증성 사이토카인의 발현이 증가함을 확인하였다. 반면, CSE와 IL-33를 각각 단독으로 처리한 군에서는 이러한 유전자의 발현이 미미하거나 대조군과 비슷한 수준으로 나타났다. 이와 같은 결과는 담배 연기가 IL-33의 반응성을 조절하여 전 염증성 반응을 유도하는 것을 보여준다. 그 기전에 대해 명확하게 밝히지는 못하였지만, CSE 단독 노출군에서 *Myd88*, *Nf-κb* 유전자 발현이 증가함을 확인하였다.

이전 연구에 따르면, IL-33가 Myd88 의존성 톨유사수용체(toll-like receptor, TLR) 신호전달을 강화시키는 주요 인자임이 보고되었다. 따라서 담배 연기 노출 후 대식세포의 Myd88/NF-κB 신호전달경로가 활성화 됨과 동시에 폐 내에 증가한 IL-33가 함께 반응하면서 전 염증성 반응이 유도되었을 가능성이 있다. 또한 CSE 노출군에서 확인되는 IL-17A^{+} 대식세포가 IL-33/ST2 신호전달의 활성화로 인해 유도되는 전 염증성 대식세포와 연관이 있을 것으로 생각된다.

만성적인 담배 연기 노출은 Ly6c^{-}CD11b^{+} 대식세포의 폐 내 유입을 유도하였다. 마우스 단핵구는 Ly6c 표지자의 발현에 따라 Ly6c^{+} 전형 단핵구(classical monocyte), Ly6c^{-} 비전형 단핵구(non-classical monocyte)로 나뉘는데, 염증의 특성과 시기에 따라 관여하는 아형이 다르다. Ly6c^{-}CD11b^{+} 대식세포의 면역학적 역할을 확인하기 위해서, C57BL/6 마우스에서 수득한 Ly6c^{-} 단핵구를 정상 마우스의 꼬리 정맥으로 입양 전달(adoptive transfer)한 후, CSE를 연속으로 4회 처리하는 마우스 모델을 구축하여, PBS를 처리한 대조군과 비교하였다. Ly6c^{-} 단핵구 전달군은 대조군에 비해 호중구성 염증의 유의미한 증가를 나타내어, Ly6c^{-} 단핵구가 CSE 매개 호중구성 염증에 기여함을 시사하였다. 또한 폐 내로 유입된 Ly6c^{-} 단핵구가 IL-17A를 분비하는 전 염증성 대식세포로 분화되어 호중구성 염증을 유도하며, 동시에 조직 리모델링에 관여하는 IL-13을 분비하는 대식세포로 분화되어 염증 반응을 유발할 수 있음을 제안하였다.

마지막으로 담배 연기 노출이 Th17 면역 반응을 유도하는 것을 관찰하였다. 대식세포가 적응 면역계에도 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 담배 연기에 의해 활성화된 IL-33/ST2 매개 전 염증성 대식세포와 naïve CD4^{+} T 세포의 공배양 실험을 진행하였고, 대식세포에서 생산되는 *Tnfα, Il6, Il23a*와 같은 사이토카인들이 Th17 세포의 분화를 유도할 수 있음을 보여주었다. 이는 담배 연기에 의해 활성화된 대식세포가 폐 내 미세면역환경을 변화시켜 적응 면역계의

활성화를 일으키는 주요 요인이 될 수 있으며, 특히 Th17 면역 반응에 관여함을 시사한다.

본 연구는 담배 연기의 만성적인 노출에 의한 기도 염증반응에 선천 면역계 최일선인 단핵구와 대식세포가 기여함을 확인하였다. 특히 $Ly6c^-$ 단핵구와 IL-17A 발현을 특징으로 하는 IL-33/ST2 매개 전 염증성 대식세포가 적응 면역계의 변화를 야기함으로써 기도 내 호중구성 염증반응을 유발함을 보여주었다.

주요어: 담배 연기, 선천 면역계, 단핵구, 대식세포, IL-33/ST2 신호전달
학 번: 2021-23430

목 차

초록 i

목차 v

표 및 그림 목차 vi

제 1 장 서론 1

제 2 장 재료 및 방법 5

제 3 장 연구 결과 15

제 4 장 고찰 29

제 5 장 결론 39

참고문헌 **40**

Abstract 45

표 목차

[Table 1] **8**
[Table 2] **14**

그림 목차

[Figure 1] **5**
[Figure 2] **6**
[Figure 3] **9**
[Figure 4] **10**
[Figure 5] **11**
[Figure 6] **12**
[Figure 7] **13**
[Figure 8] **15**
[Figure 9] **16**
[Figure 10] **18**
[Figure 11] **20**
[Figure 12] **21**
[Figure 13] **23**
[Figure 14] **27**
[Figure 15] **39**

제 1 장 서 론

전 세계적인 높은 흡연율로 인해 담배 연기 노출에 의한 만성 폐질환의 증가는 사회적인 문제가 되었다. 담배 연기는 미립자로 구성되어 있으며 기체 형태로 폐의 깊숙한 곳까지 침투할 수 있기 때문에, 기도의 섬모에 의해 걸러지지 못하고 세기관지(bronchiole)와 폐포(alveoli)까지 도달하여 폐의 구조적 손상을 유도한다. 뿐만 아니라 담배 연기에 의해 야기되는 산화 스트레스 및 염증 매개체의 증가는 기도 내 염증 증가 및 조직 개형을 유발하여 만성 폐질환의 발생과 악화에 기여하고 전신 염증반응도 유발한다.[1,2] 이러한 담배 연기의 노출이 실제로 만성 폐질환의 발병 및 악화와 관련 있다는 여러 임상 결과들이 보고되었다.[3,4] 지금까지 담배 연기가 폐질환을 유발하는 기전을 면역학적으로 밝히기 위해 많은 시도가 있었지만, 담배 연기는 다양한 성분으로 이루어져 있고 또한 면역 체계에 미치는 영향이 광범위하다는 특성 때문에, 각 세포 별 세부적인 기전이 명확하게 밝혀져 있지 않으며, 특히 기저 질환이 없는 건강인의 폐의 선천 면역계에 어떤 손상을 일으키는지 상대적으로 덜 알려져 있다.

대식세포(macrophage)는 폐에서 가장 풍부한 면역세포로 호흡기 내로 유입된 미립자 및 항원에 대한 1차 방어선으로 작용하는 한편, 평상시 폐의 항상성(homeostasis)을 유지하는 핵심적인 역할을 한다.[5] 건강한 개체의 폐에는 두 가지 유형의 조직 상주 대식세포(tissue resident macrophage)가 있다. 첫째, 폐포 대식세포(alveolar macrophage, AM)는 기도 내강과 폐포의 경계면에 위치하여 외부에서 유입되는 항원을 처리할 뿐만 아니라 계면활성제 생산 및 사멸세포 처리 등의 기능을 통해 폐포 내 항상성 유지에 핵심적인 역할을 한다. 둘째, 간질 대식세포(interstitial macrophage, IM)는 폐 간질 내에 존재하며 항상성 조절 기능을 하는 것으로 알려져 있으나, 표현형과 기능에 대한 정보는 아직까지 제한적이다.[6] 이들 두 조직 상주 대식세포들은 자기복제(self-renewal)를 통해 개체군집(population)을 유지할 수 있으나, 노화가 진행되고, 염증

또는 감염이 반복될수록 골수에서 유래한 단핵구 유래 대식세포(monocyte-derived macrophage, MoM)로 대체되는 비율이 증가한다.[6,7]

단핵구는 골수에서 생성되는 백혈구(leukocyte)의 일종으로 대식세포와 수지상세포(dendritic cell, DC)로 분화하여 감염성 병원체에 대한 초기 방어를 담당하는 선천 면역 세포이다. 혈류를 타고 순환하던 단핵구는 염증이나 감염이 발생하면 해당 부위로 이동한 후 상황에 필요한 대식세포로 분화하여 문제를 해결하고 항상성을 회복하는데 기여한다.[8] 단핵구는 표현형과 기능에 따라서 세부 아형으로 구분한다. 인간에서는 CD14와 CD16 표지자의 발현에 따라 $CD14^{++}CD16^{-}$ 전형 단핵구(classical monocyte), $CD14^{+}CD16^{+}$ 중간형 단핵구(intermediate monocyte), $CD14^{+}CD16^{++}$ 비전형 단핵구(non-classical monocyte)의 세가지 아형으로 나누는 반면, 마우스에서는 Ly6C 표지자의 발현에 따라 $Ly6c^{+}$ 전형 단핵구와 $Ly6C^{-}$ 비전형 단핵구의 두 가지 아형으로 분류한다.[9,10]

혈류 단핵구의 80-90%는 전형 단핵구가 차지하며, 나머지는 비전형 단핵구가 차지한다. 전형 단핵구는 특징적으로 전 염증성 표현형을 가지고 있으며, 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)α, 인터루킨(interleukin, IL)1β와 같은 전 염증성 사이토카인들과 케모카인을 분비하여 면역 반응을 증폭시키는 작용을 한다. 또한 포식작용(phagocytosis) 기능이 활발하여 병원체, 이물질, 자극에 의해 손상된 세포와 그 잔해를 제거하는 작용을 담당하고, 항원을 T 림프구에 제시하여 적응 면역 반응 활성화에도 기여한다. 비전형 단핵구는 순찰 단핵구(patrolling monocyte)로 불리며, 폐 혈관 내막에 주로 위치하면서 진행성 염증, 감염, 조직 손상과 관련된 변화에 민감하게 반응함으로써 항상성 유지 및 회복에 관여한다. 비전형 단핵구는 염증을 확산하기 보다는 손상에 의한 잔해를 제거하고 조직 손상을 회복하는 데 기여한다.[9]

정상 상태에서는 단핵구의 폐내 유입이 활발하지 않으나, 혈관으로부터 유입된 전형 단핵구가 상주 대식세포를 일부 보충하는

것으로 알려져 있다.[11] 그러나 염증 상황에서는 염증의 특성 및 시기에 따라 전형 단핵구 뿐만 아니라 비전형 단핵구 또한 폐 내로 유입됨이 여러 질환 모델에서 보고된 바 있다.[12,13]

최근 단일 세포 RNA 시퀀싱 기술이 도입되면서, 대식세포의 이질성을 특성화 하는 연구들에서 MoM과 AM의 특징을 공유하는 이행 대식세포(transitional macrophage, TM)가 확인되었다. TM은 정상 상태에서는 항상성 기능을 하는 AM 발달의 중간 단계로 해석할 수 있지만, 병적인 상황에서는 염증 및 조직 개형에 관여하는 것으로 사료된다.[11,14]

대식세포는 외부 자극에 민감하게 반응하여 주변 면역 환경에 따라 여러 하위 아형으로 분극화(polarization)되고, 각 아형은 전 염증성 또는 항 염증성 사이토카인을 분비하여 각자 다른 방식으로 항상성 유지에 기여한다. 대식세포의 아형은 크게 M1 대식세포와 M2 대식세포로 대략적으로 나눌 수 있다. M1 대식세포는 TNFα나 IL-1β와 같은 전 염증성 사이토카인을 생성하며, M2 대식세포는 IL-10, 전환성장인자 베타(Transforming growth factor-beta, TGF-β)와 같은 항 염증성 사이토카인뿐만 아니라 IL-4, IL-13 같은 제 2형 면역 반응을 촉진하는 사이토카인도 분비한다.[15,16] 하지만 생체 내에서 대식세포의 아형은 단순하게 이분법적으로 구분되지 않고 스펙트럼 형태로 존재하기 때문에, 여러 병적 상황에서 대식세포의 역할을 명확하게 밝히는 것에 한계가 있다.

이처럼 기도 면역계는 정상 상태를 유지하기 위해 다양한 대식세포의 아형들이 각자의 위치에서 특정 기능을 하며 항상성을 유지한다. 정상 상태에서 AM은 외부 항원에 대해 과도하게 반응하여 신체에 해를 끼치지 않도록 강력한 억제 기전을 통해 저반응 상태(hypo-responsiveness)로 유지된다.[17] 그러나 담배 연기에 노출된 대식세포는 이러한 억제 기전이 감소되고 선천 면역 반응 활성화에 관여하는 패턴인식수용체(pattern recognition receptor, PRR)들이 상향 조절되어 전 염증성 반응이 유도된다.[18,19] 따라서 담배 연기는 대식세포를 조절하여

기도 면역계가 감염 및 염증 반응에 취약한 환경이 되도록 기여한다.[20-23] 담배 연기는 주로 Th17 면역 반응을 유도함으로써 호중구의 유입과 기도 내 염증을 유발하는 것으로 알려져 있다.[24] 담배 연기에 의한 Th17 세포와 IL-17의 과발현을 설명하기 위한 연구들이 진행되었으나, 아직 그 기전에 대해서 명확하게 설명되지 않았으며 특히 단핵구와 대식세포가 어떻게 관여하는지에 대해 상세하게 연구되어 있지 않다.[25,26]

본 연구는 담배 연기의 만성적인 노출이 폐 면역계에 미치는 영향을 확인하고, 특히 담배 연기에 의해 조절된 단핵구와 대식세포가 기도 내 염증반응에서 어떠한 역할을 하는지 규명하고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 담배 연기 추출물(cigarette smoke extract, CSE) 제작

Marlboro Red 상업용 담배를 사용하였다. 가변유동 연동펌프(Fisherbrand Variable-Flox Peristaltic Pumps, Shanghai, China)를 사용하여 필터를 제거한 담배를 1개비 당 6-8분 동안 연소시켰고, 담배 10개비를 phosphate-buffered saline (PBS) 10 mL에 녹인 뒤, 미세 여과 필터(0.75 μm)로 걸러서 CSE를 제작하였다**(Fig 1)**. 다음과 같은 방법으로 제작한 CSE 농도를 100 %로 정의하였다.

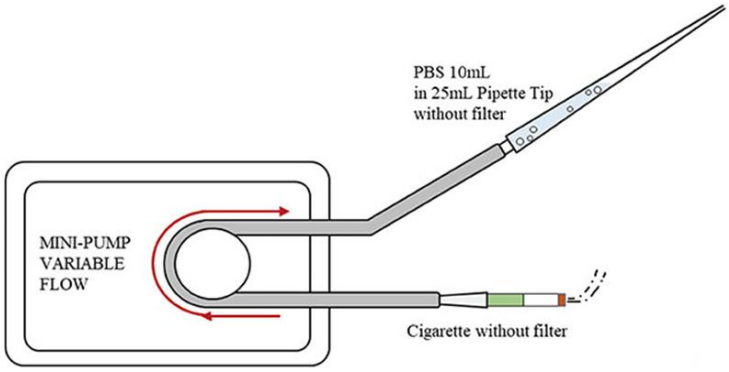


Figure 1. A schematic diagram of CSE preparation

The filter removed cigarette was burned for 6-8 minutes per cigarette using a variable-flow peristaltic pump. 10 cigarettes were dissolved in 10 mL of PBS. The solution was filtered by 0.75 μm strainer and stored in -80℃.

제 2 절 담배 연기 만성 노출 마우스 모델 제작

8주령 암컷 C57BL/6 마우스를 구입하여(Orient Bio Inc., Seongnam, Korea) 특정 병원체가 없는 환경(specific pathogen free)에서 실험을 진행하였다. 10% CSE를 주 3회, 총 4주 동안 비강 내로 투여하여 CSE 만성 노출 모델을 제작하였다**(Fig 2)**. 실험군은 PBS를 투여한 대조군, CSE 노출군으로 설정하였다. 각 군에 5마리 마우스를 사용하였고, 반복실험을 통하여 재현하였다. 모든 절차는 서울대학교

동물실험윤리위원회의 승인(SNU-IACUC No. SNU-220719-2-2) 하에 수행되었다.

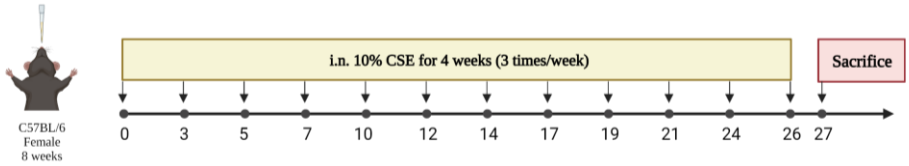


Figure 2. The protocol of the long-term effects of cigarette smoke in mice

C57BL/6 mice were exposed to 10% CSE intranasally three times per week for four weeks.

제 3 절 염증반응 분석

마우스의 기도를 통하여 PBS 0.9 mL을 주입한 후 다시 수득하는 과정을 2번 반복하여 총 1.8 mL의 기관지 폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 수득하였다. BALF를 4℃, 3,000 rpm으로 10분 간 원심 분리하여 세포 펠릿(pellet)을 분리했고, 100 μL PBS에 재부유하여 총 세포수를 측정하였다. 각각의 면역 세포 분포도를 확인하기 위하여 Cytospin (Shandon CytoSpin III, Shandon, UK)을 이용하여 1,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 세포를 슬라이드에 고정하였고, Diff-quick (Sysmex Co., Kobe, Japan)으로 세포를 염색하였다. 광학현미경으로 총 300개 이상의 세포를 세고 대식세포, 호중구, 호산구, 림프구의 분포를 확인하였다.

제 4 절 조직학적 분석

폐 조직의 병리학적 분석을 위해 폐의 좌엽을 4% paraformaldehyde에 24시간 동안 4℃에서 고정한 후 파라핀에 포매(embedding)하였다. 포매된 조직을 3 μm로 두께로 절단하여 헤마톡신 & 에오신(Hematoxylin & Eosin) 염색을 진행하였다. 포매 및 염색 과정은 서울대학교병원 의생명연구원 병리실험실에 의뢰하여 진행하였다.

제 5 절 유세포 분석

폐 조직을 면도칼로 잘게 절단한 후 콜라겐분해효소 유형4(collagenase type 4, Worthington, Lakewood, NJ, USA) 1 mg/mL을 포함한 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지(Biowest, Riverside, MO, USA)에 넣어 37℃에서 90분간 반응시켜주었으며, 분해된 폐 조직은 40 μM 무균 cell strainer로 여과하여 단일세포로 분리하였다. 적혈구 용해 용액을 처리하여 적혈구를 제거하였으며, 각 샘플 당 $1x10^6$개의 세포를 분주하여 유세포 분석을 진행하였다. 먼저 항체의 비특이적 결합을 차단하기 위하여 Fc receptor binding inhibitor antibody (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 4℃에서 5분간 처리한 후, 세포 표면 염색을 진행하였다. 세포 내 사이토카인 염색을 하기 위해서 ionomycin (1 μg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA), phorbol 12-myristate 13-acetate (100 ng/mL, Sigma), GolgiStop (1 μL/mL BD Biosciences)을 포함한 RPMI 1640 배지에 37℃에서 3시간 30분동안 배양하여 자극을 시킨 후 세포 표면 염색을 진행하였으며, Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences)을 이용하여 세포막 및 핵막 투과화를 진행한 후 세포 내 사이토카인의 염색을 진행하였다. 사용한 유세포 분석 항체(Biolegend, San Diego, CA, USA)는 **table 1**에 제시하였다. 유세포 분석은 LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences)와 FlowJO 10 (BD Biosciences)을 이용하여 진행하였다.

대식세포의 유세포 분석 게이팅 전략은 **Fig 3**에 제시하였다. 선천성림프구세포(innate lymphoid cell, ILC), 조력 T 세포(helper T cell, Th)의 유세포 분석 게이팅 전략은 **Fig 4**에 제시하였다.

Table 1. Antibodies for flow cytometry

Macrophage staining			
Name	**Fluorescence**		**Company**
CD45	BV650	BV650	Biolegend
F4/80	PE	FITC	
SiglecF	BV521	APC	
CD11c	BV711	PE-Cy7	
CD11b	BV785	BV785	
CD206	PE-Cy7		
CD86	FITC		
Ly6c	BV510		
MHCII(1-Ab)	APC		
IL-13		PE	
IL-17A		PerCP-Cy5.5	
ST2		BV421	

Regulatory T cell & $CD8^+$ T cell staining		
Name	**Fluorescence**	**Company**
CD45	BV650	Biolegend
CD3	FITC	
CD4	BV785	
CD8	PE	
CD25	BV421	
Foxp3	PerCP-Cy5.5	

ILC & $CD4^+$ T cell staining		
Name	**Fluorescence**	**Company**
CD45	BV650	Biolegend
Lineage	FITC	
CD90.2	PE-Cy7	
IL-5	APC	
IL-13	PE	
IL-17A	BV421	
IFN-γ	PerCP-Cy5.5	

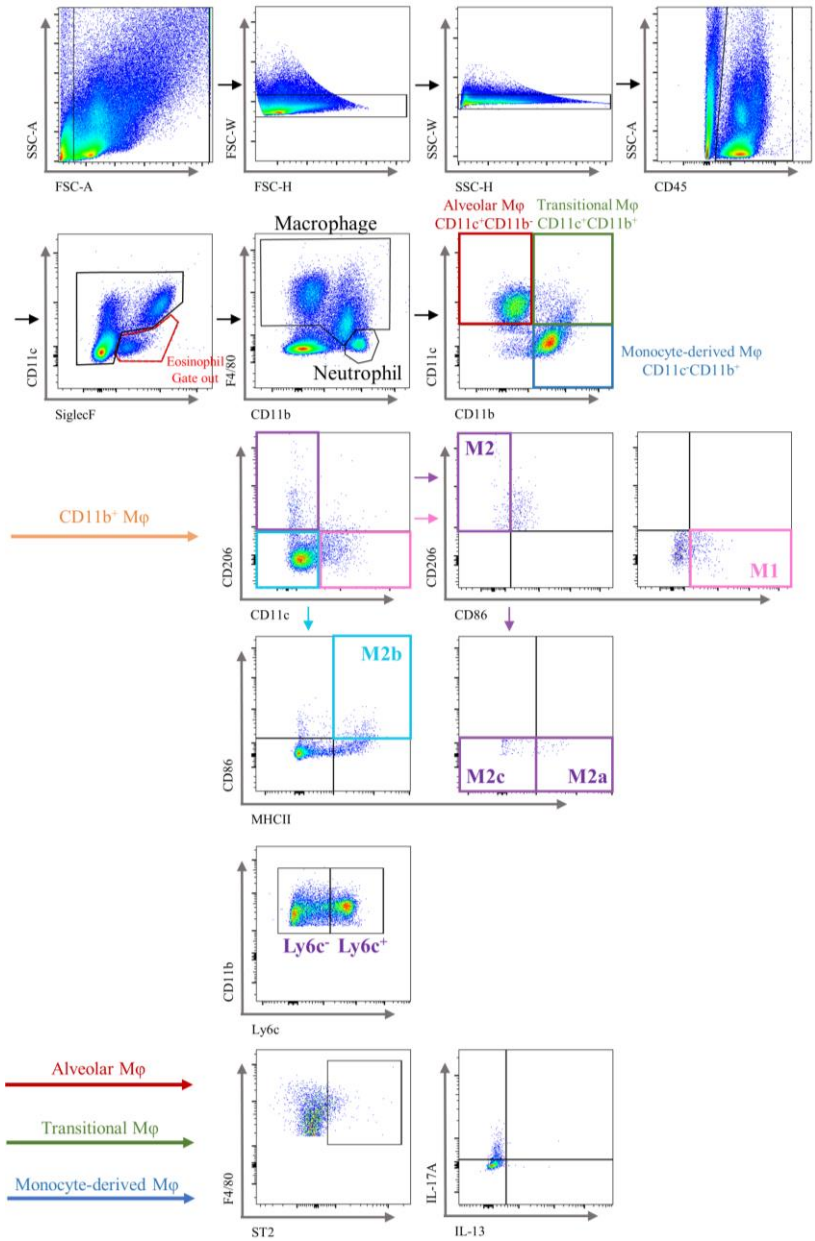


Figure 3. FACS gating strategy for macrophage populations

Leukocytes were gated from SSC-A versus FSC-A plot and CD45$^+$ cells. Following the exclusion of eosinophils from the CD11c versus SiglecF scatter plot, F4/80$^+$ cells were defined as total macrophages. Macrophages were further analyzed by dividing them based on the CD11c versus CD11b marker. CD11c$^+$CD11b$^-$, CD11c$^+$CD11b$^+$, and CD11c$^-$CD11b$^+$ macrophages were defined as alveolar macrophages, transitional macrophages, and monocyte-derived macrophages, respectively. M2 and M1 subtypes were further investigated within CD11b$^+$ macrophages. Ly6c$^+$ and Ly6c$^-$ macrophages within CD11b$^+$ macrophages were defined as classical and non-classical monocyte-derived macrophages. IL-17A, IL-13, and ST2-expressed macrophages were further investigated

within each subset of macrophages, categorized the CD11c versus CD11b marker. SSC, side scatter; FSC, forwarder scatter; IL, interleukin.

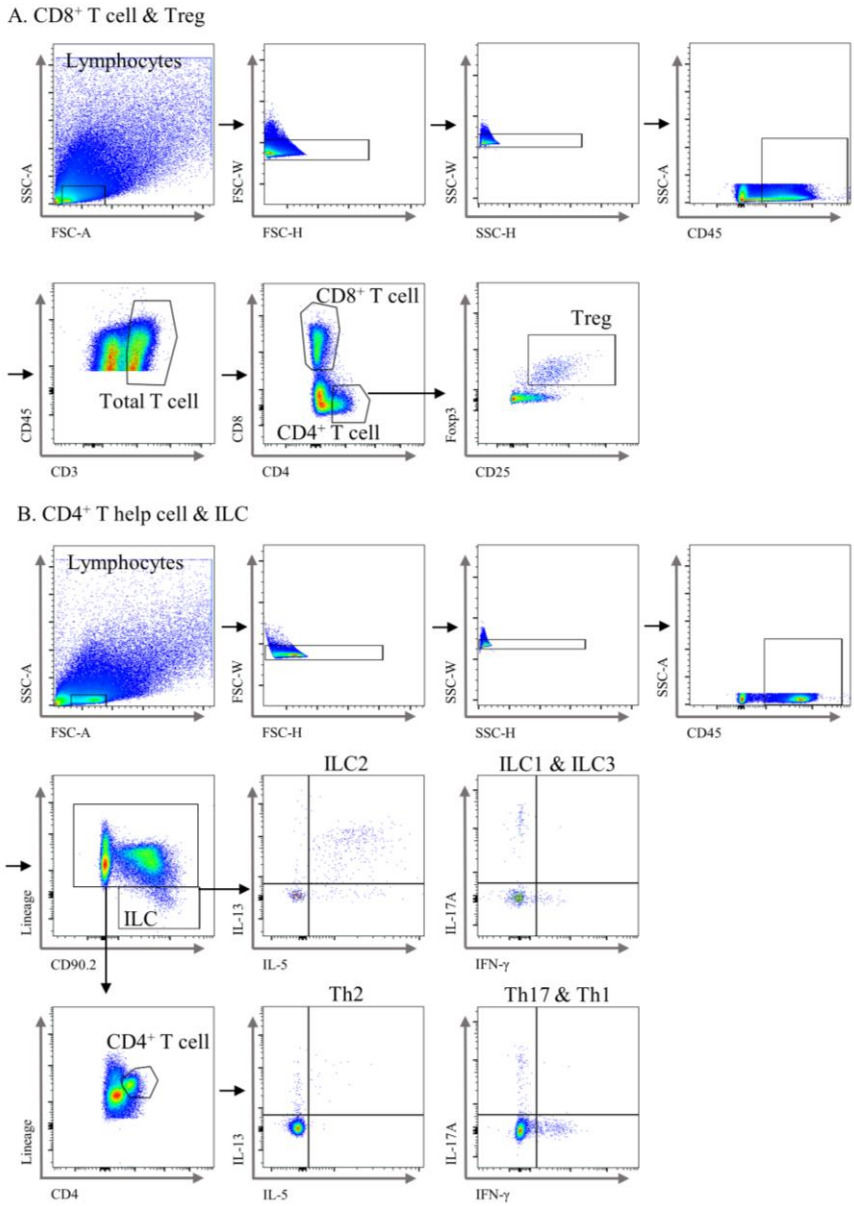


Figure 4. FACS gating strategy for T cells and ILCs

(A) Lymphocytes were gated from SSC-A versus FSC-A plot and $CD45^+$ cells. $CD3^+$ cells were defined as T cells. T cells were further divided into $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells. Tregs were defined as $Foxp3^+CD25^+$ cells within the $CD4^+$ cells (B) Lymphocytes were gated from the SSC-A versus FSC-A plot and $CD45^+$ cells. Then, ILCs were defined using lineage versus CD90.2 scatter plots. $CD4^+$ T cells were identified based on lineage versus $CD4^+$ T cell scatter plots. The subtypes of $CD4^+$ T cells and ILCs were determined by IL-5, IL-13, IL-17, and IFN-γ. SSC, side scatter; FSC, forwarder scatter; ILC, innate lymphoid cell; Treg; regulatory T cell; IL, interleukin; IFN, interferon.

제 6 절 세포 배양

CSE가 폐포 대식세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 마우스 유래 폐포 대식세포 세포주인 CRL-2019 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 이용하여 실험을 진행하였다. 24 well plate에 $5x10^4$ cell/well 조건으로 배양하였고, 10% 소태아혈청(Biowest)과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 배양 시작 후 2시간 뒤 0.2% CSE를 처리하였고, 48시간 후 20 ng/mL 농도의 IL-33 재조합 단백질(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)을 포함한 배지로 교체하여 24시간을 추가로 배양하였다**(Fig 5)**.

Figure 5. The *in vitro* and *ex vivo* protocol to identify the IL-33 response by CSE pre-exposure

The *in vitro* protocol using CRL-2019 cell line, or the *ex vivo* protocol using $CD11c^+$ macrophages isolated from the lung tissue of C57BL/6 mice. The cells were treated with 0.2% CSE media and cultured for 48 hours, and then replaced with medium containing IL-33 recombinant protein (20 ng/mL) and cultured for additional 24 hours.

제 7 절 Ly6c$^-$ 단핵구 입양 전달

C57BL/6 마우스의 골수에서 골수세포를 수득하였고, MojoSort™ Mouse Monocyte Isolation Kit (Biolegend)와 MojoSort™ Mouse Ly6c separation Kit (Biolegend)을 이용하여 Ly6c$^-$ 단핵구를 분리하였다. 1x10^5 Ly6c$^-$ 단핵구를 마우스의 꼬리 정맥으로 입양 전달한 후 4일 연속으로 10% CSE를 마우스의 비강내로 노출시키고, 2일 후 희생하여 샘플을 수득하였다**(Fig 6)**. 대조군은 꼬리 정맥 내로 PBS를 처리하고 동일하게 CSE에 노출시켰다.

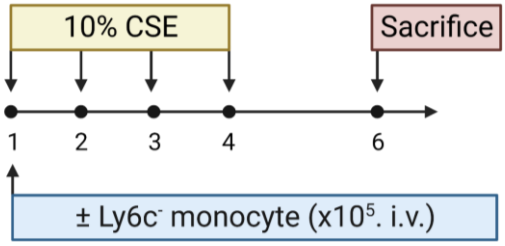


Figure 6. The adoptive transfer of Ly6c$^-$ monocyte protocol

For Ly6c$^-$ monocyte isolation, monocytes were isolated from C57BL/6 mouse bone marrow cells and separated using Ly6c separation kit. Ly6c$^-$ monocytes were adoptively transferred into mice via tail vein and 10% CSE exposed for 4 consecutive days.

제 8 절 Primary cell 분리 및 배양

8주령 암컷 C57BL/6 마우스의 폐 조직에서 단일 세포를 분리한 다음, MojoSort™ Mouse CD11c Nanobeads (Biolegend)를 이용하여 CD11c$^+$ 세포를 분리하였다. 플라스틱 표면부착법으로 대식세포를 분리하기 위해서 100 pi cell culture dish (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)을 이용하여 37℃에서 2 시간 동안 배양한 후, 상층액은 제거하고 피펫팅으로 바닥에 붙은 CD11c$^+$ 대식세포를 수득하였다. 24 well plate에 2x10^5 cell/well 조건으로 배양하였고, 10% 소태아혈청과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 배양 시작 후 2시간 뒤 0.5% CSE를 처리하였고, 48시간 후 20 ng/mL 농도의 IL-33 재조합 단백질(R&D systems)을 포함한 배지로 교체하여 24시간을 추가로 배양하였다.

CSE 노출에 의해 활성화된 대식세포와 조력 T 세포 간의 누화를 확인하고자 공배양 실험을 진행하였다. 8주령 암컷 C57BL/6 마우스의 비장 조직을 으깨어 40 μM 무균 cell strainer로 여과 후 비장 세포로 분리하였다. 적혈구 용해 용액(sigma)을 처리하여 적혈구를 제거하였으며, MojoSort™ Mouse CD4 Nanobeads (Biolegend)를 이용하여 naïve $CD4^+$ T 세포를 분리하였다. 분리한 $CD4^+$ T 세포는 37℃에서 하루 안정화시킨 후 CSE와 IL-33 자극을 준 대식세포와 1:1 비율로 24 시간 동안 공배양 하였고, 세포를 수확하여 FACS 분석을 진행하였다**(Fig 7)**.

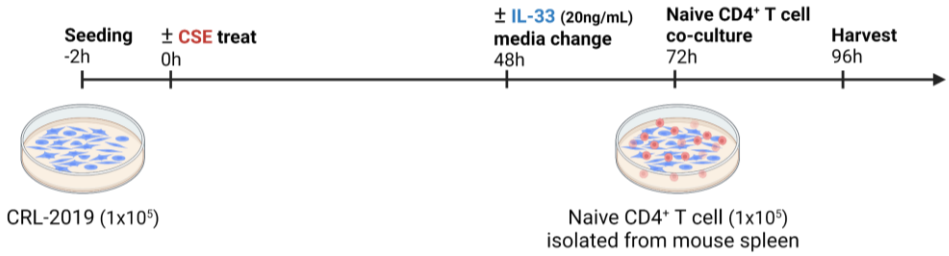


Figure 7. The macrophage and naïve $CD4^+$ T cells co-culture

CRL-2019 cell line was treated with 0.2% CSE media and cultured for 48 hours, and then replaced with a medium containing IL-33 recombinant protein (20 ng/mL) and cultured for an additional 24 hours. Naïve $CD4^+$ T cells were isolated from mouse spleen. Co-culture of naïve $CD4^+$ T cells with the CRL-2019 cell line stimulated with CSE or/and IL-33 for 24 hours.

제 9 절 RNA 추출 및 실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative real-time PCR, RT-qPCR)

Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 세포 및 조직의 RNA를 추출하였고, 역전사효소(SensiMix II probe kit, Bioline, London, UK)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. SYBR green reagents (Bioline)를 사용하여 RT-qPCR을 진행하였고, *Hprt1*을 사용하여 상대적인 유전자 발현량을 비교하였다. 사용한 primer는 **table 2**에 제시하였다.

Table 2. Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Primer sequence
Hprt1	Forward primer: 5′-CTG GTG AAA AGG ACC TCT CGA AG-3′ Reverse primer: 5′-CCA GTT TCA CTA ATG ACA CAA ACG-3′
Il33	Forward primer: 5′- CTA CTG CAT GAG ACT CCG TTC TG-3′ Reverse primer: 5′- AGA ATC CCG TGG ATA GGC AGA G-3′
St2	Forward primer: 5′-TGT ATT TGA CAG TTA CGG AGG GC-3′ Reverse primer: 5′-ACT TCA GAC GAT CTC TTG AGA CA-3′
Tnfa	Forward primer: 5′- GTG GAA CTG GCA GAA GAG-3′ Reverse primer: 5′-CCA TAG AAC TGA TGA GAG G-3′
Il1b	Forward primer: 5′-GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T-3′ Reverse primer: 5′-ATC TTT TGG GGT CCG TCA ACT-3′
Mcp1	Forward primer: 5′-TGA TCC CAA TGA GTA GGC TGG AG-3′ Reverse primer: 5′-ATG TCT GGA CCC ATT CCT TCT TG-3′
Myd88	Forward primer: 5′-AAG TAC AAG CCA ATG AAG AAA GAG-3′ Reverse primer: 5′-GAG GCG AGT CCA GAA CCA G-3′
Nfκb	Forward primer: 5′-ATA CGT CGG CCG TGT CTA T-3′ Reverse primer: 5′-GGA ACT GTG ATC CGT GTA G-3′
cjun	Forward primer: 5′-AGA GCG GTG CCT ACG GCT ACA GTA A -3′ Reverse primer: 5′-CGA CGT GAG AAG GTC CGA GTT CTT G-3′
cfos	Forward primer: 5′-ATG GGC TCG CCT GTC AAC GC-3′ Reverse primer: 5′-GGA GAT AAC TGT TCC ACC TTG CCC C-3′
Il6	Forward primer: 5′-GAT GGA TGC TAC CAA ACT GGA-3′ Reverse primer: 5′-TCT GAA GGA CTC TGG CTT TG-3′
Il23a	Forward primer: 5′-TCC GTT CCA AGA TCC TTC G-3′ Reverse primer: 5′-GAA CCT GGG CAT CCT TAA GC-3′

제 10 절 통계적 분석

모든 데이터는 평균값과 표준오차(mean ± standard error of the mean)로 표시하였으며, Mann-Whitney U test 검정 또는 One-way ANOVA 검정 후 Tukey’s test로 사후 분석을 진행하여 P값을 확인하였다. 통계적 분석은 GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, USA) 소프트웨어를 사용하였다.

제 3 장 연구 결과

제 1 절 담배 연기가 기도 염증반응에 미치는 영향

BALF 내 총 면역세포 수는 그룹 간에 차이가 없었으나, CSE 노출군에서 호중구가 증가하였다**(Fig 8A)**. 폐 조직을 헤마톡신 & 에오신 염색하여 조직학적 분석을 진행한 결과, 기도 주변으로 호중구의 침윤이 관찰되었다**(Fig 8B)**. 유세포 분석을 통해 확인한 폐 호중구와 호산구는 두 그룹 간에 차이가 없었고, 림프구가 통계적으로 유의하게 증가하였다**(Fig 8C, D)**.

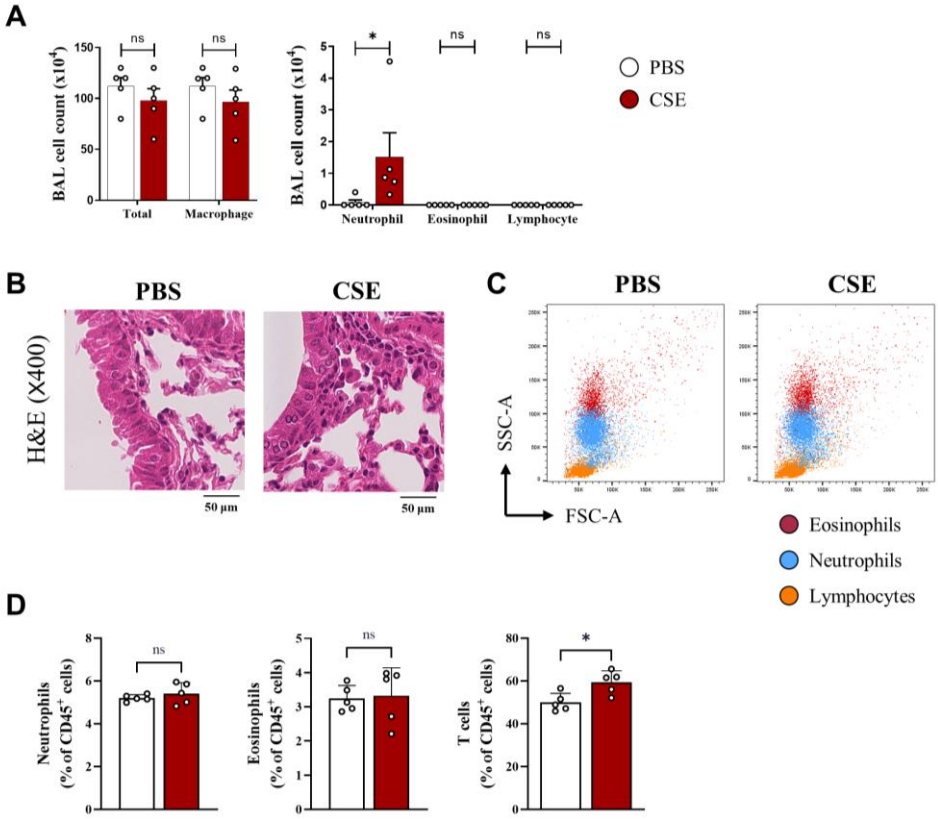
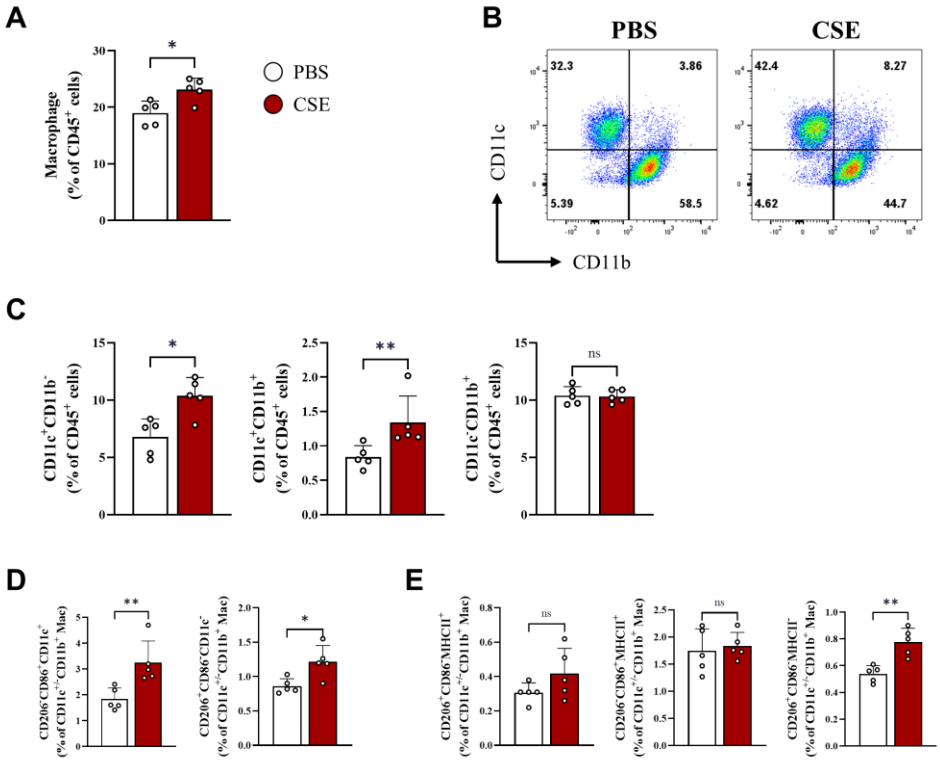


Figure 8. Effects of cigarette smoke on airway inflammatory response

(A) The number of inflammatory cells in BALF, including macrophages, neutrophils, eosinophils, and lymphocytes. (B) H&E staining (400×) for lung histology. (C) Eosinophils, neutrophils, and lymphocytes were identified in the lung tissue using flow cytometry parameter FSC/SSC. (D) The percentages of neutrophils, eosinophils and lymphocytes in lung tissue assessed by flow cytometry. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; H&E, hematoxylin and eosin. Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney *U* test. *$p < 0.05$.

제 2 절 담배 연기가 대식세포에 미치는 영향

대조군에 비하여 CSE 노출군에서 폐로의 대식세포 유입이 증가하였다**(Fig 9A)**. CSE 노출 시 $CD11c^{+}CD11b^{-}$ AM과 $CD11c^{+}CD11b^{+}$ TM이 유의하게 증가하였고, $CD11c^{-}CD11b^{+}$ MoM은 그룹 간의 차이가 없었다**(Fig 9B, C)**. $CD11b^{+}$ 대식세포의 하위 아형에서 CSE 노출에 따른 $CD206^{-}CD86^{+}CD11c^{+}$ M1 대식세포와 $CD206^{+}CD86^{-}CD11c^{-}$ M2 대식세포의 증가가 확인되었다**(Fig 9D)**. M2 대식세포의 하위 아형 중에서 $CD206^{+}CD86^{-}MHCII^{+}$ M2a와 $CD206^{-}CD86^{+}MHCII^{+}$ M2b 대식세포는 그룹 간의 차이가 없었으나, $CD206^{+}CD86^{-}MHCII^{-}$ M2c 대식세포가 증가하였다**(Fig 9E)**. IL-13^{+} 대식세포는 AM과 TM 아형 특이적으로 CSE 노출군에서 증가하였고, IL-$17A^{+}$ 대식세포는 CSE 노출에 따라 AM, TM, MoM 모든 아형에서 증가하였다**(Fig 9F, G)**.



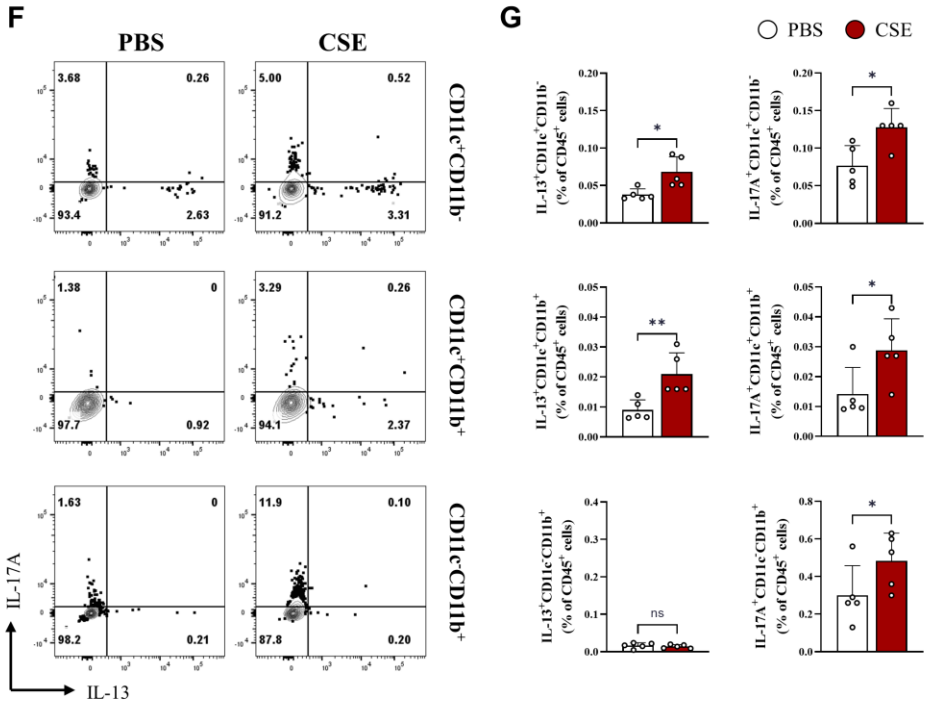


Figure 9. Effects of cigarette smoke on lung macrophages

(A) The percentages of total macrophages in the lung. (B) Representative flow cytometry plots gating macrophages subtypes; $CD11c^{+}CD11b^{-}$ (resident alveolar macrophage, AM), $CD11c^{+}CD11b^{+}$ (transitional macrophage, TM) and $CD11c^{-}CD11b^{+}$ (monocyte-derived macrophage, MoM). (C) The percentages of AM, TM, and MoM. (D) The percentages of $CD206^{-}CD86^{+}CD11c^{+}$ M1 macrophage and $CD206^{+}CD86^{-}CD11c^{-}$ M2 macrophage in $CD11b^{+}$ macrophages. (E) The percentages of $CD206^{+}CD86^{-}MHCII^{+}$ M2a, $CD206^{-}CD86^{+}MHCII^{+}$ M2b, and $CD206^{+}CD86^{-}MHCII^{-}$ M2c macrophage in $CD11b^{+}$ macrophages. (F) Representative flow cytometry plots gating IL-13^{+} or Il-$17A^{+}$ population in AM, TM, and MoM, respectively. (G) The percentages of IL-13^{+} or Il-$17A^{+}$ macrophages in AM, TM, and MoM, respectively. Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney *U* test. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$.

제 3 절 담배 연기에 의한 IL-33/ST2 신호전달의 활성화

대조군과 비교하여 CSE 노출군의 폐 조직에서 *Il33* 발현이 통계적으로 유의하게 증가하였다**(Fig 10A)**. CSE 노출은 AM, TM, MoM으로 분류한 대식세포의 각각의 아형에서 ST2 발현을 증가시켰다**(Fig 10B, C)**.

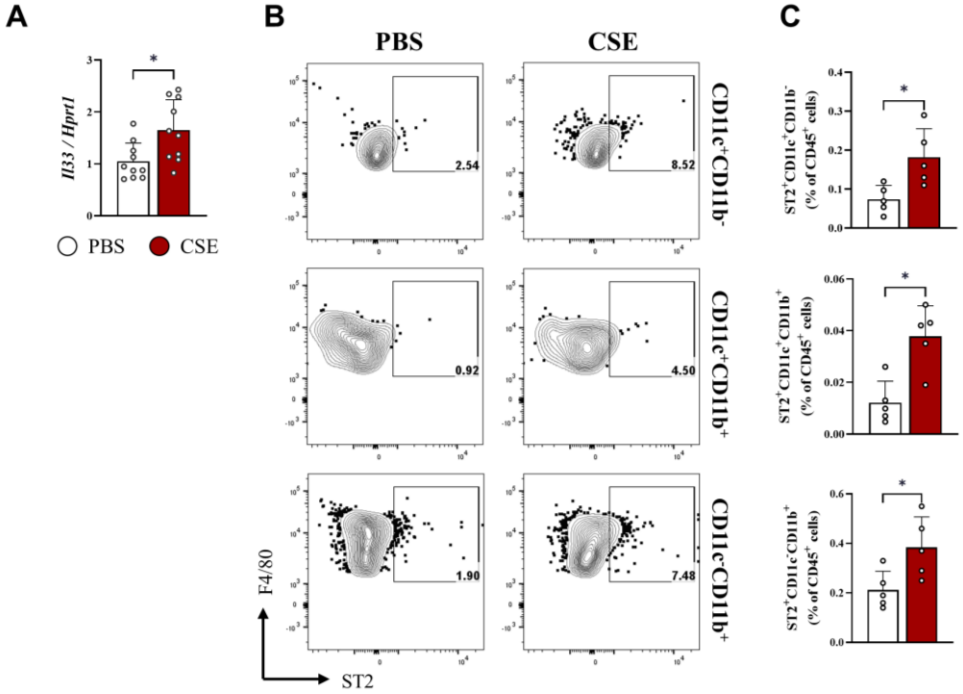


Figure 10. IL-33/ST2 signaling in lung macrophages induced by cigarette smoke

(A) *Il33* gene expression in the lung. (B) Representative flow cytometry plots gating $ST2^+$ population in AM, TM, and MoM, respectively. (C) The percentages of $ST2^+$ macrophages in AM, TM, and MoM, respectively. *Il*, interleukin. Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney *U* test. *$p < 0.05$.

제 4 절 담배 연기 노출 후 IL-17A$^+$ 대식세포 특이적 ST2 발현의 증가

CSE 노출 후 증가한 IL-13$^+$ 대식세포와 IL-17A$^+$ 대식세포가 폐 대식세포의 IL-33/ST2 신호전달의 활성화와 연관이 있는지 확인하기 위해서 IL-13$^+$ 또는 IL-17A$^+$ 대식세포에서 ST2의 발현을 확인하였다. IL-13$^+$ 대식세포는 대조군과 CSE 노출군 모두 ST2를 거의 발현하지 않았다**(Fig 11A, B)**. 그에 반하여 IL-17A$^+$ 대식세포는 대조군에 비하여 CSE 노출군에서 ST2 발현이 유의하게 증가하였다**(Fig 11C, D)**.

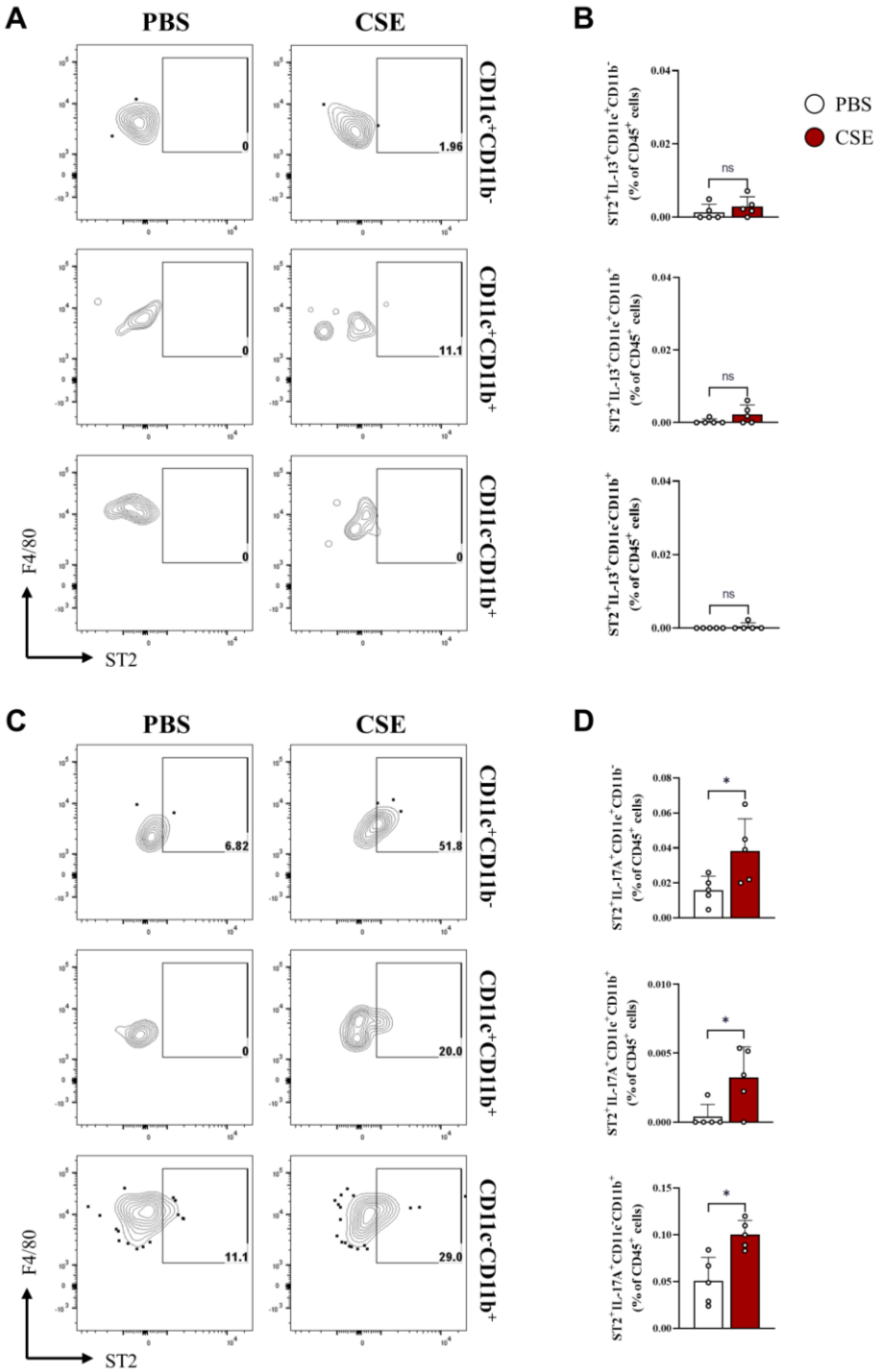


Figure 11. Increased IL-17A$^+$ macrophage-specific ST2 expression after exposure to cigarette smoke

Representative flow cytometry plots gating (A) and percentages (B) of ST2$^+$ population in IL-13$^+$ macrophages. Representative flow cytometry plots gating (C) and percentages (D) of ST2$^+$ population in IL-17A$^+$ macrophages. Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney *U* test. *$p < 0.05$.

제 5 절 담배 연기 노출 후 대식세포의 IL-33/ST2 매개 전 염증성 반응의 활성화

CSE 노출이 폐 대식세포의 IL-33/ST2 신호전달에 미치는 영향을 확인하고자, CRL-2019에 CSE를 사전 노출시키고 IL-33 반응성을 확인하였다. CSE 사전 노출 후 IL-33을 처리한 그룹은 IL-33 단독군과 비교하여 *St2* 유전자와 전 염증성 인자인 *Tnfa*, *Il1b*, *Mcp1* 유전자 발현이 상향조절 되었다**(Fig 12A)**. CSE 단독 노출은 *Myd88*, *Nfκb* 발현을 상향 조절시켰다. 반면 MAP 키나아제 경로의 주요 전사인자인 *cfos* 발현은 대조군과 비교하여 CSE 노출 후 감소하였으며, *cjun*은 그룹 간에 차이가 없었다**(Fig 12B)**. 폐 조직 내 CD11c^{+} 대식세포를 이용한 생체 외 실험에서도 마찬가지로 CSE 사전 노출 후 IL-33을 처리한 그룹은 IL-33 단독군과 비교하여 전 염증성 인자인 *Tnfa*, *Il6*, *Il23a* 유전자 발현이 상향조절 되었다. 반면, CSE와 IL-33을 각각 단독으로 처리한 그룹에서는 대조군과 유사한 정도의 유전자 발현을 보였다**(Fig 12C)**.

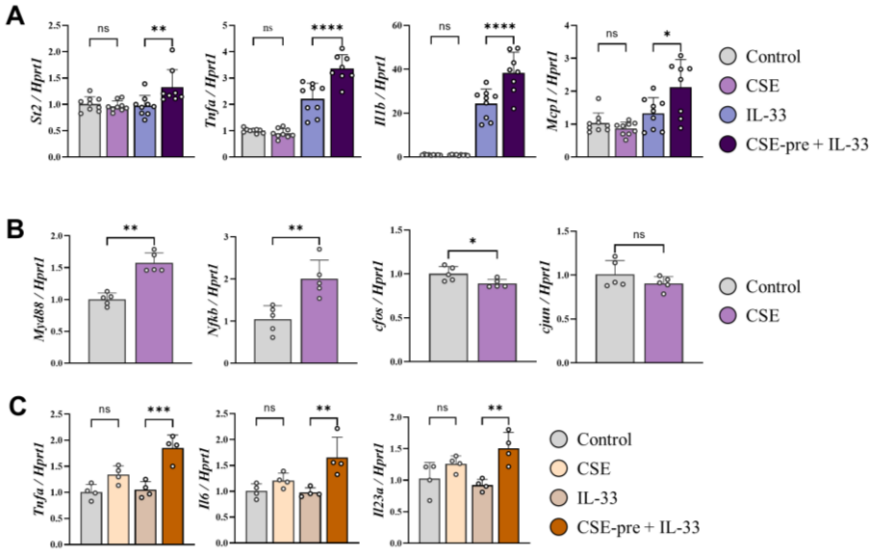


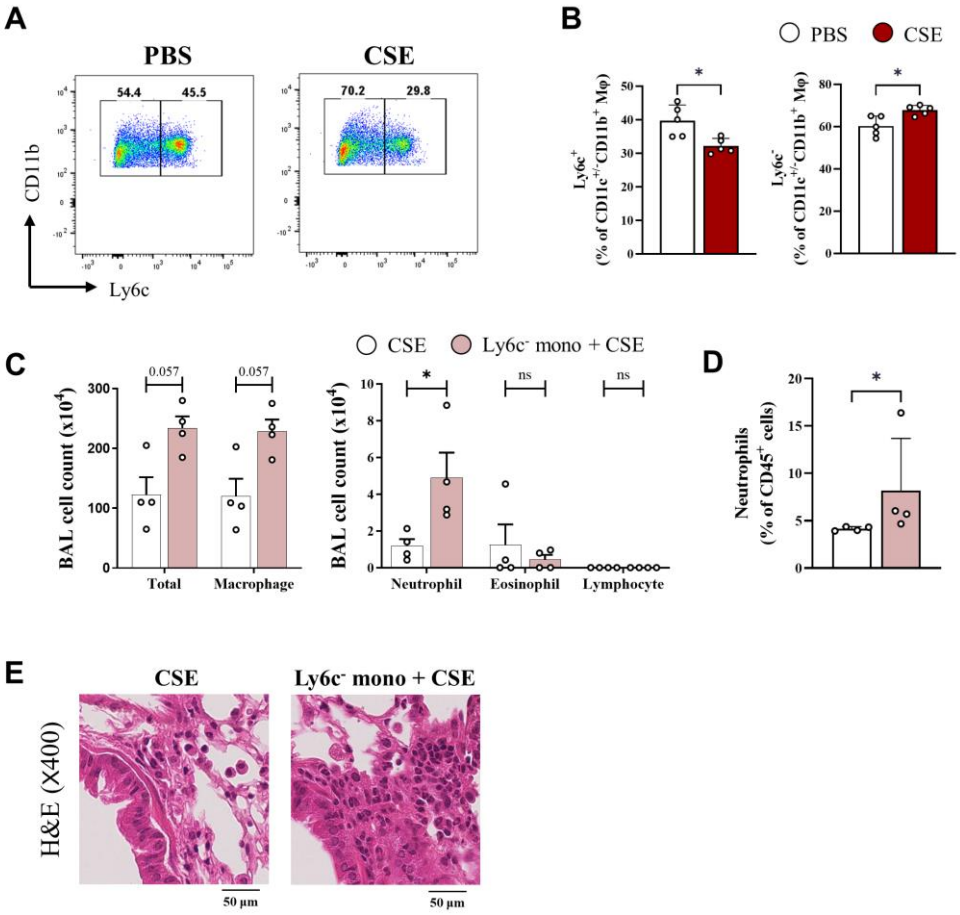
Figure 12. Cigarette smoke enhanced IL-33/ST2 signaling-mediated pro-inflammatory response in lung macrophages.

(A) *St2*, *Tnfa*, *Il1b*, and *Mcp1* gene expression of CRL-2019 in each group. (B) *Myd88*, *Nfκb*, *cfos*, and *cjun* gene expression of CRL-2019 in each group. (C) *Tnfa*, *Il6*, and *Il23a* gene expression of CD11c^{+} macrophages in each group. *Il*, interleukin. Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney *U* test, and one-way ANOVA followed by Tukey's test as a post-hoc test. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

제 6 절 담배 연기에 의한 Ly6c$^-$CD11b$^+$ 대식세포의 유입에 따른 폐 염증반응 항진과 폐 대식세포의 세부 아형 분석

대조군과 비교하여 CSE 노출군에서 Ly6c$^+$CD11b$^+$ 대식세포의 폐 내 유입이 감소하는 것이 관찰되었는데, 이와 반대로 Ly6c$^-$CD11b$^+$ 대식세포의 유입은 증가하였다**(Fig 13A, B)**. CSE 염증 기전 시 유입되는 Ly6c$^-$CD11b$^+$ 대식세포가 폐 염증반응에 미치는 역할을 확인하고자, Ly6c$^-$ 단핵구의 입양 전달 후 CSE를 노출시키는 마우스 모델을 제작하였다. Ly6c$^-$ 단핵구 전달 군에서 BALF 내 총 세포수가 증가하는 경향을 보였으며, 그 중에서도 대식세포 유입이 상당 부분을 차지하였다. 특히 Ly6c$^-$ 단핵구 전달군은 호중구성 염증이 우세한 특징을 보였다**(Fig 13C)**. 폐 조직 유세포 분석과 조직학적 분석 결과에서도 호중구의 침윤이 관찰되었다**(Fig 13D, E)**.

Ly6c$^-$ 단핵구의 입양전달에 따른 대식세포의 세부 아형의 변화를 확인하였다. 대조군과 비교하여 Ly6c$^-$ 단핵구 전달군에서 Ly6c$^+$CD11b$^+$ 대식세포의 유입이 감소하고, Ly6$^-$CD11b$^+$ 대식세포의 유입이 증가하는 것이 관찰되었다**(Figure 13F, G)**. AM은 Ly6c$^-$ 단핵구 전달군에서 유의하게 증가하였고, TM과 MoM은 그룹 간의 차이가 없었다**(Figure 13H)**. 이어서 각 세부 아형에서의 IL-13, IL-17A, ST2의 발현을 비교하였다. 이들의 발현은 대조군과 비교하여 Ly6c$^-$ 단핵구 전달군의 AM과 TM 대식세포에서 유의하게 증가하였으며, MoM 대식세포에서는 그룹 간에 차이가 없었다**(Figure 13I-K)**.


A
PBS
CSE
54.4
45.5
70.2
29.8
CD11b
Ly6c
B
PBS
CSE
Ly6c+ (% of CD11c+/+CD11b+ Mφ)
Ly6c- (% of CD11c+/+CD11b+ Mφ)
C
CSE
Ly6c- mono + CSE
0.057
0.057
BAL cell count (x10^4)
Total
Macrophage
ns
ns
Neutrophil
Eosinophil
Lymphocyte
D
Neutrophils (% of CD45+ cells)
E
CSE
Ly6c- mono + CSE
H&E (X400)
50 μm
50 μm

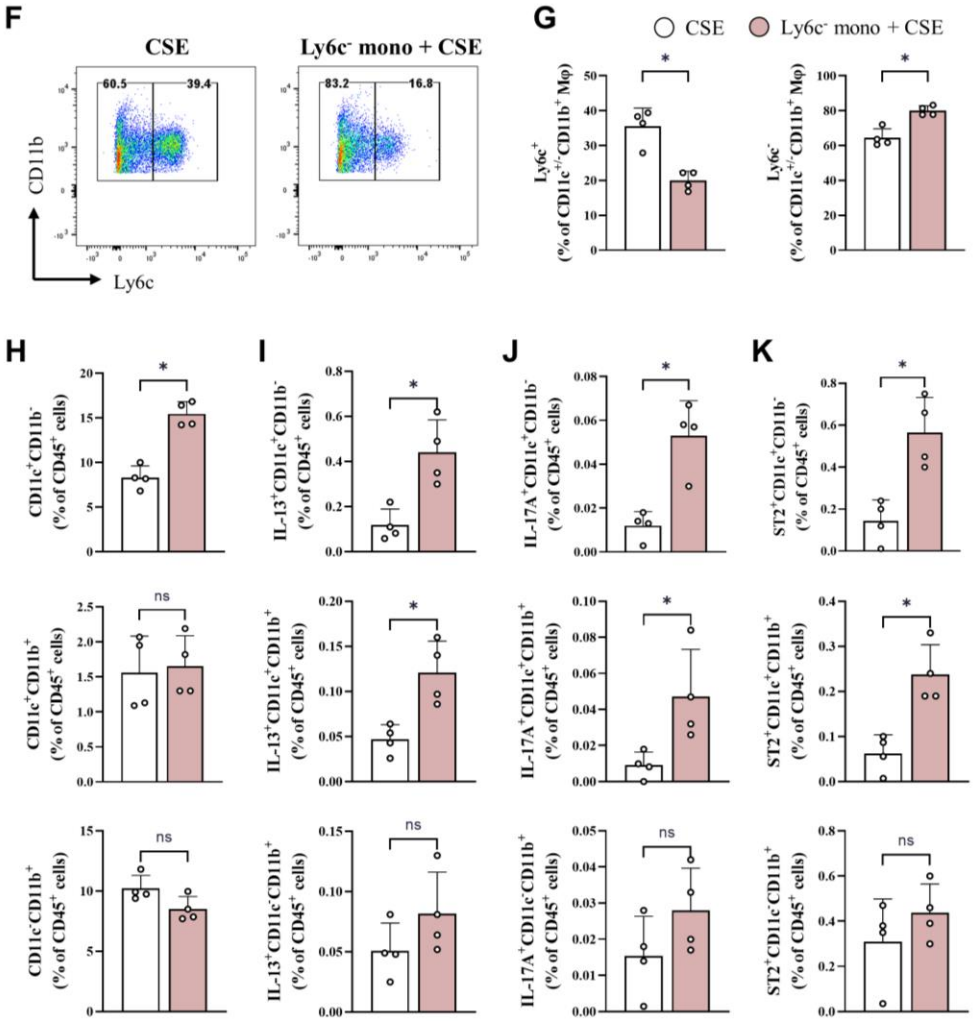
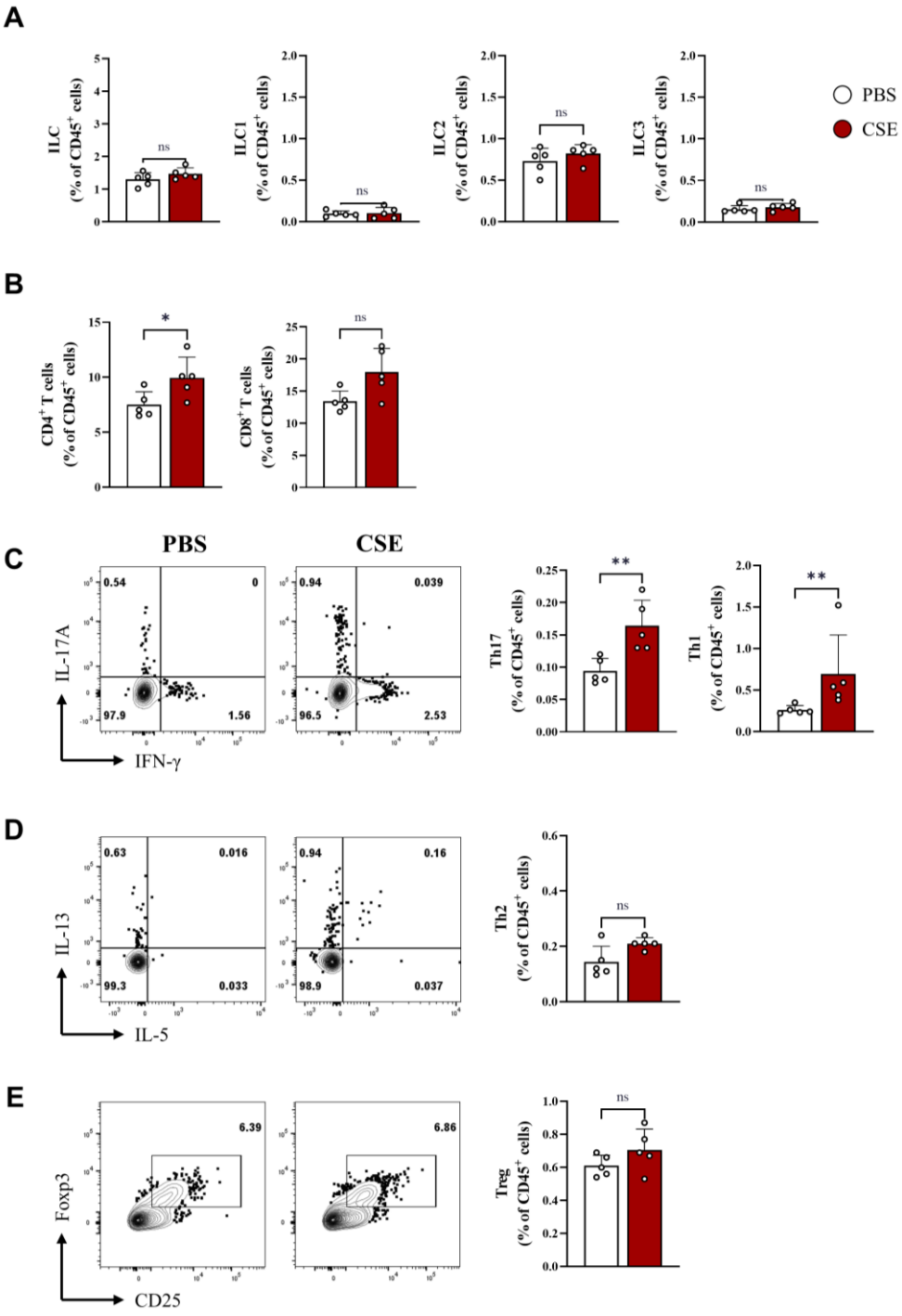

F
CSE
Ly6c⁻ mono + CSE
60.5
39.4
83.2
16.8
CD11b
Ly6c
G
CSE
Ly6c⁻ mono + CSE
Ly6c⁺ (% of CD11c⁺/⁻CD11b⁺ Mφ)
Ly6c⁻ (% of CD11c⁺/⁻CD11b⁺ Mφ)
H
I
J
K
CD11c⁺CD11b⁻ (% of CD45⁺ cells)
CD11c⁺CD11b⁺ (% of CD45⁺ cells)
CD11c⁻CD11b⁺ (% of CD45⁺ cells)
IL-13⁺CD11c⁺CD11b⁻ (% of CD45⁺ cells)
IL-13⁺CD11c⁺CD11b⁺ (% of CD45⁺ cells)
IL-13⁺CD11c⁻CD11b⁺ (% of CD45⁺ cells)
IL-17A⁺CD11c⁺CD11b⁻ (% of CD45⁺ cells)
IL-17A⁺CD11c⁺CD11b⁺ (% of CD45⁺ cells)
IL-17A⁺CD11c⁻CD11b⁺ (% of CD45⁺ cells)
ST2⁺CD11c⁺CD11b⁻ (% of CD45⁺ cells)
ST2⁺CD11c⁺CD11b⁺ (% of CD45⁺ cells)
ST2⁺CD11c⁻CD11b⁺ (% of CD45⁺ cells)
*
ns

Figure 13. The Effect of increased Ly6c^{-}CD11b^{+} macrophages after cigarette smoke exposure on pulmonary inflammation and macrophage subtypes

Representative flow cytometry plots gating (A) and percentages (B) of Ly6c^{+}CD11b^{+} and Ly6c^{-}CD11b^{+} macrophages in CD11c$^{+/-}$CD11b^{+} macrophages in CSE 4 weeks exposure model. (C) The number of inflammatory cells in BALF, including macrophages, neutrophils, eosinophils, and lymphocytes. (D) The percentages of neutrophils in lung tissue assessed by flow cytometry. (E) H&E staining (400×) for lung histology. Representative flow cytometry plots gating (F) and percentages (G) of Ly6c^{+}CD11b^{+} and Ly6c^{-}CD11b^{+} macrophages in CD11c$^{+/-}$CD11b^{+} macrophages in Ly6c^{-} monocyte adoptive transfer model. (H) The percentages of AM, TM, and MoM in lung tissue assessed by flow cytometry. (I) The percentages of IL-13^{+} macrophages in AM, TM, and MoM, respectively. (J) The percentages of IL-17A macrophages in AM, TM, and MoM, respectively. (K) The percentages of ST2^{+} macrophages in AM, TM, and MoM, respectively. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; AM, alveolar macrophage; TM, transitional macrophage; MoM, monocyte-derived macrophage. Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney *U* test. *$p < 0.05$

제 7 절 담배 연기 노출 후 ILC와 T 세포의 변화 및 담배 연기에 노출된 대식세포의 IL-33/ST2 신호전달의 활성화가 $CD4^+$ T 세포 분화에 미치는 영향

전체 ILC와 그 세부 아형에서는 CSE 노출에 따른 유의미한 변화가 확인되지 않았다**(Fig 14A)**. T 세포의 경우, 전체 $CD4^+$ T 세포가 CSE 노출군에서 유의하게 증가하는 것이 확인되었고, $CD8^+$ T 세포는 두 그룹 간에 차이가 없었다**(Fig 14B)**. $CD4^+$ T 세포의 하위 아형 중에서도 Th17 세포와 Th1 세포가 CSE 노출군에서 증가하였고, Th2 세포는 두 그룹 간에 차이가 없었다**(Fig 14C, D)**. Treg 세포 또한 두 그룹 간에 차이가 보이지 않았다**(Fig 14E)**. CSE-pre + IL-33 노출군에서 증가한 전 염증성 반응이 $CD4^+$ T 세포 분화에 관여하는지 확인하고자 CSE-pre + IL-33 노출군과 naïve $CD4^+$ T 세포의 공배양 실험을 진행하였다. 대조군과 비교하였을 때, CSE와 IL-33를 각각 단독으로 처리한 그룹과 공배양한 $CD4^+$ T 세포는 분화가 유도되지 않은 반면에, CSE-pre + IL-33 노출군과 공배양한 $CD4^+$ T 세포는 Th17 세포로 분화되었다**(Fig 14F, G)**.


A
ILC (% of CD45+ cells)
ILC1 (% of CD45+ cells)
ILC2 (% of CD45+ cells)
ILC3 (% of CD45+ cells)
ns
PBS
CSE
B
CD4+ T cells (% of CD45+ cells)
CD8+ T cells (% of CD45+ cells)
*
ns
C
PBS
CSE
IL-17A
IFN-γ
0.54
0
97.9
1.56
0.94
0.039
96.5
2.53
Th17 (% of CD45+ cells)
Th1 (% of CD45+ cells)
**
D
IL-13
IL-5
0.63
0.016
99.3
0.033
0.94
0.16
98.9
0.037
Th2 (% of CD45+ cells)
ns
E
Foxp3
CD25
6.39
6.86
Treg (% of CD45+ cells)
ns

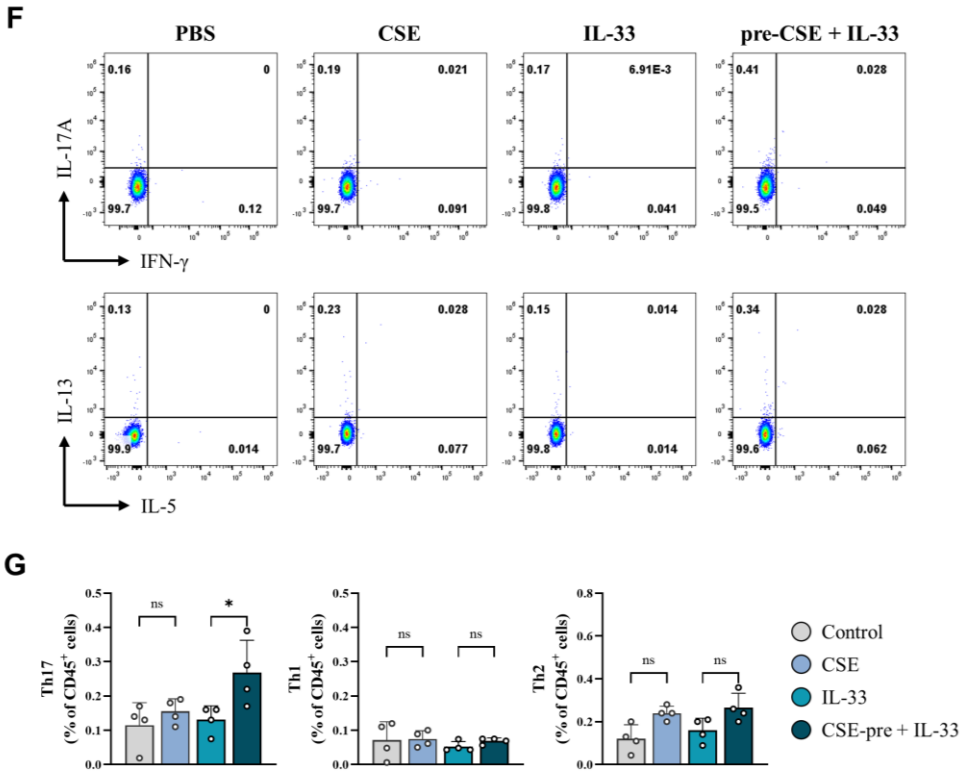


Figure 14. The changes in ILCs and CD4$^+$ T cells after CSE exposure and the effects of IL-33/ST2-mediated inflammatory macrophages enhanced by CSE on these changes

(A) The percentages of total ILCs, IFN-γ$^+$ ILC1s, IL-5$^+$ or/and IL-13$^+$ ILC2, and IL-17A$^+$ ILC3s, in CSE 4 weeks exposure model. (B) The percentages of CD4$^+$ T cells and CD8$^+$ T cells. (C) The percentages of IL-17A$^+$ Th17 and IFN-γ$^+$ Th1 in the lungs and their dot plots. (D) The percentages of IL-5$^+$ or/and IL-13$^+$ Th2 in the lungs and their dot plots. (E) The percentages of Foxp3$^+$CD25$^+$ Tregs in the lungs and their dot plots. (F) Representative flow cytometry plots gating IL-17A$^+$ Th17, IFN-γ$^+$ Th1, and IL-13$^+$ or/and IL-5$^+$ Th2 in CD4$^+$ T cell co-culture experiment. (G) The percentages of Th17, Th1, and Th2. ILC, innate lymphoid cell; IFN, interferon; Th, helper T cell; Treg, regulatory T cell. Statistical analysis was performed by the Mann-Whitney *U* test, and one-way ANOVA followed by Tukey’s test as a post-hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

제 4 장 고 찰

본 연구는 담배 연기가 폐의 정상 면역계에 미치는 영향을 단핵구와 대식세포의 관점에서 확인하였다. 담배 연기 노출로 인해 조절된 단핵구와 대식세포가 호중구성 염증 및 Th17 면역 반응의 활성화에 관여함으로써 기도 내 염증반응을 유발할 수 있음을 제안하였다.

담배 연기는 약 7,000개의 유기화합물로 구성되어 있으며, 이 중 약 70 종류가 발암물질로 알려져 있다. 담배 연기의 직접 또는 간접적인 노출은 암, 폐질환, 심장질환 등 많은 질병을 유발하는 주요 위험 요인으로 작용한다.[27] 특히 폐는 담배 연기와 직접적으로 접촉되는 기관으로, 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD), 폐 섬유증과 같은 여러 폐 질환의 유병률과 강한 상관관계를 보인다.[28,29] 담배 연기와 면역계간의 복잡한 상호작용을 이해하기 위해서 많은 연구가 진행되었으나, 아직까지 명확한 기전을 밝히지 못하였다.

대식세포는 폐 면역계에서 가장 많은 수를 차지하는 주요 면역세포로 외부 자극에 가장 먼저 신속하게 반응하며, 포식작용 및 사이토카인 분비를 통해 항상성을 유지하고 숙주 방어 역할을 한다.[5] 대식세포의 포식작용은 폐 내로 유입된 외부 항원을 처리하는 과정과 조직 손상으로 인한 사멸세포를 처리하는 과정(efferocytosis)으로 구분되는데, 흡연자의 폐 대식세포에서 외부 항원을 인식하고 포식작용을 유도하는 CD71, CD91, CD169 등의 수용체와 사멸 세포 인지 및 포식작용에 관여하는 인자들이 하향 조절되는 것이 관찰되었다.[30,31] 이처럼 흡연자의 폐 대식세포는 정상적인 기능을 수행하지 못하고 오히려 감염이나 자가 면역 반응에 대한 감수성을 높이는데 일조한다.

폐 대식세포는 해부학적 위치와 특성, 그리고 면역 상태에 따라 활성화되는 대식세포의 아형이 상이하다. 정상 기도 면역계에서는 폐포와 간질에 각각 존재하는 AM과 IM이 조직 내 항상성을 유지하는 역할을 수행한다.[6] AM은 포식작용 및 전 염증성 반응을 통해 외부 항원을 처리하는 1차 방어선 역할을 하며, IM은 AM의 방어작용을

회피하여 간질내로 침입한 외부 항원에 대한 2차 방어선 역할을 하는 것으로 알려져 있다. IM은 정상적인 상태의 폐 대식세포 중 약 4%를 차지하고 면역억제성 사이토카인인 IL-10의 주요 공급원으로 알려져 있으나, 아직까지 표현형과 역할에 대해 명확하게 정의되어 있지 않다.[32,33] 특히 IM은 염증 자극에 반응하여 폐 내로 유입되는 단핵구 유래 대식세포와 표현형이 유사하기 때문에, 본 연구에서는 IM을 명확하게 규정하지 못하였다. 그러나 흡연으로 인해 유발되는 대표적인 질환인 특발성 폐섬유화증(idiopathic pulmonary fibrosis)과 같은 간질성 폐 질환(interstitial lung disease)에서는 IM의 중요성이 강조되고 있다. 폐 섬유화 기전에서 IM이 생성하는 IL-10과 Arg-1이 섬유아세포(fibroblast)의 증식 및 분화를 유도할 수 있음이 보고되었으며, 이는 병리학적 기전에서 IM의 역할이 다를 수 있음을 시사한다.[34] 염증 상황이 유도되면 혈관을 순환하던 단핵구들이 염증 부위로 들어와 MoM으로 분화하고, 전 염증성 또는 조직 개형에 관여하는 하위 아형으로 활성화되어 염증 반응에 관여한다.[35] 단일 세포 RNA 시퀀싱 기술이 도입되면서 조직 내로 유입된 MoM이 AM으로 전환되는 과정의 중간 단계 아형인 TM이 존재하는 것이 확인되었다. 폐 대식세포 발달 과정에서 TM은 미성숙한 AM의 특징을 가지고 있으며, $CD206^{+}CD169^{+}$ AM으로 전환되어 폐 내 항상성 조절에 기여한다.[11] 하지만 블레오마이신(bleomycin)을 처리하여 제작한 폐 섬유화 마우스 모델에서 관찰된 TM은 CX3CR1과 SiglecF 표지자의 발현이 증가되어 있으며, 폐 섬유화에 기여하는 것으로 확인되었다.[14] 이는 염증의 특성에 따라 TM의 표현형과 기능이 다양하다는 것을 시사한다.

대식세포의 아형은 고전적으로 M1 대식세포와 M2 대식세포로 분류되어왔다. M1 대식세포는 TNFα나 IL-1β와 같은 전 염증성 사이토카인을 생성하며, M2 대식세포는 IL-4, IL-13과 같은 제 2형 면역 사이토카인을 분비한다.[15,16] 최근에는 생체 내에서 대식세포의 아형은 단순한 이분법적인 분류가 아닌 스펙트럼 형태로 존재한다는 이론이 주목받고 있다.[36] 대식세포는 발생적 기원과 각 조직의 내/외적인 요인에

의해 조절되어 각기 다른 기능과 특성을 가지게 된다. 그러나 아직까지 대식세포의 세부 아형에 대한 정의가 명확하지 않기 때문에, 여러 병인 기전에서 대식세포의 역할을 해석하는 것에 한계가 있다. 본 연구에서는 담배 연기가 대식세포에 미치는 영향을 확인하기 위해, 대식세포를 여러 세부 아형으로 나누어 분석하였다. CSE 노출 시 가장 두드러진 증가를 보인 대식세포 아형은 AM과 TM이었고, MoM 분율은 두 그룹간 차이가 없었다. CD11b^{+} 대식세포 내 M2 대식세포가 CSE 노출 시 유의하게 증가하였으며. M2 세부 아형 중에서도 M2c 대식세포가 증가하였다. IL-13의 발현은 AM, TM에서 증가하였으나, MoM에서는 증가하지 않았다. M2c 대식세포는 조직 개형에 관여하는 것으로 알려져 있으며,[37,38] IL-13 또한 기도 염증과 섬유화에 관여하는 대표적인 인자로 과발현 시 폐 섬유화를 유도한다.[13,39] 이는 담배 연기로 인해 증가하는 M2c 또는 IL-13^{+} 대식세포가 조직 개형 및 만성 기도 염증에 기여할 수 있음을 시사한다.

담배 연기는 주로 호중구성 염증을 유발하는데,[40,41] 흔히 Th17 염증 반응을 함께 유발한다.[42] Th17 세포에서 분비되는 IL-17A는 호중구성 염증을 유도하는 대표적인 인자로 알려져 있으며, IL-17A는 기도상피세포를 활성화시켜 CXCL-8과 같은 호중구 화학주성(chemotaxis) 인자의 분비를 유도한다.[24] IL-17의 주요 공급원으로 설명되는 면역 세포는 Th17, Tc17, ILC3, NK T 세포, 그리고 γδ T 세포가 있다.[43] 그동안 대식세포는 IL-17의 표적 세포로 작용할 것이라 여겨져 왔지만, 본 연구에서 CSE 노출군의 폐 조직내 IL-17A를 발현하는 대식세포를 확인함으로써, 대식세포 또한 IL-17A의 공급원이 될 수 있음을 제안하였다.

이전 연구에서 담배 연기가 대식세포의 분극화를 유도하는 기전 중 하나로 대식세포의 면역대사(immunometabolism) 조절이 제시되었다. 대식세포의 대사 경로는 에너지 제공 뿐만 아니라 대식세포의 표현형과 기능을 조절한다. M1 대식세포는 해당과정(glycolysis)을 통해 빠른 에너지 생성으로 염증상황에 대응하며, M2 대식세포는 산화적

인산화(oxidative phosphorylation)를 통해 염증해소에 필요한 인자들을 생성한다.[44] 담배 연기는 폐 대식세포 내 산화 스트레스를 야기함으로써 미토콘드리아 활성화와 대사 프로파일링을 변경한다. 즉, 산화적 인산화에서 해당과정으로의 대사 전환을 유도하는데, 이는 전 염증성 사이토카인과 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases)의 생성을 촉진하여 기도 내 염증 및 조직 리모델링에 기여한다.[45]

선천 면역 세포는 병원균 유래 분자유형(pattern recognition receptor, PAMP)과 손상 연관 분자유형(damage-associated molecular pattern, DAMP)을 인식하는 PRR을 발현한다. 따라서 처음 보는 병원균도 외부물질로 인식하여 신속하게 처리할 수 있으며, 손상된 세포에서 분비되는 숙주 유래 물질을 감지하여 비감염성 염증반응을 유도함으로써 손상된 조직을 회복시키고 조직 내 항상성을 유지한다.[46] 담배 연기는 기도상피세포의 손상과 세포 사멸을 유도하여 DAMP 생산을 촉진하는데, 이는 다양한 PRR을 활성화시켜 기도 염증을 유발한다.[47] 담배 연기에 의해 형성된 HMGB1은 RAGE 또는 TLR4와 결합하여 NF-κB 신호전달을 활성화시킨다.[48] 또한 담배 연기는 세포 외부 ATP의 증가와 함께 그 수용체인 P2X7의 활성화를 유도하고, NLRP3 inflammasome에 의한 caspase-1의 조절 기전을 통해 IL-1β 및 IL-18의 방출을 유도한다.[49,50] 담배 연기의 노출은 기도상피세포의 손상을 유도하여 IL-33 사이토카인을 방출한다.[51,52] IL-33는 조직 내 미세 면역 환경에 따라 전 염증성 반응과 항 염증성 반응을 모두 유도할 수 있는 다기능 단백질이다.[53] IL-33의 하위 신호 전달인 NF-κB 기전은 IL-6, TNFα, IL-1β와 같은 전 염증성 인자들의 생성을 유도하고, MAP 키나아제 기전은 IL-5, IL-13과 같은 제 2형 면역 사이토카인들의 생성을 유도한다.[53] 많은 연구에서 IL-33가 천식 및 알레르기 염증 질환의 병인 기전 중 하나라고 설명한다. 실제로 IL-33는 알레르기성 기도 염증 상황에서 M2 대식세포, ILC2, Th2 분화에 영향을 미치는 것으로 보고되었다.[54-56] IL-33와 Th17 세포 사이의 관계는 아직 많이 알려 있지 않지만, IL-33가 조직 내 면역 상황에 따라 서로 다른 역할을 하는 것은 분명하다. IL-33는 류마티스

관절염, 염증성 장 질환과 같은 자가 면역 질환 및 COPD와 같은 만성 염증 질환과 관련이 있으며, 특히 Th17 면역 반응을 유도하는 것으로 보인다. IL-33에 의해 성숙된 DC는 IL-1β, IL-6와 같은 사이토카인을 생산하는데, 이는 Th17 분화를 유도할 뿐만 아니라 Treg이 Th17으로 전환되는 것을 야기한다.[57-59] 또한 IL-33에 의해 활성화된 비만세포(mast cell)는 Th17 분화와 호중구성 염증에 기여한다.[60,61] 담배 연기 역시 폐 면역세포와 면역 환경을 조절하여 IL-33/ST2 신호전달을 활성화시키는데, 제 2형 면역 반응 스위치를 내리고 전 염증성 반응을 촉진하는 것으로 보인다. 이전 보고에 따르면, 담배 연기는 ILC2의 ST2 발현을 감소시켰다. 이로 인해 정상 마우스의 ILC2는 IL-33 자극으로 인해 강력한 제 2형 면역 반응을 유도하였으나, 담배 연기에 노출된 ILC2는 *Gata3* 전사인자와 제 2형 면역 사이토카인의 발현이 억제되었다. 또한 대식세포는 IL-33 자극과 함께 인플루엔자 A 바이러스에 노출되었을 때 *Tnfa*의 생산이 현저하게 증가하였다.[62] 이 연구 결과는 담배 연기 노출이 폐 내 IL-33/ST2 신호전달 기전을 조절하여 과도한 전 염증성 반응을 촉진시킴으로써 질병을 악화시킬 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 만성적인 CSE 노출이 폐 조직 내에서 *Il33* 발현을 증가시키고 대식세포의 ST2 발현을 증가시키는 것을 확인하였으며, 특히 담배 연기에 의해 조절된 대식세포에서 IL-33 반응성이 강화 되는 것을 확인하였다. 시험관 내 실험에서 담배 연기의 사전 노출 후 IL-33 자극을 준 대식세포에서 *St2* 및 전 염증성 인자(*Tnfa, Il1b, Mcp1*)의 유전자 발현이 상향 조절되는 것을 관찰하였다. 생체 외 실험에서도 동일하게 담배 연기에 노출된 $CD11c^+$ 대식세포는 IL-33 자극에 반응하여 전 염증성 인자(*Tnfa, Il6, Il23a*)의 유전자 발현이 상향 조절되었다. 그러나 IL-33 또는 CSE를 단독으로 처리한 군에서는 전 염증성 인자의 유전자 발현이 대조군과 유사하거나 CSE, IL-33 복합 노출군보다 낮은 수준의 유전자 발현이 관찰되었다. 흥미로운 점은 CSE 노출군의 폐 조직에서 확인된 $IL\text{-}17A^+$ 대식세포에서 ST2 발현이 특이적으로 증가했으며, 이는 $IL\text{-}13^+$ 대식세포에서는 관찰되지 않았다. 따라서 담배 연기 노출 시

증가하는 IL-33/ST2 매개 전 염증성 대식세포는 IL-17A^{+} 대식세포와 연관성이 있을 것이라고 추측된다.

기존의 연구에서 IL-33가 LPS (lipopolysaccharide) 매개 TLR4/Myd88 신호전달을 증폭시켜 대식세포의 전 염증성 반응을 유도할 수 있음을 보여주었다. IL-33는 LTA (lipoteichoic acid) 매개 TLR2/Myd88 신호전달 활성화에도 관여했지만, poly(I:C) 매개 TLR3 신호전달에는 영향을 미치지 않았다. 한편, IL-33 단독 자극만으로 대식세포의 TLR4, TLR2 신호전달에 관여하는 인자의 발현이 상향조절되고 Myd88 신호 경로가 활성화되었지만, 전 염증성 사이토카인의 생산을 유도하지는 못하였다.[63,64] 이와 같은 결과는 IL-33가 Myd88 의존성 TLR 신호전달을 강화시키는 주요 인자이며, PAMP 또는 DAMP 자극이 결합하면 대식세포의 전 염증성 반응을 증폭시킬 수 있음을 보여준다.

이러한 IL-33의 Myd88 의존성 강화 기전은 본 연구에서도 확인되었다. CSE 단독 노출군에서 *Myd88, Nfκb* 유전자 발현이 상향 조절되지만, 이 자체로는 면역 반응이 유도되지 않고, IL-33 자극이 존재해야만 전 염증성 반응이 활성화되었다. 따라서 담배 연기 노출 후 강화된 대식세포의 IL-33 반응성은 CSE에 의해 활성화된 Myd88/NF-κB 신호전달에 의해 유도되었을 가능성이 있다. Myd88은 TLR 및 IL-1 수용체 패밀리 구성원의 염증 신호의 하류에서 작용하며, 선천 면역 신호 전달 기전에서 주요한 역할을 하는 어댑터 단백질이다.[65] 추후 연구에서는 CSE가 어떤 수용체의 기전에 관여하여 Myd88 신호전달의 활성화를 유도하는지 증명하려고 한다.

염증 반응이 개시되면 혈액에서 순환하는 단핵구가 염증 부위로 빠르게 이동한 다음, 대식세포 및 DC로 분화하여 염증 반응에 기여한다. 단핵구는 표현형과 그 기능에 따라서 세부 아형으로 나뉘며, 마우스 단핵구에서는 Ly6c 표지자의 발현에 따라 Ly6c^{+} 전형 단핵구와 Ly6c^{-} 비전형 단핵구로 구분한다.[10,35] 전형 단핵구는 전 염증성 표현형을 가지고 있으며, 포식작용 기능이 활발하여 염증 부위의 항원, 손상된 세포 잔해를 처리하고 T 림프구에 항원을 제시하여 적응 면역 반응을

유도한다. 비전형 단핵구는 폐 혈관 내막에 위치하여 주변 조직의 면역학적인 이상을 감지하고, 빠르게 염증 부위로 이동하여 염증을 해소하거나 감염에 대응하여 전 염증반응을 유도한다.[9] 단핵구의 작용 기전에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않으나, 주로 염증의 시기에 따라 관여하는 단핵구의 아형이 다르다고 이야기되어왔으며, 최근에는 염증의 특성에 따라 적재적소에 맞는 단핵구 아형들이 관여한다는 것이 보고되었다. 전형 단핵구는 다양한 병원균으로 인해 유발되는 급성 염증 반응의 초기에 감염 부위로 모집되어 숙주 방어 역할을 한다.[66] 최근 들어 비전형 단핵구의 역할이 주목받고 있다. IL-13 과발현 형질전환 마우스는 기도 내 호산구성 염증, 기도 섬유화 및 점액 분비 등을 유도하여 만성 염증 질환의 병리학적 특징을 보이는데, IL-13 과발현 시 폐 내 비전형 단핵구가 증가되는 것이 관찰되었으며, 비전형 단핵구 입양 전달 실험을 통해 비전형 단핵구가 기도 내 염증 및 조직 개형에 관여함을 확인하였다.[13] 또한 병원성 감염에 의한 급성 염증 반응을 보이는 패혈증 환자와 만성 염증 반응을 보이는 루푸스 환자의 대식세포 하위 아형을 분석한 결과, 공통적으로 비전형 단핵구가 증가하였고, 비전형 단핵구에서 염증성 사이토카인의 발현이 상향 조절 되는 것이 확인되었다.[67] 이는 그동안 염증 해소에 작용할 것이라고 생각되었던 비전형 단핵구가 염증성 아형으로도 작용할 수 있으며 여러 질환의 병인 기전에 기여할 수 있음을 시사한다. 담배 연기로 활성화된 전 염증성 단핵구/대식세포를 고갈시키는 것이 폐 내 염증 인자들의 수준을 상당히 감소시킨다는 연구 결과가 있다.[68] 이 연구에서 클로드로네이트 리포솜(clodronate liposome) 처리로 폐 내 단핵구/대식세포를 고갈시켰는데, 여러 연구에서 이러한 기법이 $Ly6c^-$ 단핵구와 대식세포만 선택적으로 고갈시키는 것을 확인하였다.[69,70] 따라서 담배 연기의 염증 유발 기전에서 $Ly6c^-$ 단핵구가 핵심적으로 작용할 것이라고 추측하였다.

본 연구에서 담배 연기에 노출된 마우스의 폐 조직에서 $Ly6c^-CD11b^+$ 대식세포의 유입이 증가하고 $Ly6c^+CD11b^+$ 대식세포의 유입이 감소하는

것을 확인하였다. Ly6c$^-$CD11b$^+$ 대식세포의 유입이 폐 내 염증 반응에 미치는 영향을 확인하고자, Ly6c$^-$ 단핵구를 마우스의 꼬리 정맥으로 입양 전달하고 CSE 급성 노출을 유도하였다. 대조군과 비교하여 Ly6c$^-$ 단핵구 전달군에서 폐 조직내 Ly6c$^-$CD11b$^+$ 대식세포가 증가하는 것이 확인되었다. Ly6c$^-$ 단핵구 유입은 호중구성 염증 반응을 강화하였다. 더불어 폐 대식세포의 IL-13과 IL-17A의 발현을 비교해본 결과, Ly6c$^-$ 단핵구를 전달한 그룹의 AM, TM 하위 아형에서 증가하였다. 또한 IL-17A$^+$ 대식세포가 증가함에 따라 ST2$^+$ 대식세포도 증가하는 것이 관찰되어, IL-17A$^+$ 대식세포가 IL-33/ST2 신호전달을 매개로 활성화되었을 가능성을 시사하였다. 이러한 결과는 담배 연기 노출 후 폐 내로 유입된 Ly6c$^-$ 단핵구가 IL-17A를 발현하는 전 염증성 대식세포 또는 조직 리모델링에 관여하는 IL-13$^+$ 대식세포로 분화되어 염증 반응을 매개하는 주요 인자가 될 수 있음을 보여주며, 특히 IL-17A$^+$ 대식세포 아형은 호중구성 염증과 밀접한 관련이 있을 것으로 보인다.

담배 연기는 적응 면역 반응의 활성화에도 기여한다. 담배 연기로 유도된 COPD 마우스 모델에서 폐 조직 내의 Th17 계열 사이토카인인 IL-17A, IL-6, IL-23의 상향 조절과 함께 Th17 세포의 증가가 관찰되었다.[24] 또한 흡연 이력이 있는 COPD 환자의 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)에서도 Th17 및 Th1의 비율이 증가하였다.[71] Th17 세포는 IL-6, IL-1β 및 IL-23 사이토카인 등에 의해 유도된다.[24] Th17 세포는 IL-17, IL-22, CXCL3와 같은 염증성 사이토카인을 발현하며, 이들은 자가 면역 및 염증성 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히 IL-17A는 호중구 모집을 유발하여 만성 염증, 기류 폐쇄 및 폐기종을 유발한다.[24,72] 조력 T 세포의 활성화에는 세 가지 신호가 필요하다. 항원 펩타이드를 전달하는 MHC/TCR 복합체, 공동자극신호, 그리고 사이토카인이다.[73] 외부 항원에 노출됨으로써 적응 면역 반응이 활성화되면, 항원 특이적인 T 세포만 활성화되고 관련이 없는 T 세포는 활성화되지 않는 선택적 면역 반응이 일어난다. 그러나 바이러스 항원 펩타이드의 존재와는 상관없이 면역 환경의 사이토카인에

의해 비특이적으로 T 세포의 활성화가 유도되는 현상이 관찰되었는데 이를 방관자 T세포의 활성화라고 한다. 방관자 T 세포는 정상 세포를 무작위로 공격하여 염증을 유도하고 조직 손상을 일으킬 수 있다.[74,75] 일반적으로 DC가 조력 T 세포의 활성화에 관여한다고 알려져 있으나, 최근 연구들은 대식세포가 분비하는 사이토카인들이 적응 면역 반응의 활성화에 관여할 수 있음을 제안한다.[76] 류마티스 관절염 환자의 활막 조직에서 관찰되는 대식세포는 전 염증성 인자의 강력한 공급원으로 시험관 내 실험을 통해 해당 대식세포가 Th17 반응을 촉진하는 것을 확인하였다.[77] 또한 제 1형 당뇨병 환자의 PBMC에서 유래한 단핵구가 Th17 분화를 유도하여 적응 면역 반응에 관여할 수 있음이 보고되었다.[78]

본 연구에서 담배 연기의 노출이 Th17 및 Th1 면역 반응을 유도하는 것을 관찰하였다. 뿐만 아니라 담배 연기에 의해 활성화된 IL-33/ST2 매개 전 염증성 대식세포에서 생산되는 *Tnfa, Il6, Il23a*와 같은 사이토카인들이 Th17 세포 분화에 기여할 수 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 담배 연기에 의해 활성화된 대식세포가 조성하는 미세 환경이 조력 T 세포의 활성화를 일으키는 주요 요인으로 작용할 수 있음을 시사한다.

위와 같은 결과를 통해, 담배 연기로 인해 조절되는 단핵구와 대식세포가 호중구성 염증 및 적응 면역계의 변화를 야기함으로써 기도 내 염증반응을 유발할 수 있음을 보여주었다.

본 연구는 담배 연기로 인해 유발되는 호중구성 염증 및 Th17 면역 반응에 관여할 것으로 생각되어지는 단핵구와 대식세포의 역할을 규명하고자 하였다. 실험을 통해 담배 연기의 노출이 폐 내 IL-17A^{+}F4/80^{+} 대식세포 아형을 증가시키는 것을 관찰하였으나, 대식세포가 IL-17A의 공급원인지에 대한 부분을 뒷받침할 수 있는 연구들이 부족하기 때문에 여전히 논란의 여지가 있다. 따라서 여러 표지자를 추가로 확인하여 IL-17A가 대식세포 특이적으로 발현되는 것인지 증명해야 하며, 다른 호중구성 염증 모델에서도 IL-17A^{+} 대식세포 아형을 확인할 필요가 있다. 또한 담배 연기가 어떠한 기전으로

대식세포의 IL-33/ST2 매개 전 염증성 반응을 활성화시키는지 밝혀야 한다. 현재 가설로는 담배 연기 노출 후 증가한 대식세포의 Myd88/NF-κB 신호전달의 활성화가 IL-33 반응성을 강화하는 것으로 보이며, 이를 증명하기 위해 Myd88를 차단하는 것이 IL-33 반응성을 상쇄시키는지를 확인하고, 담배 연기가 어떻게 Myd88 활성화를 유도하는지를 확인하기 위한 추가 연구를 진행하려고 한다. 최종적으로 담배 연기에 의해 변화된 폐 면역환경, 특히 대식세포의 세부 아형의 변화가 실제로 폐 질환의 발병 또는 악화에 어떻게 관여하는지를 확인하는 것이 중요하다.

해당 연구는 담배 연기 노출이 기도 내 염증반응을 개시하고 악화시키는 전 과정을 단핵구와 대식세포의 관점으로 설명하였다는 것에 의의가 있다. 또한, 기존의 담배 연기 연구에서 논의되지 않았던 $Ly6c^-$ 단핵구와 IL-17A 발현을 특징으로 하는 IL-33/ST2 매개 전 염증성 대식세포의 역할을 밝혀내어, 담배 연기로 인한 염증 유발 기전에 대한 새로운 관점을 제시하였다.

제 5 장 결론

본 연구는 담배 연기가 폐 면역계에 미치는 영향을 대식세포의 관점에서 확인하였다. 담배 연기는 IL-33/ST2 매개 전 염증성 대식세포의 분화를 유도하였으며, 담배 연기 노출에 따른 대식세포의 Myd88/NF-κB 신호전달의 활성화가 IL-33 반응성을 강화시키는 것으로 보인다. 해당 아형은 생체 내에서 IL-17A^{+} 대식세포와 연관이 있을 것으로 추측되며, 더불어 체외 실험을 통해 Th17 세포의 분화에도 관여함을 밝혔다. 또한 담배 연기 노출 후 폐 내로 유입되는 Ly6c^{-} 단핵구가 IL-17A^{+} 전 염증성 대식세포와 조직 리모델링에 관여하는 IL-13^{+} 대식세포로 분화되어 염증 반응을 유발하는 주요 매개체가 될 수 있음을 확인하였고, 호중구성 염증과도 밀접한 관련이 있음을 보여주었다.

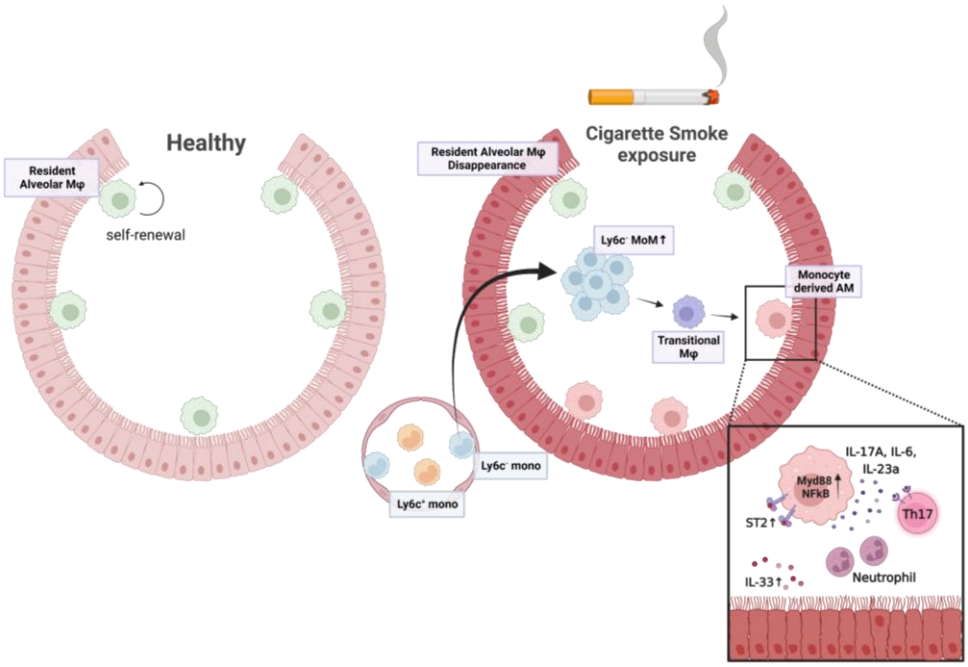


Figure 15. Graphical abstract

참고 문헌

1. Mazzone P, Tierney W, Hossain M, Puvenna V, Janigro D, Cucullo L. Pathophysiological Impact of Cigarette Smoke Exposure on the Cerebrovascular System with a Focus on the Blood-Brain Barrier: Expanding the Awareness of Smoking Toxicity in an Underappreciated Area. *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:4111-4126.
2. Rom O, Avezov K, Aizenbud D, Reznick AZ. Cigarette Smoking and Inflammation Revisited. *Respir Physiol Neurobiol* 2013;187:5-10.
3. Chang JT, Meza R, Levy DT, Arenberg D, Jeon J. Prediction of Copd Risk Accounting for Time-Varying Smoking Exposures. *PLoS One* 2021;16:e0248535.
4. Hedman L, Bjerg A, Sundberg S, Forsberg B, Rönmark E. Both Environmental Tobacco Smoke and Personal Smoking Is Related to Asthma and Wheeze in Teenagers. *Thorax* 2011;66:20-25.
5. Mu X, Li Y, Fan GC. Tissue-Resident Macrophages in the Control of Infection and Resolution of Inflammation. *Shock* 2021;55:14-23.
6. Bain CC, MacDonald AS. The Impact of the Lung Environment on Macrophage Development, Activation and Function: Diversity in the Face of Adversity. *Mucosal Immunol* 2022;15:223-234.
7. Morales-Nebreda L, Misharin AV, Perlman H, Budinger GRS. The Heterogeneity of Lung Macrophages in the Susceptibility to Disease. *Eur. Respir. J.* 2015;24:505-509.
8. Kratofil RM, Kubes P, Deniset JF. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:35-42.
9. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front Immunol* 2018;9:1726.
10. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, Schultze JL. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 2019;10:2035.
11. Evren E, Ringqvist E, Tripathi KP, Sleiers N, Rives IC, Alisjahbana A, Gao Y, Sarhan D, Halle T, Sorini C, et al. Distinct Developmental Pathways from Blood Monocytes Generate Human Lung Macrophage Diversity. *Immunity* 2021;54:259-275.
12. Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, Minowa Y, Fukushima K, Ebina I, Yoshioka Y, et al. Identification of an Atypical Monocyte and Committed Progenitor Involved in Fibrosis. *Nature* 2017;541:96-101.
13. Mo Y, Kim Y, Bang JY, Jung J, Lee CG, Elias JA, Kang HR. Mesenchymal Stem Cells Attenuate Asthmatic Inflammation and Airway Remodeling by Modulating Macrophages/Monocytes in the Il-13-Overexpressing Mouse Model. *Immune Netw* 2022;22:e40.
14. Aran D, Looney AP, Liu L, Wu E, Fong V, Hsu A, Chak S, Naikawadi RP, Wolters PJ, Abate AR, et al. Reference-Based Analysis of Lung Single-Cell Sequencing Reveals a Transitional Profibrotic Macrophage. *Nat. Immunol.* 2019;20:163-172.
15. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage Activation and Polarization. *Front Biosci* 2008;13:453-461.
16. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-969.
17. Hussell T, Bell TJ. Alveolar Macrophages: Plasticity in a Tissue-Specific Context. *Nat Rev Immunol* 2014;14:81-93.
18. Xu J, Lu L, Lu J, Xia J, Lu H, Yang L, Xia W, Shen S. Cd200fc Attenuates

Inflammatory Responses and Maintains Barrier Function by Suppressing Nf-Kb Pathway in Cigarette Smoke Extract Induced Endothelial Cells. *Biomed Pharmacother* 2016;84:714-721.

19. Doz E, Noulin N, Boichot E, Guénon I, Fick L, Le Bert M, Lagente V, Ryffel B, Schnyder B, Quesniaux VF, et al. Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation Is Tlr4/Myd88 and Il-1r1/Myd88 Signaling Dependent. *J Immunol* 2008;180:1169-1178.
20. Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, Kilty I, Rahman I. Cigarette Smoke Induces Proinflammatory Cytokine Release by Activation of Nf-Kappab and Posttranslational Modifications of Histone Deacetylase in Macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L46-57.
21. Suzuki T, McCarthy C, Carey BC, Borchers M, Beck D, Wikenheiser-Brokamp KA, Black D, Chalk C, Trapnell BC. Increased Pulmonary Gm-Csf Causes Alveolar Macrophage Accumulation. Mechanistic Implications for Desquamative Interstitial Pneumonitis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2020;62:87-94.
22. Martí-Lliteras P, Regueiro V, Morey P, Hood DW, Saus C, Sauleda J, Agustí AG, Bengoechea JA, Garmendia J. Nontypeable Haemophilus Influenzae Clearance by Alveolar Macrophages Is Impaired by Exposure to Cigarette Smoke. *Infect Immun* 2009;77:4232-4242.
23. Ortega E, Barriga C, Rodríguez AB. Decline in the Phagocytic Function of Alveolar Macrophages from Mice Exposed to Cigarette Smoke. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994;17:77-84.
24. Le Rouzic O, Pichavant M, Frealle E, Guillon A, Si-Tahar M, Gosset P. Th17 Cytokines: Novel Potential Therapeutic Targets for Copd Pathogenesis and Exacerbations. *Eur Respir J* 2017;50:1602434.
25. Russell AE, Liao Z, Tkach M, Tarwater PM, Ostrowski M, Théry C, Witwer KW. Cigarette Smoke-Induced Extracellular Vesicles from Dendritic Cells Alter T-Cell Activation and Hiv Replication. *Toxicol Lett* 2022;360:33-43.
26. Liang Y, Shen Y, Kuang L, Zhou G, Zhang L, Zhong X, Zhang J, Liu J. Cigarette Smoke Exposure Promotes Differentiation of Cd4(+) T Cells toward Th17 Cells by Cd40-Cd40l Costimulatory Pathway in Mice. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2018;13:959-968.
27. Stämpfli MR, Anderson GP. How Cigarette Smoke Skews Immune Responses to Promote Infection, Lung Disease and Cancer. *Nat Rev Immunol* 2009;9:377-384.
28. Bhatt SP, Kim YI, Harrington KF, Hokanson JE, Lutz SM, Cho MH, DeMeo DL, Wells JM, Make BJ, Rennard SI, et al. Smoking Duration Alone Provides Stronger Risk Estimates of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Than Pack-Years. *Thorax* 2018;73:414-421.
29. Oh CK, Murray LA, Molfino NA. Smoking and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Pulm Med* 2012;2012:808260.
30. Lugg ST, Scott A, Parekh D, Naidu B, Thickett DR. Cigarette Smoke Exposure and Alveolar Macrophages: Mechanisms for Lung Disease. *Thorax* 2022;77:94-101.
31. Tajbakhsh A, Gheibihayat SM, Mortazavi D, Medhati P, Rostami B, Savardashtaki A, Momtazi-Borojeni AA. The Effect of Cigarette Smoke Exposure on Efferocytosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease; Molecular Mechanisms and Treatment Opportunities. *Copd* 2021;18:723-736.
32. Liegeois M, Legrand C, Desmet CJ, Marichal T, Bureau F. The Interstitial Macrophage: A Long-Neglected Piece in the Puzzle of Lung Immunity. *Cell Immunol* 2018;330:91-96.
33. Schyns J, Bureau F, Marichal T. Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and

Future. *J Immunol Res* 2018;2018:5160794.
34. Gu Y, Lawrence T, Mohamed R, Liang Y, Yahaya BH. The Emerging Roles of Interstitial Macrophages in Pulmonary Fibrosis: A Perspective from Scrna-Seq Analyses. *Front Immunol* 2022;13:923235.
35. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. Monocyte and Macrophage Differentiation: Circulation Inflammatory Monocyte as Biomarker for Inflammatory Diseases. *Biomark Res* 2014;2:1.
36. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New Insights into the Multidimensional Concept of Macrophage Ontogeny, Activation and Function. *Nat Immunol* 2016;17:34-40.
37. Liu C, Xiao K, Xie L. Advances in the Regulation of Macrophage Polarization by Mesenchymal Stem Cells and Implications for Ali/Ards Treatment. *Front Immunol* 2022;13:928134.
38. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The Chemokine System in Diverse Forms of Macrophage Activation and Polarization. *Trends Immunol* 2004;25:677-686.
39. Marone G, Granata F, Pucino V, Pecoraro A, Heffler E, Loffredo S, Scadding GW, Varricchi G. The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. *Front Pharmacol* 2019;10:1387.
40. Zhang H, Qiu S-L, Tang Q-Y, Zhou X, Zhang J-Q, He Z-Y, Bai J, Li M-H, Deng J-M, Liang Y, et al. Erythromycin Suppresses Neutrophil Extracellular Traps in Smoking-Related Chronic Pulmonary Inflammation. *Cell Death Dis* 2019;10:678.
41. MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC. The Effect of Cigarette Smoking on Neutrophil Kinetics in Human Lungs. *N Engl J Med* 1989;321:924-928.
42. Lindén A, Laan M, Anderson GP. Neutrophils, Interleukin-17a and Lung Disease. *Eur Respir J* 2005;25:159-172.
43. Zwicky P, Unger S, Becher B. Targeting Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Disease: A Clinical Perspective. *J Exp Med* 2019;217:e20191123.
44. Izquierdo E, Cuevas VD, Fernández-Arroyo S, Riera-Borrull M, Orta-Zavalza E, Joven J, Rial E, Corbi AL, Escribese MM. Reshaping of Human Macrophage Polarization through Modulation of Glucose Catabolic Pathways. *J Immunol* 2015;195:2442-2451.
45. Dong T, Chen X, Xu H, Song Y, Wang H, Gao Y, Wang J, Du R, Lou H, Dong T. Mitochondrial Metabolism Mediated Macrophage Polarization in Chronic Lung Diseases. *Pharmacol Ther* 2022;239:108208.
46. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. Pamps and Damps: Signal 0s That Spur Autophagy and Immunity. *Immunol Rev* 2012;249:158-175.
47. Strzelak A, Ratajczak A, Adamiec A, Feleszko W. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15:1033.
48. Lin L, Li J, Song Q, Cheng W, Chen P. The Role of Hmgb1/Rage/Tlr4 Signaling Pathways in Cigarette Smoke-Induced Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Immun Inflamm Dis* 2022;10:e711.
49. Eltom S, Stevenson CS, Rastrick J, Dale N, Raemdonck K, Wong S, Catley MC, Belvisi MG, Birrell MA. P2x7 Receptor and Caspase 1 Activation Are Central to Airway Inflammation Observed after Exposure to Tobacco Smoke. *PLoS One* 2011;6:e24097.
50. Lucattelli M, Cicko S, Müller T, Lommatzsch M, De Cunto G, Cardini S, Sundas W, Grimm M, Zeiser R, Dürk T, et al. P2x7 Receptor Signaling in the Pathogenesis of Smoke-Induced Lung Inflammation and Emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:423-429.

51. Pace E, Di Sano C, Sciarrino S, Scafidi V, Ferraro M, Chiappara G, Siena L, Gangemi S, Vitulo P, Giarratano A, et al. Cigarette Smoke Alters Il-33 Expression and Release in Airway Epithelial Cells. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:1630-1637.
52. Huang Q, Li CD, Yang YR, Qin XF, Wang JJ, Zhang X, Du XN, Yang X, Wang Y, Li L, et al. Role of the Il-33/St2 Axis in Cigarette Smoke-Induced Airways Remodelling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Thorax* 2021;76:743.
53. Xu H, Turnquist HR, Hoffman R, Billiar TR. Role of the Il-33-St2 Axis in Sepsis. *Mil Med Res* 2017;4:3.
54. Gordon ED, Simpson LJ, Rios CL, Ringel L, Lachowicz-Scroggins ME, Peters MC, Wesolowska-Andersen A, Gonzalez JR, MacLeod HJ, Christian LS, et al. Alternative Splicing of Interleukin-33 and Type 2 Inflammation in Asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:8765-8770.
55. Louten J, Rankin AL, Li Y, Murphy EE, Beaumont M, Moon C, Bourne P, McClanahan TK, Pflanz S, de Waal Malefyt R. Endogenous Il-33 Enhances Th2 Cytokine Production and T-Cell Responses During Allergic Airway Inflammation. *Int Immunol* 2011;23:307-315.
56. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, et al. Il-33 Amplifies the Polarization of Alternatively Activated Macrophages That Contribute to Airway Inflammation. *J Immunol* 2009;183:6469-6477.
57. Park SH, Kim MS, Lim HX, Cho D, Kim TS. Il-33-Matured Dendritic Cells Promote Th17 Cell Responses Via Il-1β and Il-6. *Cytokine* 2017;99:106-113.
58. Park S-H, Jung H-J, Kim TS. Il-33 Changes Cd25hi Tregs to Th17 Cells through a Dendritic Cell-Mediated Pathway. *Immunol Lett* 2020;218:5-10.
59. Cheng L, Jiao Y, Jiang W, Zhang X, Zhang L, Jia G. Il-33 Deficiency Attenuates Lung Inflammation by Inducing Th17 Response and Impacting the Th17/Treg Balance in Lps-Induced Ards Mice Via Dendritic Cells. *J Immunol Res* 2022;2022:9543083.
60. Cho K-A, Suh JW, Sohn JH, Park JW, Lee H, Kang JL, Woo S-Y, Cho YJ. Il-33 Induces Th17-Mediated Airway Inflammation Via Mast Cells in Ovalbumin-Challenged Mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302:L429-L440.
61. Divekar R, Kita H. Recent Advances in Epithelium-Derived Cytokines (Il-33, Il-25, and Thymic Stromal Lymphopoietin) and Allergic Inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2015;15:98-103.
62. Kearley J, Silver Jonathan S, Sanden C, Liu Z, Berlin Aaron A, White N, Mori M, Pham T-H, Ward Christine K, Criner Gerard J, et al. Cigarette Smoke Silences Innate Lymphoid Cell Function and Facilitates an Exacerbated Type I Interleukin-33-Dependent Response to Infection. *Immunity* 2015;42:566-579.
63. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in Allergy. *Allergy* 2012;67:1203-1214.
64. Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, Synguelakis M, von Aulock S, Sallenave JM, McKenzie AN, Kanellopoulos J. Il-33 Enhances Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokine Production from Mouse Macrophages by Regulating Lipopolysaccharide Receptor Complex. *J Immunol* 2009;183:1446-1455.
65. Deguine J, Barton GM. Myd88: A Central Player in Innate Immune Signaling. *F1000Prime Rep* 2014;6:97.
66. Shi C, Pamer EG. Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011;11:762-774.
67. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical Monocytes Display Inflammatory Features:

Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematous. *Sci Rep* 2015;5:13886.
68. Lim D, Kim W, Lee C, Bae H, Kim J. Macrophage Depletion Protects against Cigarette Smoke-Induced Inflammatory Response in the Mouse Colon and Lung. *Front Physiol* 2018;9:47.
69. Misharin Alexander V, Cuda Carla M, Saber R, Turner Jason D, Gierut Angelica K, Haines GK, Berdnikovs S, Filer A, Clark Andrew R, Buckley Christopher D, et al. Nonclassical Ly6c− Monocytes Drive the Development of Inflammatory Arthritis in Mice. *Cell Rep* 2014;9:591-604.
70. Culemann S, Knab K, Euler M, Wegner A, Garibagaoglu H, Ackermann J, Fischer K, Kienhöfer D, Crainiciuc G, Hahn J, et al. Stunning of Neutrophils Accounts for the Anti-Inflammatory Effects of Clodronate Liposomes. *J Exp Med* 2023;220:e20220525.
71. Wang H, Peng W, Weng Y, Ying H, Li H, Xia D, Yu W. Imbalance of Th17/Treg Cells in Mice with Chronic Cigarette Smoke Exposure. *Int Immunopharmacol* 2012;14:504-512.
72. Duan MC, Tang HJ, Zhong XN, Huang Y. Persistence of Th17/Tc17 Cell Expression Upon Smoking Cessation in Mice with Cigarette Smoke-Induced Emphysema. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:350727.
73. Gutcher I, Becher B. Apc-Derived Cytokines and T Cell Polarization in Autoimmune Inflammation. *J Clin Invest* 2007;117:1119-1127.
74. Lee H, Jeong S, Shin EC. Significance of Bystander T Cell Activation in Microbial Infection. *Nat Immunol* 2022;23:13-22.
75. Lee HG, Cho MZ, Choi JM. Bystander Cd4(+) T Cells: Crossroads between Innate and Adaptive Immunity. *Exp Mol Med* 2020;52:1255-1263.
76. Roberts CA, Dickinson AK, Taams LS. The Interplay between Monocytes/Macrophages and Cd4+ T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol* 2015;6:571.
77. Zheng Y, Sun L, Jiang T, Zhang D, He D, Nie H. Tnfα Promotes Th17 Cell Differentiation through Il-6 and Il-1β Produced by Monocytes in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res* 2014;2014:385352.
78. Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, Hafler DA. Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes Spontaneously Secrete Proinflammatory Cytokines Inducing Th17 Cells1. *J Immunol* 2009;183:4432-4439.

Abstract

The Effect of Cigarette Smoke on the Normal Respiratory Immune System: Focus on Monocytes and Macrophages

Yujin Kim

Department of Translational medicine

College of Medicine

The Graduate School

Seoul National University

Cigarette smoke is a risk factor contributing to the development of chronic lung diseases by inducing airway inflammation and tissue remodeling. As cigarette smoke is composed of various components and has a broad impact on the immune system, the mechanisms by which it affects pulmonary immunity are complex. Pulmonary macrophages are known to regulate airway homeostasis and protect the host from external antigens. However, macrophages exposed to cigarette smoke may exhibit compromised functions and enhanced pro-inflammatory responses, thereby contributing to chronic inflammatory diseases. In this study, we investigated the effects of cigarette smoke on the normal respiratory immune system focusing on monocytes and macrophages and determined their roles in the inflammatory response induced by cigarette smoke exposure.

We established a chronic cigarette smoke exposure mouse model by intranasally administering cigarette smoke extract (CSE) to 8-week-old C57BL/6 mice, three times a week for four weeks. To examine the changes in airway inflammation and immune cell distribution, we performed differential counts of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and conducted histology, flow cytometry, and mRNA expression analyses of lung tissues. Based on the expression levels of CD11c, a marker for tissue-resident macrophages, and CD11b, a marker associated with migratory capacity, we categorized macrophages into distinct subtypes. Specifically, we classified them as $CD11c^{+}CD11b^{-}$ alveolar macrophages (AM), $CD11c^{+}CD11b^{+}$

transitional macrophages (TMs), and $CD11c^{-}CD11b^{+}$ monocyte-derived macrophages (MoMs). Then the expression of IL-13, IL-17A, and ST2 markers in each subset of macrophages was analyzed. Furthermore, $CD11b^{+}$ macrophages were classified into $CD206^{+}CD86^{-}CD11c^{-}$ M2 macrophages and $CD206^{-}CD86^{+}CD11c^{+}$ M1 macrophages. M2 macrophages were further subdivided into $CD206^{+}CD86^{-}MHCII^{+}$ M2a, $CD206^{-}CD86^{+}MHCII^{+}$ M2b, and $CD206^{+}CD86^{-}MHCII^{-}$ M2c.

Chronic exposure to cigarette smoke did not cause any significant changes in the distribution of lung immune cells, but neutrophilic inflammation in the airway was confirmed in the CSE-exposed group. Regarding macrophages, AM and TM increased in the CSE-exposed group compared to the control group, and MoM did not differ between the two groups. CSE exposure induced differentiation of M2 macrophages within $CD11b^{+}$ macrophages, especially M2c macrophages that contribute to tissue remodeling. In addition, in AM and TM, an increase in the expression of IL-13, a key factor that causes airway inflammation and fibrosis, was observed. It was shown that CSE can contribute to tissue remodeling by inducing M2 macrophage polarization. Interestingly, IL-17A expression was detected in all macrophage subsets, including AM, TM, and MoM, exposed to CSE. This suggests that macrophages exposed to CSE can act as the main source of IL-17A and contribute to the neutrophilic inflammation.

CSE exposure also influenced the IL-33/ST2 signaling pathway in macrophages. CSE exposure augmented the expression of *Il-33* in lung tissues and upregulated the expression of the IL-33 receptor, *St2*, in macrophages. Significantly, the expression of ST2 was specifically elevated in $IL\text{-}17A^{+}$ macrophages, while no such expression was observed in $IL\text{-}13^{+}$ macrophages. *In vitro* and *Ex vivo*, the gene expression of *St2* and pro-inflammatory cytokines, including *Tnfα, Il-1β, Mcp1*, *Il-6*, and *Il-23a*, was upregulated with IL-33 treatment when preceded by CSE exposure but not with either single stimulation of IL-33 or CSE exposure. CRL-2019 cells exposed to CSE showed the activation of Myd88/NF-κB signaling, downstream of the IL-33/ST2 pathway. These findings demonstrated that cigarette smoke modulates the responsiveness of macrophages to IL-33, leading to the induction of a pro-inflammatory response. Although we have not elucidated the mechanism, previous studies have shown that IL-33 is a major factor in enhancing

Myd88-dependent TLR signaling. Consequently, it is plausible that exposure to cigarette smoke activated the Myd88/NF-kB signaling pathway in macrophages, while the increased levels of IL-33 in the lungs synergistically contributed to the induction of a pro-inflammatory response. It is also supposed that IL-17A$^+$ macrophages identified in the CSE exposed group may be associated with IL-33/ST2 mediated pro-inflammatory macrophages.

Chronic exposure to cigarette smoke induces the recruitment of Ly6c$^-$CD11b$^+$ macrophages into the lungs. Mouse monocytes are classified into Ly6c$^+$ classical monocytes and Ly6c$^-$ non-classical monocytes. Previous studies have indicated that these subsets have distinct roles depending on the characteristics and timing of inflammation. To investigate the role of increased Ly6c$^-$CD11b$^+$ macrophages upon CSE exposure, Ly6c$^-$ monocytes were adoptively transferred into the tail vein, and CSE was intranasally administered. It was observed that neutrophilic inflammation significantly increased in the Ly6c$^-$ monocyte transfer group, suggesting a crosstalk between Ly6c$^-$ monocytes and CSE-mediated neutrophilic inflammation. Furthermore, it was proposed that Ly6c$^-$ monocytes infiltrating the lungs could undergo differentiation into IL-17A$^+$ pro-inflammatory macrophages and IL-13$^+$ macrophages, which are known to participate in tissue remodeling, thus acting as key mediators of inflammatory responses.

Lastly, CSE exposure induces a Th17 immune response in the lung. To confirm whether macrophages affect the adaptive immune system, co-culture experiments were conducted with naive CD4$^+$ T cells. It was observed that IL-33/ST2-mediated pro-inflammatory macrophages, activated by CSE, induced the differentiation of Th17 cells. These findings suggest that macrophages, activated by cigarette smoke, can be a major factor in the activation of the adaptive immune system by changing the microenvironment in the lungs, especially in the context of Th17 immune response.

This study confirms the potential contributions of monocytes and macrophages to airway inflammation in response to chronic exposure to cigarette smoke. In particular, we demonstrated that Ly6c$^-$ monocytes and IL-33/ST2-mediated pro-inflammatory macrophages induce neutrophilic inflammation and alterations in the adaptive immune system, ultimately leading to airway inflammatory responses.

Keywords: Cigarette smoke, Innate immune response, Monocytes, Lung macrophages, IL-33/ST2 pathway
Student Number: 2021-23430