

ORIGINAL ARTICLE

마우스의 급성 DSS 장염 모델에서 편도 유래 중간엽 줄기 세포의 치료 효과

송은미, 정성애, 이고은, 장지영, 이강훈, 태정현, 문창모, 주양희, 김성은, 정혜경, 심기남

이화여자대학교 의과대학 내과학교실 의학연구소

The Therapeutic Efficacy of Tonsil-derived Mesenchymal Stem Cells in Dextran Sulfate Sodium-induced Acute Murine Colitis Model

Eun Mi Song, Sung-Ae Jung, Ko Eun Lee, Ji Young Jang, Kang Hoon Lee, Chung Hyun Tae, Chang Mo Moon, Yang-Hee Joo, Seong-Eun Kim, Hye-kyung Jung and Ki-Nam Shim

Department of Internal Medicine, Ewha Medical Research Institute, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells currently under investigation for its efficacy as the treatment for inflammatory bowel disease. In this study, we evaluated the efficacy of tonsil-derived mesenchymal stem cells (T-MSCs) as a novel source of mesenchymal stem cells and traced their localization in a murine model of acute colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS).

Methods: C57BL/6 mice were randomly assigned to the following three groups: the normal control group, DSS colitis group (DSS+phosphate buffered saline), and T-MSC group (DSS+T-MSCs, 1×10^6). The severity of colitis was assessed by determining the severity of symptoms of colitis, colon length, histopathologic grade, and levels of inflammatory cytokines. T-MSCs labeled with PKH26 were traced *in vivo*.

Results: The T-MSC group, compared with the DSS colitis group, showed a significantly lower disease activity index (11.3 ± 1.5 vs. 8.3 ± 1.9 , $p=0.015$) at sacrifice and less reduction of body weight ($-17.1 \pm 5.0\%$ vs. $-8.1 \pm 6.9\%$, $p=0.049$). In the T-MSC group, the histologic colitis score was significantly decreased compared with the DSS colitis group (22.6 ± 3.8 vs. 17.0 ± 3.4 , $p=0.039$). IL-6 and IL-1 β , the pro-inflammatory cytokines, were also significantly reduced after a treatment with T-MSCs. *In vivo* tracking revealed no PKH26-labelled T-MSCs in the colonic tissue of mice with acute colitis.

Conclusions: In the acute colitis model, we demonstrated that the administration of T-MSCs ameliorates inflammatory symptoms and histology. Moreover, the anti-inflammatory activities of T-MSCs were independent of gut homing.

(Korean J Gastroenterol 2017;69:119-128)

Key Words: Palatine tonsil; Mesenchymal stem cells (MSC); Inflammatory bowel disease

서론

궤양성 대장염과 크론병으로 대표되는 염증성 장질환은 만성 질환으로 재발과 악화를 반복하여 환자의 삶의 질을 악화

시킨다. 염증성 장질환의 유병률과 발병률은 최근 크게 증가하고 있으며 이는 한국에서도 마찬가지이다.^{1,2} 염증성 장질환의 발병 기전에 대하여 여러 연구 결과가 있었으나 아직까지 명확하게 밝혀지지 않은 부분이 많다. 유전과 환경 등도 중요한

Received October 22, 2016. Revised November 22, 2016. Accepted December 2, 2016

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2017. Korean Society of Gastroenterology.

교신저자: 정성애, 07985, 서울시 양천구 안양천로 1071, 이화여자대학교 의과대학 내과학교실

Correspondence to: Sung-Ae Jung, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Ewha Womans University, Ewha Medical Research Institute, 1071 Anyangcheon-ro, Yangcheon-gu, Seoul 07985, Korea. Tel: +82-2-2650-5053, Fax: +82-2-2655-2076, E-mail: jassa@ewha.ac.kr

Financial support: This study was supported by a grant of the National Research Foundation of Korea, Ministry of science, ICT and Future Planning, Republic of Korea (NRF-2013R1A1A2014344). Conflict of interest: None.

역할을 하는 것으로 보이며 취약한 개체에서 장내 세균에 대하여 과도한 면역 반응이 발생하여 생기는 것으로 생각된다.¹

염증성 장질환에 대한 치료는 기존의 관용적인 치료와 더불어 생물학적 치료가 주가 되고 있다. 기존의 스테로이드, 5-aminosalicylic acid, azathioprine들을 이용한 치료에는 지속적인 관해를 유지하는 환자들이 일부에 불과하며 스테로이드 독성 및 azathioprine에 의한 혈구 감소를 포함한 많은 부작용이 발생한다. 따라서, 최근 면역 경로를 대상으로 하는 항 종양 괴사인자(anti-tumor necrosis factor, anti-TNF)가 주가 되는 생물학적인 치료가 많이 행해지고 있다. 하지만, 생물학적인 치료에도 여러 가지 부작용이 있으며 1/3의 환자에서 반응이 없고 누공성 염증성 장질환에서 수술 치료가 불가능한 경우, 수차례 수술적 치료를 반복해야 하는 경우 등의 치료가 힘든 염증성 장질환 사례들로 인하여 새로운 치료법의 필요성이 대두되고 있다.^{3,4}

줄기 세포 치료(stem cell therapy)는 최근 다양한 난치성 질환의 잠재적인 새로운 치료법으로 각광받고 있다. 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell)는 다양한 조직에 존재하는데 실험적 환경에서 집락(colony)을 형성하고 중배엽 기원의 다양한 조직, 즉, 지방, 연골, 뼈 세포들로 분화할 수 있는 능력을 가지는 것을 특징으로 한다. 중간엽 줄기 세포는 다양한 세포로의 분화능을 가지고 있을 뿐만 아니라 면역 세포의 증식을 억제하고 다양한 사이토카인 분비를 통하여 면역 조절 세포들의 활동을 증진시키고 염증 반응을 억제하고 조직 재생을 돕는 기능을 한다.^{5,6} 또한, 중간엽 줄기 세포를 동종 이형간 혹은 이종 간에 배양 및 이식을 시행한 경우 1형 조직적합성 항원은 발현하지만 2형 조직적합성 항원은 발현하지 않기 때문에 동종이형반응(allogenic response)과 같은 면역 반응이 유발되지 않는 장점도 있다.⁷ 이러한 중간엽 줄기 세포의 기능을 이용하여 다양한 질환에의 적용이 시도되고 있는데 염증성 장질환에서도 인체 실험 및 동물 실험에서 그 항염증 효과가 증명된 바 있다.⁸⁻¹⁰ 골수(bone marrow)와 지방 조직(adipose tissue)이 주요한 중간엽 줄기 세포의 원천으로 알려져 있지만, 치은조직, 태반, 그리고 양막 등 다양한 다른 조직에서도 최근 중간엽 줄기 세포가 존재하는 것으로 보고되고 있다. 하지만, 이러한 원천은 임상에 활용되기에 적절한 수의 세포를 얻기 힘들고 세포를 얻기 위해서 침습적인 시술을 거쳐야 한다는 단점을 가지고 있다.

최근 편도 조직에서 분리한 편도 유래 중간엽 줄기 세포(tonsil-derived mesenchymal stem cells, T-MSC)가 중간엽 줄기 세포의 특징을 가지는 것이 밝혀졌다.^{11,12} 인간 편도 조직은 사춘기 무렵까지는 면역 기관으로서 작용하나 이후에는 점차 퇴화하는 기관으로, 비정상적으로 커지거나 염증이 만성화되면 편도절제술을 통하여 제거한다. 편도 절제술은 소

아 환자에서 가장 흔하게 행해지는 수술 중 하나로, 수술적으로 제거되어 버려지는 편도 조직에서 쉽게 줄기 세포를 얻을 수 있다는 점이 T-MSC의 가장 큰 장점이 있다.¹³ 기증자의 연령이 비교적 어려서 분화하는데 짧은 시간이 소요된다는 것도 장점이다. 또한, 여러 기증자로부터 채취한 T-MSC가 특정 세포의 우세 없이 잘 용화되어 자라고, 냉동저장과 해동하는 과정에서 줄기세포로서의 특성이 손상되지 않고 잘 보존된다는 점에서 미래의 줄기 세포 은행 역할을 하여 임상에 쉽게 활용 가능할 것으로 생각된다.¹⁴

본 연구에서는 급성 마우스 장염 모델에서 새로운 기원의 중간엽 줄기 세포인 T-MSC를 적용하여 그 효과를 확인하고 그 작용 기전에 대하여 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용된 동물은 7-8주령의 수컷 C57BL/6 마우스로 오리엔트 바이오 사(Orient Bio Co., Ltd., Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 마우스는 이화여자대학교 의과연구소의 동물 실험실에서 7일간의 적응 기간 후 실험을 진행하였으며 적응 기간 동안 물과 사료를 제한하지 않았다. 실험동물에 표준화된 환경을 제공하였으며, 12시간 간격으로 낮과 밤을 유지하였고, 실내 온도($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) 및 습도(55-55%)를 적정 수준으로 유지시켰다. 모든 실험은 이화여자대학교 의학전문대학원의 동물실험 윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다(승인 번호: ESM 14-0262).

2. T-MSC의 배양

편도 조직은 편도 절제술을 받는 환자들에서 사전 동의 하에 얻어졌으며 임상실험 윤리위원회의 승인을 얻었다(ECT 11-53-02). 본 연구에 사용된 T-MSC는 기존의 이화편도줄기 세포 연구센터에서 분리 및 배양에 성공한 세포를 2번째 계대 배양단계(passage 2)에서 분양 받아 실험하였다.^{14,15} 분양 후 T-MSC를 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM 용액(Dulbecco modified eagle medium)에서 배양하였으며 3-4일에 한번씩 신선한 배지로 바꾸어 주었다. 실험에는 6-8 계대 배양단계(passage 6-8)의 T-MSC를 사용하였다.

3. 동물실험

실험에 사용된 마우스는 정상 대조군을 제외하고 dextran sulfate sodium (DSS)를 이용하여 급성 장염을 유발하였다. 급성 장염은 3% DSS (MP biochemical, Irvine, CA, USA) 용액을 총 7일간 복용시켜 유도하였으며 DSS 복용 3일째에 T-MSC를 주입하여 그 효과를 평가하였다. T-MSC의 치료

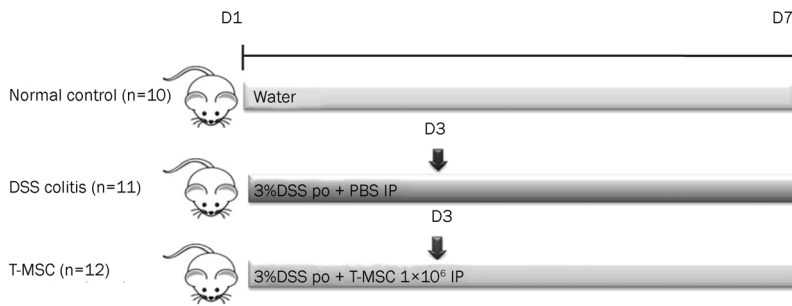


Fig. 1. Induction of acute colitis. Acute colitis was induced by 3% DSS treatment for 7 days. T-MSC was injected intraperitoneally on day 3 after an induction of acute colitis. PBS only was administered as a control in the DSS colitis group. DSS, dextran sulfate sodium; T-MSC, tonsil-derived mesenchymal stem cell; PBS, phosphate-buffered saline.

효과를 판단하기 위하여 정상군, 장염 대조군과 비교 분석하였다. 정상 대조군은 마우스에 어떠한 처치도 시행하지 않은 표준화된 물과 사료를 제공한 군으로 삼았고 장염 대조군은 DSS로 장염을 유도한 군으로 삼아 DSS로 장염을 유도하며 T-MSC를 투여하여 치료를 시행한 T-MSC 투여군과 비교하였다. 이때 장염 대조군은 T-MSC 투여 시기인 DSS 복용 3일째에 T-MSC의 투여 매개체인 phosphate buffered saline (PBS)만을 투여하였다(Fig. 1). 급성 장염을 유도하는 7일 동안 체중 변화, 변의 굳기, 변이나 항문에서 육안적으로 관찰되는 혈변 유무를 확인하여 매일 질병 활성 척도(disease activity index, DAI)를 측정하였다.¹⁶ 마우스는 장염 유도 주기가 끝난 후 실험 8일째에 희생시켜 맹장에서 항문까지 장을 적출하여 장 길이를 측정하였고, 장의 근위부와 원위부에서 검체에서 얻었다.

4. 조직학적 평가

적출된 대장 조직은 10% 포르말린에 고정 후 일반적인 파라핀 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다. 조직학적인 분석은 각각 근위부의 2개 검체, 원위부의 2개 검체, 총 4개의 검체에 대하여 이루어졌으며 이전에 보고된 조직학적 장염 점수 체계(histologic colitis scoring system)를 따랐다. 각 검체의 염증의 정도, 염증의 범위, 음와(crypt) 손상 정도, 전체 대장의 손상 범위(%)를 측정하여 각 변수를 합산하였다.¹⁷

5. 편도 유래 줄기 세포의 면역억제 효과의 평가

장조직에서 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α , IL-1 β 및 IL-17과 케모카인인 KC, MIP-2의 수치를 실시간 중합효소연쇄반응(real-time polymerase chain reaction) 방법을 통하여 측정하였다. 장조직 검체는 -70°C 초저온 냉동고에 동결시켜 분석 전까지 보관하였다. 마우스 장 조직에 Easy-BLUE™ (Intron biotechnology, Korea) 1 mL를 넣고, 잘게 부순 후 여기에 chloroform (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) 200 μ L를 넣고, 세계 소용돌이 혼합(vortexing)하였다. 실온에서 2-3분간 방치한 후에 12,000 rpm (4°C)으로 10분간 원심 분리한

Table 1. Primer Sequences of the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (real time-PCR)

Primer	Sequence
GAPDH	F 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' R 5'-TCCTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3'
IL-6	F 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3' R 5'-TCCACGATTCCAGAGAAC-3'
TNF-alpha	F 5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3' R 5'-AGATACCAAATCGGCTGACG-3'
IL-17	F 5'-TCCCTCTGTGATCTGGGAAG-3' R 5'-CTCGACCCTGAAAGTGAAGG-3'
IL-1 β	F 5'-GAGCCCATCCTCTGTGACTC-3' R 5'-TCCATTGAGGTGGAGAGCTT-3'
KC	F 5'-CAATGAGCTGCGCTGTCAAGT-3' R 5'-CTTGGGGACACCTTTTAGCATC-3'
MIP-2	F 5'-CCAAGGGTTGACTTCAAGAAC-3' R 5'-AGCGAGGCACATCAGGTACG-3'

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; KC, keratinocyte chemoattractant; MIP, macrophage inflammatory protein.

후, 상층액을 새로운 튜브에 담아 여기에 동량의 isopropanol (Sigma)을 넣고 전도 혼합(invert mixing)한 뒤에 실온에서 5분간 방치한 후에 다시 12,000 rpm (4°C)으로 10분간 원심 분리하였다. 세포 소결체(pellet)가 보이면 75% ethanol로 2-3번 세척한 후에 실온에서 말리고, nuclease free water로 소결체를 녹인 후, nano-drop으로 RNA농도를 측정하였다. 이후 2 μ g 상당량의 RNA와 oligo dT primer 0.5 μ g를 넣고, 70°C에 10분간 둔 후, 여기에 M-MLV RT (Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) 200 unit, rRNasin Ribonuclease inhibitor (Promega) 25 unit, 5 \times RT buffer와 2 mM의 dNTP를 넣고, nuclease free water로 25 μ L를 맞춘 후, 42°C에서 60분간 둔 후, 95°C에서 5분간 둔 후에 4°C에 보관하였다. 합성된 cDNA 0.1 μ g을 주형으로 2X Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)와 각각의 primer set을 이용하여 7000 Real time PCR system (Applied Biosystems)을 통하여 분석하였다. 본 실험에서 사용하는 primer는 Macrogen (Korea)사로부터 제조되었으며, 각각의 염

기서열은 표 1과 같다(Table 1). 각 PCR 반응은 95°C에서 10 분간 예비 변성 한 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 40회 반복하여 수행하였다. PCR 반응 종결 후 melting curve 작성을 통하여 유전자 증폭의 정확성을 재확인하였다. 유전자 발현량의 내부 보정을 위하여 칩거(house keeping) 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 이용하였고, 상대적 유전자 발현량은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값으로 표시하였다.

6. 편도 유래 줄기 세포의 세포 자체로서 작용의 추적 (편도 유래 줄기 세포의 생체 내 위치 추적)

PKH26 red fluorescent linker MINI kit (Sigma-Aldrich)를 이용하여 T-MSC의 생체 내 작용 위치에 대하여 알아보았다. 과정을 간략하게 기술하면 먼저 세포 부유액(2×10^7 cells/mL)과 염료 용액(4×10^{-6} M PKH25)을 혼합하여 피펫을 이용하여 잘 섞었다. 실온에서 5분간 방치 후, 동일한 용량의 혈청을 섞어서 다시 1분간 방치하였다. 이후 세포만을 10분간 원심 분리(400 g, 실온)하여 거른 뒤 동일한 용량의 매체에 섞는 방식을 3회 반복한 뒤 최종적으로 마우스에 투약하기 위하여 2 mL PBS 용액에 섞었다. 실험 3일째에 PKH26으로 표시한 T-MSC를 마우스에 주입한 뒤 5일 뒤인 8일째에 마우스를 희생시켜 동일한 방식으로 조직을 얻었다. 조직을 동결하여 5- μ m 길이로 절단한 뒤 4',6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)가 포함된 VECTASHIELD® 봉입물질로 덮어 형광현미경(Olympus fluorescence microscope, Tokyo, Japan)으로 관찰하였으며 카메라(Moticam pro camera, Hongkong)로 사진을 촬영하였다.

7. 통계분석

통계 처리는 SPSS for Window 21.0 version (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였으며, 검사 결과는 평균값과 표준편차로 표기하였다. 실험군 간의 차이에 대해서는 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U 검정을 시행하여 p 값이 0.05 이하일 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 급성 장염 모델에서 T-MSC 치료 효과

T-MSC를 급성 장염 모델에 DSS 투여 3일째에 복강 내 주입 방식으로 투여하였다. DSS 투여 4일째부터 대부분의 마우스가 궤양성 대장염 증상과 비슷한 설사, 혈변과 체중 감소 등의 심한 장염 증상을 보였다. 임상 증상을 DAI로 평가하여 보았을 때 T-MSC 투여에 의하여 장염 증상의 유의한 호전이 관찰되었다(11.3 ± 1 vs. 8.3 ± 1.9 , $p=0.015$; Fig. 2A, B). 또한,

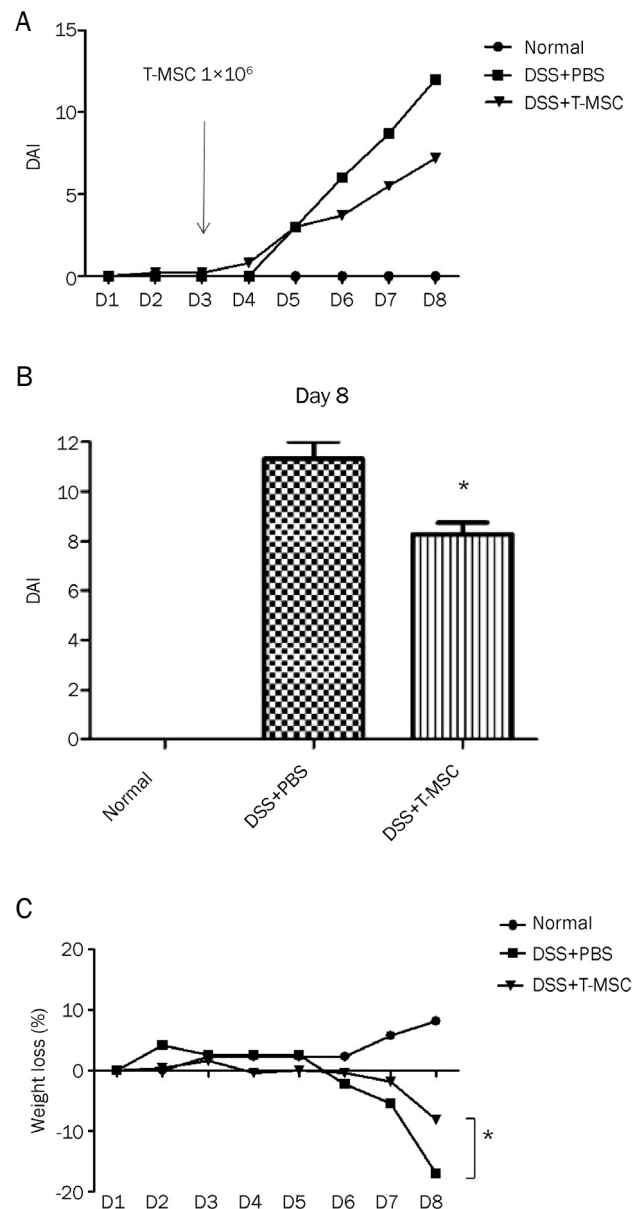


Fig. 2. Effect of treatment with T-MSCs on inflammatory symptoms. T-MSC ameliorated the inflammatory symptoms assessed by the DAI in DSS-induced acute colitis. (A) The difference of DAI between the T-MSC group and the DSS colitis group assessed daily was maximized by day 8. (B) The mean DAI of the T-MSC group on day 8 was significantly lower than that of the DSS colitis group (11.3 ± 1.5 vs. 8.3 ± 1.9 , $p=0.015$). (C) The reduction of body weight at sacrifice was attenuated with T-MSCs treatment ($-17.1 \pm 5.0\%$ vs. $-8.1 \pm 6.9\%$, $p=0.049$). Data are presented as the mean \pm SEM (* $p<0.05$). T-MSCs, tonsil-derived mesenchymal stem cells; DAI, disease activity index; DSS, dextran sulfate sodium; PBS, phosphate-buffered saline.

급성 장염 유도 마지막 날을 기준으로 평가한 최종적인 체중 감소도 T-MSC 투여에 의하여 완화되었다($-17.1 \pm 5.0\%$ vs. $-8.1 \pm 6.9\%$, $p=0.049$; Fig. 2C).

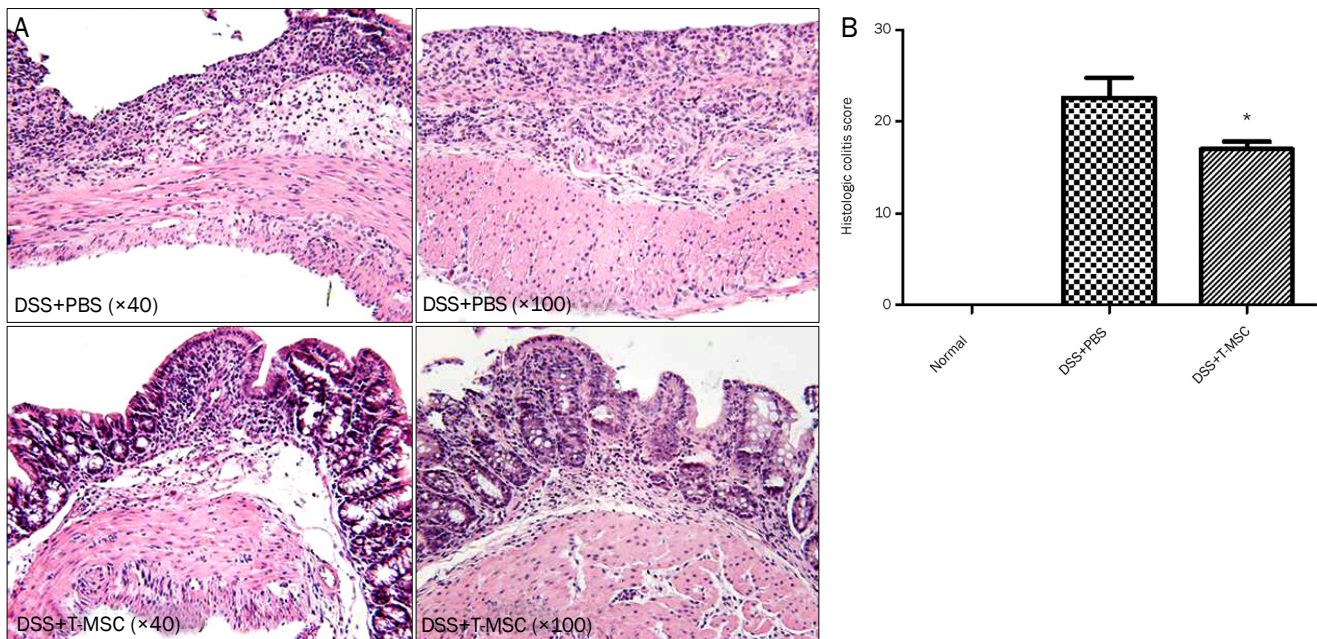


Fig. 3. Treatment with T-MSCs reduced the colonic damage microscopically. (A) The induction of acute colitis showed an extensive infiltration of inflammatory cells, crypt damage, edema, and ulceration. Treatment of T-MSCs reduced the infiltration of inflammatory cells and extent of disease. (B) The histologic colitis score was significantly reduced after T-MSCs treatment ($p < 0.05$). DSS, dextran sulfate sodium; PBS, phosphate-buffered saline; T-MSC, tonsil-derived mesenchymal stem cell.

실험 8일째에 마우스를 희생하여 맹장에서 항문에 이르는 대장의 길이를 측정하였다. 정상에서 평균 86.5 ± 12.0 mm이었던 장길이에 비해, DSS를 투여한 장염 대조군에서는 53.7 ± 7.1 mm로 장길이가 짧았다($p < 0.01$). T-MSC의 투여에 의하여 대장의 장염에 의하여 유도된 장길이 단축은 호전되는 소견을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(53.7 ± 7.1 mm vs. 59.9 ± 4.1 mm, $p = 0.088$).

2. T-MSC에 의한 조직학적 호전

조직학적 점수 체계를 이용하여 T-MSC가 급성 장염에 의하여 유도된 염증 소견을 호전시키는지 알아보았다. 근위부와 원위부 대장에서 검체를 각각 얻어 조사하였다. 염증은 전체적인 대장 염증의 중증도, 염증의 범위, 선와 손상 및 침범 정도에 기초하여 평가하였다. 급성 장염이 유도된 마우스에서 대장 점막, 점막하층과 심한 경우 근층까지 염증이 관찰되었으며 다양한 염증 세포의 침투, 선와 손상 및 배상 세포의 소실이 동반되어 있었고 일부 염증이 심한 부위는 깊은 궤양이 보였다. 장염 대조군에 비하여 T-MSC 투여군은 염증 세포 침투의 감소, 염증 범위의 감소 및 선와 손상의 완화 등 염증의 호전 소견이 관찰되었다. 조직학적 점수 체계로 평가하여 보았을 때 T-MSC 투여군에서 장염 대조군에 비하여 점수가 유의하게 감소되었다(22.6 ± 3.8 vs. 17.0 ± 3.4 , $p = 0.039$; Fig. 3).

3. T-MSC 투여에 의한 염증성 사이토카인 및 케모카인의 변화

DSS에 의하여 유도된 장염 모델에서 T-MSC의 치료 효과의 기전에 대하여 알아보려고 채취한 대장 조직에서 염증성 사이토카인과 케모카인을 실시간 중합효소연쇄반응을 통하여 측정하였다. Th1과 Th17 관련 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-17은 DSS로 급성 장염이 유도된 장염 대조군에서 모두 증가된 소견을 보였다(Fig. 4). T-MSC의 투여에 의하여 IL-6와 IL-1 β 는 대장 점막에서 유의하게 감소하였다(IL-6, $p = 0.007$; IL-1 β , $p = 0.049$; Fig. 4A, C). TNF- α 수치 또한 T-MSC 투여에 의하여 감소하였으나 통계적인 의미는 없었다(Fig. 4B). IL-17 수치는 장염 대조군과 T-MSC 투여군에서 큰 차이가 없었다(Fig. 4D).

케모카인 KC (CXCL1)과 MIP-1 (CXCL2) 또한 장염이 유도된 마우스의 대장 조직에서 증가된 소견이 보였다. 장염 유도군과 T-MSC 투여군을 비교하였을 때 유의미한 차이를 발견할 수는 없었으나 T-MSC의 투여에 의하여 MIP-2가 다소 감소하는 경향이 관찰되었다($p = 0.081$; Fig. 4F).

4. T-MSC의 생체 내 위치 추적

생체 내에서 T-MSC의 작용 위치에 대하여 알아보기 위하여 PKH26 형광 물질로 표시한 T-MSC를 정상 마우스와 급성 장염을 유도한 마우스에 각각 투여하였다. 투여 5일 후에 마우스를 희생시켜 PKH26으로 표시된 T-MSC (T-MSC-PKH26)

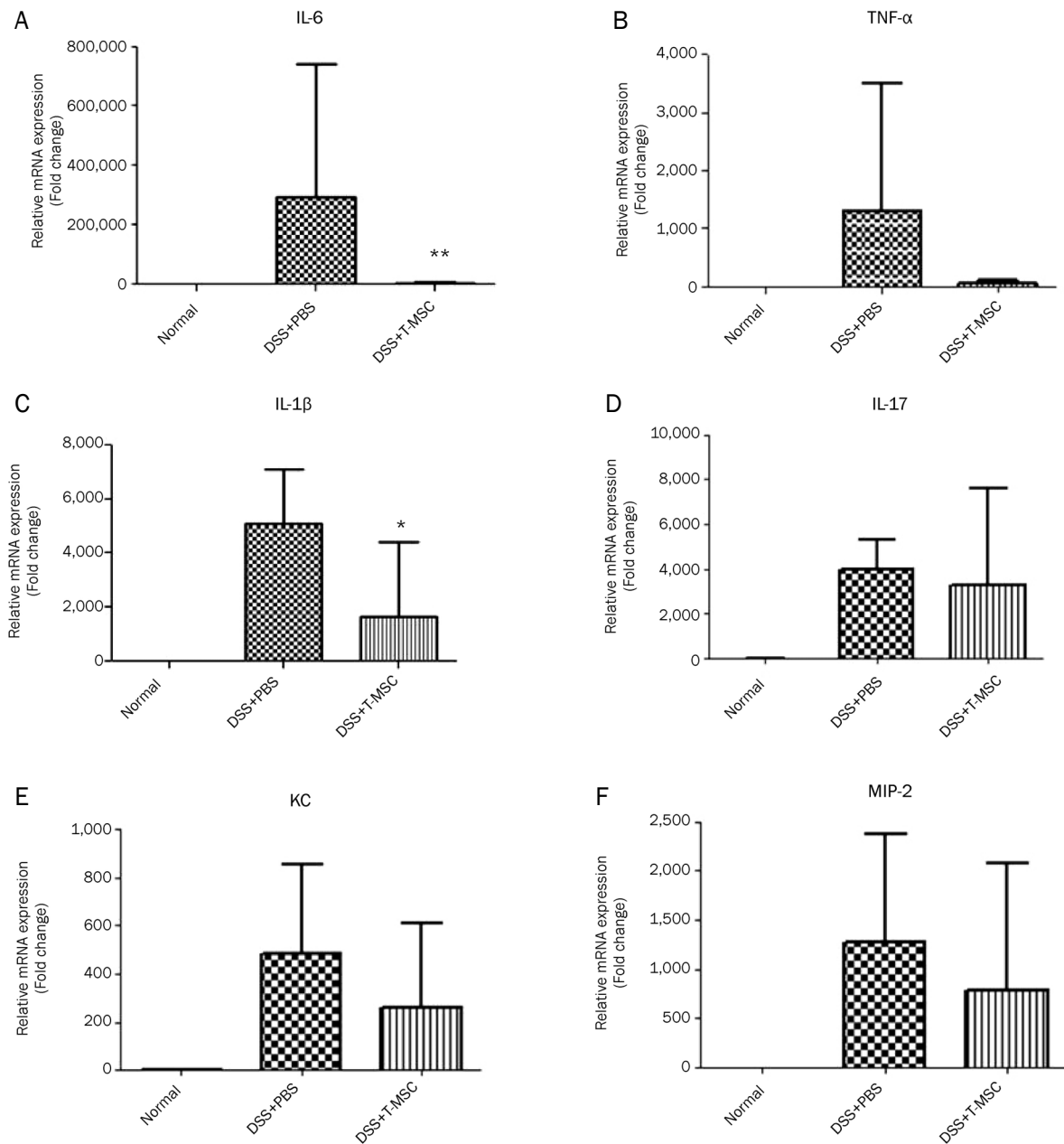


Fig. 4. The effect of T-MSCs on the expression of pro-inflammatory cytokines, IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-17 and chemokines, KC, MIP-2. The mRNA expression of inflammatory mediators was measured in the colonic mucosa by real-time PCR. The level of IL-6 (A) and IL-1 β (C) was reduced significantly in the colonic mucosa after a treatment with T-MSCs compared with the DSS colitis group. The level of TNF- α (B), IL-17 (D), KC (E), and MIP-2 (F) were not different between the two groups. Data are presented as the mean \pm SEM. (* p <0.05, ** p <0.01). T-MSCs, tonsil-derived mesenchymal stem cells.

의 위치를 대장 조직에서 현미경적으로 확인하였다. 급성 장염이 유도된 마우스에서 대장 조직을 검사하였을 때 T-MSC-PKH26 세포는 발견되지 않았다. 또한, 장염이 유도되지 않은 정상 마우스에서 T-MSC-PKH26의 위치를 추적하였을 때 역시 대장 조직에서 발견되지 않았다(Fig. 5).

고찰

최근 염증성 장질환에서 줄기 세포를 이용한 치료가 미래의 유용한 치료가 될 것이라고 전망하는 많은 연구 결과가 나오고 있다.¹⁸⁻²⁰ 하지만, 아직 실제로 임상에 적용하기 위해서는 여러 가지 해결해야 할 문제점들이 남아 있다. T-MSC는 지방 세포와 골수 등 다른 줄기세포의 원천을 대체할 수 있는

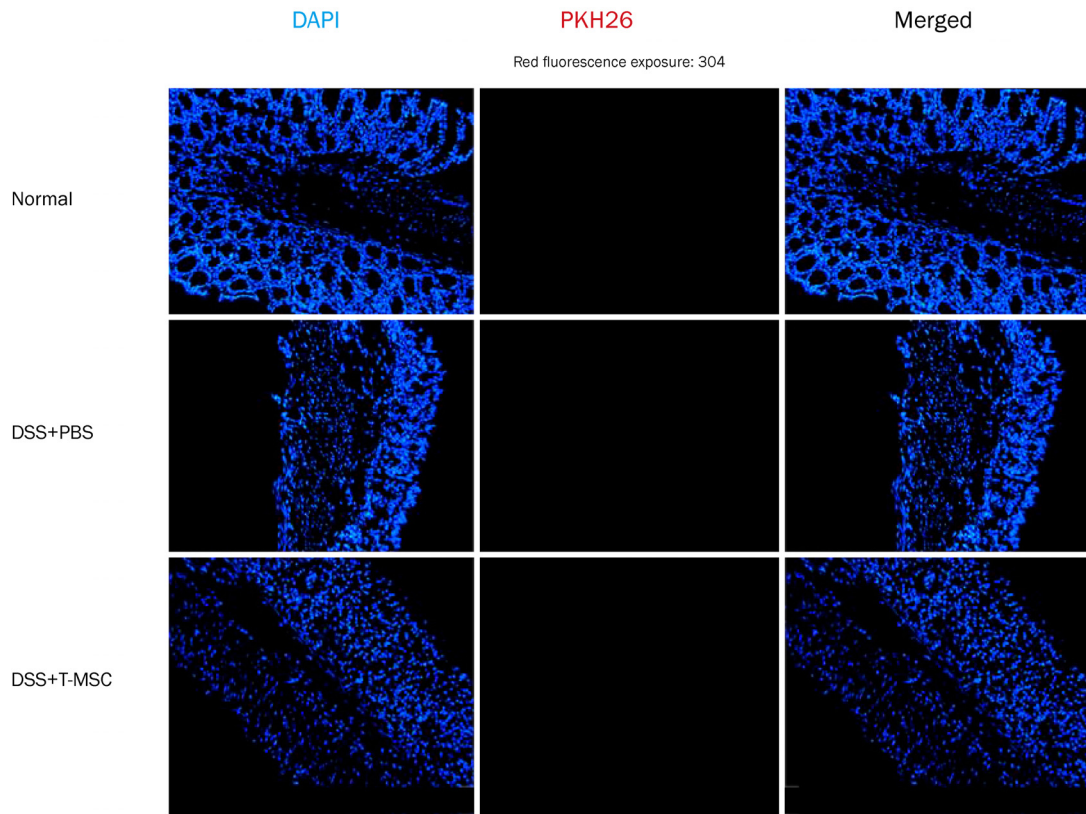


Fig. 5. Fluorescent microscopy analysis of T-MSC labeled with PKH26. The localization was measured 5 days after intraperitoneal injection. Microscopic examination revealed no distribution of red colored T-MSC-PKH26 cells in the colon of mice with acute colitis. In merge images, nuclei were stained with DAPI (blue). Original magnificationx200. T-MSC, tonsil-derived mesenchymal stem cell; DSS, dextran sulfate sodium; PBS, phosphate-buffered saline.

새로운 줄기세포로서 제안되었다.¹⁴ 본 연구에서는 DSS로 유도된 마우스 급성 장염 모델에서 T-MSC를 적용하여 치료제로서의 가능성을 확인하였다. T-MSC 투여에 의하여 설사, 체중감소 및 혈변을 기준으로 하는 DAI가 낮아져 임상 증상의 호전 소견을 보였으며 DSS에 의하여 유도되는 장 길이의 단축이 완화되었다. 현미경적으로 관찰하였을 때 조직학적인 호전 소견도 뚜렷하였다. 또한, 이러한 염증의 호전은 염증성 사이토카인 수치 완화와 관련 있음을 증명하였다.

이전의 연구에서 T-MSC는 다양한 사이토카인의 자극에 의하여 여러 세포로 분화하는 능력을 가진 것으로 보고되었다.^{11,14} T-MSC의 치료 효과는 이러한 다양한 세포로 분화하여 조직의 재생을 돕는 능력에서 기원하는 것으로 보여지는데 이전에 시행된 동물 실험에서 T-MSC가 분화하여 부갑상선 조직과 골격근을 대체하는 것이 증명되었다.^{21,22} T-MSC의 조직 재생 능력뿐만 아니라 면역 억제 기능도 중요한 작용을 하는데 이전 연구에서 급성과 만성 간 손상 모델에서 T-MSC를 투여하였을 때 유의하게 간 조직의 손상이 완화되었으며 염증성 사이토카인의 수치도 완화시킴이 보고되었다.^{15,23}

이 연구는 염증성 장질환과 유사한 급성 장염 동물 모델에

서 T-MSC의 효과를 증명한 최초의 연구이다. 질병의 증상 초기에 T-MSC의 단일 투여(1×10^6 cells)만으로 체중 감소를 포함한 임상 증상이 호전되었으며 염증 세포의 침투 감소를 비롯한 조직학적인 소견 전반이 호전되었다.

장염 모델에서는 염증성 장질환 환자에서와 같이 Th1 세포와 Th2 세포가 활성화되고 이에 따라 활성화된 대식세포가 호중구를 불러모아 점막에서 심한 염증을 일으킨다.²⁴ 실제로 본 실험에서 유도된 장염 모델에서도 IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-17과 같은 도움 T 세포와 관련된 염증성 사이토카인의 수치가 조직에서 증가되었다. IL-6와 IL-1 β 는 활성화된 대식세포가 분비하는 사이토카인으로 대장 점막의 방어에 중요한 역할을 하며 활동기의 궤양성 대장염 환자의 점막에서 활성화되는 인자로 알려져 있다.^{25,26} 이전의 임상 및 실험 연구에서 항 IL-6 항체와 항 IL-1 β 항체를 투여하였을 때 장염의 증상과 조직학적 소견이 호전됨이 관찰되었다.^{27,28} 또한, 다른 기원의 중간엽 줄기 세포를 이용한 연구에서 장염 모델에서 줄기 세포 투여를 통하여 IL-6와 IL-1 β 의 수치가 완화된 소견도 보고되었다.^{29,30} 본 연구에서도 이전 연구들의 소견과 마찬가지로 T-MSC의 투여에 의하여 장염 모델의 대장 점막에서 IL-6

과 IL-1 β 의 mRNA의 발현이 감소함이 증명되어 T-MSC의 치료 효과가 이러한 염증성 사이토카인 수치의 완화와 관련 있음을 시사하였다. 또한 이전 연구에서 T-MSC가 수지 세포(dendritic cell)를 억제하는 것이 밝혀진 것을 고려하였을 때 활성화된 수지 세포에서 많이 분비되는 IL-6가 억제된 것은 이전의 연구 결과와도 관련 있는 것으로 생각된다.³¹

TNF- α 는 Th1관련 사이토카인으로 알려져 있고 IL-17은 Th17 관련 사이토카인으로 이 둘 모두 IL-6와 더불어 중간엽 줄기세포의 작용으로 억제되는 것이 보고되었다.^{32,33} 하지만, 본 실험에서는 T-MSC의 투여에 의하여 이 두 가지 사이토카인의 수치가 감소가 명확하지 않았다. 추가적으로 각 군 당 한 마리씩 사이토카인 발현 분석(cytokine array)을 통하여 조직의 단백질 수치를 분석하여 보았을 때에도 IL-1 β 와 IL-6 level은 T-MSC 투여군에서 억제된 반면 IL-17과 TNF- α level은 차이가 없었다. 이러한 이유는 명확하지 않으나 한 가지 가능한 설명은 TNF- α , IL-17가 T-MSC를 투여한 직후에 조직에서 억제되었다가 마우스를 희생할 당시에는 억제 소견이 완화되었을 가능성이 있으며 생체 내에서 다양한 사이토카인의 상호 작용이 복합적으로 이루어지므로 이에 따라 수치가 충분히 감소되지 않았을 가능성이 있다. 또한, 생체 내에서는 다양한 물질에 의한 상호작용으로 T-MSC의 사이토카인 억제 효과가 제대로 측정되지 않았을 가능성이 있으며 세포 수준에서 실험을 진행하였을 때의 결과와 다를 수 있으므로 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다.

이전에 Castelo-Branco 등이 시행한 연구에서 Trinitro-benzenesulfonic acid로 유도된 장염 모델에 중간엽 줄기 세포를 복강 내로 투여하였을 때 염증이 있는 장으로 줄기 세포가 이동하여 조직에 정착된 모습이 관찰되었다.³⁴ 또한, 급성 간손상 모델에서 T-MSC가 염증이 있는 간으로 이동함이 증명되었다.¹⁵ 본 연구에서는 T-MSC의 위치를 생체 내에서 추적하였을 때 염증이 있는 장으로 이동하는 것이 관찰되지 않았다. 각 연구마다 연구 과정이 다르고 사용된 줄기세포의 종류가 달라서 생기는 차이로 생각되나 본 결과는 다른 한편으로는 기존의 다른 연구에서 주장된 바와 같이 줄기 세포의 치료 효과가 세포 자체의 생착을 통한 조직 재생보다는 그 위치와 투여 경로와 상관없는 줄기 세포의 면역 억제 효과에 의한 것이라는 의견과 일치한다.^{35,36} Sala 등이 시행한 연구에서도 투여된 중간엽 줄기 세포가 대장 조직으로 이동하지는 않았지만 TSG6를 포함한 면역 억제 기능을 갖는 물질을 분비하여 치료효과를 나타냄이 관찰되었다.³⁷ 또한 세포 자체를 투여하지 않고 세포에서 기인한 세포 외 소포물질(extracellular vesicles)만을 추출하여 투여하였을 때에도 치료 효과가 동일하게 나타나는 소견이 이전 연구에서 보고되었다.³⁸ 향후 T-MSC의 작용 기전에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로

생각되며 면역억제 효과의 주 역할을 하는 물질을 밝혀내는 연구도 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 T-MSC를 최초로 마우스 장염 모델에 투여하여 그 효과를 알아본 실험이며 T-MSC에 의한 임상 증상의 호전 및 조직학적 소견의 호전을 증명하였고 더불어 염증성 사이토카인 및 케모카인의 억제를 통한 기전의 일부를 밝혀내었다는 점에서 의미가 있다. T-MSC는 염증성 장질환의 새로운 치료 물질로서의 가능성이 있으며 향후 줄기 세포 은행을 만들어 염증성 장질환의 치료제로 사용하기 위하여 체내에서 세포의 작용에 대한 추적 및 구체적인 작용 기전에 대한 연구를 포함하여 더 많은 개체 수에서 발전된 연구가 필요할 것으로 보인다.

요 약

목적: 궤양성 대장염과 크론병으로 대표되는 염증성 장질환은 만성적인 질환으로 재발과 악화를 반복하여 환자의 삶의 질을 악화시킨다. 줄기 세포 치료는 최근 염증성 장질환을 비롯한 다양한 난치성 질환의 잠재적인 치료법으로 각광받고 있다. 새롭게 개발된 편도 유래 중간엽 줄기 세포(tonsil-derived mesenchymal stem cells, T-MSC)는 줄기 세포 고유 기능을 모두 가지며 비교적 채취가 용이하고 여러 기증자로부터 받은 세포가 잘 융화되어 자란다는 장점이 있다. 본 연구에서는 이러한 T-MSC를 dextran sulfate sodium (DSS)로 유도된 만성 장염 마우스 모델에 적용하여 그 효과를 알아보고자 하였다.

방법: C57BL/6 마우스를 각각 정상 대조군, DSS 장염군(DSS+PBS), T-MSC 투여군(DSS+T-MSC)으로 나눠서 급성 장염을 유도하였다. T-MSC 투여군에서는 급성 장염 유도 3일째에 복강 내로 T-MSC 1×10^6 을 투여하였다. 장염의 평가는 임상 증상과 장길이, 조직학적 호전 정도로 평가하였다. 대장 조직의 염증성 사이토카인을 측정하여 비교하였다. PKH26으로 표시된 T-MSC의 위치를 생체 내에서 추적하였다.

결과: T-MSC의 투여에 의하여 급성 장염 유도 마지막 날 DAI가 유의하게 낮아졌으며 (11.3 ± 1.5 vs. 8.3 ± 1.9 , $p=0.015$) 장염 증상에 의한 체중의 감소도 완화된 소견을 보였다 ($-17.1 \pm 5.0\%$ vs. $-8.1 \pm 6.9\%$, $p=0.049$). 조직학적 소견을 비교하였을 때 T-MSC 투여군은 염증 세포 침투의 감소, 염증 범위의 감소 및 선와 손상의 완화 등 염증의 호전 소견이 관찰되었다 (22.6 ± 3.8 vs. 17.0 ± 3.4 , $p=0.039$). 염증성 사이토카인인 IL-6 and IL-1 β 수치 또한 T-MSC 투여에 의하여 의미 있게 감소되었다. T-MSC의 위치를 생체 내에서 추적하였을 때 급성 장염이 유도된 대장 점막에서 T-MSC는 발견되지 않았다.

결론: 급성 장염 모델에서 T-MSC의 투여는 장염의 증상 및 조직학적인 염증 소견을 호전시켰다. 또한, 이러한 효과는

T-MSC의 생체 내 위치와는 무관한 소견으로 향후 T-MSC의 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

색인단어: 편도, 중간엽 줄기세포, 염증성 장질환

REFERENCES

1. Nagaishi K, Arimura Y, Fujimiya M. Stem cell therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2015;50:280-286.
2. Yang SK, Yun S, Kim JH, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the Songpa-Kangdong district, Seoul, Korea, 1986-2005: a KASID study. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:542-549.
3. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007;117:514-521.
4. Miehsler W, Novacek G, Wenzl H, et al. A decade of infliximab: The Austrian evidence based consensus on the safe use of infliximab in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2010;4:221-256.
5. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-2749.
6. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 2005;11:1198-1211.
7. Atoui R, Chiu RC. Concise review: immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: update, controversies, and unknowns. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:200-205.
8. Chen QQ, Yan L, Wang CZ, et al. Mesenchymal stem cells alleviate TNBS-induced colitis by modulating inflammatory and autoimmune responses. *World J Gastroenterol* 2013;19:4702-4717.
9. Kim HS, Shin TH, Lee BC, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells reduce colitis in mice by activating NOD2 signaling to COX2. *Gastroenterology* 2013;145:1392-1403.e1-8.
10. Gonzalez-Rey E, Anderson P, Gonzalez MA, Rico L, Buscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 2009;58:929-939.
11. Cho KA, Kim JY, Kim HS, Ryu KH, Woo SY. Tonsil-derived mesenchymal progenitor cells acquire a follicular dendritic cell phenotype under cytokine stimulation. *Cytokine* 2012;59:211-214.
12. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2011;20:5-14.
13. Janjanin S, Djouad F, Shanti RM, et al. Human palatine tonsil: a new potential tissue source of multipotent mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R83.
14. Ryu KH, Cho KA, Park HS, et al. Tonsil-derived mesenchymal stromal cells: evaluation of biologic, immunologic and genetic factors for successful banking. *Cytotherapy* 2012;14:1193-1202.
15. Ryu KH, Kim SY, Kim YR, et al. Tonsil-derived mesenchymal stem cells alleviate concanavalin A-induced acute liver injury. *Exp Cell Res* 2014;326:143-154.
16. Stevceva L, Pavli P, Husband A, Ramsay A, Doe WF. Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice. *Genes Immun* 2001;2:309-316.
17. Kihara N, de la Fuente SG, Fujino K, Takahashi T, Pappas TN, Mantyh CR. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats. *Gut* 2003;52:713-719.
18. Liang J, Zhang H, Wang D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease. *Gut* 2012;61:468-469.
19. Dave M, Mehta K, Luther J, Baruah A, Dietz AB, Faubion WA Jr. Mesenchymal stem cell therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:2696-2707.
20. Molendijk I, Bonsing BA, Roelofs H, et al. Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Healing of Refractory Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* 2015;149:918-927.e6.
21. Park YS, Kim HS, Jin YM, et al. Differentiated tonsil-derived mesenchymal stem cells embedded in Matrigel restore parathyroid cell functions in rats with parathyroidectomy. *Biomaterials* 2015;65:140-152.
22. Park S, Choi Y, Jung N, et al. Myogenic differentiation potential of human tonsil-derived mesenchymal stem cells and their potential for use to promote skeletal muscle regeneration. *Int J Mol Med* 2016;37:1209-1220.
23. Park M, Kim YH, Woo SY, et al. Tonsil-derived mesenchymal stem cells ameliorate CCl4-induced liver fibrosis in mice via autophagy activation. *Sci Rep* 2015;5:8616.
24. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;3:521-533.
25. Seegert D, Rosenstiel P, Pfahler H, Pfefferkorn P, Nikolaus S, Schreiber S. Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48:326-332.
26. Kwon KH, Murakami A, Hayashi R, Ohigashi H. Interleukin-1beta targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:647-654.
27. Ito H. Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody. *J Gastroenterol* 2005;40 Suppl 16:32-34.
28. Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H, Okayasu I. Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Cytokine* 1998;10:890-896.
29. Kong QF, Sun B, Bai SS, et al. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta. *J Neuroimmunol* 2009;207:83-91.
30. He XW, He XS, Lian L, Wu XJ, Lan P. Systemic infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci* 2012;57:3136-3144.
31. Park M, Kim YH, Ryu JH, Woo SY, Ryu KH. Immune suppressive effects of tonsil-derived mesenchymal stem cells on mouse bone-marrow-derived dendritic cells. *Stem Cells Int* 2015;2015:106540.
32. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW, et al. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1998;273:15148-15156.
33. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, et al. Mesenchymal stem

- cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106:1755-1761.
34. Castelo-Branco MT, Soares ID, Lopes DV, et al. Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *PLoS One* 2012;7:e33360.
 35. Camussi G, Deregibus MC, Cantaluppi V. Role of stem-cell-derived microvesicles in the paracrine action of stem cells. *Biochem Soc Trans* 2013;41:283-287.
 36. Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:3037-3042.
 37. Sala E, Genua M, Petti L, et al. Mesenchymal stem cells reduce colitis in mice via release of TSG6, independently of their localization to the intestine. *Gastroenterology* 2015;149:163-176.e20.
 38. Yang J, Liu XX, Fan H, et al. Extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via attenuating colon inflammation, oxidative stress and apoptosis. *PLoS One* 2015;10:e0140551.