



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](#)

이학석사 학위논문

제2형 대식세포 분화 유도를 통한
Fenofibrate의 폐섬유화 치료 효과

Inhibition of pulmonary fibrosis by Fenofibrate

울산대학교 대학원

의과학과

백지연

제2형 대식세포 분화 유도를 통한
Fenofibrate의 폐섬유화 치료 효과

지도교수 나승원

지도교수 권병석

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2022년 2월

울산대학교 대학원

의과학과

백지연

백지연의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 권병석 (인)

심사위원 나승원 (인)

심사위원 제갈양진 (인)

울산대학교 대학원

2022년 2월

국문 요약

특발성 폐 섬유화 증(IPF)이란 만성적으로 진행되는 간질 성 폐 질환으로 수많은 연구에 불구하고 아직 섬유화의 메커니즘과 치료방법이 밝혀져 있지 않다. 이러한 섬유화에 대한 잠재적 치료 전략 중 하나는 염증과 항염증작용을 동시에 진행할 수 있는 대식세포의 기능적 표현형을 조절하는 것이 될 수 있다. 본 연구에서는 이상지질혈증 조절에 임상적으로 사용되는 퍼옥시좀 증식활성수용체 알파(Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha; PPAR α) 작용제인 Fenofibrate 가 대식세포 양극화에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구는 먼저 Fenofibrate 가 골수유래 대식세포(BMDM)에서 LPS 유도 염증 작용 유전자들의 발현을 PPAR α 독립적 방식으로 억제할 뿐만 아니라 제 2 형 대식세포 표지자 유전자의 발현을 촉진한다는 것을 보여주었다. 또한 Fenofibrate 가 C57BL/6 마우스의 블레오마이신 유도 폐 섬유화 증의 진행에서 초기에 제 2 형 대식세포의 분화로 염증반응을 낮추고, 이후에 제 2 형 대식세포의 분화가 감소하면서 섬유화의 진행을 억제하고 항상성을 유지하는 것을 확인하였다. 따라서 블레오마이신 유도 폐 섬유화 증에서 염증 및 섬유화의 진행을 억제한다는 것을 보여주었다. 종합하면, 본 연구의 결과는 Fenofibrate 가 염증 환경에서 항염증성 제 2 형 대식세포의 표현형으로 전환시킴으로써 섬유증에서 대식세포의 항상성을 유지하고, 염증성 섬유화 질환에서의 폐를 보호한다는 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

키워드: 폐 섬유증, Fenofibrate, 대식세포, 항염증, 조직

차 례

국문 요약.....	i
그림 차례.....	iii
서론.....	1
연구재료 및 방법.....	3
결과.....	7
1. Fenofibrate converts LPS-Mediated expression of M1 macrophage polarization toward an M2 type in BMDMs.	
2. Fenofibrate converts M1 macrophage polarization toward an M2 type independently of PPAR α .	
3. Oral administration of fenofibrate induces polarization of M2 macrophages in the lung during bleomycin-induced pulmonary fibrosis.	
4. Anti-inflammatory effects of fenofibrate on advancing pulmonary fibrosis	
5. Effect of fenofibrate on lung fibrosis in bleomycin induced lung fibrosis model.	
고찰.....	20
참고 문헌.....	22
영문 요약.....	25

그림 차례

Figure 1.....	8
Figure 2.	10
Figure 3.	12-13
Figure 4.	15
Figure 5.	18

서론

특발성 폐 섬유증(Idiopathic Pulmonary Fibrosis; IPF)은 간질성 폐질환의 가장 흔한 유형으로 만성 염증성 폐 질환이다. IPF 는 폐포 조직의 비가역적인 변화가 생겨 정상적인 가스 교환 장애를 받는 질병으로 주로 비정상적인 세포외 기질(Extracellular Matrix; ECM) 특히 콜라겐의 침착을 특징으로 한다. IPF 는 두가지 단계로 진행되는데 초기 염증단계와 후기 염증 및 조직 회복 단계이다. IPF 의 초기에는 감염, 바이러스 같은 여러 요인에 의한 염증반응은 제 1 형 면역반응이 활성화시킨다(1). 이후 활성화된 면역 반응으로 폐의 조직이 손상 받게 되는데 이를 회복시키기 위하여 후기에 제2형 면역반응으로 염증 억제 및 조직의 회복이 일어난다. 이때 제 2 형 면역반응이 과도하게 유지가 되면서 면역 세포의 조직회복 사이토 카인을 통한 콜라겐의 합성, 섬유아 세포의 축적이 일어난다(2). 그리고 콜라겐을 분해하는 MMP(Matrix metalloproteinase-1)의 저해와, 콜라겐 분해 억제효소의 증가로 인하여 분균형이 자극되어 콜라겐의 비정상적인 침착을 더 자극한다고 알려져 있다(3). 이는 결과적으로 환자 폐 조직에 섬유증을 일으켜, 비 가역적이고, 산소공급을 저해하여 예후가 좋지 않은 질병이다(4). 하지만 여러 연구가 진행되고 있음에도 아직 치료법과 명확한 발생 기전 또한 밝혀져 있지 않다(5). 따라서 이를 극복하기 위한 연구가 필요하다.

대식세포는 폐 실질세포들의 항상성의 유지하는 중요한 역할을 한다(6). 조직의 감염과 염증과 같은 스트레스가 많은 조건에서 대식세포들은 항상성을 유지하기 위하여 표현형과 기능적 전환을 한다(7). 대식세포는 염증과정에 관여하는 제1형 대식세포와(M1) 염증 해소 및 조직수선에 관여하는 제2형 대식세포로(M2) 나뉜다(8,9). 제1형 대식세포는 식 세포 작용이 활성화 되어있고 iNOS (inducible nitric oxide synthase)의 발현이 증가하여 ROS(Reactive oxygen species)합성이 증가되고 염증성 사이토카인인 *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* 를 분비한다(10). 제2형 대식세포는 항 염증성 사이토카인인

1 *IL-10*을 분비하고 식 세포 작용이 감소하며, 아르기닌이 활성화되
2 downstream 물질으로 콜라겐 합성이 증가한다(10). 최근 연구에 따르면
3 두가지 대식세포의 기능적 전환이 유동적으로 일어난다는 것을 확인했다(11).
4 따라서 이론적으로 염증성 질환과 섬유증의 치료를 위하여 대식세포의 기능적
5 표현형을 전환하는 작용제와 길항제가 있을 수 있다.

6

7 Fenofibrate는 지질대사의 주요 조절제인 퍼옥시좀 증식활성수용체
8 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α ; PPAR α)의 합성 작용제로
9 수십년 동안 임상적으로 사용되었다(12). 그러나 최근 연구에서는 PPAR α 에
10 독립적인 효과가 보고되고 있다(13-17). 특히 고지혈증을 포함한 염증성 질환,
11 섬유성 질환 등 많은 유형의 질병에 효과가 있는 것으로 보인다. 따라서
12 Fenofibrate의 메커니즘에서의 다방면의 기능을 밝히는 연구가 많이 진행
13 중이다.

14

15 대식세포의 분극을 결정하기 위하여 동물 실험을 통해 메커니즘 조사를
16 위한 연구를 진행한다. 마우스 연구에서는 블레오마이신을 통한 폐의 만성
17 염증을 유도하여 조직의 섬유화를 유도한다(18). 또한 마우스에서 폐 섬유화를
18 매개하기 위한 단핵구의 집단이 확인되어 대식세포가 섬유화에 필수적인
19 역할을 한다는 중요한 증거가 존재한다(19).

20

21 따라서 본 연구에서는 Fenofibrate가 마우스의 골수세포에서 LPS로 유도된
22 대식세포의 분극을 제1형 대식세포를 제2형 대식세포로 변환 할 수 있을
23 것이라고 가정하였다. 또한 블레오마이신으로 유도된 만성 폐 염증 in vivo
24 모델에서 실제 섬유화에 미치는 영향을 확인하여 다양한 만성 염증성 및
25 섬유화 질환을 치료하는 것을 목표로 하는 대식세포의 분극을 확인해 보았다.

연구재료 및 방법

Mice

7-8주령의 Female C57BL/6 마우스는 Orient Bio(Seoul, Korea)에서 구입하였다. C57BL/6 background PPAR α ^{-/-} 마우스는 Specific Pathogen Free(SPF) 조건에서 유지되었으며, 실험 전 최소 1주일 동안 적응시켜 사용하였다. 본 연구는 울산대학교 동물실험 협의회 승인에 따라 수행되었다.

Reagents and Antibodies

Fenofibrate 와 LPS 는 Sigma-Aldrich 사로부터 구입하였고, 블레오마이신은 Nippon Kayaku 사로부터 구입했다. FITC-, PE-, APC-, Percp-, APC/cy7- 결합 단일 클론 항체들은 BD Biosciences 그리고 eBioscience 사에서 구입하였다: CD45, CD11b, F4/80, MHCII, CD206 그리고 Ly6G. CD16/32(2.4G2) 단일 클론 항체는 본 실험실에서 제작되어 복수로부터 정제되었다.

Induction of pulmonary fibrosis and drug treatment

폐 섬유증의 유도는 표준 실험방법에 의하여 유도되었다. 7 주령의 Wild Type C57BL/6 Female 마우스를 마취(3 ml/kg mixture of 25 mg/kg of ketamine in 2.5 ml of xylazine) 하고 블레오마이신(40ug/40ul)를 마취된 마우스에 기관내 주사(intratracheal injection) 시켜 유도한다. 대조군으로 40ul 의 PBS 를 같은 방법으로 기관 내 주사하였다. 질병유도 14 일 이후로부터 Fenofibrate 의 폐 섬유화에 대한 영향을 알아보기 위하여 4 군으로 나누어서 실험 하였다. PBS 대조군와 블레오마이신 실험군을 각각 Fenofibrate(200ug/100ul)와 DMSO(Dimethyl Sulfoxide) 동량을 2-6 일간 매일 존테(Sonde)를 사용하여 경구 투약(oral administration)한다.

Cell isolation and culture

블레오마이신 유도된 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 다음 폐를 Collagen I 과 DNase I 으로 단일세포로 만든 이후 적혈구를 용해시켜 폐의 전체세포들을 분리했다. 또한 골수를 채취하기 위하여 7 주령의 WT C57BL/6 와 PPAR α ^{-/-} Female 마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 다음 양쪽 경골과 대퇴골로부터 25G 주사바늘을 사용하여 채취한 후 DPBS 에 세척 및 재 부유되었다. 적혈구를 용해시킨 후, ml 당 2*10⁶ 개의 세포를 100mm 세포 배양용 플레이트에서 배양하였다. 골수세포의 대식세포로의 분화를 유도하기 위하여 세포들은 10% FBS, 100U/ml 페니실린/스트렙토마이신 및 30% L929 세포를 배양하여 얻은 조정배지(Macrophage colony-stimulating factor; M-CSF 의 공급원)를 첨가하여 37°C 에 5 일간 배양되었다. 배양 후 세포의 90% 이상 대식세포인 환경에서 24 시간 동안 10 μ M Fenofibrate 및 1 μ g/ml LPS(Lipopolysaccharide)의 조합에서 배양되었다.

Wet/Dry Lung weight ratio

폐의 wet-to-dry(W/D) 무게의 비율은 섬유화로 인한 폐의 부종을 확인하기 위하여 시행되었다. 폐를 채취한 직후의 wet weight 을 측정하였다. 그 뒤 폐 조직을 50°C 오븐에 72 시간 동안 건조하고 dry weight 을 측정하였다. W/D 무게 비율은 Wet weight 를 dry weight 으로 나누어 계산하였다.

Cell staining and flow cytometry

폐로부터 분리된 세포를 FC 차단을 위해 2.4G2(10ug/ml)로 4°C 에서 10 분간 처리 후 FACs buffer(0.2% BSA 와 5mM EDTA, 0.1% sodium azide 를 포함하는 PBS)에 포함된 세포 표면 마커 특이적 항체들로 4°C 에서 20 분간 처리 이후 FACs buffer 로 2 회 세척되었다. Flow cytometric analysis 는 FACS Canto II unit(BD Biosciences)을 통하여 수행되었고, BD FACS Diva(BD Biosciences)에서 분석되었다.

Real-time RT-PCR

Total RNA는 TRIzol(Invitrogen)을 사용하여 lung과 골수유래 대식세포로부터 분리되었고, cDNA는 M-MLV 역전사 효소에 의한 RT-PCR manufacturer's instructions(Invitrogen)으로 진행하였다. Real-time PCR은 2× amfiSure qGreen Q-PCR master mix(GenDEPOT)을 사용하여 QuantStudio™ 1 Real-Time PCR System(Applied Biosystems)에서 실행되었다. 타겟 유전자의 발현은 18s를 이용하여 normalization 하였다. primer로는 *iNOS*, *TNF-α*, *IL-6*, *IL-1β*, *IL-12*, *IFN-γ*, *CCL5*, *ARG1*, *YMI1*, *FIZZ1*, *IL-10*, *TGF-β1*, *IL-1Rn*, *PDGFα* *CD206*을 사용하였고, 제노텍(대전, 한국)에서 구매하였다.

Histology, fibrosis scoring, and pathological scoring

폐 조직은마우스를 마취한 이후 우심실을 통해서 PBS 로 관류한 이후 10% 포르말린으로 재관류 하고 적출하여 10% 포르말린과 파라핀에 고정시켰다. 조직학적 소견을 관찰 하기 위하여 5um 간격으로 조직 절편을 만들어서 H&E or Masson's Trichrome stain kit(Sigma-Aldrich)으로 염색하였다. 또한 섬유화와 병리학적 차이를 확이 하기 위하여 한 명의 병리학과 전문의가 모든 폐 조직의 병리 소견을 분석하였다. 폐 조직 절편 샘플에서 증가하는 섬유화 증 정도는 이전 다른 연구들에서 기술된 Ashcroft 점수로 정량화하여 0 에서 8 까지 점수화 하였다(19, 20). 구체적인 기준은 아래와 같다.

Grade of Fibrosis; Ashcroft Sale

- 0: Normal lung
- 1: Minimal fibrous thickening of alveolar or bronchiolar vessels
- 3: Moderate thickening of walls without obvious damage to lung architecture
- 5: Increased fibrosis with definite damage to lung structure and formation of fibrous bands or small fibrous masses
- 7: Severe distortion of structure and large fibrous areas
- 8: Total fibrous obliteration of lung fields

Measurement of cytokines

염증 및 항 염증 관련 사이토카인을 측정하기 위하여 전체 폐를 homogenizer 를 이용해 균질화 시킨 이후 4°C 에서 1,400rpm 으로 5 분간 centrifugation 한 이후 상층액에서 *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* 및 *TGF- β 1* 를 Cytometric Bead Array kit(BD Biosciences)와 ELISA kit(eBioscience)를 이용하여 제작자의 지침에 따라 분석하였다.

Hydroxyproline measurement

폐는 1 ml PBS 에 균질화 시키고 110°C 에서 6 N HCl 로 하룻밤 동안 배양했다. 45 μ m syringe filter(Millipore)를 통해 가수분해효소를 걸러낸 후, 50 μ l 의 구연산(5% citric acid, 7.24% sodium acetate, 3.4% sodium hydroxide, and 1.2% glacial acetic acid [pH 6.0]) 및 chloramine-T 혼합 용액 100 μ l(282 mg of chloramine-T, 2 ml of n-propanol, 2 ml of H₂O, and 16 ml of citrate-acetate buffer)가 실온에서 15 분간 처리되었다. 다음으로, Ehrlich's solution(Sigma-Aldrich)의 100 μ l 이 첨가하고 혼합물은 15 분 동안 65°C 에서 배양되었다. 샘플은 BIO-TEK 분광계에서 550nm 흡광도로 측정하여 농도를 알고있는 Hydroxyproline standard 표준곡선을 이용하여 판독되었다.

Statistics

본 연구의 data 는 GraphPad Prism 8(GraphPad Software)를 이용하여 분석 및 시각화 되었다. 모든 값은 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 여러 군간의 폐 조직 섬유화 정도, hydroxyproline 함량 및 cytokine 의 차이에 대한 통계적 유의성은 one-way analysis of variance(ANOVA)검정을 사용하였다. 서로 다른 그룹 간의 통계적 유의성은 two-tailed t-test, one-way 또는 two-way ANOVA 를 이용하고 post-hoc Tukey 분석을 통해 검증하였다. 통계학적 유의 수준은 *P*-value 가 0.05 미만인 경우로 설정하였다.

결과

1. Fenofibrate converts LPS-Mediated expression of M1 macrophage polarization toward an M2 type in BMDMs.

Fenofibrate 의 항 염증성 작용은 염증성 섬유화 질환의 억제와 관련이 있다(20,21). 하지만 아직 메커니즘은 크게 밝혀져 있지 않았다. Fenofibrate 의 항 염증성 작용이 대식세포 중에서 제 2 형 대식세포의 특징 일 것이라는 조건 하에, 본 연구는 Fenofibrate 가 염증성 조건 하에 제 1 형 대식세포를 제 2 형 대식세포로 전환 할 것이라는 가설을 세웠다.

이 가설을 검증하기 위하여 WT C57BL/6 마우스의 골수유래 대식세포 (bone-marrow derived macrophage; BMDM)에서 제 1 형 대식세포를 분화시키는 LPS 와 Fenofibrate 를 같이 처리하여 실험을 진행하였다. Fenofibrate 는 단독 처리되었을 때 미 처리 대조군(No-treat; NT)와 동일하게 효과가 없었지만, LPS 와 같이 처리되었을 때 제 1 형 대식세포 표지 유전자(*iNOS*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* , *IL-12*, *IFN- γ* , and *CCL5*)들의 발현을 효과적으로 줄였다(Fig 1A). 대조적으로 Fenofibrate 는 LPS 와 같이 처리되었을 때 제 2 형 대식세포 표지 유전자 (*ARG1*, *YMI*, *FIZZ1*, *IL-10*, *TGF- β 1*, *IL-1Rn*, *PDGF α* and *CD206*)들의 발현을 증가시켰다(FIG 1B).

이러한 결과는 Fenofibrate 가 LPS 가 존재할 때 대식세포의 표지 유전자 들을 제 1 형 대식세포에서 제 2 형 대식세포로 전환한다는 것을 확인하였다.

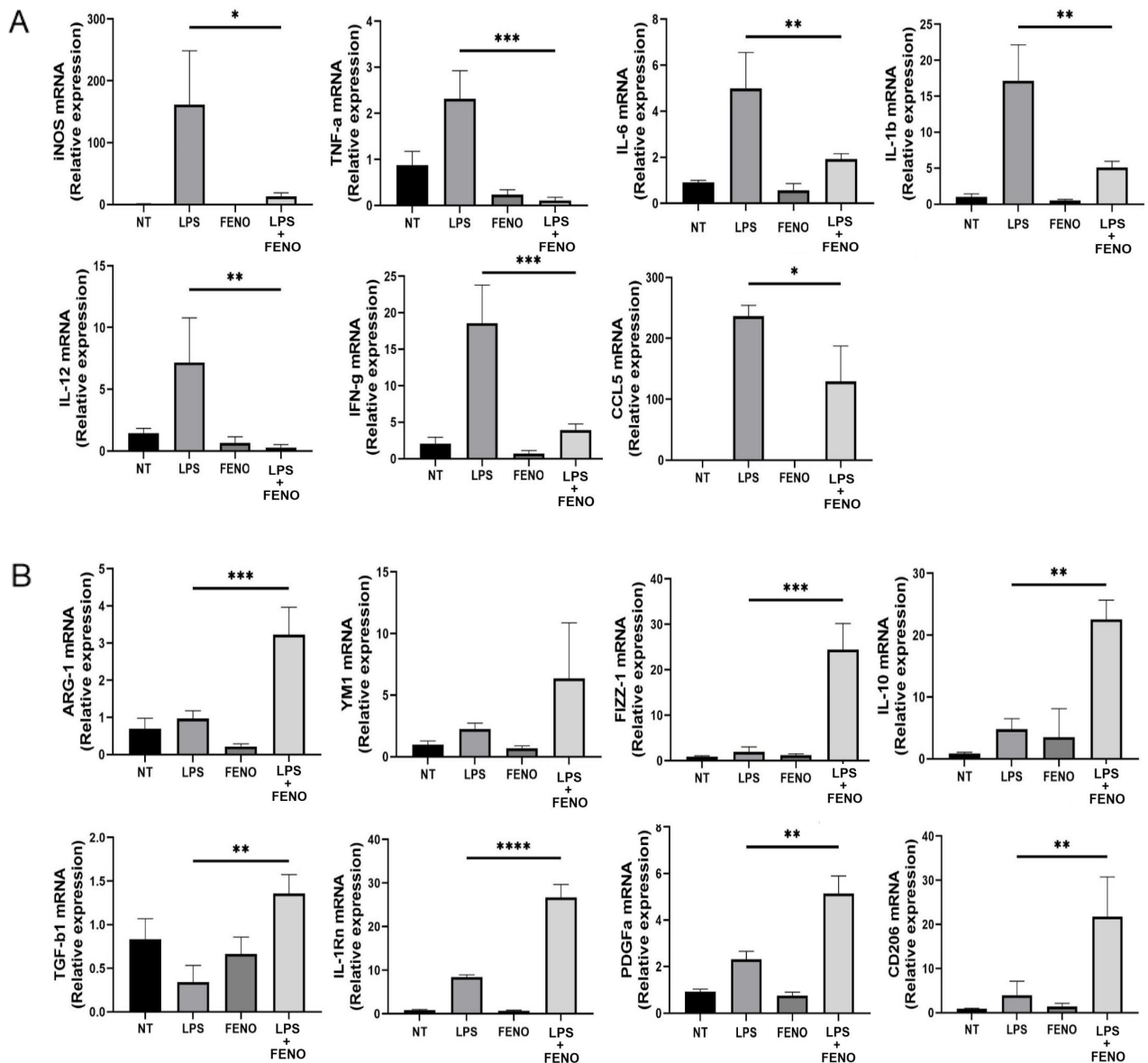


Fig1. Fenofibrate converts LPS-Mediated expression of M1 macrophage polarization toward M2 type in BMDMs.

Wild-type(WT) C57BL/6 BMDMs were treated with a combination of LPS and Fenofibrate for 24 hours. A&B. Real-time RT-PCR was performed to measure mRNA levels of M1 and M2 macrophage marker genes. All data are presented as means \pm SEM (n = 3/group) and are representative of at least two independent experiments. One-way ANOVA with a *post hoc* Tukey test was conducted. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

2. Fenofibrate converts M1 macrophage polarization toward an M2 type independently of PPAR α .

Fenofibrate 는 원래 피옥시좀 증식활성수용체 α (PPAR α)의 작용제로 개발되었기 때문에 정확한 대식세포에서의 역할을 알아보기 위하여 PPAR $\alpha^{-/-}$ 마우스로 확인을 했다. PPAR $\alpha^{-/-}$ 마우스의 골수 유래 대식세포에 LPS 와 Fenofibrate 를 같이 처리하여 실험을 하였다.

Fig1 과 동일하게 LPS 와 같이 처리되었을 때 제 1 형 대식세포 표지 유전자(*iNOS*, *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* , *IL-12*, *IFN- γ* , and *CCL5*)들의 발현은 감소하고(Fig 2A), 제 2 형 대식세포 표지 유전자 (*ARG1*, *YMI1*, *FIZZ1*, *IL-10*, *TGF- β 1*, *IL-1Rn*, *PDGF α* and *CD206*)들의 발현이 증가하였다(Fig 2B).

따라서 Fenofibrate 는 PPAR α 독립적으로 제 2 형 대식세포의 표지 유전자들을 조절 한다는 것을 확인하였다.

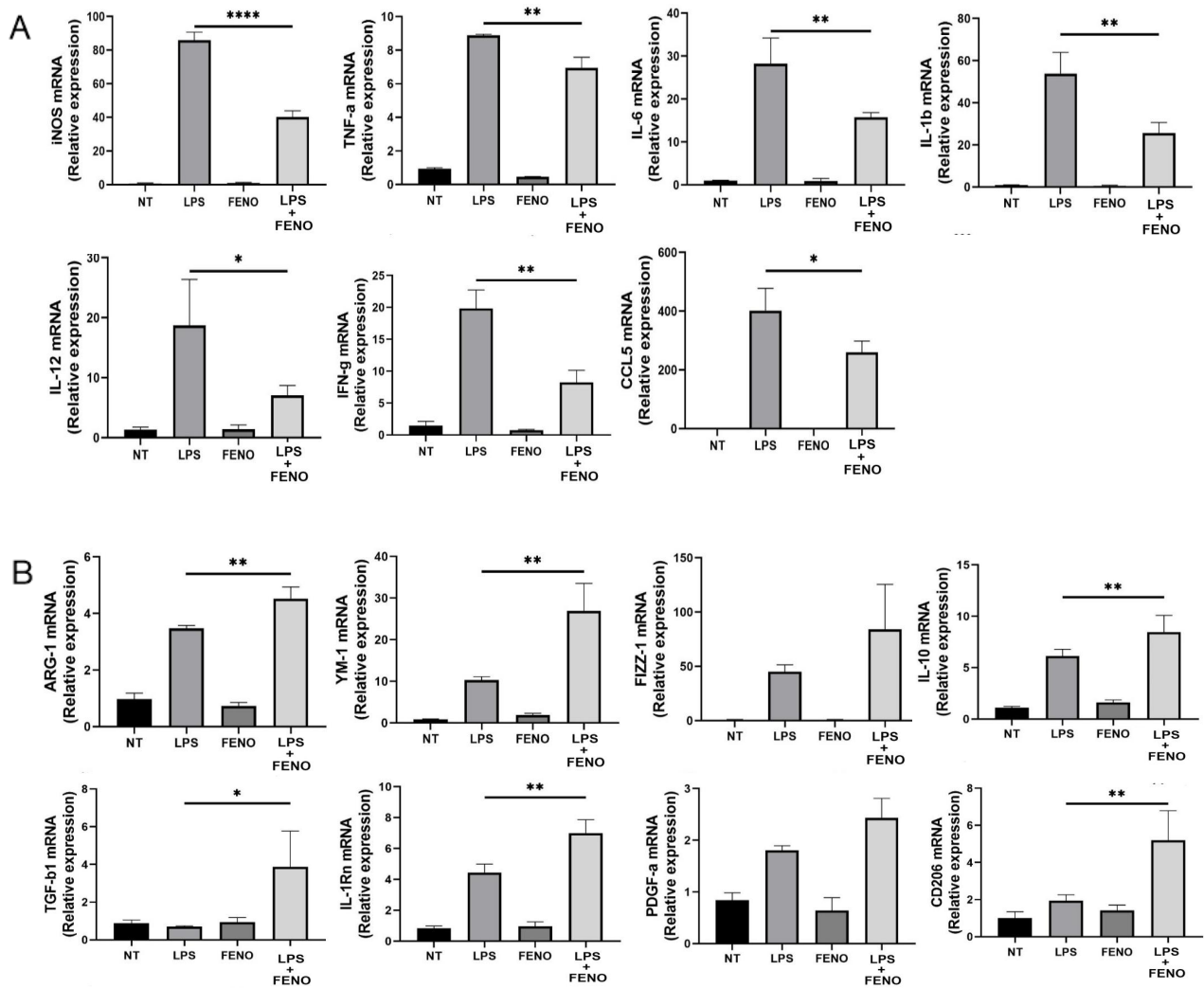


Fig2. Fenofibrate converts M1 macrophage polarization toward an M2 type independently of PPAR α .

PPAR α ^{-/-} C57BL/6 BMDMs were treated with a combination of LPS and Fenofibrate for 24 hours. A&B) Real-time RT-PCR was performed to measure mRNA levels of M1 and M2 macrophage marker genes. All data are presented as means \pm SEM(n = 3/group) and are representative of at least two independent experiments. One-way ANOVA with a *post hoc* Tukey test was conducted. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. FENO : Fenofibrate

3. Oral administration of fenofibrate induces polarization of M2 macrophages in the lung during bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

본 연구는 골수유래 대식세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 증명된 것을 토대로, 실제 제 2 형 대식세포로의 표지 유전자들의 변화가 실제 섬유증에 영향을 알아보기 위하여 블레오마이신으로 유도된 폐 섬유증 *in vivo* 모델을 진행하였다.

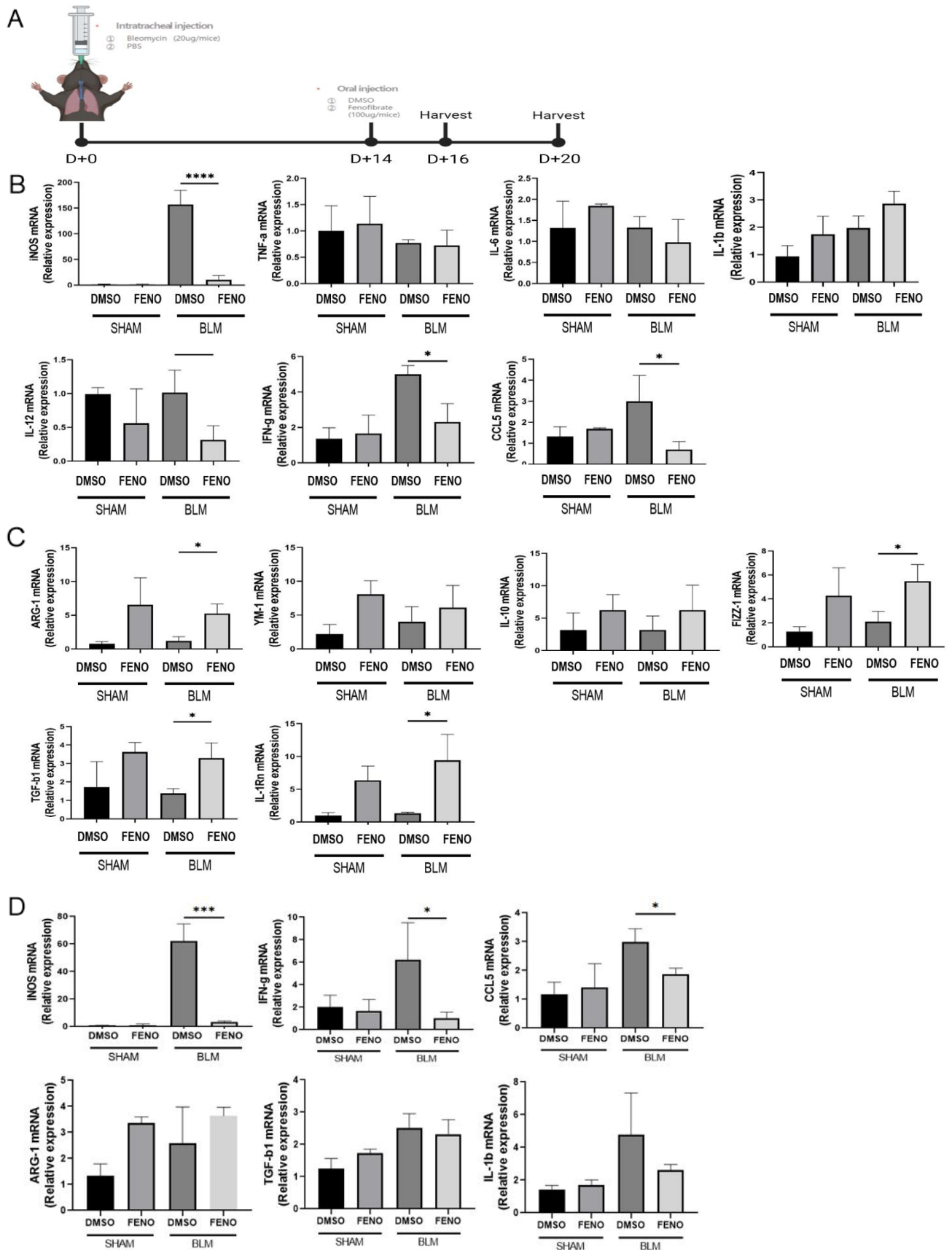
블레오마이신(40ug/40ul)를 마취된 마우스에 기관내 주사(*intratracheal injection*) 시켜 섬유화를 유도시킨 이후(Day+ 14) Fenofibrate(200ug/100ul)와 대조군 DMSO 를 2-7 일간 존데를 사용하여 경구 투약(*oral administration*)하고 난 이후 폐 조직에서 대식세포 유전자 발현을 분석했다(Fig 3A).

블레오마이신 유도 Fenofibrate 경구 투약 모델에서 2 일째 폐 조직의 제 1 형 대식세포 표지 유전자들의 발현은 감소하고(Fig 3B), 제 2 형 대식세포 표지 유전자들이 증가하여 이전의 골수유래 대식세포의 결과와 일치하는 것을 확인하였다(Fig 3C).

또한 블레오마이신 유도 섬유화 마우스에 DMSO 경구투약 6 일째 그룹은 폐 조직의 제 1 형과 2 형 대식세포 표지 유전자들 모두 발현이 증가하고 반대로 블레오마이신 유도 Fenofibrate 경구투약 6 일째 그룹은 제 2 형 대식세포 표지 유전자의 감소를 나타내었다(Fig 3D).

폐 조직에서 CD45+ CD11B+ F4/80+ 대식세포를 FACs 로 분석한 결과 CD206+ 제 2 형 대식세포는 Fenofibrate 를 투약한지 2 일째 일시적으로 증가하고 6 일 때에 다시 낮아졌다(Fig 3E&F).

이는 Fenofibrate 가 블레오마이신 유도 폐 섬유증에서 제 2 형 대식세포의 발현의 증가로 염증성 제 1 형 대식세포의 발현을 낮추고 차후에 제 2 형 대식세포의 발현이 낮아지면서 섬유화의 진행을 억제하고 항상성을 유지할 수 있게 한다는 것을 확인하였다.



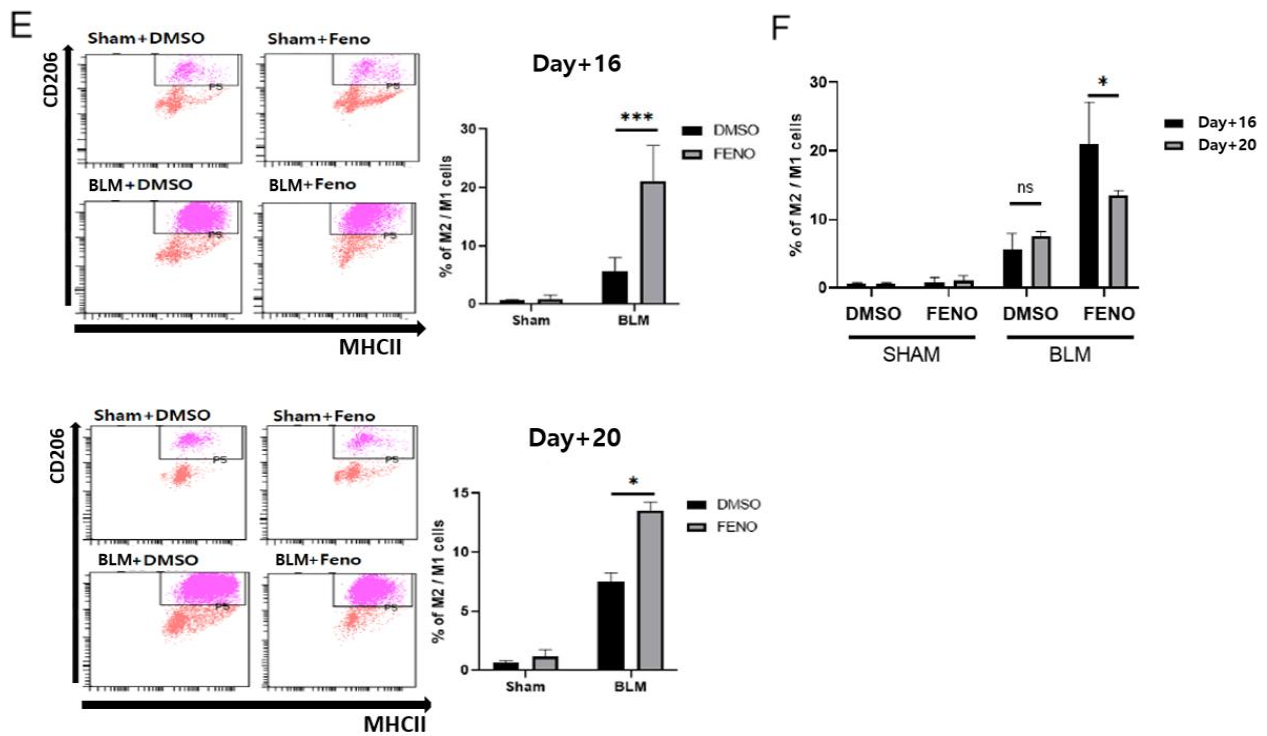


Fig3. Oral administration of fenofibrate induces polarization of M2 macrophages in the lung during bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

Fenofibrate was orally fed 7 times starting from day 14 after bleomycin injection. A) Experimental protocol for bleomycine-induced pulmonary fibrosis and timetable for drug administration B&C) Real-time RT-PCR was performed to measure mRNA levels of M1 and M2 marker genes from day 16 after bleomycin injection. D) Real-time RT-PCR was performed to measure mRNA levels of M1 and M2 marker genes from day 20 after bleomycin injection. E&F) Lungs cells were isolated for FACS analysis. CD45⁺ leukocytes were gated and representative dot plots of CD11b⁺ MHCII⁺ F4/80⁺ macrophages and CD206⁺ type2 macrophage population. All data were presented as the mean \pm SEM(n = 4-5/group) and representative of at least two independent experiments. One-way ANOVA with post hoc Tuckey test was conducted. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001. BLM : bleomycin, FENO : Fenofibrate

4. Anti-inflammatory effects of fenofibrate on advancing pulmonary fibrosis

Fenofibrate 의 폐 섬유증 단계에서 항 염증 역할을 확인하기 위하여 inflammatory 관련 실험을 진행하였다.

생존율을 확인하였을 때, 블레오마이신 유도 마우스에서 Fenofibrate 를 경구 투약 한 그룹이 DMSO 를 투약한 그룹보다 생존율이 높아졌다(Fig 4A). 다음으로 염증반응의 지표인 부종을 확인하고자, 폐를 harvest 하고 폐의 wet-to-dry(W/D) 무게를 측정하였다. 블레오마이신으로 섬유증이 유도된 마우스에 Fenofibrate 를 투여한 그룹은 DMSO 그룹에 비하여 육안으로 보기에도 부종이 적었고, W/D 무게 또한 적은 것을 확인하였다(Fig 4C). 폐 조직을 균질화 한 이후 염증성 관련 cytokine($IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF-\alpha$)을 ELISA 와 CBA 로 확인하였을 때, 염증성 cytokine 의 발현이 줄어들고(Fig 4D), 폐 내부의 염증성 호중구(Ly6G+ CD11b+)이 블레오마이신 유도된 이후 Fenofibrate 의 효과로 줄어든 것이 확인되었다.

따라서 Fenofibrate 는 블레오마이신 유도 in vivo 섬유화 모델에서 항 염증 작용을 하여 폐를 보호한다는 것을 확인하였다.

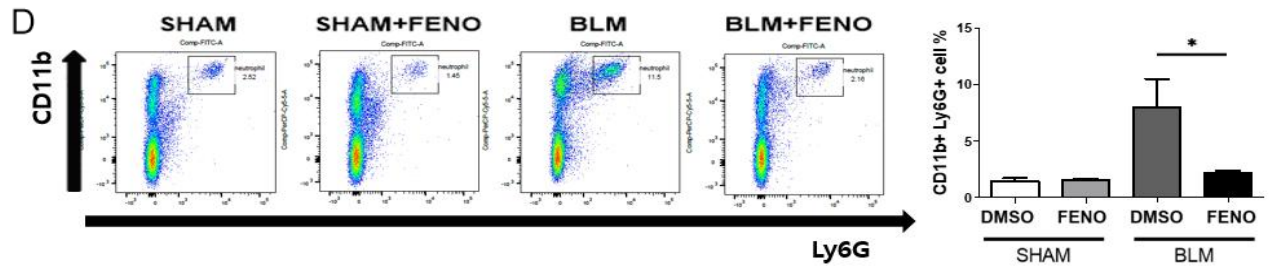
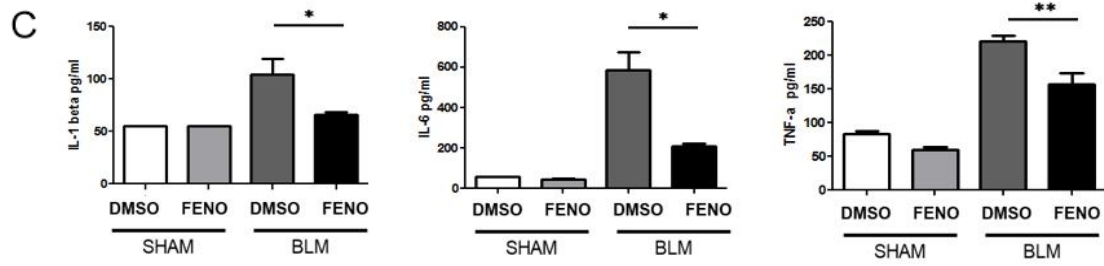
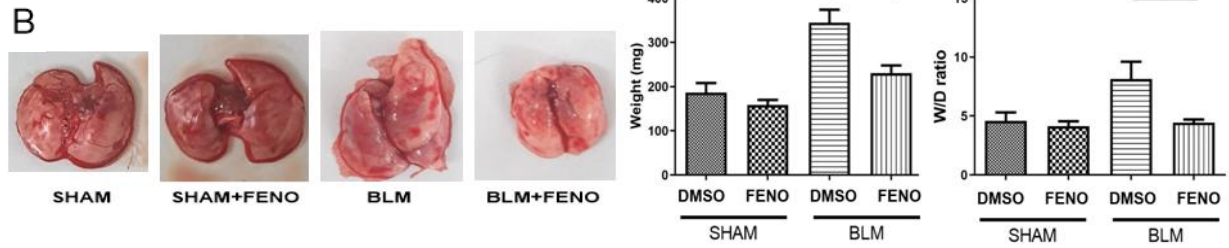
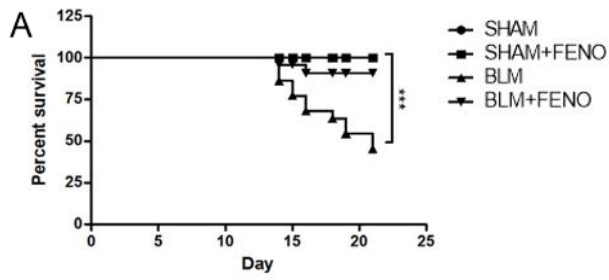


Fig4. Anti-inflammatory effects of fenofibrate on advancing pulmonary fibrosis

Fenofibrate was orally fed 7 times starting from day 14 after bleomycin injection. The lungs were harvested 21 d after disease induction. A) Survival(n=5, two times repeat) B). Photo of Injured Lung and Lung weight C). Inflammatory cytokine levels of pro-inflammatory cytokines in Lung extract. D). Lungs cells were isolated for FACS analysis. CD45+ leukocytes were gated and representative dot plots of CD11b+ Ly6G+ neutrophils.

All data were presented as the mean \pm SEM(n = 4-5/group) and representative of at least two independent experiments. One-way ANOVA with post hoc Tuckey test was conducted. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

5. Effect of fenofibrate on lung fibrosis in bleomycin induced lung fibrosis model.

Fenofibrate 의 직접적인 섬유화에 대한 효과를 확인하기 위하여 병리학적 방법과 섬유화 관련 인자들을 확인해보았다.

앞선 방법과 동일하게 마우스에 섬유화를 유도하고 Fenofibrate 를 경구 투여한 이후 H&E 염색과 Masson's trichrome 염색으로 fibrosis score 을 측정하였을 때 Fenofibrate 를 투여한 마우스의 폐에서 DMSO 에 비하여 더 적은 섬유증이 나타났다(Fig 5A-B). 또한 폐 섬유화증에서 콜라겐의 안정성을 유도하여 섬유화의 지표를 나타내는 Hydroxyproline 수치와 주된 섬유화 인자인 TGF- β 1 또한 적은 것으로 나타났다. 그리고 폐에서 α -SMA(Alpha-Smooth Muscle Actin)을 표현하는 세포를 FACs 와 면역형광법을 이용하여 확인하였을 때 Fenofibrate 를 경구투여한 그룹이 낮은 것을 확인하였다(Fig 5C, D).

따라서 Fenofibrate 는 블레오마이신 유도 in vivo 섬유화 모델에서 실질적으로 폐의 섬유화를 줄이는 효과가 있다는 것을 확인하였다.

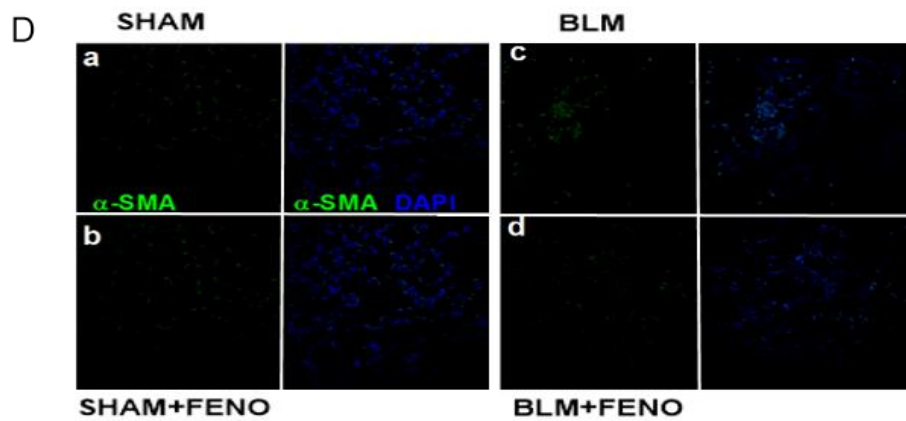
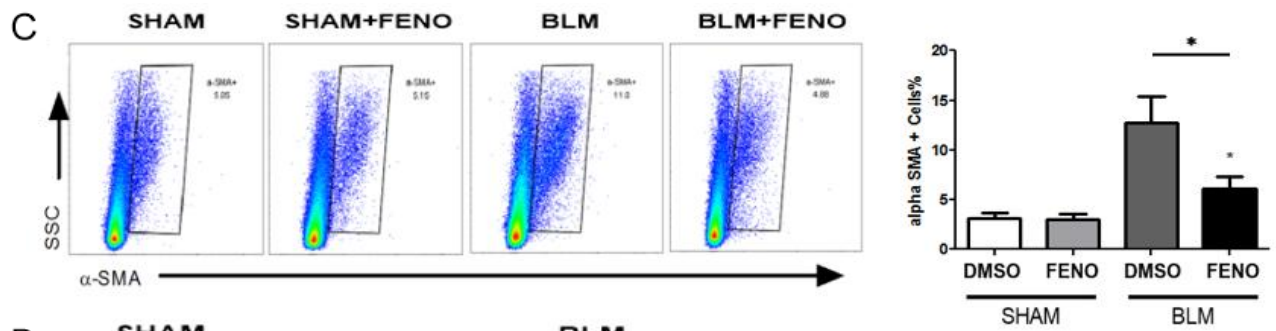
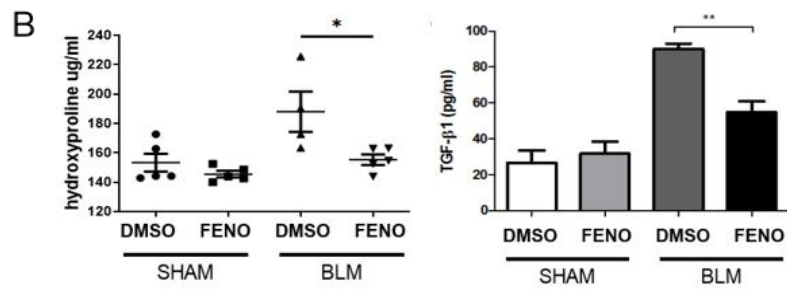
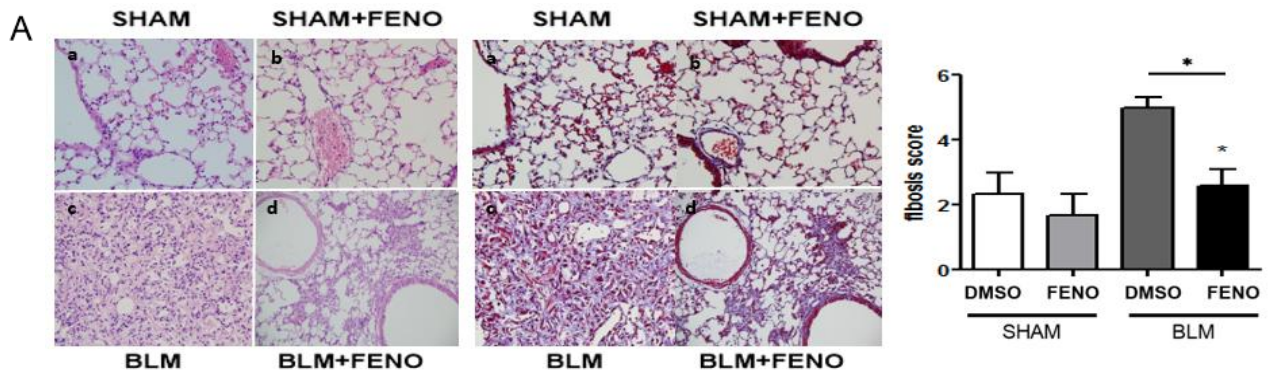


Fig 5. Anti-fibrotic effects of fenofibrate on advancing pulmonary fibrosis.

Fenofibrate was orally fed 7 times starting from day 14 after bleomycin injection. The lungs were harvested 21 d after disease induction. A) H&E, Mason's Trichrome staining of Lung tissue bleomycin induced day21 B) WT sham control, b. Fenofibrate oral administrate in shame mouse c. DMSO or d. Fenofibrate oral administrate during 7day after 14days intratracheal injection bleomycin. C). Levels of hydroxyproline and TGF- β 1 in lung tissues (n = 5/group). D). Intracellular staining of α -SMA. Representative FACS dot plots for α -SMA+ cells were shown in the left column and their percentages were shown in the right column (n = 5/group). E). Immunohistochemical staining of α -SMA in lung tissue sections.

All data were presented as the mean \pm SEM and representative of at least two independent experiments. One-way ANOVA with post hoc Tuckey test was conducted. *, p < 0.05; **, p < 0.01

고찰

특발성 폐 섬유증(IPF)은 염증성 폐 질환으로 주로 면역반응의 항상성의 조절 불능으로 인하여 생겨난다. 이러한 조절 불능으로는 일반적으로 제 1형 대식세포와 같은 염증성 세포에 의하여 분비되는 사이토카인(TNF- α , IFN- γ 및 IL-6)에 의해 만성 염증이 유발된다(22). 이후 만성 염증 상태에서 염증성 제 1형 대식세포는 항 염증성 조직 수리 제 2형 대식세포로 전환된다. 제 2형 대식세포는 TGF- β 1 를 포함한 섬유화 유도 Th2 사이토카인과 대식세포 섬유아세포 성장 인자(FGF), 혈소판 유래 성장 인자 α (PDGF α) 등을 활성화시킨다(23). 따라서 여러 면역 세포들이 조직 수선에 관여하지만 제 2형 대식세포가 만성 염증에서의 조직 수선과 섬유화에 중요한 조절을 한다는 것이 밝혀졌다(24).

이 연구에서는 염증조건하에서 제2형 대식세포의 분화를 유도하여 만성 염증을 줄이고 면역체계를 조절하는 화학물질인 Fenofibrate를 퍼옥시좀 증식활성수용체 α (PPAR α) 독립적인 효과를 확인하였다.

먼저 마우스의 골수유래 대식세포에서 LPS 자극이 제 1형 대식세포의 분화를 촉진하는 반면, LPS 와 Fenofibrate 의 동시 자극이 있으면 제 1형 대식세포관련 유전자(iNOS, TNF- α 등)의 감소와 제 2형 대식세포유전자(Arg1, Ym1 등)로의 전환을 확인 하였다. 또한 PPAR α 녹아웃 마우스 에서도 같은 결과가 도출되었다. 이는 골수유래 대식세포에서 LPS 에 의해 유도된 염증성 제 1형 대식세포가 Fenofibrate 에 의하여 PPAR α 독립적으로 항 염증성 제 2형 대식세포로의 전환을 확인 하였다.

또한 마우스에서 블레오마이신으로 유도한 염증성 폐 섬유화에서 Fenofibrate 의 경구투약이 iNOS 와 IFN- γ 등의 염증성 사이토카인을 줄이고 ARG1 과 TGF- β 1 등의 항 염증성 사이토카인의 증가를 보였다. 또한 실제 폐 조직에서 FACs 로 분석한 결과 CD206+ 제 2형 대식세포의 증가가 2 일차에

가장 높게 증가하였다가 6 일차에 점점 낮아지는 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 Fenofibrate 가 제 2 형 대식세포의 정상적인 조절으로 인하여 폐섬유화를 유발하지 않음을 시사할 수 있다. 이후 실제 섬유증에서의 효과를 보았을 때 블레오마이신으로 유도한 폐 섬유화에서 마우스의 생존율이 높았고, 폐의 부종과 염증성 사이토카인 그리고 염증성 호중구 (Ly6G+ CD11b+)이 감소한 것을 확인하였다. 또한 병리학적 섬유화 점수와 α -SMA, hydroxyproline 이 감소하여 Fenofibrate 의 경구투약이 실제 마우스에서 블레오마이신으로 유도한 폐 섬유화 증에서 염증성 수치를 낮추고 섬유화의 억제로 인하여 생존율을 높였음을 알 수 있었다.

이러한 결과를 종합하여 봤을 때 Fenofibrate 는 골수 유래 대식세포에서 PPAR α 독립적으로 제 1 형 대식세포를 제 2 형 대식세포로 전환시킨다. 또한 마우스 실험에서 초기 염증 단계에서 제 2 형 대식세포의 편향된 분화로 인하여 제 1 형 대식세포로 인한 염증을 낮추고, 후기에 항상성을 유지하면서 제 2 형 대식세포가 낮아지면서 결국 섬유화로부터 폐를 보호한다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구는 Fenofibrate 가 제 2 형 대식세포의 작용에서 비롯한 대식세포의 기능적 분화 조절이 만성 염증성 및 폐 섬유증의 치료에 중요한 타겟이 될 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. Pardo A, Selman M. 2002. "Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 34: 1534–1538.
2. Richard L. Gieseck III, Mark S. Wilson & Thomas A. Wynn. 2018. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nature Reviews Immunology*. 18: 62–76
3. Sushweta M, Sukanya S, Sayanta D, and Parames C.Sil. 2020. Matrix metalloproteinase: An upcoming therapeutic approach for idiopathic pulmonary fibrosis. *Pharmacological Research*. 152
4. Mora, A. L., M. Rojas, A. Pardo, and M. Selman. 2017. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age-related disease. *Nat. Rev. Drug Discov*. 16: 755-772.
5. Raghu G, Collard HR, Egan JJ. 2011. "An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 183: 788–824.
6. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol*. (2016) 17:9-17. doi: 10.1038/ni.3320.
7. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* (2016) 44:450-62. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
8. Murray PJ, Wynn TA. 2011. Protective and pathogenic function of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 11(11):723-737.
9. Sica A, Mantovani A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 122(3):787-795.
10. Kwan T, Wu H & Chadban SJ. 2014. Macrophages in renal transplantation: Roles and therapeutic implications. *Cell Immunol*. 291(1-2):58-64

11. Murray PJ. Macrophage polarization. *Annu Rev Physiol.* (2017) 79:541-66. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
12. Staels B., Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* (1998) 98:2088–93.
13. Scatena R, Bottoni P, Giardina B. Mitochondria, PPARs, and cancer: is receptor-independent action of PPAR agonists a key? *PPAR Res.* (2008) 2008: 256251. doi: 10.1155/2008/256251
14. Araki H, Tamada Y, Imoto S, Dunmore B, Sanders D, Humphrey S, et al. Analysis of PPAR α dependent and PPAR α -independent transcript regulation following fenofibrate treatment of human endothelial cells. *Angiogenesis* (2009) 12:221-9. doi: 10.1007/s10456-009-9142-8
15. Chandra, D., C. H. Lee, Y. H. Kim, J. R. Noh, D. K. Kim, J. H. Park, J. H. Hwang, M. R. Lee, K. H. Jeong, I. K. Lee, G. R. Kweon, M. Shong, G. T. Oh, J. Y. L. Chiang, and H. S. Choi. 2009. Fenofibrate differentially regulates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase-dependent induction of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Hepatology.* 50: 880–892.
16. Wilk, A., Wyczechowska D, Zapata A, Dean M, Mullinax J, Marrero L, Parsons C, Peruzzi F, Culicchia F, Ochoa A, Grabacka M, and K. Reiss.2015. Molecular mechanisms of fenofibrate-induced metabolic catastrophe and glioblastoma cell death. *Mol. Cell. Biol.* 35: 182-198.
17. Yang, C. S., J. M. Yuk, J. J. Kim, J. H. Hwang, C. H. Lee, J. M. Kim, G. T. Oh, H. S. Choi, and E. K. Jo. Small heterodimer partner-targeting therapy inhibits systemic
18. inflammatory responses through mitochondrial uncoupling protein 2. *Plos One.* 8: e63435.

19. R.Carrington, S.Jordan, S.C.Pitchford and C.P.Page. 2018. Use of animal models in IPF research. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 51: 73-78
20. Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, et al. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature* (2017) 541: 96-101. doi: 10.1038/nature20611.
21. Ashcroft, T., J. M. Simpson, and V. Timbrell. 1988. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J. Clin. Pathol.* 41: 467-470.
22. Hübner, R. H., W. Gitter, N. E. El Mokhtari, M. Mathiak, M. Both, H. Bolte, S. Freitag-Wolf, and B. Bewig. 2008. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *BioTechniques*. 44: 507-517.
23. Gali E.S, Elizabetha B, Becky B.W and David S. 2020. TGF- β pathway activation by idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) fibroblast derived soluble factors is mediated by IL-6 trans-signaling. *Respiratory Research*. 56: doi: 10.1186/s12931-020-1319-0
24. P.Heukels, C.C.Moor, J.H.von der Thüsen, M.S.Wijzenbeek and M.Kool. 2019. Inflammation and immunity in IPF pathogenesis and treatment. *Respiratory Medicine*. 147:79-91
25. Wynn TA & Barron L. 2010. Macrophage: Master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 30(3):245-257

영문 요약

Idiopathic pulmonary fibrosis(IPF) is a chronically advanced interstitial lung disease, and despite numerous studies, the mechanisms and treatment of fibrosis have not yet been identified. One therapeutic strategy for chronic inflammatory and fibrotic diseases would manipulate the fate of macrophages toward a disease-inhibiting functional phenotype without a disease-driving property. In this study, we investigated the effects of Fenofibrate, a PPAR α agonist that is clinically used to control dyslipidemia, on macrophage polarization. We first showed that Fenofibrate suppressed the LPS-induced expression of pro-inflammatory mediators in bone marrow-derived macrophages(BMDMs) in a PPAR α -independent manner while promoting M2 macrophage markers. In addition, it was confirmed that Fenofibrate initially lowered the inflammatory response to differentiation of M2 macrophages in the progression of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in C57BL/6 mice, and gradually decreased M2 expression inhibited the progression of fibrosis and maintained homeostasis. Inflammation and fibrosis progression were suppressed in the progression of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in C57BL/6 mice. Taken together, our results suggest that Fenofibrate can re-direct polarization of macrophages toward a functional M2-like macrophage phenotype in an inflammatory environment, which may have clinical implications for the therapy of inflammatory diseases.