

호흡기질환에서 줄기세포

□ 증설 □

순천향대학교 의과대학 부천병원 호흡기알레르기내과
장 안 수

Stem Cells in Respiratory Diseases

An Soo Jang, M.D.

Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University Hospital, Bucheon, Korea

서 론

줄기세포는 자가 재생산과 다양한 세포로의 분화능력을 갖으며 발생 초기의 배반포(blastocyst)에서 얻어지는 배아줄기세포와 발생과정이 끝난 성인 또는 태반에서 얻어지는 성체줄기세포가 있다. 이 두 가지 줄기세포는 서로가 상이한 특징을 가지고 있어서 배아줄기세포의 경우는 미분화상태의 자가 재생산 능력이 뛰어나서 증식이 용이한 반면, 생체 내 세포 치료를 위해 이식할 경우 미분화 상태의 세포가 증식하여 암을 발생시킬 수 있으며, 배아줄기세포주의 조직 적합성 불일치에 따른 면역학적 거부반응이 문제될 수 있다. 성체줄기세포는 체외배양 등의 조건에서 쉽게 분화에 빠져 체외조작이 어렵고, 대량증식이 어려운 측면이 있으나, 생체 내에 이식된 후 장기의 특성에 맞게 분화하는 장기 특이적 분화 및 본래의 세포 특성과 다른 종류의 장기세포로 전이분화 할 수 있는 분화의 유연성(plasticity of stem cells)을 가지고 있다. 골수나 제대혈 등에서 얻어지는 조혈줄기세포 및 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)는 다양한 분화능력으로 치료에 응용되고 있는 세포이다. 따라서 최근 발표된 줄기세포 관련 논문을 분석하고 향후 폐질환에서 응용 가능성을 알아보려고 한다.

1. Burnham EL, et al. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated

Address for correspondence: **An Soo Jang, M.D.**
Division of Allergy and Respiratory Medicine,
Department of Internal Medicine, Soonchunhyang
University Bucheon Hospital, 1174, Jung-dong,
Wonmi-gu, Bucheon-si, Gyeonggi, 420-767, Korea
Phone: 82-32-621-5143, Fax: 82-32-621-5016
E-mail: jas877@schbc.ac.kr

with survival in acute lung injury. (Am J Respir Crit Care Med 2005;172:854-60)

배 경: 급성폐손상은 폐포 모세혈관 막의 손상을 가져오며 이러한 손상된 혈관내피세포의 회복은 급성폐손상의 회복에 중요하다.

가 설: 급성폐손상에서 말초 혈관내피 progenitor 세포가 증가하고 이러한 증가가 급성폐손상과 급성호흡부전증후군의 예후에 좋은 영향을 미칠 것이다.

방 법: 초기 급성폐손상 환자 45명, 기관 삽관 대조군 10명, 건강대조군 7명을 대상으로 혈액에서 PBMC를 분리하여 세포배양관에 배양 후 24시간에 non-adherent 세포를 제거 후 1×10^6 cells/well로 배양 판에 분주 후 7일에 콜로니 수를 세었다.

결 과: 혈관내피세포 콜로니가 정상대조군에 비해 급성폐손상 환자에서 유의하게 증가하였으나($p < 0.05$, Figure 1), 급성폐손상과 기관삽관 대조군과는 차이가 없었다. 급성폐손상 환자에서 콜로니 수가 증가할수록 생존기간이 증가하였다(Figure 2). 나이, 성별, 병의 중증도를 보정하였을 때 콜로니수가 35개 이상인 군에서 사망률이 30%, 35개 미만인 군에서 61%로 콜로니 수가 많은 군에서 사망률이 낮았다.

결 론: 말초 혈관내피 progenitor 세포 수 증가는 급성폐손상 환자의 생존율을 증가시킨다.

논문분석: 말초 혈관내피 progenitor 세포의 분석을 콜로니로 하였는데 줄기세포의 마커나 면역화학염색을 통하여 확인하지 않아 콜로니가 줄기세포외에 다른 세포의 혼합 가능성을 배제하기 어려운 점이 있고 동물실험에서 밝혀진 것처럼 혈관내피 progenitor 세포가 1형 상피세포, 섬유아세포, 대식세포 등으로 분화하여 어떻게 급성 폐손상에 영향을 미쳤는지에 대한 기전연구가 필요하다.

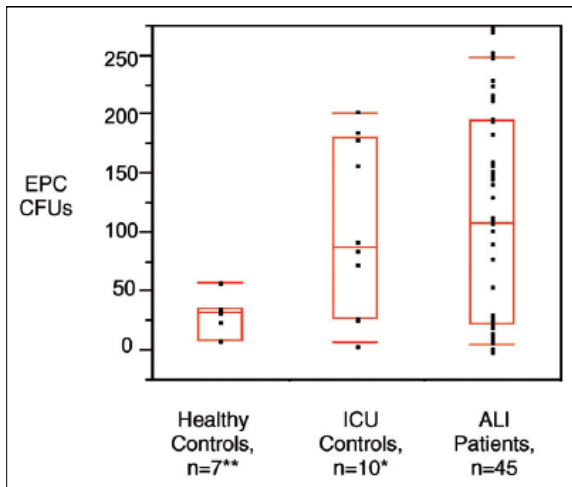


Figure 1. Numbers of EPC colony-forming units (CFUs) from healthy control patients, ICU control patients, and patients with ALI. Both ICU control patients and patients with ALI have significantly more EPC CFUs than do healthy control patients. * $p=0.95$ versus patients with ALI, ** $p<0.05$ versus patients with ALI. Boxes represent the median, 25th, and 75th percentiles. The 10th and 90th percentiles are signified by floating red bars.

2. Fadini GP, et al. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. (Stem Cells 2006;24:1806-13)

배 경: 중증 만성폐질환 환자는 폐혈관내피세포의 기능변화로 폐혈관개형을 초래한다. 말초 혈관내피 progenitor 세포는 혈관내피세포의 항상성을 유지한다. 이 연구는 폐쇄성 및 제한성폐질환의 임상적 지표와 말초혈액의 혈관내피 progenitor 세포 수와 관련성을 평가하였다.

방 법: 산소치료를 받고 있는 폐쇄성 및 제한성폐질환 각각 15명과 대조군 15명을 대상으로 하였으며 각 환자의 말초혈액에서 혈관내피 progenitor 세포 수를 세었으며, 혈관내피 progenitor 세포 표면항원 마커는 CD33, CD133, kinase-insert domain으로 하였다. 그리고 폐기능검사, 동맥혈가스분석, 혈액세포분획 등과 혈관내피 progenitor 세포 수와의 관련성을 분석하였다.

결 과: 만성저산소증 폐질환환자에서 혈관내피 progenitor 세포 수가 대조군에 비해 낮았고, 제한성

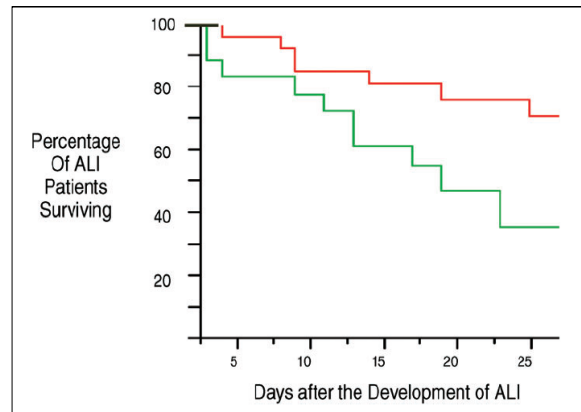


Figure 2. Kaplan-Meier curve of patients with ALI stratified by EPC CFU count of greater than or equal to 35 (red line) or less than 35 (green line). Patients with ALI with an EPC CFU count of greater than 35 had a survival benefit, with approximately 70% of these patients alive at 28 days, compared with 35% in those patients with EPC CFUs less than 35. $p<0.03$ for comparison between the two groups.

폐질환환자에서 폐쇄성폐질환환자 보다 더 낮았으며 세포 자연사는 증가하였다(Figure 3). 제한성폐질환환자에서 혈관내피 progenitor 세포 수의 감소는 폐용량감소, 폐포모세혈관 확산장애와 관련되며 적혈구 수와 연관이 있었다. 폐쇄성폐질환에서는 혈관내피 progenitor 세포 수와 기도폐쇄, 산소분압과 관련이 있었다.

결 론: 말초 혈관내피 progenitor 세포 수 감소는 만성폐질환과 만성적 저산소증과 관련이 있으며, 특히 제한성폐질환의 중증도와 관련이 있었다. 말초 혈관내피 progenitor 세포 수의 감소는 이러한 질환의 혈관내피세포의 균형의 변화에 의해 일어남을 제시한다.

3. Coraux C, et al. Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. (Am J Respir Cell Mol Biol 2005;32:87-92)

배 경: 발생 초기의 배반포(blastocyst)에서 얻어지는 배아줄기세포는 미분화상태의 자가 재생산 능력이 있다. 배아줄기세포의 다양한 세포로의 분화는 세포 치료제의 가능성을 제시한다. 따라서 이 연구에서는 배아줄기세포로부터 기도상피세포로의 분화가능성을

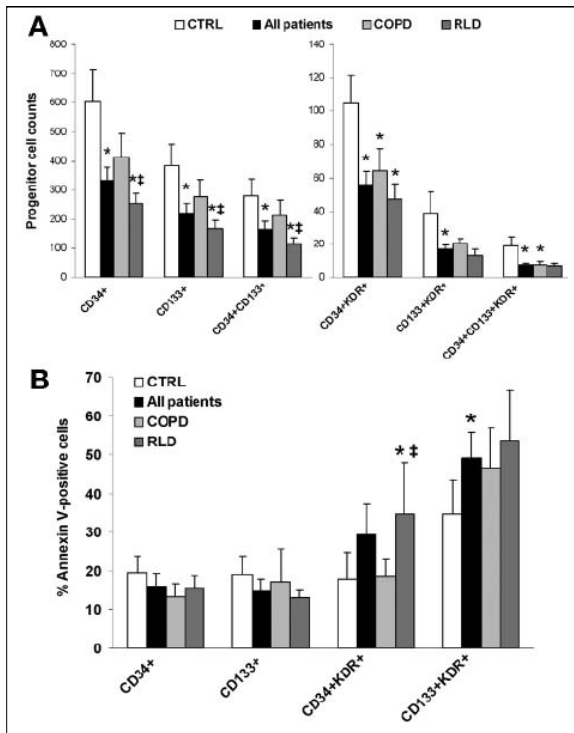


Figure 3. Reduction of circulating progenitor cells in patients with severe lung disease. (A): Comparisons of the levels of all progenitor cell subtypes in control subjects, in all patients with hypoxemia due to pulmonary disease, in patients with RLD, and in patients with COPD. Analysis of variance (ANOVA) $p < .05$ for all cell types. (B): Percentages of progenitor cells positive for Annexin V binding in the same four groups. ANOVA $p < .05$ for CD34 KDR and CD133 KDR cells. * $p < .05$ for t test comparing COPD with controls. † $p < .05$ for t test comparing COPD with RLD patients. Abbreviations: COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CTRL, control subjects; RLD, restrictive lung disease.

알아보고자하였다.

방 법: Mouse cell line의 배아줄기세포를 배양하여 기도상피세포로 분화하는 것을 확인하고 type 1 collagen이 분화유도에 영향을 미치는 지를 확인하며, air-liquid interface에 배양 시 배아줄기세포가 기도상피로 분화하는지, 분화된 세포는 정상적인 기관-기관지상피세포와 유사한지 등을 RT-PCR, 면역화학염색, Western blotting, 전자현미경으로 확인하였다.

결 과: Mouse cell line의 배아줄기세포를 배양하여 non-ciliated secretory Clara cells로 분화하고 type 1 collagen이 분화유도에 영향을 미침을 확인하

였다. 그리고 air-liquid interface에 배양 시 배아줄기세포가 기도상피로 분화하고, 분화된 세포는 정상적인 기관-기관지상피세포와 유사한 basal, ciliated, intermediate, Clara cells로 구성되며 전자현미경에서 섬모의 중앙에 tubule-doublet과 주위에 9쌍의 tubule을 확인하였다(Figure 4).

논문분석: 배아줄기세포가 기도상피세포로 분화하는 것으로 확인되어 기도상피질환의 세포치료제 개발의 가능성을 제시하였다.

4. Wang G, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. (Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:186-91)

배 경: 낭성섬유화증은 CF transmembrane conductance regulator(CFTR)의 변이로 chloride와 수분의 이동을 변화시켜 폐 방어기전에 손상을 주어 세균 감염, 호흡부전을 초래한다. 지금까지 손상된 기도상피에 바이러스나 non-viral vector를 통해 정상 CFTR 유전자를 이입하는 방법이 연구되었으나 점액, 바이러스 vector의 수용체 결핍, 빠른 DNA 파괴, 핵내 이입이 잘되지 않음과 같은 문제점이 있었다. 손상된 CFTR 기능을 정상적인 기도 상피로 변화시키는 것이 낭성섬유화증의 근본적인 치료법이다. 이 연구의 목적은 CFTR 유전자를 교정한 중간엽 줄기세포를 이용하여 정상적인 기도상피로의 분화를 확인하기 위함이다.

방 법: 골수에서 유래하는 중간엽 줄기세포를 분리하여 air-liquid 배양 체계를 이용하여 중간엽 줄기세포가 기도상피세포로 분화하는지 알기위해 면역조직염색, flow cytometry, 광학현미경 등으로 확인하고, CFTR유전자 교정 중간엽 줄기세포가 cAMP 자극에 의해 chloride분비에 영향을 미치는가를 Cl-efflux분석으로 확인하였다.

결 과: 중간엽줄기세포는 air-liquid 배양 체계에서 기도상피세포로 분화하였으며 CFTR 유전자를 교정한 중간엽줄기세포가 cAMP 자극으로 chloride를

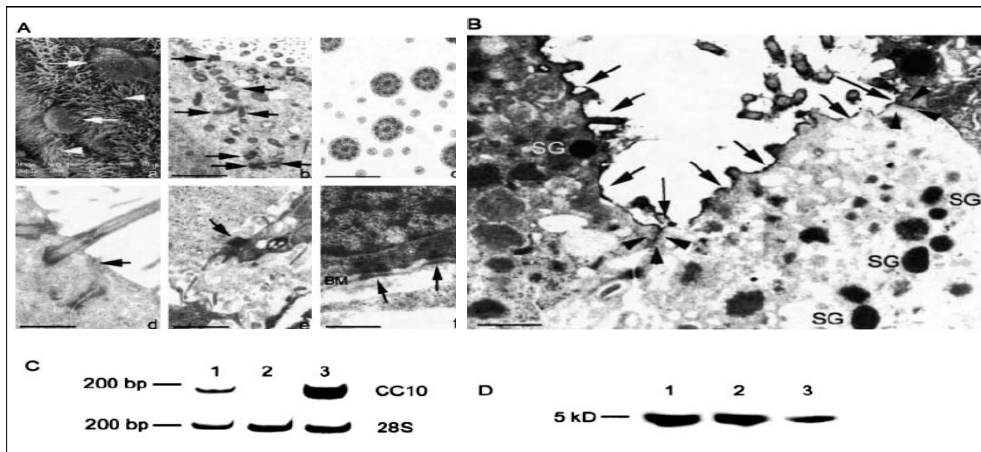


Figure 4. SEM of generated airway epithelium (Aa) showing ciliated cells (white arrowheads) and cells exhibiting a nonciliated bulging apical membrane, characteristic of Clara cells (white arrows). Ultrastructural features of in vitro ES-derived bioengineered airway epithelium observed by TEM (Ab, Ac, Ad, Ae, and Af). This epithelium exhibits active ciliogenesis demonstrated by centriole migration (black arrows) toward the apical plasma membrane (b) leading to the formation of mature cilia composed of nine tubule-pairs at the periphery and a tubule-doublet in the center of the cilia (c). The bioengineered epithelium exhibits tight junctions (black arrow) at the apical part of lateral plasma membranes (d), desmosomes (black arrow) at the lateral plasma membranes (e) and hemidesmosomes (black arrows) connecting the basal plasma membranes to the underlying basement membrane (BM) (f). Bars 10 μm (a); 150 nm (b), 30 nm (c), 75 nm (d), 295 nm (e), and 50 nm (f). (B) Functionality of the tight junctions analyzed using the lanthanum nitrate diffusion technique and visualized by TEM. Ultrathin sections show that lanthanum nitrate remains located at the apical surface of the ES-derived bioengineered airway epithelium (black arrows) and does not penetrate through the tight junctions (black arrowheads) between electron-dense secretory granule (SG)-containing Clara cells. Bar 50 nm. (C) Electrophoresis of RT-PCR products of CC10 mRNA extracted from control mouse trachea (lane 1), undifferentiated ES cells (lane 2) and ES-derived airway epithelium (lane 3) shows the expected 198-bp transcript in bioengineered airway epithelium. 28S housekeeping gene generates the expected 212-bp transcript. (D) Western blot analysis of the CC10 protein in the secretions covering the air-liquid interface cultures reveal a 5-kD protein corresponding to the CC10 protein (lane 3) also observed in native mouse lung (lane 1) and tracheal (lane 2) tissues.

분비하였다(Figure 5).

결론: 중간엽줄기세포를 이용하여 낭성 섬유화증에서 CFTR 유전자의 세포치료 가능성을 제시하였다.

논문분석: 이 논문은 air-liquid 배양 체계를 이용한 논문으로 환자에서의 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

5. Rojas M, et al. Bone marrow - driven mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. (Am J Respir Cell Mol Biol 2005; 33:145 - 52)

배경: 중간엽 줄기세포는 폐포상피세포 type 1, type 2, 그리고 fibroblast, 기관지 상피세포로 분화하는 것으로 알려져 있다. 이 연구에서 쥐에서 bleomycin 치료로 폐손상 모델을 만들고 중간엽 줄기세포

로 세포치료하여 중간엽 줄기세포가 폐손상의 회복에 관여하는지, 어떤 세포로 분화하는지, 세포분화에 관여하는 환경(microenvironments)은 무엇인지 등을 알아보고자 하였다.

방법: busulfan 20 mg/kg로 골수를 억제하고 4 U/kg bleomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처치하여 기도손상을 일으킨 동물모델에서 대식세포 [anti-CD11b (BD, Palo Alto, CA)]와 조혈모세포 [anti-CD45 (BD)] 항체로 혈액줄기세포를 분리하고 5×10^6 cells/ml의 중간엽 줄기세포를 꼬리에 주입한 후 중간엽줄기세포의 분화와 microenvironments 변화를 조직화적인 방법, 사이토카인 측정 등을 통하여 확인하고, 중간엽 줄기세포 주입 후 14일까지 추적관찰하였다.

결과: bleomycin 처치군에서 기도손상이 증가되었고, 중간엽 줄기세포 처치군에서 2주 동안 쥐의 생

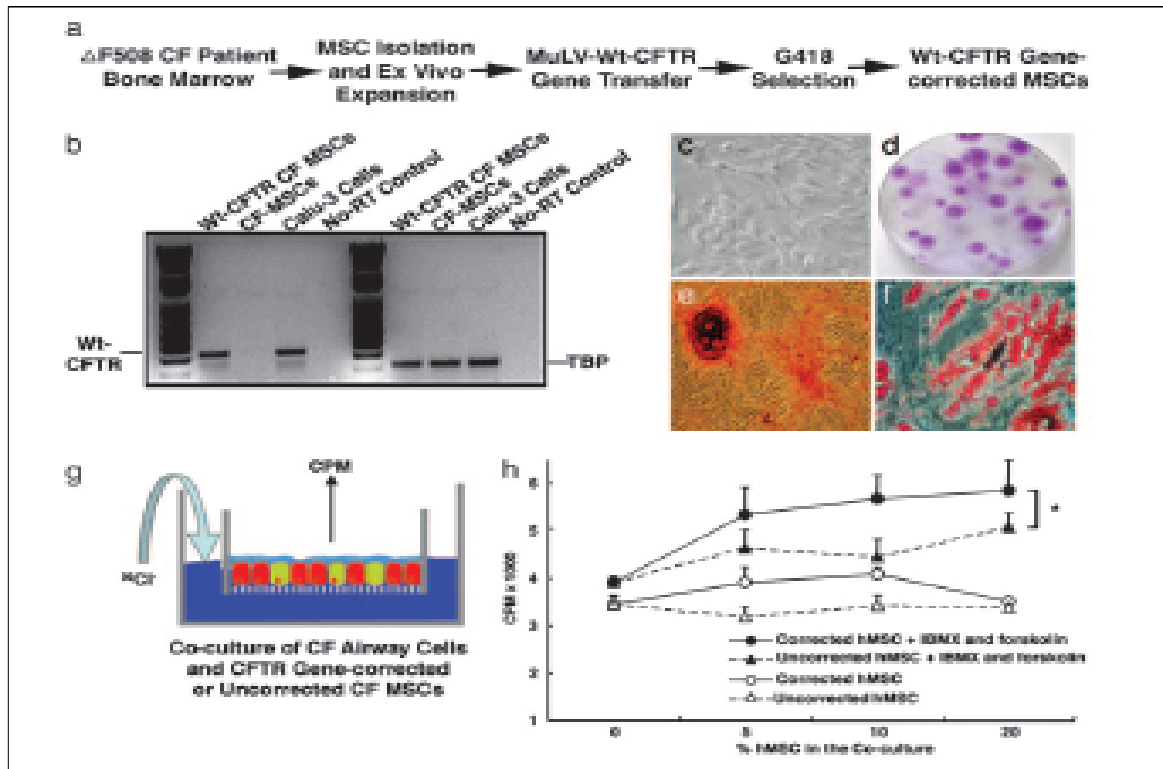


Figure 5. CFTR-corrected CF-patient MSCs retained their multipotency and responded to cAMP stimulation by secreting chloride to the apical side. (a) Schematic for CF-patient MSC isolation, expansion, gene correction, and positive drug selection. (b) RT-PCR to verify the successful CFTR gene transfer. RT-PCR was performed to amplify WT CFTR transcripts but not Δ F508 mutant transcripts. The gene-corrected CF MSCs and positive control Calu-3 cells have WT CFTR transcription, whereas non-gene-corrected CF MSCs and the no-RT control show negative amplification. In the TBP RT-PCR control, all of the samples except the no-RT control show positive PCR products. (c) Phase-contrast microscopic view of the CFTR gene-corrected CF-patient MSCs. (d) Photomicrograph of a representative stem cell colony plate. Purple-stained foci are the MSC colonies. (e) Osteogenesis of the CFTR gene-corrected CF-patient MSCs. After differentiation in an osteogenic medium, cells had mineral deposits visualized in red by Alizarin red staining. (f) Adipogenesis of the CFTR gene-corrected CF-patient MSCs. After differentiation in an adipogenic medium, cells had lipid droplet accumulation stained in red with oil red O. (g and h) CFTR gene-corrected MSCs from CF patients contributed to the apical cAMP-stimulated Cl⁻ secretion. CFTR gene-corrected CF-patient MSCs or non-gene-corrected CF-patient MSCs were mixed with Δ F508 CF AECs at different ratios as indicated. After 1 month in culture at the air-liquid interface, chloride efflux assays were performed as described in Materials and Methods. A two-way ANOVA test revealed that cocultures with the CFTR gene-corrected CF-patient MSCs (F) had a greater chloride secretion in response to the IBMX and forskolin stimulation than the cocultures with non-gene-corrected CF-patient MSCs (OE) (n 4; P \leq 0.05).

존율이 100%이었으며, 기도의 염증세포 및 폐손상, 폐섬유화가 유의하게 감소하였다. 중간엽 줄기세포는 손상된 폐에서 폐포 상피세포 type 1, type 2, fibroblasts, myofibroblasts로 분화하였다(Figure 6). 중간엽 줄기세포는 손상된 폐에 더 잘 모이고 정착하며, 그리고 세포배양에서도 손상된 폐에서 모집한 세포 쪽으로 중간엽 줄기세포가 더 이동하였다. 혈액에서 G-CSF, GM-CSF 등이 증가하며 폐조직에서

IFN- γ , IL-2, IL-1 β , 그리고 IL-4 등이 증가하였다.

결론: 중간엽 줄기세포는 손상된 폐로 모여서 여러 가지 세포로 분화하고 폐염증을 감소시키고 세포 성장인자의 생성을 증가시킨다.

논문분석: 이 논문은 동물 실험이지만 중간엽 줄기세포가 손상된 폐에서 더 많이 모이고 폐포 상피세포 type 1, type 2와 fibroblasts, myofibroblasts로 분화하며, 또한 세포 분화에 주위 환경(microenviron-

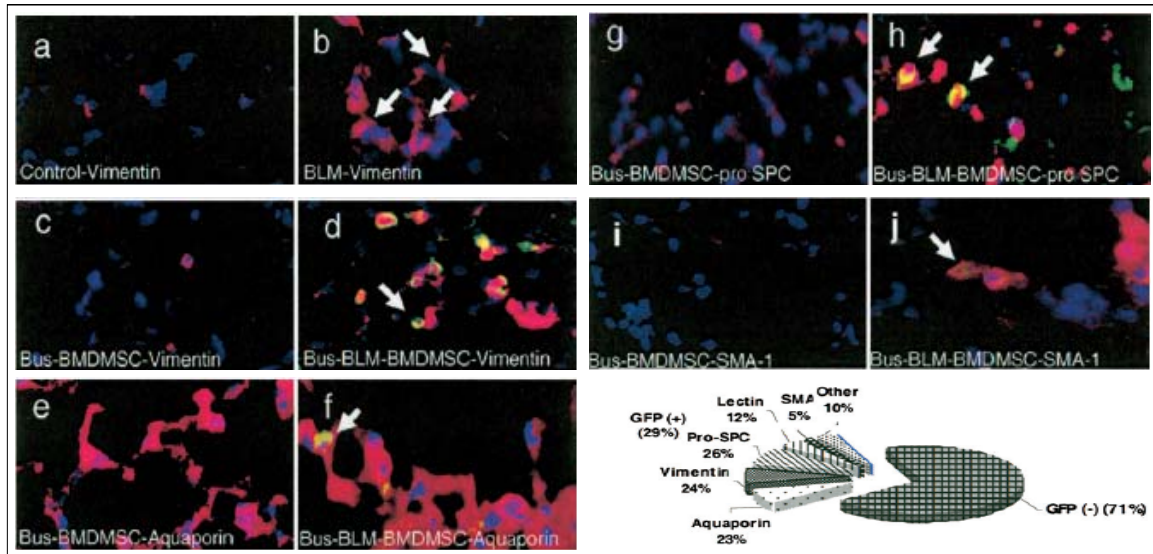


Figure 6. Donor BMDMSC localizing to injured lung assume lung cell phenotypes. Sections were analyzed in double-stained IIFA with anti-GFP (green) and antibodies to specific cell type markers (red); co-localization in each case appears yellow (arrows point to double positive cells). (a-d) Anti-vimentin (fibroblast). (a) Normal control; (b) 14 d after bleomycin; (c) 14 d after busulfan followed by BMDMSC (no lung injury); (d) 14 d after bleomycin followed by BMDMSC in a busulfan myelosuppressed animal. (e, f) Anti-aquaporin (type I alveolar epithelium). (e) Fourteen days after busulfan followed by BMDMSC (no lung injury); (f) 14 d after bleomycin followed by BMDMSC in busulfan myelosuppressed animal. (g, h) Anti-pro-surfactant protein C (type II alveolar epithelium). (g) Fourteen days after busulfan followed by BMDMSC (no lung injury); (h) 14 d after bleomycin followed by BMDMSC in busulfan myelosuppressed animal. (i, j) Anti-smooth muscle actin (SMA-1, myofibroblasts). (i) Fourteen days after busulfan followed by BMDMSC (no lung injury); (j) 14 d after bleomycin followed by BMDMSC in busulfan myelosuppressed animal. (k) Percentage of GFP-positive cells that express lung cell phenotype markers in myelosuppressed mice treated with bleomycin and infused with BMDMSC. All microphotographs were taken at 40 magnification.

ment)이 영향을 주어 폐손상을 억제함을 보여주는 논문으로 줄기세포치료가 폐에서 세포손상, 폐섬유화의 억제에 치료제로 사용될 수 있음을 보여주는 논문으로 생각된다. 그러나 분화된 세포가 fibroblasts, myofibroblasts로 분화하여 만성폐쇄성폐질환이나, 중증 천식에서 이러한 세포들이 위해한 영향을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있어 더 많은 연구가 필요할 것이다. 또한 분화된 세포들이 얼마동안 효과가 있을 것인지, 투여되는 세포의 수의 변화가 치료에 대한 효과를 증대시킬 수 있을 것인지에 대한 연구가 필요하고, 사람에서 일반적인 치료에 반응하지 않는 폐섬유증이나, 만성 천식에서 임상연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론

줄기세포의 응용을 통한 난치병 정복은 21세기 생

명과학계의 중요한 이슈로 심근 경색증, 뇌졸중, 골형성이상, 혈액 및 면역계, 유전병, 간질환, 내분비 질환, 피부 질환 등 의학의 거의 모든 영역에서의 변화를 일으키고 있다. 특히 과거 의학적 한계로 생각되었던 퇴행성 질환이나 말기 장기부전 등의 다른 대안이 없는 질환에 대해 줄기세포를 통한 재생의학의 새로운 장을 열어감으로써 현대의학의 획기적 발전을 이루었다. 그러나 폐질환에 대한 줄기세포 치료는 거의 없는 상태이다. 그러나 최근의 보고들은 폐질환에서도 줄기세포가 치료제의 가능성을 보여주고 있어, 폐에서 줄기세포의 분화 기전, 안전성 등이 확립되어, 발병하면 5년 생존율이 30-50% 정도 밖에 되지 않는 특발성 폐섬유증, 급성 폐손상, 만성폐쇄성폐질환, 치료에 반응하지 않는 천식 등에서 세포 치료제로 역할이 기대된다.

참 고 문 헌

1. Sanders RC Jr, Slayton WB, Cogle CR, Fisher RC, Scott EW. Stem cell research. *Paediatr Respir Rev* 2006;7:135-40.
2. Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, Rojas M, Brigham KL, Moss M. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:854-60.
3. Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, Baesso I, Facco M, Miorin M, et al. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. *Stem Cells* 2006;24:1806-13.
4. Coraux C, Nawrocki-Raby B, Hinnrasky J, Kileztky C, Gaillard D, Dani C, et al. Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:87-92.
5. Wang G, Bunnell BA, Painter RG, Quiniones BC, Tom S, Lanson NA Jr, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:186-91.
6. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:145-52.
7. Randell SH. Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:718-25.
8. Al-Jamal R, Wallace WA, Harrison DJ. Gene therapy for chronic obstructive pulmonary disease: twilight or triumph? *Expert Opin Biol Ther* 2005;5:333-46.
9. Ward C, Forrest IA, Murphy DM, Johnson GE, Robertson H, Cawston TE, et al. Phenotype of airway epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients. *Thorax* 2005;60:865-71.
10. Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Numasaki M, Ueda S, et al. Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* 2004;172:1266-72.
11. Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:686-95.
12. Yen CC, Yang SH, Lin CY, Chen CM. Stem cells in the lung parenchyma and prospects for lung injury therapy. *Eur J Clin Invest* 2006;36:310-9.
13. Kubo H. Is cell therapy in acute lung injury a realistic dream? *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:794-5.
14. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 2005;6:56.
15. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens* 2007; 69:1-9.
16. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36:2566-73.
17. Weiss DJ, Berberich MA, Borok Z, Gail DB, Kolls JK, Penland C, et al. Adult stem cells, lung biology, and lung disease. NHLBI/Cystic Fibrosis Foundation Workshop. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:193-207.