

Lipopolysaccharide로 자극한 RAW 264.7 세포에서 성체줄기세포 유래 엑소좀(exosome)의 면역 조절 효과

정수경[†], 박미정[†], 이지현[†], 변정수, 구나연, 조인수, 차상호*
농림축산검역본부 바이러스질병과

Received: April 29, 2016 / Revised: June 28, 2016 / Accepted: July 1, 2016

Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells

Soo-Kyung Jung[†], Mi Jeong Park[†], Jienny Lee[†], Jeong Su Byeon, Na-Yeon Gu, In-Soo Cho, and Sang-Ho Cha^{*}
Viral Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Republic of Korea

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells that can be differentiated into a variety of cell types, including adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, β -pancreatic islet cells, and neuronal cells. MSCs have been reported to exhibit immunomodulatory effects in many diseases. Many studies have reported that MSCs have distinct roles in modulating inflammatory and immune responses by releasing bioactive molecules. Exosomes are cell-derived vesicles present in biological fluids, including the blood, urine, and cultured medium of cell cultures. In this study, we investigated the immunomodulatory effects of mouse adipose tissue-derived MSCs (mAD-MSCs), cultured medium (MSC-CM) of mAD-MSCs, and mAD-MSC-derived exosomes (MSC-Exo) on lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 cells. We observed that the expression levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-10 were significantly increased in LPS-stimulated RAW 264.7 cells compared to those in LPS-unstimulated RAW 264.7 cells. Additionally, these values were significantly ($p < 0.05$) decreased in mAD-MSCs-RAW 264.7 cell co-culture groups, MSC-CM-treated groups, and MSC-Exo-treated groups. MSCs can modulate the immune system in part by secreting cytokines and growth factors. We observed that immunomodulatory factors such as IL-1 β , TNF- α , and IL-10 were secreted by mAD-MSCs under co-culturing conditions of mAD-MSCs with activated RAW 264.7 cells. In addition, mAD-MSC-derived exosomes exhibited similar immunomodulatory effects in activated RAW 264.7 cells. Therefore, our results suggest that mAD-MSCs have an immunomodulatory function through indirect contact.

Keywords: Adipose tissue, mesenchymal stem cells, exosome, indirect contact

서 론

성체줄기세포는 지방세포, 조골세포, 연골세포, 근육세포 등의 세포로 분화 가능한 다능성 세포로 조직 재생[9], 면역 조절 등 다양한 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 성체줄기세포는 기초 연구 분야 및 심근경색[17], 이식편대숙주병[37], 대장염[35], 간부전[36], 신부전[23], 크론병

[33], 중추신경계 외상[15], 자가면역성 뇌척수염[47], 류마티스성 관절염[50] 등 질병과 관련한 임상 연구 분야에서 면역 조절 기전에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다[16].

염증 반응은 미생물 감염, 내독소, 조직 손상과 같은 위해성 자극을 정상적으로 회복하기 위한 필수적 방어 작용으로, 정상적인 염증 반응은 시간이 지남에 따라 염증 촉진성 매개체(pro-inflammatory mediators)의 생성은 감소하고 항염증성 매개체(anti-inflammatory mediators)는 증가됨으로써 스스로 염증 반응 조절 과정을 가진다[26]. 이러한 염증 반응이 최근 암, 비만, 당뇨병 등 다양한 질환의 발병과 진행에 있어 중요한 역할을 한다고 보고되면서 염증 반응 조절을 통해 염증 관련 질환이 개선될 수 있는 가능성을 보이게 되었다[19]. 이러한 염증 반응에 관여하여 중요한 역

*Corresponding author

Tel: +82-54-912-0805, Fax: +82-54-912-0812
E-mail: virusmania@korea.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

할을 하는 것으로 알려져 있는 대식세포(macrophages)는 세균 세포막 성분인 lipopolysaccharides (LPS)의 자극으로 활성화된다[43]. 대식세포를 LPS로 자극하면 interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factors- α (TNF- α) 등과 같은 사이토카인 및 nitric oxide (NO)의 발현이 증가되므로[49], 항염증제를 개발하는 다른 방법으로 사이토카인 생성을 억제하는 치료제 개발이 연구되고 있다.

엑소좀(exosome)은 작은 지질층으로 이루어진 세포 분비소낭으로 세포 간에 단백질이나 RNA를 전달하여 세포 간 신호 전달을 매개하는데[11], 최근 성체줄기세포가 조직을 회복하는 과정이 엑소좀을 통한다고 알려졌다[2, 22, 27], 성체줄기세포 유래 엑소좀의 조직 회복에 관한 메커니즘은 명확하지 않다. 본 연구는 쥐 지방 조직으로부터 성체줄기세포(mouse adipose tissue derived-mesenchymal stem cells, mAD-MSCs)를 분리하여 그 특성을 분석하였으며, 대식세포를 이용한 염증 유사 세포 모델에서 성체줄기세포의 면역 조절 능력을 평가하고자 하였다. 이를 위해 대식세포와 성체줄기세포를 공배양하고 성체줄기세포 상층 배양액 및 성체줄기세포 유래 엑소좀을 활성화된 대식세포에 처리하여 성체줄기세포 및 성체줄기세포 유래 bioactive molecules의 면역 조절 능력을 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

세포의 분리 및 배양

성체줄기세포는 쥐의 복부 지방 조직으로부터 분리한다. 분리한 지방 조직은 300 U/ml penicillin (Gibco, USA)와 300 μ g/ml streptomycin (Gibco, USA)이 포함된 dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; Gibco, USA)으로 2회 세척하여 가위로 잘게 자른 다음 0.1% collagenase type I (Gibco, USA)과 1% bovine serum albumin (Bioworld, USA)이 포함된 DPBS를 넣고 37°C에서 40분간 반응한다. 100 μ m의 cell strainer (BD, USA)를 사용하여 조직 부유물을 거르고 400 \times g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거한다. 원심 분리된 pellet에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 low glucose dulbecco's modified eagle's media (DMEM; Gibco, USA)를 넣고 잘 섞은 다음 세포 배양용 175 T-flask에 1×10^6 개의 세포를 분주하여 5% CO₂, 37°C

세포배양기에서 배양한다. 다음날 세포 배양액을 교체하며, 3일 간격으로 세포 배양액을 교체하여 세포가 80% 밀집하면 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, USA)를 처리하여 세포를 계대 배양한다. 대식세포(ATCC, USA)는 5% CO₂, 37°C의 세포배양기에서 DMEM 배지로 배양한다. 2일마다 세포 배양액을 교체하며, 세포가 80% 밀집하면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 계대 배양한다.

유세포 분석(flow cytometric analysis)을 통한 세포 표면 특이 단백질 발현 검사

FACS Calibur™ flow cytometer (BD, USA)를 이용한 유세포 분석을 통해서 지방 조직으로부터 분리한 세포의 세포 표면 특이 단백질의 발현을 조사한다. 해당 세포에 형광 물질 fluorescein isothiocyanate (FITC) 또는 phycoerythrin (PE)이 결합된 CD34, CD45 (BD, USA) 및 CD44 (Abcam, UK) 항체를 사용하였으며, Cell Quest Pro (BD, USA) 프로그램 사용하여 결과를 분석한다.

중배엽 분화 유도 및 염색

중배엽 세포로 분화능을 확인하고자 adipogenesis, chondrogenesis, osteogenesis 유도용 맞춤 배지(Table 1)를 사용하여 분화를 유도한다. 3-4일 주기로 분화용 맞춤 배지를 교체하며, 21일째에 분화 확인용 키트를 이용하여 분화 여부를 관찰한다. Adipogenesis 분화는 Oil Red-O stain kit, chondrogenesis 분화는 Alcian Blue stain kit, osteogenesis 분화는 Alzarin Red stain kit를 이용한 특이 세포 염색을 통해 성체줄기세포의 중배엽 분화능을 확인한다(IHC World, USA).

성체줄기세포와 대식세포 공배양

성체줄기세포와 대식세포의 공배양은 trans-well culture 방법을 이용한다. 0.4 μ m pore 크기의 insert와 lower well에 성체줄기세포와 대식세포를 각각 24시간 배양하고, insert와 lower well을 결합한 다음 1 μ g/ml LPS (Sigma, USA)를 이용하여 대식세포를 자극하고 24시간 경과 후 대식세포를 모아 다음 실험에 사용한다. 또한, 성체줄기세포 상층 배양액(cultured medium; CM)을 얻고자 성체줄기세포를 12-36 시간 동안 배양하여 상층액을 수집한 다음 원심 분리하여 세포 등을 제거하고 다음 실험에 사용한다.

Table 1. Composition of differentiation media.

Adipogenesis		Chondrogenesis		Osteogenesis	
Dexamethasone	1 μ M	Dexamethasone	100 μ M	Dexamethasone	100 μ M
Indomethacin	200 μ M	Ascorbic acid 2-phosphate	25 μ M	Ascorbic acid 2-phosphate	50 μ g/ml
Isobutyl methylxanthine	500 μ M	β -glycerophosphate	10 μ M	TGF- β 1	0.5 μ g/ml
Insulin	20 μ g/ml				

엑소좀(exosome)의 분리

ExoQuick kit (SBI, USA)를 사용하여 성체줄기세포 유래 엑소좀을 분리한다. 성체줄기세포를 배양한 세포 상층액을 원심 분리하여 준비한 다음, 제조사의 안내 방법에 따라 ExoQuick exosome precipitation solution을 넣고 4°C에서 24시간 동안 반응시킨 뒤 350 × g에서 원심 분리하여 엑소좀을 분리하고 다음 실험에 사용한다[27, 40].

정량적 중합효소연쇄반응(quantitative real-time RT-PCR)을 이용한 면역 조절인자 분석

RNeasy mini kit (Qiagen, USA)를 이용하여 RNA를 추출하고, Nano-drop 1000 (Thermo, USA)을 사용하여 RNA 상태와 농도를 측정하며, cDNA 합성을 위해 GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, USA)를 사용한다. Quantitative real-time RT-PCR (qPCR)은 96 well plate에 LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics, USA)를 사용하여 predenaturation (95°C, 10분), annealing (62°C, 10초), elongation (72°C, 10초)을 45 cycle 반복한다. 그리고 2^{-ΔCt} 계산법을 이용하여 melting curve를 분석하고[30], GAPDH 발현을 reference gene으로 이용하여 qPCR 결과를 분석한다.

통계학적 분석

독립적인 3회(n = 3)의 실험을 수행하였으며, 결과는 평균과 표준편차(mean ± SD)를 표시하여 나타내었다. 두 실험군 사이의 유의성은 Student's *t*-test (JMP® 6.0; SAS Institute Inc., USA) 및 one-way ANOVA (analysis of variance)를 사용하여 검정하였으며, 유의성있는 결과(*p* < 0.05)를 판정한다.

결과 및 고찰

성체줄기세포의 분리 및 증식

성체줄기세포는 1970년대 사람 골수로부터 처음 분리되었으며[13, 14], 이러한 성체줄기세포는 지방 조직, 제대, 제대혈 등 다양한 조직으로부터 분리, 연구되고 있다[18, 24, 51]. 본 연구는 쥐의 복부 지방 조직으로부터 세포를 분리하여 해당 세포가 성체줄기세포의 특성 중 하나인 섬유아세포 모양으로 부착해서 잘 자라는 것을 확인하였다(Fig. 1A).

세포 표면 특이 단백질 발현 및 증배업 분화 유도능 확인

세포 표면 특이 단백질을 확인하고자 유세포 분석 방법을 통해 CD11b, CD31, CD34, CD44, CD45 및 CD117의 발현을 확인하였다. 그 결과 성체줄기세포의 positive marker인 CD44의 발현을 확인하였고, negative marker인 CD11b,

CD31, CD34, CD45 및 CD117은 발현되지 않음을 확인하였다(Fig. 1B). 다음으로 해당 세포의 증배업 세포 분화능을 확인하고자 지방세포, 골세포, 연골세포로 분화를 유도하였다. 그 결과 지방세포로 분화를 유도한 성체줄기세포를 Oil Red-O로 염색하여 붉은 색으로 염색된 지방 방울이 축적되어 지방세포로 분화됨을 확인하였다. 다음으로 골세포로 분화를 유도한 성체줄기세포를 Alizarin Red로 염색하여 갈색으로 염색된 골기질 구조가 확인되어 골세포로 분화됨을 확인하였다. 또한, 연골세포로 분화를 유도한 성체줄기세포를 Alcian Blue로 염색하여 파란색으로 염색된 연골 기질을 확인, 연골세포로 분화됨을 확인하였다(Fig. 1C). 즉, 지방세포, 골세포, 연골세포에 대한 특이 세포 염색을 통해 쥐의 복부 지방 조직으로부터 분리한 성체줄기세포의 증배업 분화능을 확인하였다.

염증 유사 대식세포 모델에 미치는 성체줄기세포와 상층 배양액의 영향

성체줄기세포를 이용한 이식 치료 분야에서 성체줄기세포를 손상 부위에 이식하면 기능적 개선은 보이나 성체줄기세포가 이식 부위 내에서 적절한 세포 유형으로 분화되는 모습은 보기 드물다고 보고되었으며[12, 39, 42], 성체줄기세포 이식 치료에서 나타난 이러한 기능적 개선이 성체줄기세포와 조직의 직접적인 접촉에 의존하지 않는다고 보고되기도 하였다[5, 7, 20, 32]. 이러한 결과들은 성체줄기세포에 의한 조직의 손상 감소 및 회복이 성체줄기세포의 직접적인 분화보다는 성체줄기세포가 분비하는 bioactive molecules을 통해 이루어지고 있을 가능성을 제안한다[4]. 염증과 관련한 다양한 사이토카인 중, IL-1β는 외부 감염이나 염증이 발생하였을 때 국소적으로 생산되는데, 과도한 IL-1β의 생성은 염증성 질환이나 암을 유발하며[41], T 세포, B 세포, NK 세포 활성화에 직접적으로 관여하여 염증 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다[8, 34]. 또한 TNF-α는 염증성 전구 사이토카인으로 주로 자극된 대식세포에서 분비되지만 섬유아세포, T 세포, B 세포, 내피세포 및 상피세포에서도 분비되어 급성 염증 반응에서 중요한 역할을 한다. IL-10은 다양한 특성을 가진 사이토카인으로 적응 면역(adaptive immunity)에 관련된 세포를 조절하며 T 세포, B 세포, NK 세포와 비만세포를 활성화시켜 면역을 자극하는 특성을 가지고 있다[31, 46]. 또한 루프스와 뇌척수염과 같은 자가면역질환에서 비정상적인 혈관 형성을 유도한다고 알려져 있으며[6], 오히려 건선을 악화시키는 데에 중요한 역할을 한다고도 보고되었다[38]. 흑색종이나 몇몇 림프종에서 IL-10의 과발현이 발견되었고 이는 암의 진행과 관련이 있다고 보고되었으며[1], 그람 음성균성 폐렴 모델에서도 과발현된 IL-10이 대식세포의 표현형을 변형시켜 사망률을 증가시킨다고 보고되었다[10].

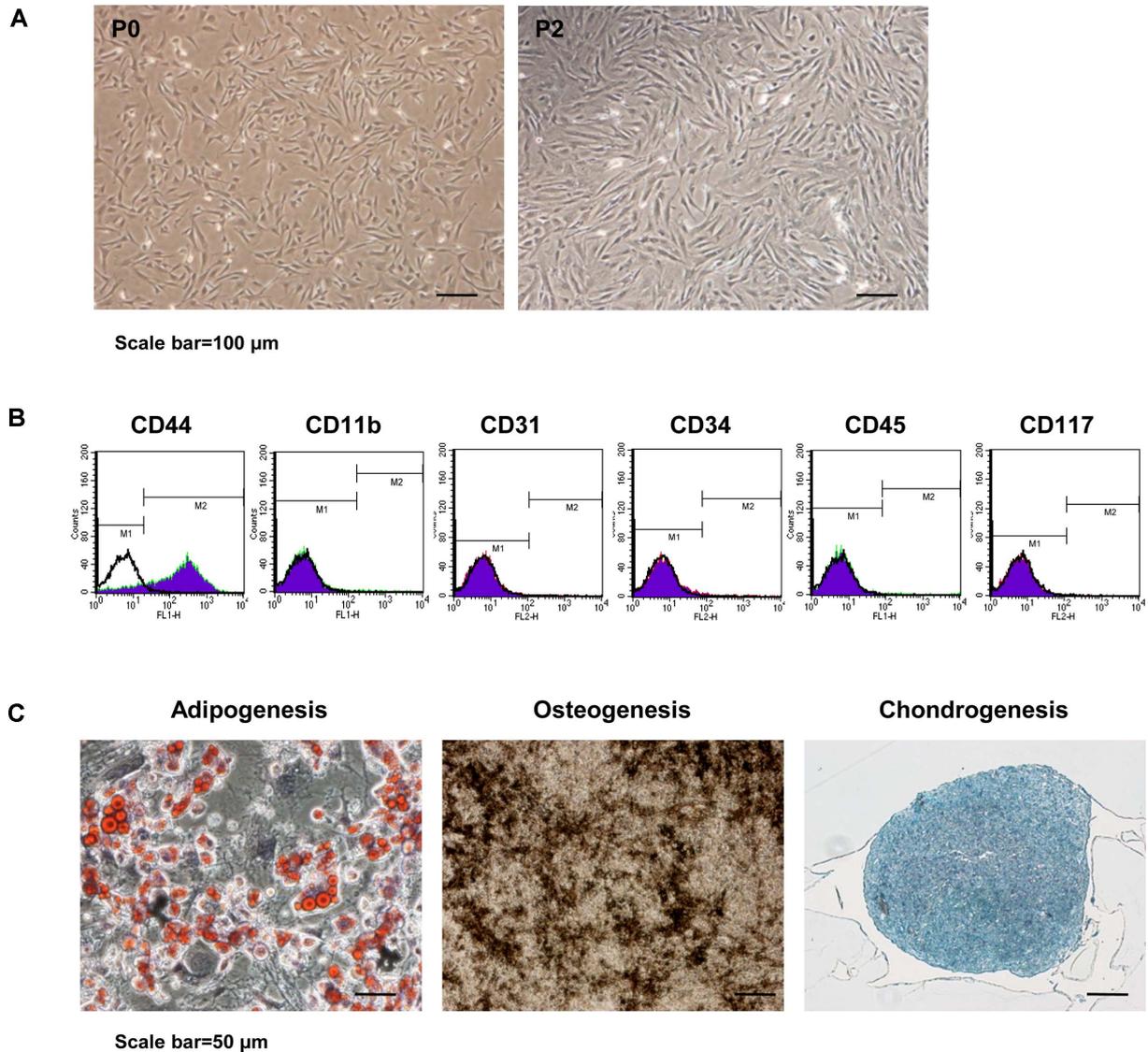


Fig. 1. Isolation, characterization and differentiation potential of mouse adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (mAD-MSCs). (A) The mAD-MSCs obtained from mouse adipose tissue were able to attach to the culture plates and expand in vitro at passage 0 and 2 ($\times 100$). (B) For further characterization of the mAD-MSCs, cell surface markers were analyzed by FACS. mAD-MSCs were strongly positive for CD44, but negative for CD11b, CD45, CD31, CD34 and CD117. (C) mAD-MSCs were differentiated to adipogenesis, osteogenesis and chondrogenesis. mAD-MSCs were cultured in adipogenic, osteogenic or chondrogenic medium for up to 21 days. Adipocytes (Oil Red-O), osteocytes (Alizarin Red), and chondrocytes (Alcian Blue) were positively stained in differentiated cells.

본 연구는 LPS를 이용한 대식세포 염증 유사 세포 모델에서 성체줄기세포의 면역 조절 능력을 평가하였다. 대식세포를 LPS로 자극하여 대식세포에서 염증 관련 면역인자로 알려져 있는 IL-1 β , IL-10 및 TNF- α 등의 사이토카인 생산을 확인하였으며, 순수하게 대식세포에 미치는 성체줄기세포 상층 배양액의 영향을 관찰하고자 대식세포의 mRNA에서 사이토카인 생산을 확인하였다[45]. IL-1 β 는 LPS로 12시간 자극한 단독 실험군에서 최대 생성되었으며, 성체줄기세포

와 공배양한 실험군과 상층 배양액을 처리한 실험군에서 통계학적으로 유의하게 IL-1 β 의 생성이 억제됨을 확인하였다 (Fig. 3A). TNF- α 또한 LPS로 12시간 자극한 단독 실험군에서 최대 생성되었으며, 성체줄기세포와 공배양한 실험군과 상층 배양액을 처리한 실험군에서 통계학적으로 유의하게 TNF- α 의 생성이 억제됨을 확인하였다(Fig. 3B). 다음으로 면역 관련 저해 인자로 알려져 있는 IL-10의 생성을 확인한 결과, IL-10은 LPS로 36시간 자극한 단독 실험군에서 최

대로 생성되었으며, 성체줄기세포와 공배양한 실험군과 상층 배양액을 처리한 실험군에서 통계학적으로 유의하게 IL-10의 생성이 억제됨을 확인되었다(Fig. 3C). 대조군으로는 LPS 무자극 실험군을 이용하여 성체줄기세포와 상층 배양액을 처리하였다. 그 결과 성체줄기세포 및 상층 배양액 단독군에 의한 대식세포의 면역 반응은 관찰되지 않았다. 즉, LPS 자극에 의해 증가된 IL-1 β , TNF- α 및 IL-10의 생성은 성체줄기세포를 공배양한 실험군 뿐만 아니라 성체줄기세포를 배양한 상층 배양액을 처리한 실험군에서도 동일한 효과를 나타냄을 확인하여 성체줄기세포가 분비하는 물질에 의

해 대식세포의 증가된 면역 반응이 조절되고 있음을 확인하였다.

염증 유사 대식세포 모델에 미치는 성체줄기세포 유래 엑소좀의 영향

최근 성체줄기세포를 적용한 심근경색, 급성호흡부전, 심근허혈, 이식편대숙주병 등 다양한 질병 연구 모델에서 성체줄기세포의 치료 효과가 성체줄기세포 유래 엑소좀에 의한 새로운 세포 간 신호 전달에 의한다고 보고되었다[2, 22, 25, 27]. Bian 등[2]은 심근경색 모델에서 엑소좀에 의한 혈류의

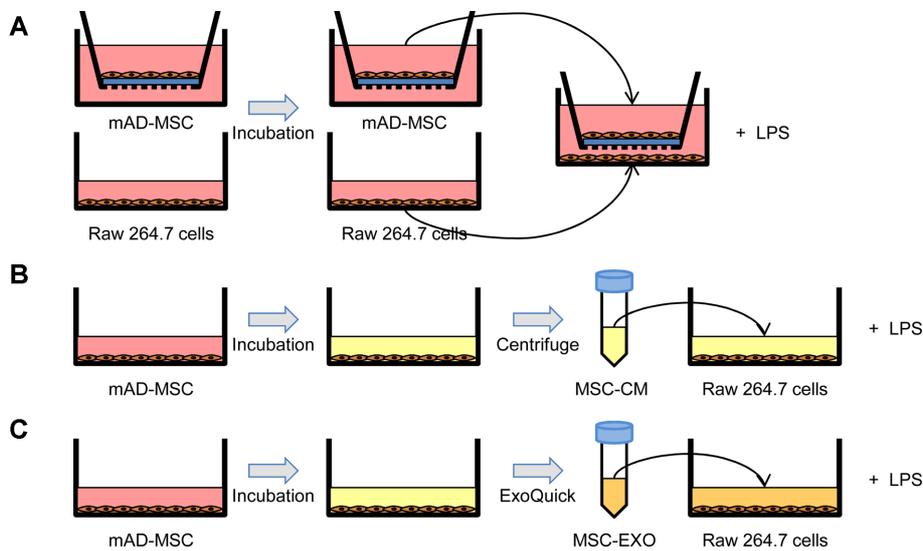


Fig. 2. Schematic diagram of co-culture experiment and representation of the in vitro co-culture system. Firstly, mAD-MSCs (1×10^6 cells/well) were plated on the inner transwell membrane (0.4 μm pore size) and co-cultured with RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/well) stimulated with mitogen (LPS 1 μg/ml). After coculturing for 12-36 h, culture supernatants were collected. Exosomes were isolated from mAD-MSCs supernatants using ExoQuick kit (SBI, USA) according to the manufacturer's protocol. In this study, we examined the immunomodulatory effects of mAD-MSCs in 3 groups: Group A, mAD-MSCs; Group B, MSC-CM; and Group C, MSC-Exo.

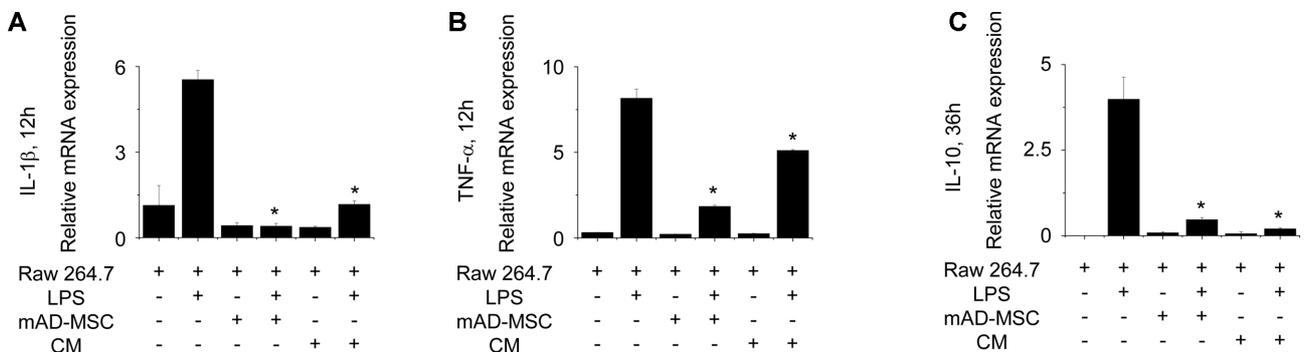


Fig. 3. Immunomodulatory effects of mAD-MSCs and MSC-CM on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. mAD-MSCs and MSC-CM significantly reduced the expression levels of (A) IL-1 β (12 h) (B) TNF- α (12 h), and (C) IL-10 (36 h) in stimulated RAW 264.7 cells. The mRNA levels of anti-inflammatory or pro-inflammatory cytokines were analyzed by quantitative real-time RT-PCR and normalized against the level of GAPDH. Also, each data from three independent experiments were evaluated and expressed as mean \pm SD (* $p < 0.05$).

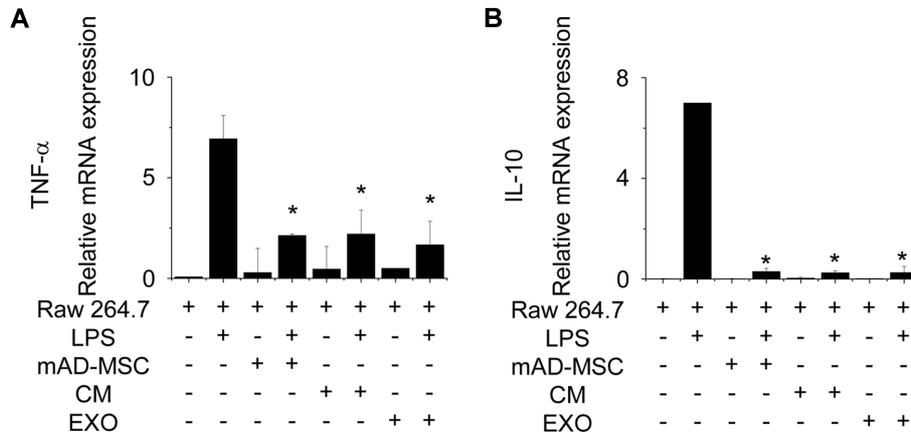


Fig. 4. Immunomodulatory effects of MSC-Exo on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. MSC-Exo significantly reduced the expression levels of (A) TNF- α (12 h) and (B) IL-10 (36 h) in stimulated RAW 264.7 cells. The mRNA levels of anti-inflammatory or pro-inflammatory cytokines were analyzed by quantitative real-time RT-PCR and normalized against the level of GAPDH. Also, each data from three independent experiments were evaluated and expressed as mean \pm SD (* p < 0.05).

개선을 보고하였고, Li 등[27]은 급성호흡부전 모델에서 엑소좀이 기관지폐포세척액 내 백혈구와 중성구의 수치를 낮춰 허혈성 저산소증의 전단계를 막는다고 보고하였다. Lai 등[25]은 심근허혈 모델에서 엑소좀이 경색부위를 줄인다고 보고하였고 Kordelas 등[22]은 엑소좀을 이용하여 처음으로 인간 이식편대숙주병 들에게 엑소좀을 투여하여 이후 환자들의 증상이 개선됨을 보고하였다. 이러한 결과들은 엑소좀을 이용하여 다양한 질병 분야에 치료적인 적용이 가능하고 또한 추가 연구에 대한 가치가 있음을 의미한다. 또한 이러한 성체줄기세포 유래 엑소좀이 성체줄기세포가 정기적으로 분비하는 성장인자보다 더욱 기능적인 역할을 한다고 알려졌다[2, 3, 21, 22, 27-29, 44, 48]. 엑소좀은 내피세포의 증식과 이동, 관생성 능력을 증가시키고[2], Akt의 인산화와 Bcl-2의 발현 증가 및 Bax의 발현은 감소시키며 caspase-3의 분해를 감소시켜 신경세포 독성을 완화한다[25]. 또한, 신경교의 성상세포와 뉴런에 miR-133 β 를 전달하여 유전자발현을 조절함으로써 뇌졸중에 있어 신경돌기 재형성과 기능적 회복에 도움을 준다고 알려졌다[44].

본 연구는 LPS를 이용한 대식세포 염증 유사 세포 모델에서 성체줄기세포 유래 엑소좀의 면역 조절 능력을 평가하였다. 대식세포를 LPS로 자극하여 대식세포에서 IL-10과 TNF- α 사이토카인 생산을 확인하였으며, 이에 성체줄기세포 유래 엑소좀의 영향을 확인하고자 하였다. LPS로 자극한 단독 실험군에서 TNF- α 는 최대 생성되었으며, 성체줄기세포 유래 엑소좀을 처리한 실험군에서 통계학적으로 유의하게 TNF- α 의 생성이 억제됨을 확인하였다(Fig. 4A). 또한, LPS로 자극한 단독 실험군에서 최대 생성된 IL-10 또한 성체줄기세포 유래 엑소좀을 처리한 실험군에서 통계학적으로

유의하게 IL-10의 생성이 억제됨을 확인하였다(Fig. 4B).

요약

본 연구는 대식세포에서 LPS를 이용하여 염증 유사 세포 모델을 만들고 염증 유사 대식세포 모델에서 성체줄기세포의 면역 조절 능력을 평가하였다. LPS 자극에 의해 증가된 IL-1 β , TNF- α 및 IL-10의 생성은 성체줄기세포를 공배양한 실험군 뿐만 아니라 성체줄기세포를 배양한 상층 배양액을 처리한 실험군에서도 동일한 효과를 나타내었으며, 또한 성체줄기세포 유래 엑소좀을 염증 유사 대식세포 모델에 처리하여 유사한 결과를 관찰하였다. 이 결과는 성체줄기세포 자체의 염증 억제 기능보다는 성체줄기세포 유래 엑소좀을 포함하여 성체줄기세포가 분비하는 bioactive molecules에 의해 세포 간 신호 전달이 이루어지고 있음을 의미하며, 이러한 엑소좀은 염증 관련 질환 분야에 치료적 적용이 가능하고 또한 새로운 염증 치료제 개발의 틀로 사용될 수 있음을 시사한다.

Acknowledgments

This work was funded by the Animal and Plant Quarantine Agency (M-1543083-2014-17-01), Republic of Korea.

References

- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. 2003. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol. Rev.* **55**: 241-269.
- Bian S, Zhang L, Duan L, Wang X, Min Y, Yu H. 2014. Extracellu-

- lar vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J. Mol. Med. (Berl)* **92**: 387-397.
3. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, et al. 2009. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**: 1053-1067.
 4. Caplan AI, Dennis JE. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.* **98**: 1076-1084.
 5. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**: 2287-2299.
 6. Dace DS, Khan AA, Stark JL, Kelly J, Cross AH, Apte RS. 2009. Interleukin-10 overexpression promotes Fas-ligand-dependent chronic macrophage-mediated demyelinating polyneuropathy. *PLoS One* **4**: e7121.
 7. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. 2005. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation.* **112**: 214-223.
 8. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. 2003. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* **37**: 355-361.
 9. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. 2013. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front. Immunol.* **4**: 201.
 10. Dolgachev VA, Yu B, Sun L, Shanley TP, Raghavendran K, Hemmila MR. 2014. Interleukin 10 overexpression alters survival in the setting of gram-negative pneumonia following lung contusion. *Shock.* **41**: 301-310.
 11. EL Andaloussi S, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ. 2013. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**: 347-357.
 12. Ferrand J, Noel D, Lehours P, Prochazkova-Carlotti M, Chambonnier L, Menard A, et al. 2011. Human bone marrow-derived stem cells acquire epithelial characteristics through fusion with gastrointestinal epithelial cells. *PLoS One* **6**: e19569.
 13. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Lalykina KS. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* **3**: 393-403.
 14. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. 1987. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* **20**: 263-272.
 15. Galindo LT, Filippo TR, Semedo P, Ariza CB, Moreira CM, Camara NO, et al. 2011. Mesenchymal stem cell therapy modulates the inflammatory response in experimental traumatic brain injury. *Neurol. Res. Int.* **2011**: 564089.
 16. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, et al. 2016. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.* **7**: e2062.
 17. Gneccchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. 2005. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* **11**: 367-368.
 18. Hoogduijn MJ, Betjes MG, Baan CC. 2014. Mesenchymal stromal cells for organ transplantation: different sources and unique characteristics? *Curr. Opin. Organ. Transplant.* **19**: 41-46.
 19. Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**: 860-867.
 20. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, et al. 2007. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**: 700-706.
 21. Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, et al. 2013. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci. Rep.* **3**: 1197.
 22. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doepfner TR, et al. 2014. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* **28**: 970-973.
 23. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D, et al. 2006. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**: 2202-2212.
 24. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. 2001. Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* **153**: 1133-1140.
 25. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, et al. 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem. Cell Res.* **4**: 214-222.
 26. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 787-795.
 27. Li L, Jin S, Zhang Y. 2015. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of mesenchymal stem cells on endotoxin-induced acute lung injury in mice through secretion of exosome. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**: 3825-3832.
 28. Li T, Yan Y, Wang B, Qian H, Zhang X, Shen L, et al. 2013. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem. Cells Dev.* **22**: 845-854.
 29. Lin SS, Zhu B, Guo ZK, Huang GZ, Wang Z, Chen J, et al. 2014. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect rat pheochromocytoma PC12 cells from glutamate-induced injury via a PI3K/Akt dependent pathway. *Neurochem Res.* **39**: 922-931.
 30. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
 31. Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. 2004. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**: 61-76.
 32. Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. 2006. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac

- function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol. Ther.* **14**: 840-850.
33. Panes J, Benitez-Ribas D, Salas A. 2011. Mesenchymal stem cell therapy of Crohn's disease: are the far-away hills getting closer? *Gut.* **60**: 742-744.
 34. Papayianni A. 1996. Cytokines, growth factors, and other inflammatory mediators in glomerulonephritis. *Ren. Fail.* **18**: 725-740.
 35. Parekkadan B, Upadhyay R, Dunham J, Iwamoto Y, Mizoguchi E, Mizoguchi A, et al. 2011. Bone marrow stromal cell transplants prevent experimental enterocolitis and require host CD11b+ splenocytes. *Gastroenterology* **140**: 966-975.
 36. Parekkadan B, van Poll D, Sukanuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al. 2007. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* **2**: e941.
 37. Resnick IB, Barkats C, Shapira MY, Stepensky P, Bloom AI, Shimon A, et al. 2013. Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC). *Am. J. Blood Res.* **3**: 225-238.
 38. Schon MP, Boehncke WH. 2005. Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **352**: 1899-1912.
 39. Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, et al. 2003. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 2397-2402.
 40. Teng X, Chen L, Chen W, Yang J, Yang Z, Shen Z. 2015. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation. *Cell Physiol. Biochem.* **37**: 2415-2424.
 41. Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Kurt-Jones EA, Rickman B, et al. 2008. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer. Cell.* **14**: 408-419.
 42. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**: 901-904.
 43. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177**: 1779-1784.
 44. Xin H, Li Y, Liu Z, Wang X, Shang X, Cui Y, et al. 2013. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem. Cells* **31**: 2737-2746.
 45. Xu Y, Balasubramaniam B, Copland DA, Liu J, Armitage MJ, Dick AD. 2015. Activated adult microglia influence retinal progenitor cell proliferation and differentiation toward recoverin-expressing neuron-like cells in a co-culture model. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **253**: 1085-1096.
 46. Yuk SS, Lim EM, Lee JY, Lee YJ, Kim YS, Lee TH, et al. 2010. Anti-inflammatory effects of Epimedium brevicornum water extract on lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophages. *Phytother. Res.* **24**: 1781-1787.
 47. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. 2005. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* **106**: 1755-1761.
 48. Zhang HC, Liu XB, Huang S, Bi XY, Wang HX, Xie LX, et al. 2012. Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo. *Stem. Cells Dev.* **21**: 3289-3297.
 49. Zhao Q, Shepherd EG, Manson ME, Nelin LD, Sorokin A, Liu Y. 2005. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J. Biol. Chem.* **280**: 8101-8108.
 50. Zheng ZH, Li XY, Ding J, Jia JF, Zhu P. 2008. Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **47**: 22-30.
 51. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7**: 211-228.