

博士論文

パパインを用いた喘息・COPD オーバーラップ
マウスモデルの構築

福田 健介

目次

要旨	3
序文	5
方法	10
結果	18
考察	43
謝辞	51
参考文献	52

要旨

Background: The pathogenesis of the asthma–COPD overlap (ACO) including its exacerbation has not been elucidated partly due to the lack of an animal model of ACO. Therefore, we aimed to develop a murine model to elucidate the pathogenesis of ACO and its exacerbation.

Methods: Papain or porcine pancreatic elastase (PPE) was intratracheally administered in aerosol form in wild-type mice. Polyinosinic:polycytidylic acid [poly(I:C)] was administered to mimic viral infection-induced exacerbation. Lung mechanics, airway responsiveness to methacholine, histology, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cell counts, mRNA in lung homogenates, and cytokine concentration in BALF or serum were analyzed.

Results: Weekly intratracheal administration of papain (days 0, 7, 14, and 21) reproduced the ACO features. Both papain- and PPE-treated mice showed increased lung compliance and airspace enlargement, whereas only the papain-treated mice showed airway hyper-responsiveness, airway eosinophilia, mucus hypersecretion, and enhanced type 2 cytokine expression. Eosinophilic inflammation and elevated total and papain-specific serum IgE levels persisted even at 5 weeks after the final papain treatment. Poly(I:C) treatment

caused similar additional airway inflammation in both papain-induced ACO and PPE-induced COPD models, but eosinophilic airway inflammation was sustained only in the ACO model. High levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), which is a potential candidate marker for ACO, were found in the BALF of the ACO model.

Conclusions: We developed a murine model that recapitulated the important clinical features of ACO; thus, it could be useful for elucidating the pathological processes and identifying the diagnostic markers or therapeutic targets for ACO.

序文

1. 疫学と臨床的背景

気管支喘息と慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、閉塞性換気障害を呈する呼吸器病のうち特に有病率の高い疾患である(1)。2025年には気管支喘息の罹患者数は、世界中で約4億人にのぼると推測されている(2)。COPDも同様に罹患率が高く、さらに死亡率の高い疾患であり、2015年には世界中で320万人がCOPDにより死亡している(3)。気管支喘息の病態はアレルギー性の気道炎症、気道過敏性の亢進、気道リモデリングによって特徴づけられる。一方でCOPDの病態は、主に喫煙習慣と関連した肺気腫や好中球性気道炎症が、非可逆性の気道閉塞をもたらすものである。いずれの疾患も気道感染や大気汚染を原因とした急性増悪を起し、QOLや予後の悪化をもたらす(4,5)。気管支喘息とCOPDが合併した病態は、近年では喘息・COPDオーバーラップ（ACO）と呼称され、広く認知されている疾患概念である(6)。ACOの定義や診断基準について国際的に統一されたものは存在しないが(7)、ACOは全閉塞性呼吸器疾患のうち20%ほどを占めると推測されている(8)。ACOは気管支喘息やCOPD単独と比べて病状の進行が早いこと(9)、増悪の頻度が多く重症であること(10)、合併症が多いこと(11)から、各疾患とは異なる病態機序の存在が想定されている。過去の臨

床研究では、COPD の患者と比較して ACO の患者では気道過敏性が亢進していること、血中および喀痰中の好酸球が増加していること、2 型サイトカインの産生が亢進していることが示されている(12)(13)。しかし ACO の分子生物学的な機序や、頻回かつ重症な増悪を起こす機構については十分に解明されておらず、また疾患の病態機構解明に重要である疾患動物モデルは確立されていないのが現状である。

2. パパインに関する既報

パパインはパパイヤ (学名: *Carica papaya*) に含まれる植物由来のシステインプロテアーゼであり、肉や頭足類を軟化させる際や、ビールの清澄化、薬品や化粧品の加工などに用いられている(14)。一方で、過去にはパパインに起因する職業性喘息の発症も報告されており、急性/亜急性の曝露でも気管支喘息の臨床的特徴を示しうることが報告されている(15)(16)。動物モデルにおいても、パパインの吸入により急性/亜急性のアレルギー性気道炎症が起こることが知られている。この反応では、パパインにより障害された気道上皮細胞からインターロイキン (IL) -33 が放出され、2 型自然リンパ球 (ILC2) に発現した ST2 受容体を介して炎症性シグナルが伝達される。このように、既報のパパインによるアレルギー性気道炎症においては、IL-33/ILC2 を主とする経路で IL-5、IL-13 など

の2型サイトカインが誘導され、急性/亜急性の気道炎症が起こることが解明されている(17)(18)。また、動物における肺気腫モデルで頻用されるブタ腭臓エラスターゼ(PPE)やパパインの吸入により、2-4週間ほどの経過で肺気腫が形成されることが示されている(19)(20)(21)。本研究ではCOPDの重要な特徴である肺気腫を呈し、COPDマウスモデルとして頻用されているPPE投与マウスを、気管支喘息を伴わないCOPDコントロール群として用いた。

3. 閉塞性肺疾患の急性増悪を模した動物モデル

気管支喘息およびCOPDの急性増悪においては、ウイルス性の急性気道感染が最も主要な原因であることが示されている(22)(23)(24)。動物モデルにおいては、トル様受容体-3(TLR3)の作動薬である合成二本鎖RNA:ポリイノシン酸-ポリシチジル酸[poly(I:C)]がウイルス感染を模す薬剤として頻用される。閉塞性呼吸器病モデルマウスにおける既報では、喫煙暴露によるCOPDマウスモデルや(25)、オボアルブミン(OVA)気道内投与による気管支喘息マウスモデル(26)などの急性増悪を惹起するためにpoly(I:C)が用いられている。こうしたpoly(I:C)による急性増悪モデルでは、種々の炎症性サイトカインや好中球走化因子の産生を伴って、顕著な好中球性炎症が起きることが知られている。

4. ACO のバイオマーカー

気管支喘息においては血中および喀痰中の好酸球数、血中総 IgE 値、呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO)、ペリオスチンなどの多様なバイオマーカーが見出されて臨床応用されている(27)。しかし、COPD や ACO の診断や重症度、予後予測などに関わるバイオマーカーはまだ十分に確立されていない。好中球セラチナーゼ結合性リポカリン (NGAL) は急性腎障害の鋭敏なバイオマーカーとして確立されており、臨床上も広く用いられている(28)。近年、NGAL が気管支喘息や COPD 単独と ACO を鑑別するための診断的バイオマーカーとなりうることが報告され注目を集めており、気管支喘息単独あるいは COPD 単独の患者と比較して ACO の患者では特に喀痰中で NGAL が増加することが示されている(29, 30)。NGAL は元々、好中球が産生・放出する分泌糖タンパク質として見出されたが、のちに気道上皮、消化管上皮、前立腺や腎臓での発現も確認されている(31)。しかし、ACO において喀痰中あるいは血中の NGAL が増加する機序についてはまだ解明されておらず、NGAL が呼吸器疾患の診療において日常的に実用されるには至っていない。

5. 本研究の目的

ACO およびその急性増悪における病態・機序はまだ十分に解明されていない。

その一因として、気管支喘息ではダニ投与モデルや OVA 投与モデルなどが、COPD では喫煙暴露モデルや PPE 投与モデルなどが、疾患モデルマウスとして確立され多くの基礎研究がなされているのに対して、ACO では確立された疾患モデルマウスが存在せず、病態・機序についての検討が不十分である点が挙げられる。そこで本研究では、動物モデルにおいて短期集中的な投与で急性/亜急性のアレルギー性気道炎症を惹起する報告や、数週間以上の経過で肺気腫を形成する報告があるパパインに着目した。週に 1 回パパインをエアロゾルで経気管的に反復投与することによって、慢性的なアレルギー性気道炎症、気道過敏性の亢進、2 型サイトカインの発現亢進（気管支喘息の臨床的特徴）(32)、肺気腫の形成や肺コンプライアンスの増大（COPD の臨床的特徴）に加えて、ACO のバイオマーカーとして期待される NGAL の発現亢進など、臨床的 ACO に見られる特徴が再現されるか評価を行った。そして、ACO モデルマウスとしての妥当性を検証し、モデルを確立することを目的とした。過去に ACO の疾患モデルマウスは確立されていないため、その急性増悪を模したマウスモデルの特徴についても既報はない。そこで本研究ではさらに、PPE の投与による COPD モデルとパパインの投与による ACO モデルに対して、それぞれ poly(I:C)を経気管投与し、両群の急性増悪モデルにおける表現型の差異を解析し、ACO の急性増悪モデルの特徴を解明することも目的とした。

方法

1. 実験動物

5-6週齢の C57BL/6N の雌マウスを日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan) から購入し、specific pathogen-free (SPF) 環境で飼育した。飼料および飲水については常に摂取可能な環境とした。動物実験は東京大学で承認された研究倫理申請書 (実験計画書承認番号: 医-P17-006) および動物資源研究領域動物実験施設ガイドラインに基づいて施行した。

2. 気道炎症マウスモデルの作成

気道炎症モデルマウスおよびそのコントロール群の作成に際しては、動物用吸入麻酔器 (Univentor 400, Bioresearch Center, Aichi, Japan) を用いて、4.0%イソフルラン (Mylan-Pfizer, Pennsylvania, USA) による吸入麻酔下で薬剤を投与した。COPD モデルの作成に際しては 0.25 U の PPE (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を 50 μ l のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) に溶解して day 0 に投与した。ACO モデルの作成に際しては 50 μ g のパパイーン (Merck KGaA) を 50 μ l の PBS に溶解して day 0, 7, 14, 21 に投与した。PPE およびパパイーンは気管挿管下でマイクロスプレーヤー (Penn Century,

Pennsylvania, USA) を用いてエアロゾルの状態で投与した。COPD および ACO の急性増悪モデルについては、poly(I:C) (Tocris Bioscience, Bristol, UK) 100 μ g を 100 μ l の PBS に溶解して day 22, 23, 24 に 3 日間連続で経気管投与した。各群の解析・検体採取は day 25 に行ったが、パパインのみを投与した群と PBS のみを投与した群においては day 56 での解析・検体採取も行った。各群のマウスは、day 0 における群平均体重が 17.8 g から 17.9 g の間になるように振り分け、day 0, 7, 14, 21 に体重測定を行った。

3. 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の解析

各群のマウスにおいて day 25 または day 56 にペントバルビタール (Kyoritsu Pharmaceutical, Nara, Japan) 200 mg/kg の腹腔内投与後に、下大静脈から脱血して失血死させたうえで検体を採取した。BALF の回収に際しては 20 ゲージのカニューラを気管切開部から挿管し、1 ml の PBS で合計 3 回洗浄した。BALF は 350 x g, 4 °C で 5 分間遠心分離し、上清は -80°C で保存ののち解析した。沈殿は 1 ml の PBS に再溶解し、Acridine Orange/Propidium Iodide cell viability kit (Logos Biosystems, Gyeonggi-do, South Korea) により染色して細胞数を測定した。細胞分画の測定には May-Grünwald-Giemsa 染色 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) を用い、1 検体あたり 400 細胞以上を目視で確認のうえ各分画をカウントした。

4. 組織学的解析

Day 25 または day 56 に前述の通り安楽死させたマウスを開胸し、下大静脈をクランプしたうえで 29 ゲージの注射針で右心室を穿刺し、5 ml の PBS を灌流することで肺の脱血をしてから肺組織を採取した。肺組織の回収に際しては、10 % 中性ホルマリン (FUJIFILM Wako Pure Chemical) で経気管的に 25 cmH₂O の圧を 15 分間かけて肺を拡張させた後に左肺門部を結紮して 24 時間ホルマリン固定し、左肺をパラフィン固定した。切片は矢状断最大割面で 5 μm 厚とし、hematoxylin and eosin (HE) 染色および Alcian blue and periodic acid-Schiff (AB-PAS) 染色を行った。病理組織の切片作成および染色は New Histo.Science Laboratory Co. (Tokyo, Japan) に委託した。肺気腫の重症度は平均肺胞間距離 (MLI: Mean Linear Intercept) を測定することで評価した(33)。MLI の測定では、顕微鏡的に肺尖部から肺底部まで等間隔に多数の水平線を引き、20 倍拡大像でランダムに 10 視野を観察のうえ、水平線と肺胞壁の交点間距離を測定して平均を計算した。

5. 呼吸メカニクスの測定

呼吸メカニクスは前述の通りマウスを安楽死させた直後に、非開胸下で小動物

用人工呼吸器 flexiVent (Scireq, Quebec, Canada) を用い、20 ゲージのカニューレで気管切開部から挿管し、3 cmH₂O の呼気終末陽圧 (PEEP) 下で施行した。吸気量は 30 cmH₂O の陽圧下で測定し、気道抵抗および動的肺コンプライアンスの測定には single-compartment model を用いた。データの解析には flexiVent ソフトウェアバージョン 5.2 を用い、多重線形回帰モデルを single-compartment model に適用した。

6. 気道過敏性の測定

気道過敏性の測定はマウスを安楽死させる前に施行した。全身麻酔には 2,2,2-トリブromoエタノール 300 mg/kg (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を、筋弛緩には 3 mg/kg のパンクロニウム (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) をそれぞれ腹腔内注射で用い、20 ゲージのカニューレで気管切開部から挿管下で flexiVent にマウスを接続した。気道抵抗の測定時には呼吸数は 150 回/分に設定し、1 回換気量は 10 ml/kg、PEEP は 3 cmH₂O とした。このもとで、PBS に溶解したメサコリン (Sigma-Aldrich) を 0, 50, 100, 200 mg/ml の濃度で段階的に増量しながら超音波ネブライザーで発生させたエアロゾルを吸入させ、各濃度で 9 回の薬剤吸入を行った。また、それぞれの吸入直後に気道抵抗を測定し、9 回の測定のうち気道抵抗が最も高いもの 3 回分について測定値を記録した(34)。なお、メサコリ

ン吸入を行ったマウスは他の実験解析には用いなかった。

7. BALF および血清を用いた ELISA

IL-33 (R & D Systems, Minnesota, USA)、IgE (BioLegend, California, USA)、NGAL (R & D Systems) の ELISA 法による測定は全て製造社の説明書に従い duplicate で施行した。血清中パパイン特異的 IgE の測定については既報(35)(36)を参考に、マイクロプレート (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) に上記の ELISA キット中の coating buffer を溶媒とした 30 μ g/ml のパパイン溶液を 4 °C で 18 時間静置して固層化した。また、上記の ELISA キット中の assay diluent で 25 °C 下に 1 時間静置してブロッキングした。ここにマウス血清を 4°C で 18 時間静置し、ビオチン化抗マウス IgE (BioLegend)、アビジン HRP (BioLegend) を反応させた。各反応ステップ間では tween 20 (Sigma-Aldrich) 入りのトリス緩衝生理食塩水 (Wako Pure Chemical) でプレートを 5 回ずつ十分に洗浄した。パパイン特異的 IgE 濃度は 450 nm 波長での吸光度からコントロールウェルの吸光度を差し引いて算出したものを指標とした。

8. 定量的 RT-PCR

RNA はマウスの全肺ホモジネートから FastGene RNA Premium Kit (Nippon

Genetics, Tokyo, Japan) を用いて抽出し、SuperScript III (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA に逆転写した。定量的 RT-PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System III (Takara Bio, Shiga, Japan) および TB Green Fast qPCR Mix (Takara Bio) を用いて duplicate で行った。mRNA は内在性コントロールとしてハウスキーピング遺伝子 Gapdh を用いて標準化して発現レベルを計算した。DNA の増幅に際しては 95 °C 5 秒間、55 °C-60 °C 10 秒間、72 °C 21 秒間で 3 ステップ PCR 法を用いた。各 DNA 増幅に用いたプライマー配列は次頁 Table. 1 の通りである。

Table. 1

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Gapdh	CCCACTCTTCCACCTTCGATG	AGGTCCACCACCCTGTTGCT
Muc5ac	ACCACTTTCTCCTTCTCCACAC	AACAGGGCTCTTCACAGACAATA
Muc5b	AGGAAGACCAGTGTGTTTGTC	GTCCTCATTGAAGAAGGGCTG
Ccl11 (Eotaxin1)	AGCTAGTCGGGAGAGCCTAC	AAGGAAGTGACCGTGAGCAG
Ccl24 (Eotaxin2)	TCCCAAACATGCTGATGGGT	AAATCCTCCGTTTCTGCCAAC

Table. 1

使用したプライマー配列

9. 定量的サイトカインアレイ

BALF 中の各サイトカイン濃度は Quantibody mouse cytokine array kit (QAM-CYT-1-2, RayBiotech, Georgia, USA) を用いて quadruplicate で定量的に測定した。データの解析にはマイクロアレイ用レーザースキャナー (GenePix 4400A, Molecular Devices, California, USA) を利用した。

10. 統計解析

2 群間の比較には両側 Student t 検定を、3 群間以上の比較には一元配置または二元配置で analysis of variance (ANOVA) による分散分析の後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いて評価した。統計解析には JMP Pro 14.2.0 (SAS Institute, North Carolina, USA) を用い、一部の統計解析およびグラフ作成には Microsoft Excel for Mac 2019 を用いた。 $p < 0.05$ を有意水準とし、データはいずれも平均±標準誤差で表記した。

結果

1. PPE およびパパインの投与で臨床的 COPD の特徴が再現された

パパインを経気管投与されたマウスが ACO モデルとして相応しいかどうかを検証するため、既知の確立された PPE による COPD モデルと比較し、まずはパパイン投与群の COPD としての特徴について解析した。投薬および解析のスケジュールを Figure. 1 に示す。各群の体重の推移について、PPE 投与群およびパパイン投与群とも PBS コントロール群と比較して有意な変化は見られなかった (Figure. 2)。呼吸メカニクスの解析では、PPE 投与群およびパパイン投与群とも体重あたりの吸気量が増加し、動的肺コンプライアンスの上昇を認めた。一方で、気道抵抗の有意な変化は認められなかった (Figure. 3)。組織学的には HE 染色で PPE 投与群、パパイン群での肺気腫性変化を認め、コントロール群と比較して MLI は有意に増加した (Figure. 4)。これらの結果より、機能的かつ組織学的側面から、PPE 投与群およびパパイン投与群は COPD の特徴を持つマウスモデルとして妥当であることが示された。さらに AB-PAS 染色ではパパイン投与群で粘液産生の増加が認められた (Figure. 4)。この所見に一致して、全肺ホモジネートの mRNA 発現解析では、パパイン投与群で気道粘液産生に関与する遺伝子 Muc5ac の発現が有意に亢進し、有意ではないものの Muc5b においても

亢進する傾向が認められた (Figure. 4)。

Figure. 1

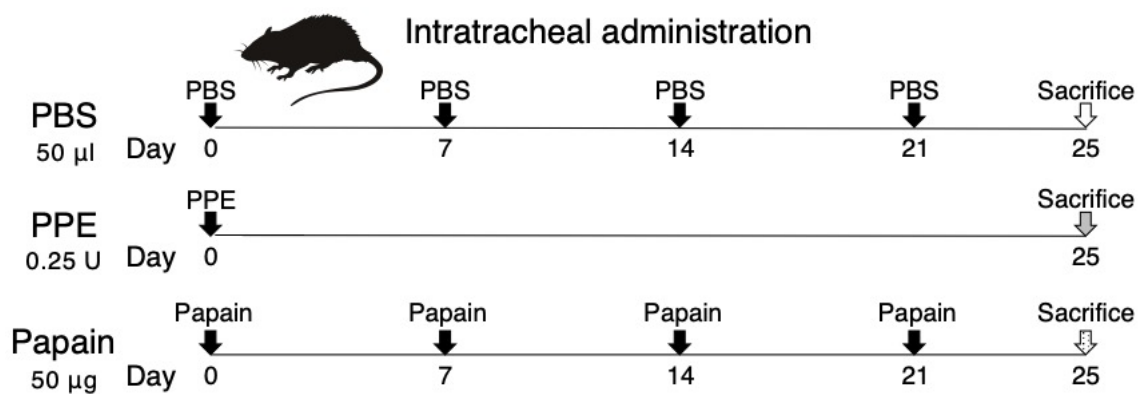


Figure. 1

薬剤投与スケジュールのシェーマ

0.25 U の PPE を day 0 に、50 μ g のパパインを day 0, 7, 14, 21 にエアロゾルで経気管投与した。溶媒は PBS 50 μ l とし、コントロール群として PBS 50 μ l を day 0, 7, 14, 21 に投与した群をおいた。解析は day 25 に行った。

Figure. 2

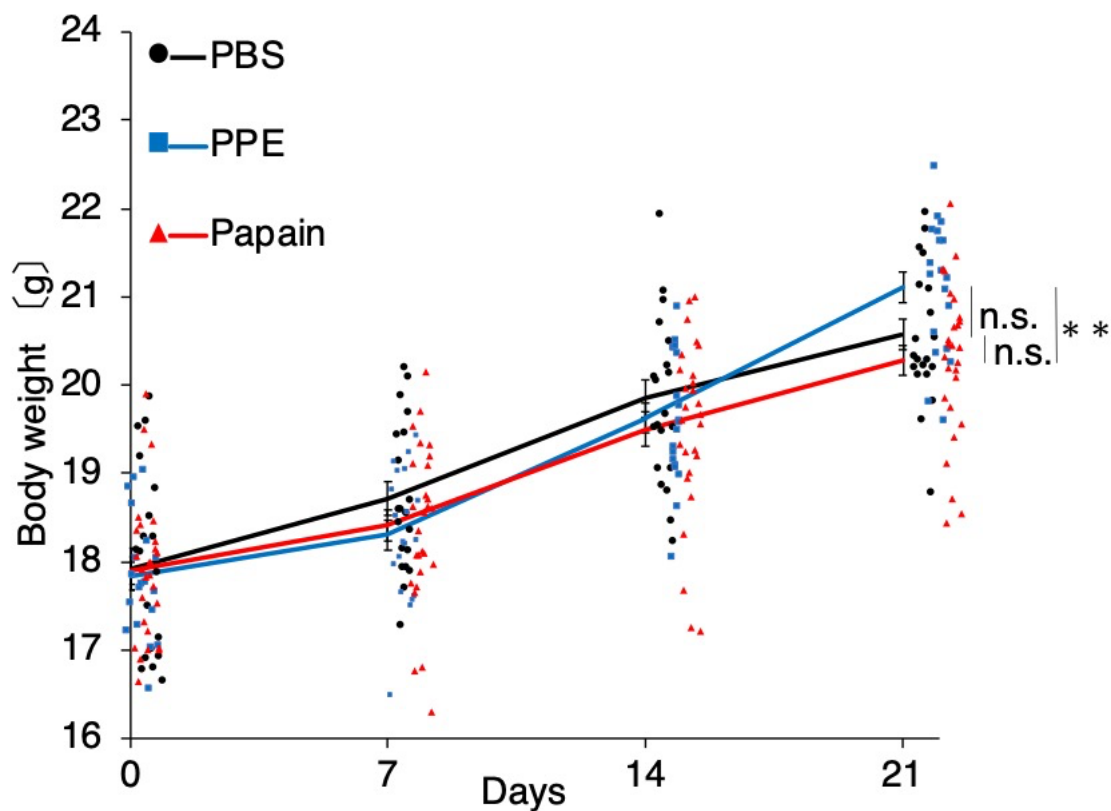


Figure. 2

各薬剤投与群における体重の推移

Day 0, 7, 14, 21 における各群の体重を示す。PPE 投与群は $n = 19$ 、パパイン投与群は $n = 27$ 、PBS コントロール群は $n = 20$ である。統計解析は two-way repeated measures ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。

** $p < 0.01$; n.s. not significant.

Figure. 3

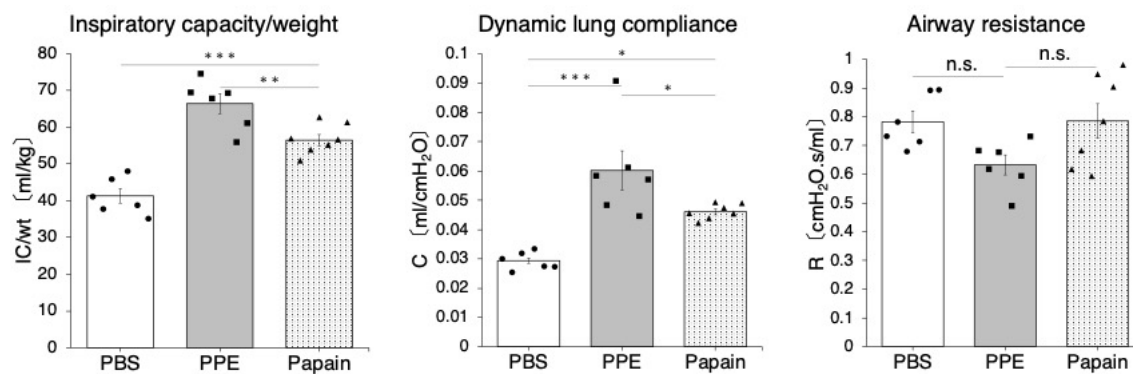


Figure. 3

各薬剤投与群における呼吸メカニクス

Day 25 に各群で体重当たりの吸気量、動的肺コンプライアンス、気道抵抗を測定した。各群で n = 6-7 とした。統計解析は one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; n.s. not significant.

Figure. 4

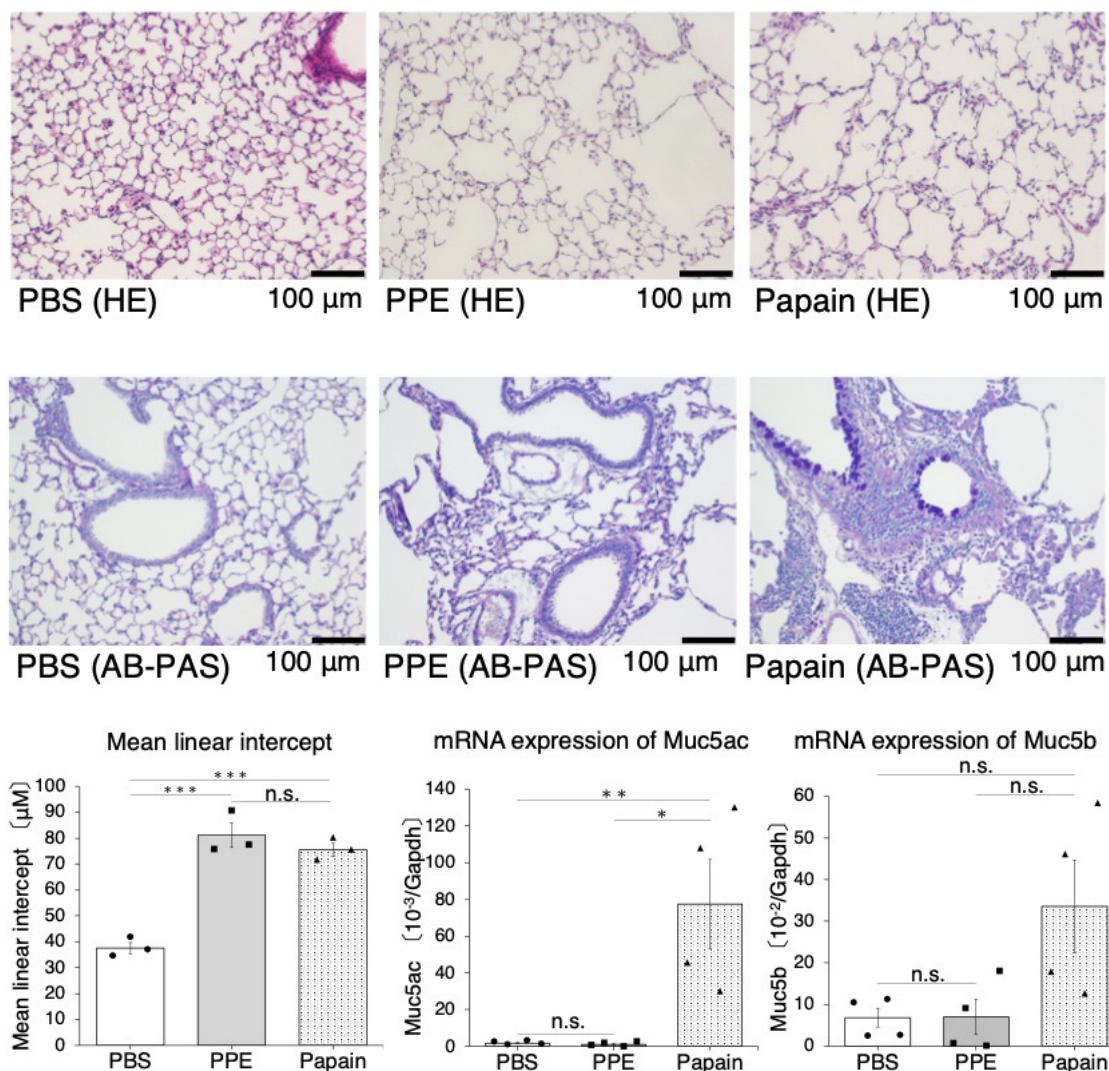


Figure. 4

組織学的所見、平均肺胞間距離の測定、粘液産生の評価

Day 25 に採取した肺組織切片を HE 染色および AB-PAS 染色し、HE 染色した標本を用いて MLI を測定した。MLI の測定は各群 n = 3 とした。組織は 20 倍拡大像である。また、全肺ホモジネートを用いて Muc5ac および Muc5b の発現を定量的 RT-PCR で解析した (各群 n = 3-4)。統計解析は one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; n.s. not significant.

2. パパインの投与により臨床的気管支喘息の特徴が再現された

パパインを経気管投与されたマウスにおける気管支喘息の特徴を把握するため、BALF の解析、気道過敏性試験、定量的 RT-PCR を施行した。BALF の解析では、パパイン投与群で総細胞数やマクロファージ、好酸球数が他群と比較して有意に増加していた (Figure. 5)。一方で、PBS コントロール群と PPE 投与群においては、細胞数や細胞分画に有意な差を認めなかった。気道過敏性試験では、パパイン投与群が他群と比較してメサコリンに対して有意に気道過敏性の亢進を示した (Figure. 6)。全肺ホモジネートの定量的 RT-PCR では、IL-5 や IL-13 によって誘導され好酸球の遊走、組織移行に寄与すると考えられている (37)Eotaxin1 (Ccl11) および Eotaxin2 (Ccl24) の発現がパパイン投与群で亢進していた (Figure. 7)。これらの結果 (1.および 2.) から、パパイン投与群は臨床的な COPD と気管支喘息両者の特徴を再現するものと考えられ、ACO マウスモデルとして妥当と考えられた。より詳細な解析や臨床的 ACO との比較のために、さらに以降の実験を行った。

Figure. 5

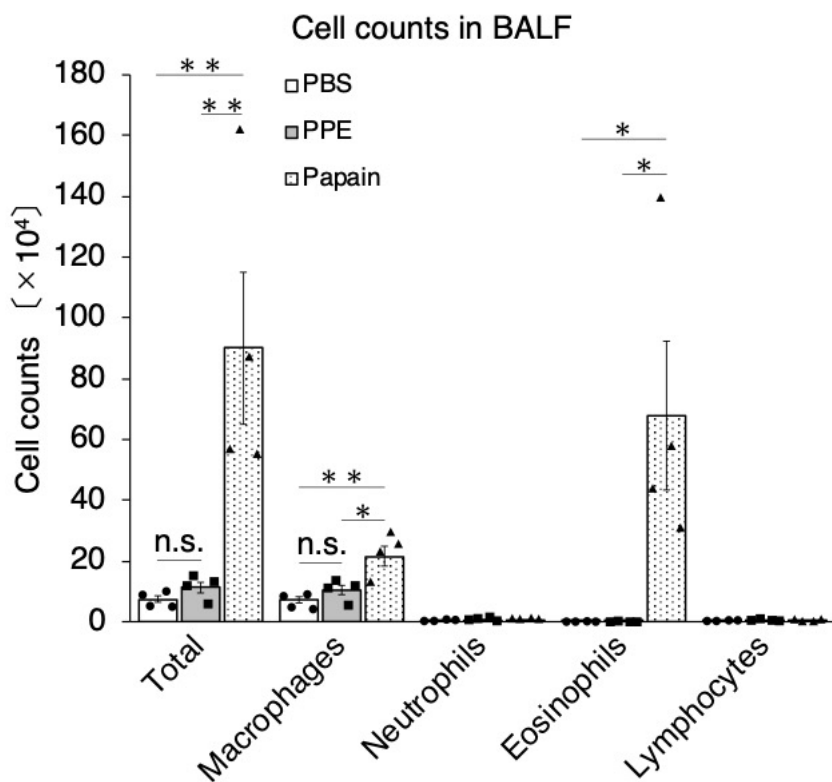
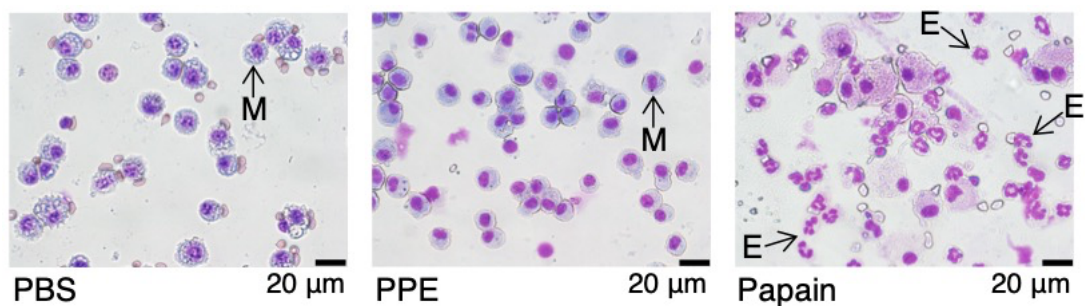


Figure. 5

BALF のサイトスピン標本、細胞数および細胞分画

各薬剤投与群における BALF サイトスピンの 50 倍拡大像を示す。M はマクロファージ、E は好酸球を指す。細胞数は各群 $n = 4$ で測定した。統計解析は one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; n.s. not significant.

Figure. 6

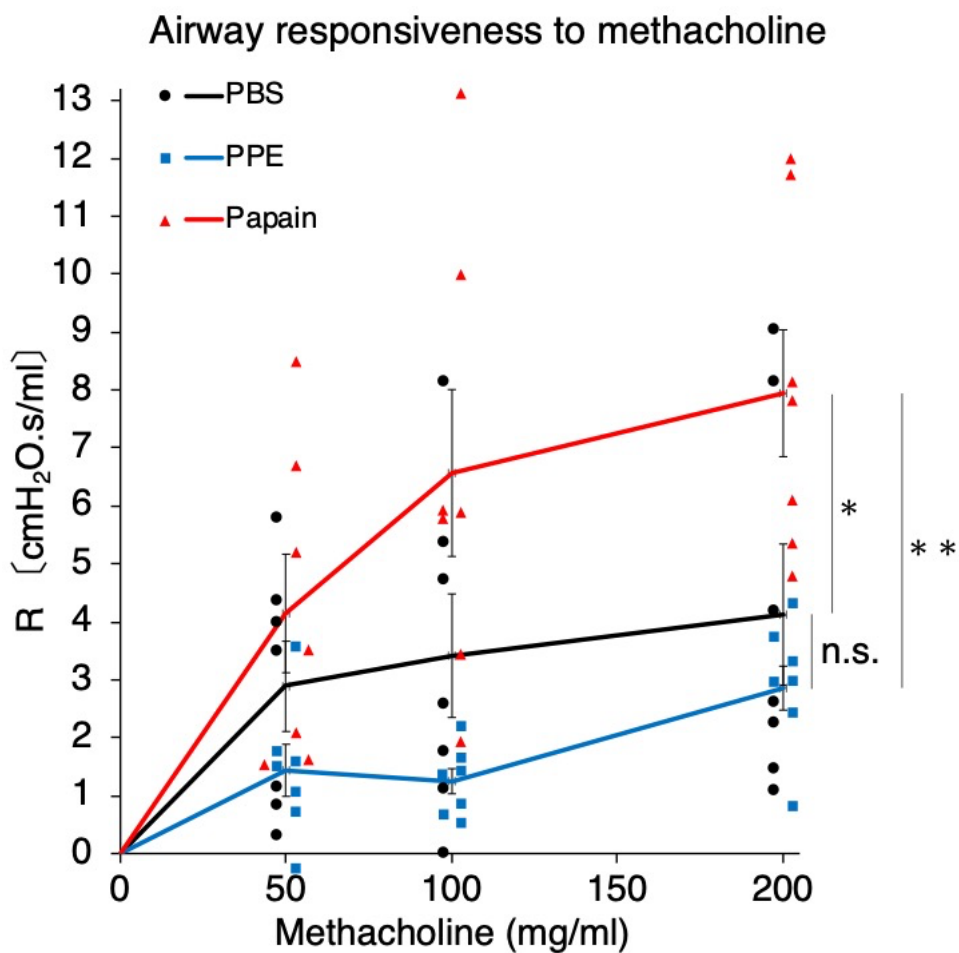


Figure. 6
気道過敏性試験

各薬剤投与群でメサコリン濃度を 0, 50, 100, 200 mg/ml と漸増して吸入させた下での気道抵抗を測定した。統計解析は two-way repeated measures ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; n.s. not significant.

Figure. 7

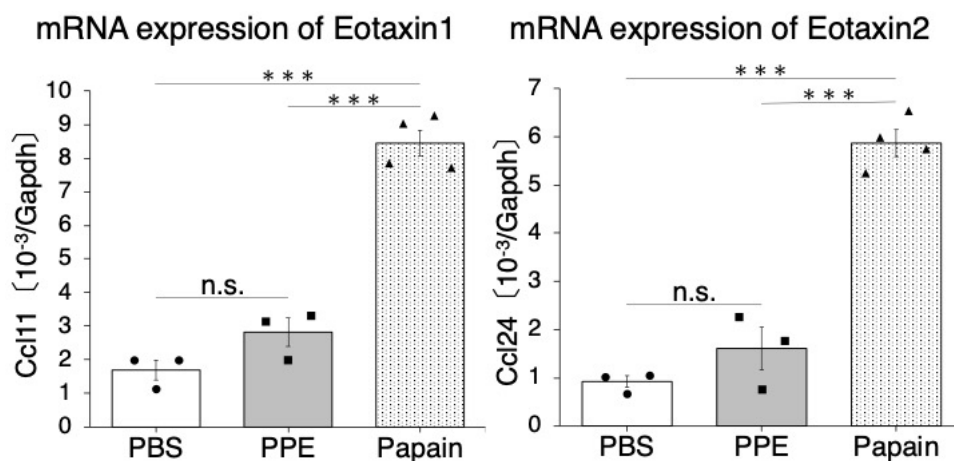


Figure. 7

全肺ホモジネートを用いた定量的 RT-PCR での Eotaxin 発現解析

全肺ホモジネートを用いて Eotaxin 1 (Ccl11) および Eotaxin 2 (Ccl24) の発現を定量的 RT-PCR で解析した (各群 n = 3-4)。統計解析は one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。*** $p < 0.001$; n.s. not significant.

3. パパインの投与により BALF 中のマクロファージや好中球に関連したサイトカイン、および 2 型サイトカインが増加した

各薬剤投与群での BALF 中のサイトカインを、定量的サイトカインアレイにより測定した (Table. 2, Figure. 8)。マクロファージおよび好中球の活性化・遊走に主に関与するサイトカインはパパイン投与群でのみ検出された。すなわち Macrophage colony stimulating factor (M-CSF)、keratinocyte-derived chemokines (KC: CXCL1)、IL-6 は PPE 投与群や PBS コントロール群では認められなかった。2 型サイトカインについては RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted: CCL5) がパパイン投与群で増加している傾向にあったが、統計学的有意差はなかった。IL-4 は群間で差がなかったものの、IL-5、IL-13 はパパイン投与群においてのみ認められた。IL-33 については血清中および BALF 中の濃度を ELISA 法により測定したが、群間での差は見られなかった (Figure. 9)。気管支喘息のフェノタイプ判別バイオマーカーの 1 つである血中総 IgE 濃度はパパイン投与群で、他群に比べて有意な上昇を示した (Figure. 9)。

Table. 2

	PBS	PPE	Papain	PPE+Poly(I:C)	Papain+Poly(I:C)
GM-CSF	18.06 (\pm 2.395)	15.08 (\pm 1.970)	15.45 (\pm 0.8398)	18.29 (\pm 2.709)	13.64 (\pm 2.463)
IFN- γ	25.36 (\pm 6.080)	33.81 (\pm 7.248)	26.08 (\pm 4.268)	50.42 (\pm 20.57)	30.16 (\pm 5.597)
IL-1 α	1.602 (\pm 1.055)	3.063 (\pm 1.134)	3.717 (\pm 0.7083)	9.052 (\pm 0.8196)	10.26 (\pm 1.238)
IL-1 β	15.27 (\pm 4.282)	23.17 (\pm 7.681)	14.20 (\pm 1.665)	ND	ND
IL-2	17.71 (\pm 2.586)	24.55 (\pm 10.19)	10.72 (\pm 3.905)	8.454 (\pm 5.865)	8.915 (\pm 1.934)
IL-3	2.168 (\pm 0.2027)	2.085 (\pm 0.2380)	2.032 (\pm 0.1490)	2.160 (\pm 0.1912)	1.863 (\pm 0.09033)
IL-4	2.448 (\pm 1.495)	1.968 (\pm 0.8217)	2.401 (\pm 1.317)	ND	4.411 (\pm 0.4189)
IL-5	ND	ND	26.12 (\pm 12.46)	ND	ND
IL-6	ND	ND	362.1 (\pm 244.7)	1848 (\pm 371.3)	731.2 (\pm 298.0)
IL-9	95.93 (\pm 38.63)	93.81 (\pm 45.73)	92.39 (\pm 40.30)	ND	ND
IL-10	ND	ND	ND	ND	ND
IL-12	7.216 (\pm 2.439)	5.941 (\pm 3.815)	5.554 (\pm 2.330)	8.554 (\pm 3.454)	4.997 (\pm 1.615)
IL-13	ND	ND	173.6 (\pm 82.79)	ND	291.1 (\pm 116.8)
IL-17	4.496 (\pm 1.583)	11.28 (\pm 5.999)	9.658 (\pm 0.8300)	ND	ND
KC	ND	ND	17.27 (\pm 9.034)	14.21 (\pm 6.342)	9.165 (\pm 2.619)
MCP-1	20.75 (\pm 2.047)	21.99 (\pm 0.8488)	47.85 (\pm 13.85)	610.5 (\pm 43.70)	914.4 (\pm 316.9)
M-CSF	ND	ND	13.03 (\pm 6.842)	1.818 (\pm 1.119)	3.344 (\pm 0.7033)
RANTES	2.008 (\pm 0.6949)	3.225 (\pm 0.7369)	18.34 (\pm 9.646)	456.9 (\pm 110.8)	316.6 (\pm 79.96)
TNF- α	14.72 (\pm 6.985)	22.50 (\pm 15.38)	37.25 (\pm 9.076)	137.5 (\pm 13.27)	52.06 (\pm 13.90)
VEGF	35.15 (\pm 4.788)	39.52 (\pm 5.512)	48.96 (\pm 7.898)	58.59 (\pm 13.02)	10.70 (\pm 2.302)

(pg/ml)

Table. 2

BALF 検体における定量的サイトカインアレイ (各群 n = 3)

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, IFN- γ : Interferon gamma, MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1 (CCL2), TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

Figure. 8

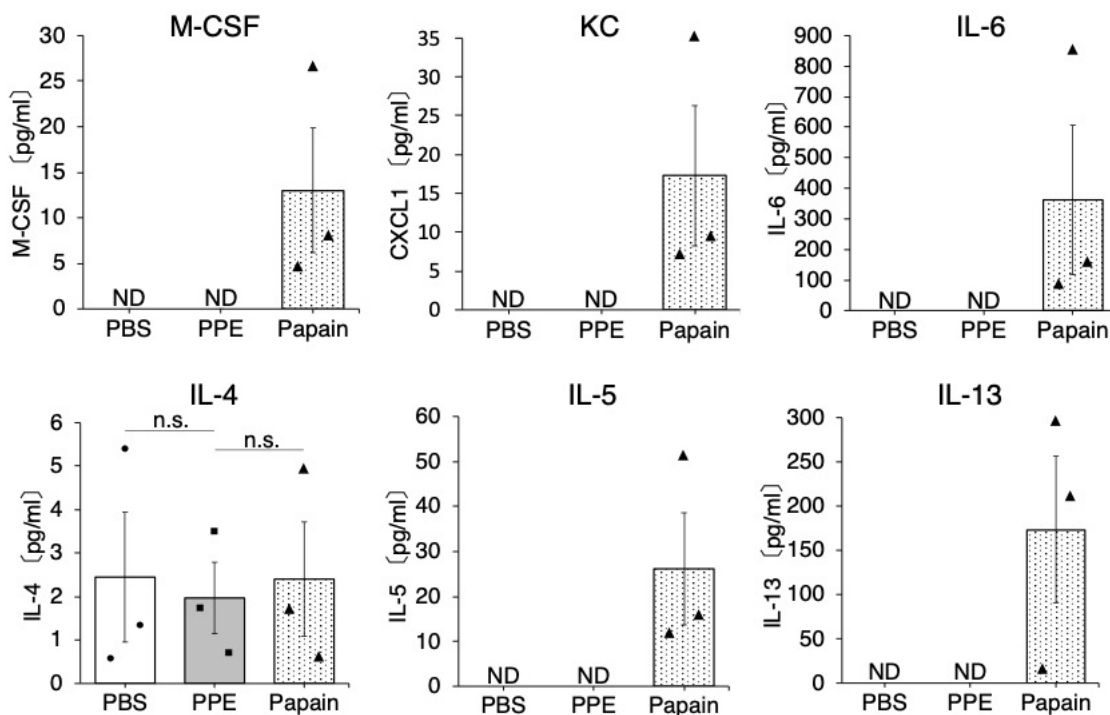


Figure. 8

BALF 検体における定量的サイトカインアレイ

定量的サイトカインアレイにより BALF 中のサイトカイン濃度を測定した (各群 n = 3)。統計解析は one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。n.s. not significant; ND not detected.

Figure. 9

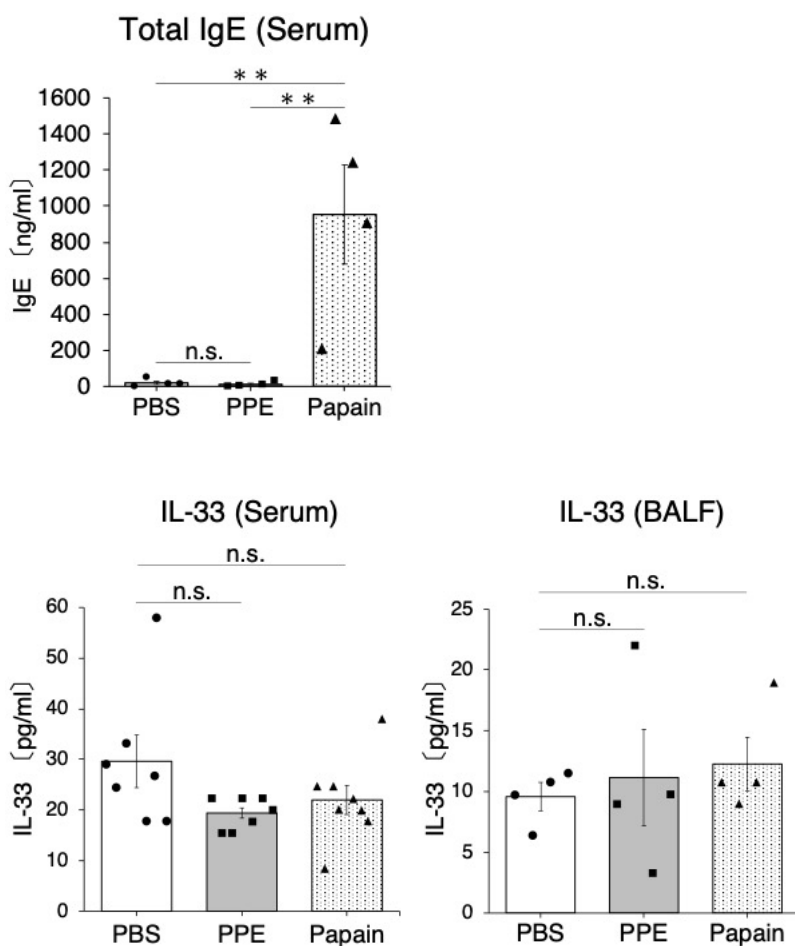


Figure. 9

血中総 IgE 濃度、血中および BALF 中の IL-33 濃度

各薬剤投与群において血中総 IgE 濃度 (各群 n = 4)、血中 IL-33 濃度 (各群 n = 7-8)、BALF 中 IL-33 濃度 (各群 n = 4) をそれぞれ測定した。統計解析は one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。

** $p < 0.01$; n.s. not significant.

4. パパインの投与により誘導された ACO の特徴は長期持続した

ここまでの実験結果では、パパイン投与による ACO モデルの気道炎症は、PPE 投与による COPD モデルの気道炎症よりも顕著なものであった。その原因として、PPE 投与群は薬剤最終投与から 25 日目に解析しており、パパイン投与群は最終薬剤投与から 4 日目に解析をしているため、薬剤に対する反応性の差ではなく、薬剤投与から解析までの時間差による影響を主に観察している可能性も考慮された。これを検証するため、day 21 にパパインを最終投与したマウスについて day 56 における解析も追加した (Figure. 10)。Day 56 の解析でもパパイン投与群で BALF 中の好酸球は有意に増加しており、好酸球性気道炎症が遷延していることが示唆された (Figure. 11)。この実験系でも呼吸メカニクスの解析を行ったところ、4 週時点での解析で見られたのと同様に、パパイン投与群で体重あたりの吸気量や動的肺コンプライアンスの増加が認められた (Figure. 12)。また、組織学的にも肺気腫が残存していることが確認された (Figure. 12)。ELISA 法による血清検体での測定では、パパイン投与群の 4 週時点、8 週時点ともに総 IgE 濃度およびパパイン特異的 IgE 濃度が増加していることが確認された。以上から、本研究の ACO モデルはパパインの最終投与から 35 日経過しても 2 型炎症、好酸球性気道炎症が持続し、肺気腫も残存することが示された。

Figure. 10

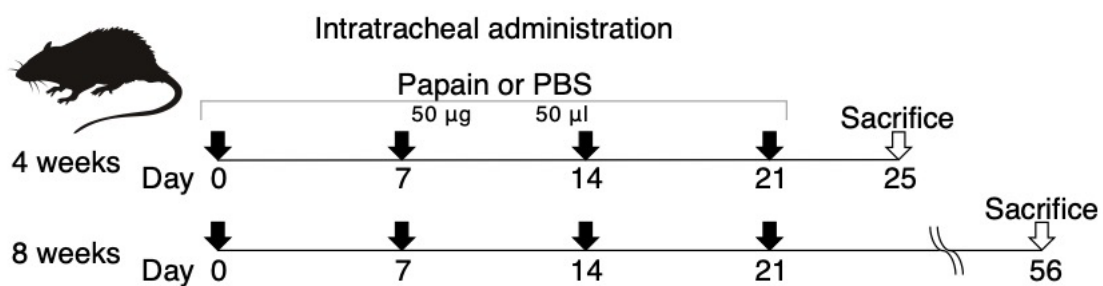


Figure. 10

薬剤投与スケジュールのシエーマ

50 μg のパパインを 50 μl の PBS に溶解し、day 0, 7, 14, 21 にエアロゾルで経気管投与した。コントロール群は PBS 50 μl のみ投与した。解析は day 25 または day 56 に施行した。

Figure. 11

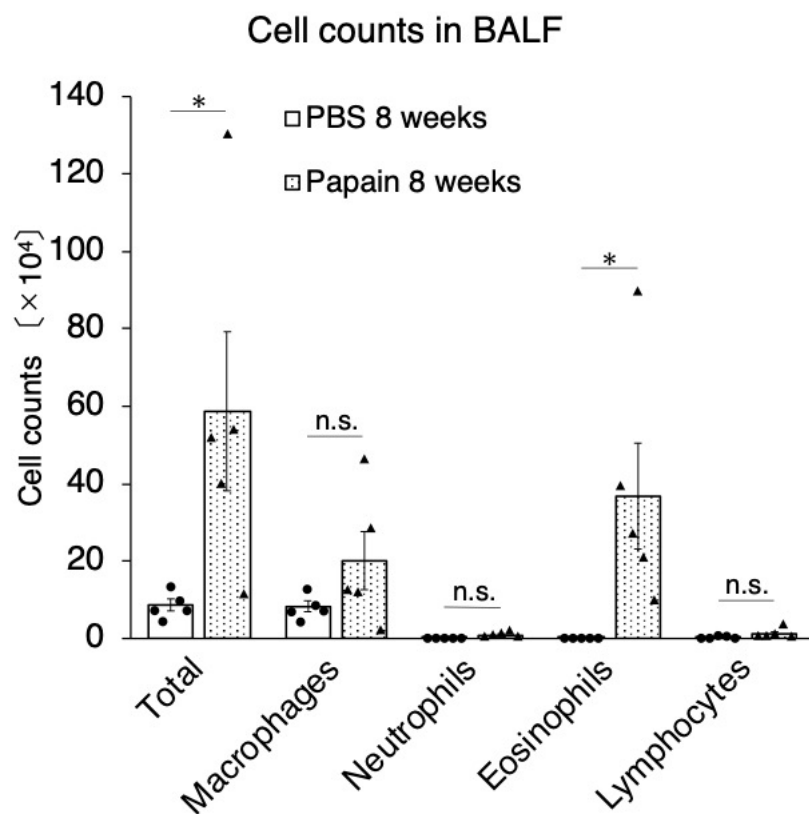


Figure. 11

BALF 中の細胞数および細胞分画

細胞数は各群 $n = 5$ で測定した。統計解析には両側 Student t 検定を用いた。

* $p < 0.05$; n.s. not significant.

Figure. 12

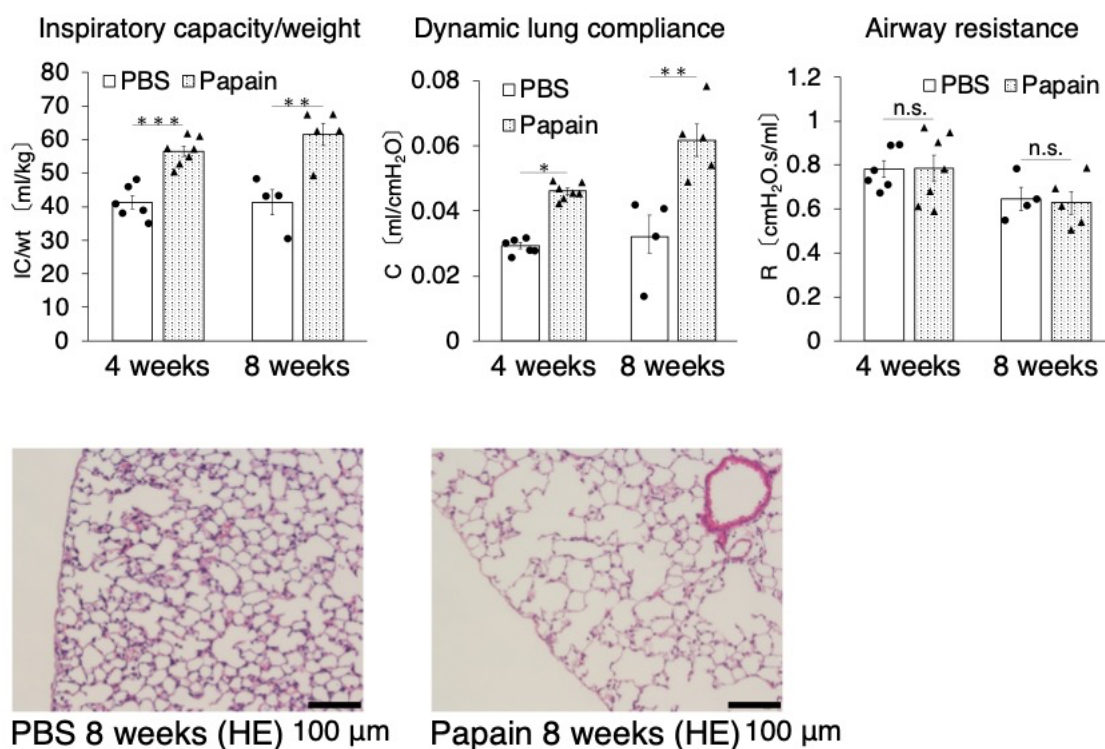


Figure. 12

パパイン投与群の8週時点での呼吸メカニクス、肺気腫の比較

Day 25, 56 に各群で体重当たりの吸気量、動的肺コンプライアンス、気道抵抗を測定した。各群で $n = 4-7$ とした。組織像は 20 倍拡大の HE 染色を示している。統計解析は 4 週時点でのデータには one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用い (Figure. 3 のデータを一部再掲)、8 週時点でのデータには両側 Student t 検定を用いた。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; n.s. not significant.

Figure. 13

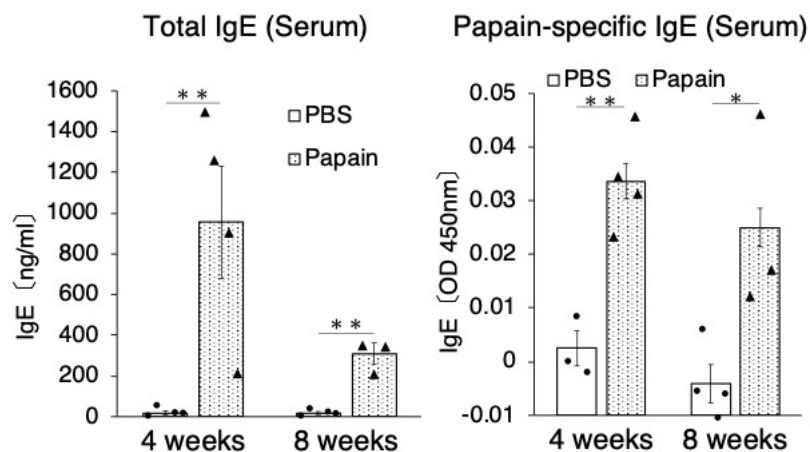


Figure. 13

4週および8週時点での血清総IgEおよびパパイン特異的IgEの解析

Day 25, 56にELISA法で血清中の総IgE値およびパパイン特異的IgE値を測定した。各群でn = 3-4とした。統計解析は4週時点の総IgE値解析にはone-way ANOVA後にHolm-Bonferroni post hoc testを用いた (Figure. 9のデータを一部再掲)。それ以外の解析には両側Student *t*検定を用いた。**p* < 0.05, ***p* < 0.01.

5. Poly(I:C)の投与により COPD モデルと ACO モデルでは同様の気道炎症が

惹起されたが、ACO モデルでは好酸球性気道炎症も残存した

COPD モデルと ACO モデルにおいて、poly(I:C)を用いたウイルス性気道感染による急性増悪モデルの比較・解析を行った (Figure. 14)。BALF の解析では COPD 急性増悪モデル、ACO 急性増悪モデルのいずれにおいても好中球が有意に増加していることが確認され、ACO 急性増悪モデルにおいては好酸球の増多が維持されていた (Figure. 15)。また、組織学的には肺胞壁の破壊と、血管周囲への炎症細胞浸潤を認めた (Figure. 15)。呼吸メカニクスの解析も試みたが、喀痰が著増したことにより気管カニューレが閉塞し、正確な測定を行うことができなかった (データは示していない)。次に定量的サイトカインアレイキットを用いて両急性増悪モデルの BALF 中サイトカインを検出したところ、PPE+poly(I:C)投与群では PPE のみを投与した群と比較して MCP-1 (CCL2)、IL-1 α 、TNF- α 、KC (CXCL-1)、IL-6、RANTES (CCL5) などの増加が認められた (Figure. 16, Table. 2)。Papain+poly(I:C)投与群でも同様の傾向が見られたものの、IL-5 はこの急性増悪モデルでは検出されず、IL-13 は PPE+poly(I:C)群よりも高値であった (Figure. 16)。以上から poly(I:C)は COPD モデルと ACO モデルで同様の気道炎症を起こすことが示されたが、好酸球性気道炎症は ACO モデルの急性増悪時にも残存することが確認された。

Figure. 14

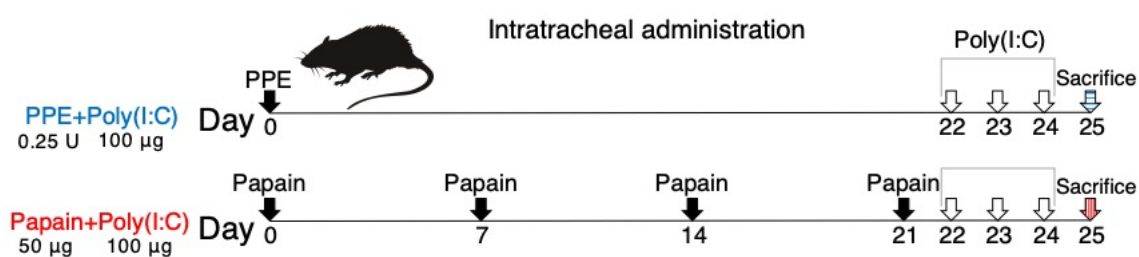


Figure. 14

薬剤投与スケジュールのシェーマ

Figure. 1 のスケジュールと同様に PPE またはパパインを投与して COPD モデル、ACO モデルを作成した。その後、day 22, 23, 24 に 3 日間連続で 100 μg の poly(I:C) を 100 μl の PBS に溶解して経気管投与した。解析はいずれも day 25 に行った。

Figure. 15

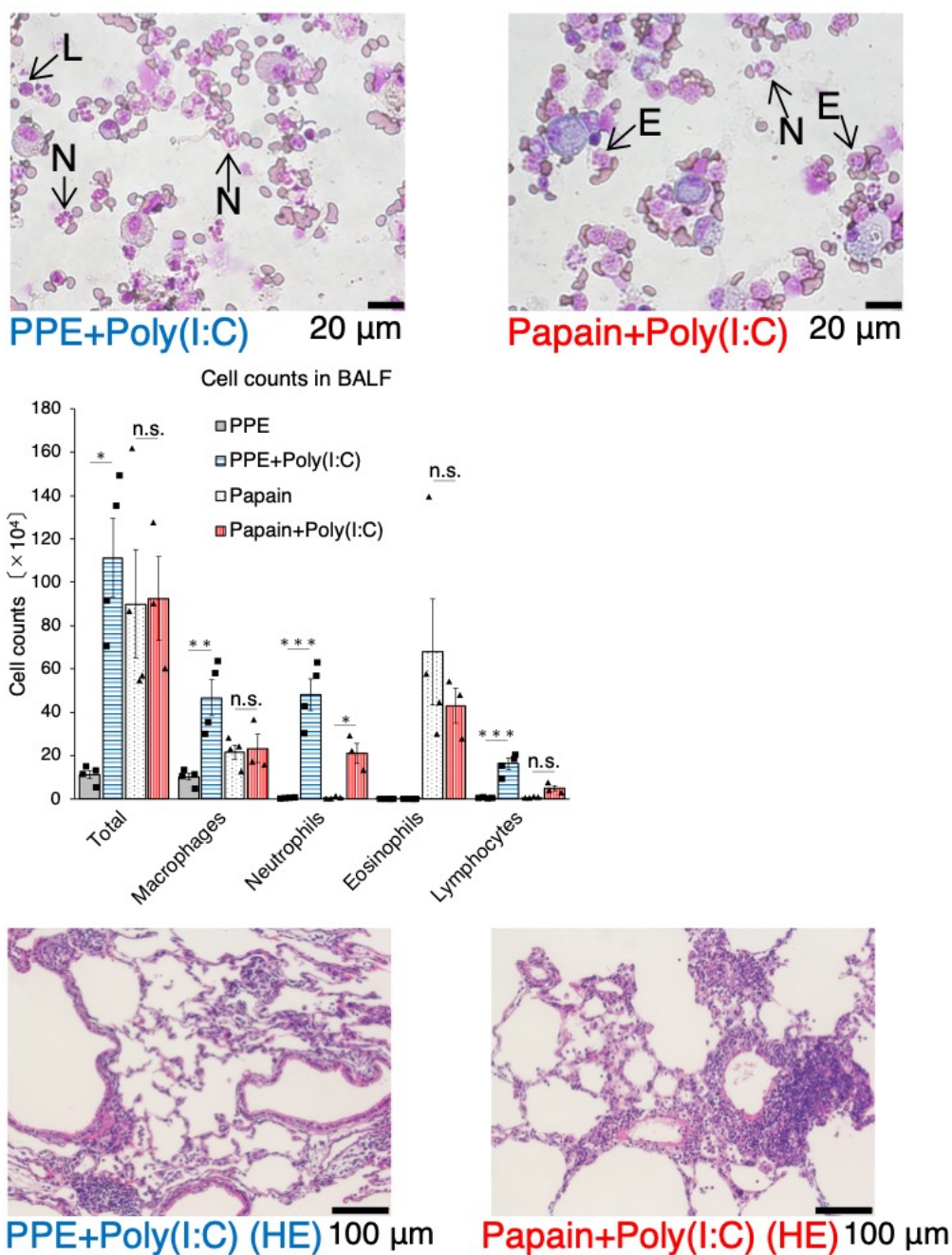


Figure. 15

BALF のサイトスピン標本、細胞数・細胞分画および組織学的所見

BALF サイトスピンの 50 倍拡大像を示す。L はリンパ球、N は好中球、E は好酸球を指す。細胞数・細胞分画は各群 n = 3-4 で測定した。組織像は 20 倍拡大の HE 染色像を示す。統計解析は one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; n.s. not significant.

Figure. 16

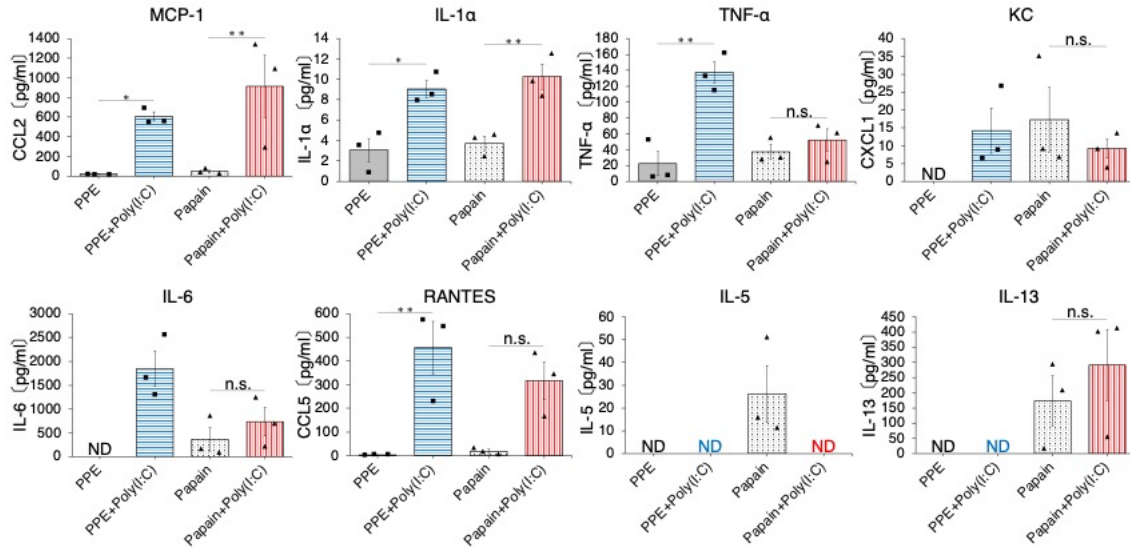


Figure. 16

BALF 検体における定量的サイトカインアレイ

定量的サイトカインアレイにより BALF 中のサイトカイン濃度を測定した（各群 $n = 3$ ）。統計解析は one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いた。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$; n.s. not significant; ND not detected.

6. ACO モデルおよび急性増悪モデルで NGAL 濃度の上昇を認めた

ACO の臨床的バイオマーカーとしての有用性が期待されている NGAL について、本研究のモデルでの挙動を検討した。Figure. 1 に示した 4 週モデルでは、パパイン投与群は BALF 中の有意な NGAL 濃度上昇を示した。一方で血清中では有意な変動を認めなかった (Figure. 17 上段)。Figure. 10 に示した 8 週モデルでもパパイン投与群は BALF 中の NGAL 濃度上昇を示し、やはり血清中では有意な変動を認めなかった (Figure. 17 中段)。Figure. 14 に示した急性増悪モデルでは、poly(I:C)投与により血清中、BALF 中とも NGAL 濃度の上昇を示したものの、papain+poly(I:C)投与群の BALF では有意な上昇を認めなかった (Figure. 17 下段)。以上を総合し、NGAL 濃度は ACO モデルの BALF 中および急性増悪モデルの血清中と BALF 中で上昇する傾向にあることが分かった。

Figure. 17

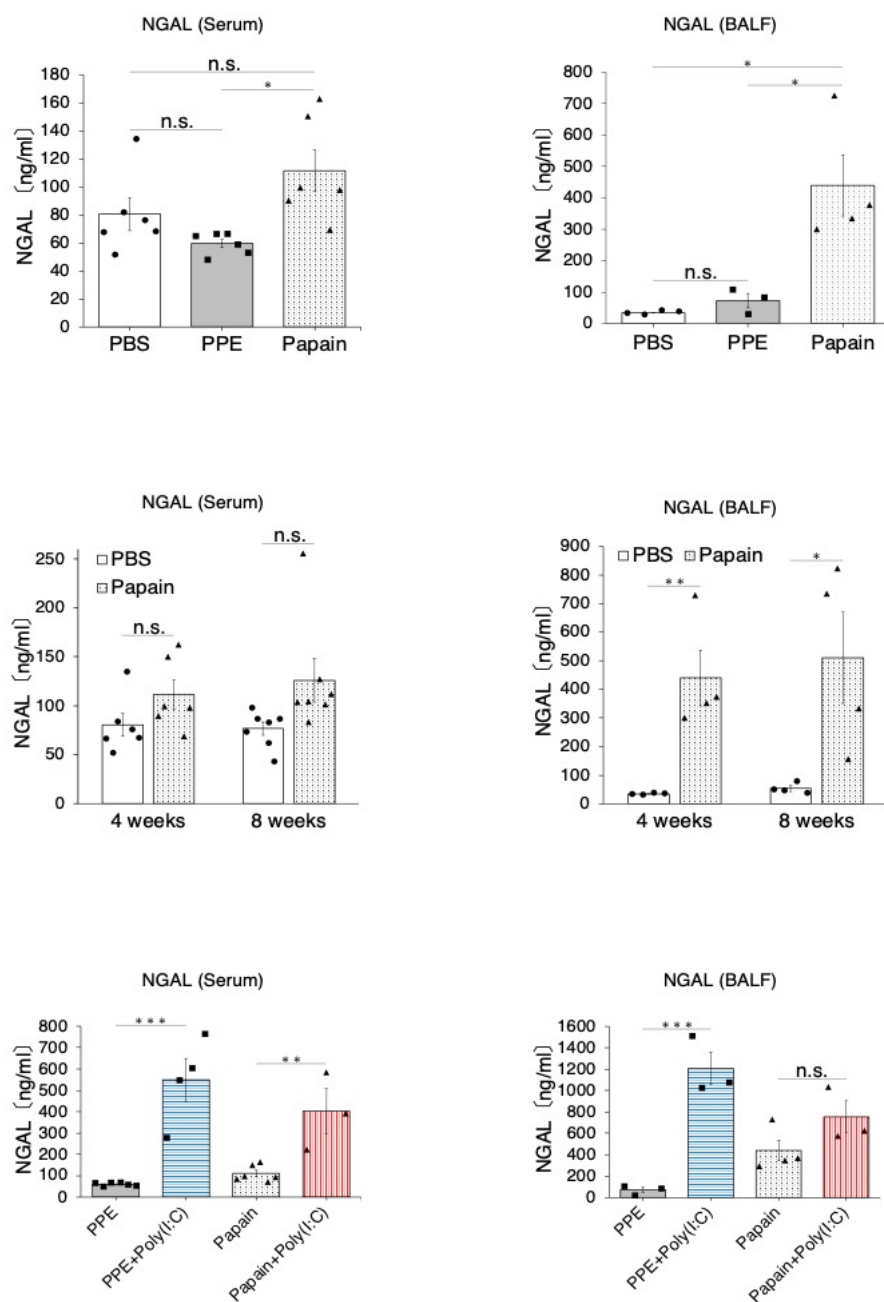


Figure. 17

各モデルにおける血清中およびBALF中のNGAL濃度

ELISA法により血清中およびBALF中のNGAL濃度を測定した

(各群 n = 3-7)。統計解析は one-way ANOVA 後に Holm-Bonferroni post hoc test を用いたが、8週時点でのデータ解析のみ両側 Student *t* 検定を用いた。

p* < 0.05, *p* < 0.01, ****p* < 0.001; n.s. not significant.

考察

パパインはマウス実験における既報で、IL-33 を介した ILC2 の肺組織内移行によって急性/亜急性のアレルギー性気道炎症を起こすことが報告されている(17)。また、パパインの反復投与により肺気腫が形成されることも報告されている(21)。しかし、これらの報告は散発的なものであり、パパインの反復投与によりこれらの特徴を慢性期にも示し、臨床的 ACO をよく模したマウスモデルとなるかどうか検討した既報はこれまでに存在しなかった。臨床的 ACO の特徴としては、アレルギー性気道炎症が持続すること、気道過敏性を示すこと、肺気腫や肺コンプライアンスの上昇を示すこと、などが挙げられる(29)(30)。本研究はパパインの反復的な経気管投与により、臨床的 ACO の特徴をよく再現した ACO マウスモデルができることを初めて示したものである。また、複数時点で多面的な解析を行うことにより、このモデルの妥当性は確認されている。本モデルにおけるアレルギー性気道炎症では、持続的な 2 型サイトカイン発現、気道中の好酸球増多、血清総 IgE およびパパイン特異的 IgE の上昇を伴っていた。さらに、近年 ACO のバイオマーカー候補として注目されている分泌糖タンパク質 NGAL が臨床的な挙動と同様の動きを示したことも、本モデルの妥当性を裏付けるものと考えられる(38)。

既報で ACO のマウスモデルを作成したものはほぼ見当たらないが、気管支喘息と COPD 両者の特徴を再現しようと試みた研究として、OVA の経気管投与により気管支喘息の特徴を、surfactant protein-D (SP-D) のノックアウトにより肺気腫を誘導したものが存在する(39)。このマウスモデルは気管支喘息と COPD 両方の臨床的特徴を部分的には有していたものの、SP-D のノックアウトマウスモデルにおいては気腫形成が軽微であり、臨床的 COPD の肺気腫性変化を再現したものとして十分とは言い難いものであった。また、SP-D のノックアウトでは胸膜直下の肺線維化も伴うため、その点でも純粋な臨床的 COPD の特徴を有するとは言えないものであった(40)。本研究の ACO マウスモデルは顕著な肺気腫や気道過敏性を示し、BALF 中のサイトカイン濃度について網羅的かつ定量的に検証され、NGAL 濃度の比較においても臨床的知見と良好に一致していた点で、既報のモデルと比して妥当性が高いものと考えられた。さらに、パパイン最終投与から 5 週間経過した時点でも ACO の特徴が見られ、ACO マウスモデルとしての特徴が長期に維持されることが確認できた。

パパインはアレルギー性気道炎症を誘導する物質として頻用されているが、その既報の多くは 3-10 日以内に複数回のパパイン投与を行って急性/亜急性の気道炎症を IL-33/ILC2 を介して惹起するものである(41) (42)。IL-33 はパパインの投与後速やかに誘導され、3 時間後にはピークアウトし、BALF 中の IL-

33 濃度は 24 時間後にはベースラインの濃度まで低下すると報告されている

(36)。こうした急性/亜急性のアレルギー性気道炎症モデルにおいては、自然免疫系が重要な役割を果たし、IL-33 の刺激を受けたマスト細胞によって活性化された制御性 T 細胞がパピンの最終投与後 1-2 週間以内にアレルギー性気道炎症を抑制すると報告されている(43)。本研究では Figure. 9 に示した通り、IL-33 濃度の有意な変動は血清中および BALF 中で認められなかった。これはパピンの最終投与から 4 日後に解析を行ったためと考えられた。しかし、IL-33 が既にピークアウトしていたと考えられるにも関わらず、血中総 IgE およびパピン特異的 IgE の上昇を伴って好酸球性気道炎症がパピン最終投与後 35 日時点でも遷延していた。マウスの好酸球の生物学的半減期は 36 時間未満(44)、IgE では 12 時間ほどと報告(45)されており、本研究のモデルで 8 週時点でも好酸球や IgE が顕著であったのは、持続的なアレルギー性気道炎症が起きていたためと推察され、獲得免疫の関与も示唆されるものと考えられた。

臨床的な COPD においては気道中の好中球やマクロファージ増多が見られる頻度が多い(46)が、本研究においては PPE 投与群やパピン投与群 (8 週) において BALF 中の好中球・マクロファージ増多は認められなかった。経気管的に PPE を投与すると、投与後 1-7 日目の解析では好中球やマクロファージ優位の気道炎症が起きると報告されているが、14 日目には BALF 中の細胞数増

多は認められなくなると報告されている(47)(48)。したがって、PPE 投与後 25 日目に解析した本研究の COPD モデルでは、既に気道炎症は鎮静化して気腫のみが残存していたものと考えられる。臨床的には ex-smoker においては BALF 中のマクロファージや好中球は乏しいことが報告されており(46)(49)、本研究の PPE モデルや 8 週時点での ACO モデルは、ex-smoker の COPD や ACO を模したものであると考えることができるかもしれない。一方で 4 週時点での ACO モデルは BALF 中でマクロファージ、M-CSF、IL-6、KC (CXCL-1)、IL-5、IL-13 などが増加しておりこれは current smoker および気管支喘息患者の臨床データに一致する所見である(50)(51)(52)(53)。このように本研究の ACO モデルは 4 週時点で current smoker の気道炎症の特徴を示し、8 週時点で ex-smoker の特徴を示した。

ACO の患者は COPD 単独の患者と比較して高頻度かつ重症の急性増悪を起こすことが知られている(12)。しかし、本研究で poly(I:C)の経気管投与により誘導される炎症細胞および炎症性サイトカインは、COPD モデルおよび ACO モデル間で類似していた。また、好酸球の分化・遊走・活性化に寄与する 2 型サイトカインの 1 つである IL-5 は、ACO の急性増悪モデルにおける BALF 中で検出されなかった。気管支喘息の患者においては、気道上皮におけるタイトジャンクションの障害により上皮からウイルスの侵入を受けやすくなっており、

IL-5 の欠損下でも好酸球性気道炎症が持続しうることが報告されている(54)。

本研究でも、Figure. 16 に示したように ACO の急性増悪モデルにおいて好酸球性気道炎症が遷延していた。これには IL-13 などが気道炎症の維持に関与している可能性があり、臨床的な COPD と ACO の急性増悪における特徴の差を説明する要因になるかもしれない。

NGAL は ACO 患者の特に喀痰中で増加することが報告されており、ACO のバイオマーカー候補として期待されている(29)(30)(38)。本研究で ACO モデルにおいては 4 週時点、8 週時点とも BALF 中の NGAL 濃度上昇を認めた。マウス実験において臨床的な傾向と同様の NGAL 変動が見られることを示したのは本研究が初めてである。NGAL は COPD においては、NGAL の殺菌作用および NGAL による基質分解の亢進が病態形成に関与していると報告されている(55)。NGAL は気道のリモデリングにも関与しているとされており、これには上皮間葉転換(56)、CD1d 拘束性 NKT 細胞を介した気道過敏性の亢進(57)が関わっていると報告されている。本研究では、poly(I:C)の投与により BALF 中および血中の NGAL 濃度が上昇することが示されたが、パパイン投与による血中 NGAL 濃度の上昇は軽微であった。NGAL の産生細胞は好中球が主体であるが、気道上皮からも産生されることが示されており(31)、BALF から検出される NGAL は好中球に由来するものと、気道炎症への応答として上

皮から分泌されるものがあると考えられる。したがって本研究においては、poly(I:C)投与時の NGAL は主に好中球に由来する一方で、パパイン投与時の NGAL は上皮から産生されるものが主体であると推察される。パパイン投与群では気道中の好中球は乏しかったにも関わらず、BALF 中の NGAL 濃度が上昇していたことはこの仮説を裏付ける所見と考えられる。8 週モデルにおける NGAL 濃度の上昇も併せて考慮すると、ACO モデルにおける NGAL 濃度上昇の機序と急性増悪モデルにおける NGAL 濃度上昇の機序は異なるものと推測される。

小児喘息の既往は、中年以降に ACO を発症するかどうかの主要な予測因子であることが知られている(58)(59)。本研究では薬剤投与開始時において 5-6 週齢のマウスを用いたため、成長過程で発症した気管支喘息を模したモデルと言える。他の特徴も合わせると、本研究の ACO モデルは小児発症喘息で好酸球性気道炎症が顕著であり、血清 IgE 値が上昇している Th2 型のフェノタイプを呈する気管支喘息の特徴を再現しているものと考えられる(60)。

本研究の限界としては、まず ACO が多様性のある疾患であることに関連した問題が挙げられる。本モデルは上述のフェノタイプを呈するものであり、2 型気道炎症を主体とする気管支喘息の特徴を有する。2 型炎症優位の気管支喘息は最も臨床的に高頻度で認められ(61)臨床的に重要である(62)ものの、好中球

性気道炎症優位型などの他の ACO フェノタイプについてのモデルとしては相応しくない。また、成長過程で肺気腫を発症するのは、成人後の喫煙による臨床的気腫形成過程とは異なり、ACO の臨床的特徴を十分に反映していないと言える。本研究における COPD としての特徴は肺気腫の形成を中心に評価しており、気道病変が COPD モデルとして妥当か検討できていない点も本研究の限界である。さらに、実際の臨床的肺気腫形成は主に喫煙によるものだが、本研究では喫煙同様に肺基質に対するタンパク分解の機序に因るものとはいえ (63) システインプロテアーゼであるパパインの投与によって気腫が形成されている点も臨床的な ACO の特徴とは異なる。しかし、喫煙によってマウスに肺気腫を発症させるためには数ヶ月以上にわたって特殊な装置を用いて喫煙暴露させる必要があり、設備面・労力面・時間面で大きな負担を伴う (63)。その面で、週に 1 回の薬剤投与にて 1 ヶ月で ACO のマウスモデルを作成できる本研究のプロトコルは有用であるものと考えられる。

結論として、本研究で示した ACO マウスモデルは肺気腫の形成、遷延する気管支喘息の特徴、気道中 NGAL 濃度の上昇など臨床的 ACO 患者の特徴をよく反映していた。単剤で ACO のマウスモデルを比較的簡便に作成できるこのモデルは、ACO の病態解明や治療標的の探索に今後役立つものと期待される。

Figure. 18

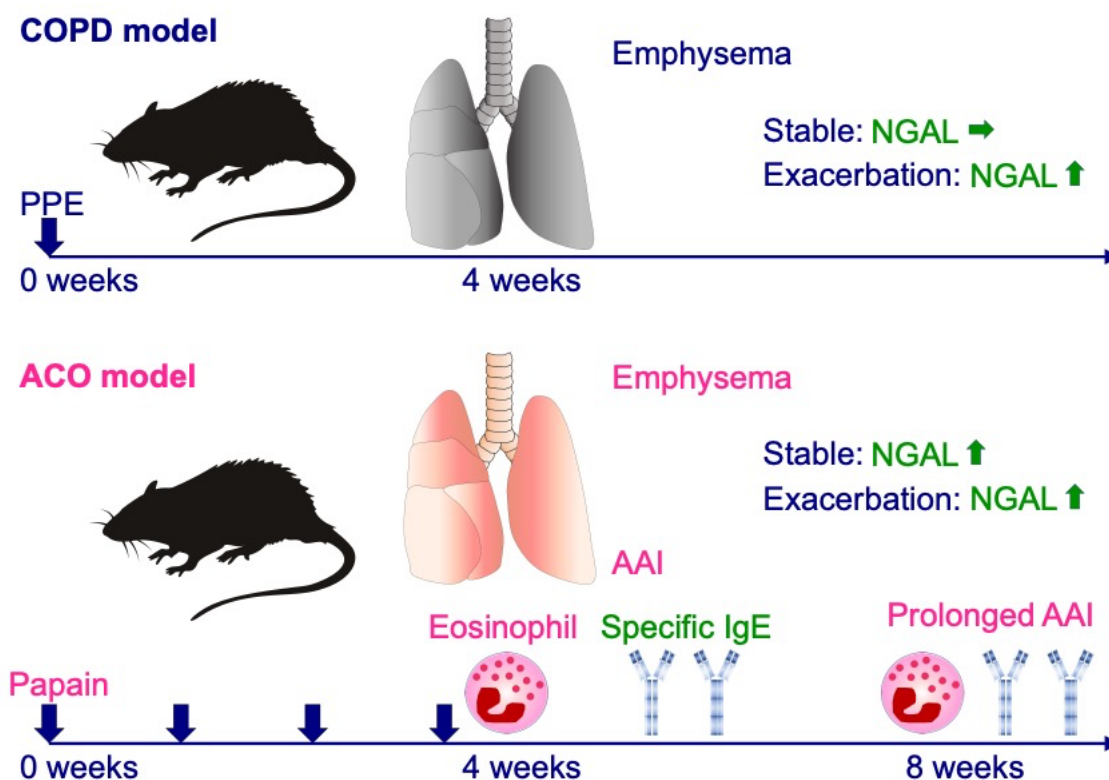


Figure. 18

本研究における要点のシェーマ

既存の PPE による COPD モデルでは肺気腫が形成される一方で、パパインを 1 週間ごとに反復投与した本研究のモデルでは肺気腫およびアレルギー性気道炎症 (AAI: Allergic Airway Inflammation) が誘導された。AAI やパパイン特異的 IgE 抗体は、パパイン最終投与から 5 週間経過してもなお残存していた。本研究のモデルは気道過敏性の亢進、粘液産生の増加、2 型サイトカインの増加、気道中 NGAL の増加など臨床的 ACO に合致する特徴を認め、ACO マウスモデルとして妥当と考えられた。

謝辞

本研究に際して多大なる御高配と御指導の御鞭撻を頂きました東京大学大学院
医学系研究科 器官病態内科学講座 呼吸器内科学 長瀬隆英教授に深く感謝い
たします。

また、本研究全般にわたり直接の御指導、御鞭撻を賜りました呼吸器内科 松
崎博崇先生、三上優先生、平石尚久先生、齋藤朗先生に感謝いたします。

最後に、本研究の遂行にあたり様々なご協力を頂きました技術補佐員 岩根奈
美氏に感謝いたします。

参考文献

1. Porsbjerg C, Sverrild A, Baines KJ, Searles A, Maltby S, Foster PS, Brightling C, Gibson PG.
Advancing the management of obstructive airways diseases through translational research.
Clin Exp Allergy 48: 493-501; 2018.
2. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma P. The global burden of
asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59:
469-478; 2004.
3. Soriano JB, Abajobir AA, Abate KH, Abera SF, Agrawal A, Ahmed MB, Aichour AN, Aichour I,
Aichour MTE, Alam K, Alam N, Alkaabi JM, Al-Maskari F, Alvis-Guzman N, Amberbir A,
Amoako YA, Ansha MG, Antó JM, Asayesh H, Atey TM, Avokpaho EFGA, Barac A, Basu
S, Bedi N, Bensenor IM, Berhane A, Beyene AS, Bhutta ZA, Biryukov S, Boneya DJ,
Brauer M, Carpenter DO, Casey D, Christopher DJ, Dandona L, Dandona R,
Dharmaratne SD, Do HP, Fischer F, Gebrehiwot TT, Geleto A, Ghoshal AG, Gillum RF,
Ginawi IAM, Gupta V, Hay SI, Hedayati MT, Horita N, Hosgood HD, Jakovljevic MB,
James SL, Jonas JB, Kasaeian A, Khader YS, Khalil IA, Khan EA, Khang Y-H,
Khubchandani J, Knibbs LD, Kosen S, Koul PA, Kumar GA, Leshargie CT, Liang X, El
Razek HMA, Majeed A, Malta DC, Manhertz T, Marquez N, Mehari A, Mensah GA,

Miller TR, Mohammad KA, Mohammed KE, Mohammed S, Mokdad AH, Naghavi M, Nguyen CT, Nguyen G, Le Nguyen Q, Nguyen TH, Ningrum DNA, Nong VM, Obi JJ, Odeyemi YE, Ogbo FA, Oren E, Pa M, Park E-K, Patton GC, Paulson K, Qorbani M, Quansah R, Rafay A, Rahman MHU, Rai RK, Rawaf S, Reinig N, Safiri S, Sarmiento-Suarez R, Sartorius B, Savic M, Sawhney M, Shigematsu M, Smith M, Tadese F, Thurston GD, Topor-Madry R, Tran BX, Ukwaja KN, van Boven JFM, Vlassov VV, Vollset SE, Wan X, Werdecker A, Hanson SW, Yano Y, Yimam HH, Yonemoto N, Yu C, Zaidi Z, El Sayed Zaki M, Lopez AD, Murray CJL, Vos T. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Respiratory Medicine* 5: 691-706; 2017.

4. Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown A, Carter A, Casey DC, Charlson FJ, Chen AZ, Coggeshall M, Cornaby L, Dandona L, Dicker DJ, Dilegge T, Erskine HE, Ferrari AJ, Fitzmaurice C, Fleming T, Forouzanfar MH, Fullman N, Gething PW, Goldberg EM, Graetz N, Haagsma JA, Hay SI, Johnson CO, Kassebaum NJ, Kawashima T, Kemmer L, Khalil IA, Kinfu Y, Kyu HH, Leung J, Liang X, Lim SS, Lopez AD, Lozano R, Marczak L, Mensah GA, Mokdad AH, Naghavi M, Nguyen G, Nsoesie E, Olsen H, Pigott DM, Pinho C, Rankin Z, Reinig N, Salomon JA, Sandar L, Smith A, Stanaway J,

Steiner C, Teeple S, Thomas BA, Troeger C, Wagner JA, Wang H, Wanga V, Whiteford HA, Zoeckler L, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abraham B, Abubakar I, Abu-Raddad LJ, Abu-Rmeileh NME, Ackerman IN, Adebisi AO, Ademi Z, Adou AK, Afanvi KA, Agardh EE, Agarwal A, Kiadaliri AA, Ahmadi H, Ajala ON, Akinyemi RO, Akseer N, Al-Aly Z, Alam K, Alam NKM, Aldhahri SF, Alegretti MA, Alemu ZA, Alexander LT, Alhabib S, Ali R, Alkerwi Aa, Alla F, Allebeck P, Al-Raddadi R, Alsharif U, Altirkawi KA, Alvis-Guzman N, Amare AT, Amberbir A, Amini H, Ammar W, Amrock SM, Andersen HH, Anderson GM, Anderson BO, Antonio CAT, Aregay AF, Ärnlöv J, Artaman A, Asayesh H, Assadi R, Atique S, Avokpaho EFGA, Awasthi A, Quintanilla BPA, Azzopardi P, Bacha U, Badawi A, Balakrishnan K, Banerjee A, Barac A, Barker-Collo SL, Bärnighausen T, Barregard L, Barrero LH, Basu A, Bazargan-Hejazi S, Beghi E, Bell B, Bell ML, Bennett DA, Bensenor IM, Benzian H, Berhane A, Bernabé E, Betsu BD, Beyene AS, Bhala N, Bhatt S, Biadgilign S, Bienhoff K, Bikbov B, Biryukov S, Bisanzio D, Bjertness E, Blore J, Borschmann R, Boufous S, Brainin M, Brazinova A, Breitborde NJK, Brown J, Buchbinder R, Buckle GC, Butt ZA, Calabria B, Campos-Nonato IR, Campuzano JC, Carabin H, Cárdenas R, Carpenter DO, Carrero JJ, Castañeda-Orjuela CA, Rivas JC, Catalá-López F, Chang J-C, Chiang PP-C, Chibueze CE, Chisumpa VH, Choi J-YJ, Chowdhury R, Christensen H, Christopher DJ, Ciobanu LG, Cirillo M, Coates MM,

Colquhoun SM, Cooper C, Cortinovis M, Crump JA, Damtew SA, Dandona R, Daoud F,
Dargan PI, das Neves J, Davey G, Davis AC, Leo DD, Degenhardt L, Gobbo LCD,
Dellavalle RP, Deribe K, Deribew A, Derrett S, Jarlais DCD, Dharmaratne SD, Dhillon
PK, Diaz-Torné C, Ding EL, Driscoll TR, Duan L, Dubey M, Duncan BB, Ebrahimi H,
Ellenbogen RG, Elyazar I, Endres M, Endries AY, Ermakov SP, Eshrati B, Estep K, Farid
TA, Farinha CSeS, Faro A, Farvid MS, Farzadfar F, Feigin VL, Felson DT, Fereshtehnejad
S-M, Fernandes JG, Fernandes JC, Fischer F, Fitchett JRA, Foreman K, Fowkes FGR, Fox
J, Franklin RC, Friedman J, Frostad J, Fürst T, Futran ND, Gabbe B, Ganguly P, Gankpé
FG, Gebre T, Gebrehiwot TT, Gebremedhin AT, Geleijnse JM, Gessner BD, Gibney KB,
Ginawi IAM, Giref AZ, Giroud M, Gishu MD, Giussani G, Glaser E, Godwin WW,
Gomez-Dantes H, Gona P, Goodridge A, Gopalani SV, Gotay CC, Goto A, Gouda HN,
Grainger R, Greaves F, Guillemin F, Guo Y, Gupta R, Gupta R, Gupta V, Gutiérrez RA,
Haile D, Hailu AD, Hailu GB, Halasa YA, Hamadeh RR, Hamidi S, Hammami M, Hancock
J, Handal AJ, Hankey GJ, Hao Y, Harb HL, Harikrishnan S, Haro JM, Havmoeller R, Hay
RJ, Heredia-Pi IB, Heydarpour P, Hoek HW, Horino M, Horita N, Hosgood HD, Hoy DG,
Htet AS, Huang H, Huang JJ, Huynh C, Iannarone M, Iburg KM, Innos K, Inoue M, Iyer
VJ, Jacobsen KH, Jahanmehr N, Jakovljevic MB, Javanbakht M, Jayaraman SP, Jayatilleke
AU, Jee SH, Jeemon P, Jensen PN, Jiang Y, Jibat T, Jimenez-Corona A, Jin Y, Jonas JB,

Kabir Z, Kalkonde Y, Kamal R, Kan H, Karch A, Karema CK, Karimkhani C, Kasaeian A, Kaul A, Kawakami N, Keiyoro PN, Kemp AH, Keren A, Kesavachandran CN, Khader YS, Khan AR, Khan EA, Khang Y-H, Khera S, Khoja TAM, Khubchandani J, Kieling C, Kim P, Kim C-i, Kim D, Kim YJ, Kissoon N, Knibbs LD, Knudsen AK, Kokubo Y, Kolte D, Kopec JA, Kosen S, Kotsakis GA, Koul PA, Koyanagi A, Kravchenko M, Defo BK, Bicer BK, Kudom AA, Kuipers EJ, Kumar GA, Kutz M, Kwan GF, Lal A, Lalloo R, Lallukka T, Lam H, Lam JO, Langan SM, Larsson A, Lavados PM, Leasher JL, Leigh J, Leung R, Levi M, Li Y, Li Y, Liang J, Liu S, Liu Y, Lloyd BK, Lo WD, Logroscino G, Looker KJ, Lotufo PA, Lunevicius R, Lyons RA, Mackay MT, Magdy M, Razek AE, Mahdavi M, Majdan M, Majeed A, Malekzadeh R, Marcenes W, Margolis DJ, Martinez-Raga J, Masiye F, Massano J, McGarvey ST, McGrath JJ, McKee M, McMahon BJ, Meaney PA, Mehari A, Mejia-Rodriguez F, Mekonnen AB, Melaku YA, Memiah P, Memish ZA, Mendoza W, Meretoja A, Meretoja TJ, Mhimbira FA, Millea A, Miller TR, Mills EJ, Mirarefin M, Mitchell PB, Mock CN, Mohammadi A, Mohammed S, Monasta L, Hernandez JCM, Montico M, Mooney MD, Moradi-Lakeh M, Morawska L, Mueller UO, Mullany E, Mumford JE, Murdoch ME, Nachega JB, Nagel G, Naheed A, Naldi L, Nangia V, Newton JN, Ng M, Ngalesoni FN, Nguyen QL, Nisar MI, Pete PMN, Nolla JM, Norheim OF, Norman RE, Norrving B, Nunes BP, Ogbo FA, Oh I-H, Ohkubo T, Olivares PR, Olusanya BO,

Olusanya JO, Ortiz A, Osman M, Ota E, Pa M, Park E-K, Parsaeian M, de Azeredo Passos VM, Caicedo AJP, Patten SB, Patton GC, Pereira DM, Perez-Padilla R, Perico N, Pesudovs K, Petzold M, Phillips MR, Piel FB, Pillay JD, Pishgar F, Plass D, Platts-Mills JA, Polinder S, Pond CD, Popova S, Poulton RG, Pourmalek F, Prabhakaran D, Prasad NM, Qorbani M, Rabiee RHS, Radfar A, Rafay A, Rahimi K, Rahimi-Movaghar V, Rahman M, Rahman MHU, Rahman SU, Rai RK, Rajsic S, Ram U, Rao P, Refaat AH, Reitsma MB, Remuzzi G, Resnikoff S, Reynolds A, Ribeiro AL, Blancas MJR, Roba HS, Rojas-Rueda D, Ronfani L, Roshandel G, Roth GA, Rothenbacher D, Roy A, Sagar R, Sahathevan R, Sanabria JR, Sanchez-Niño MD, Santos IS, Santos JV, Sarmiento-Suarez R, Sartorius B, Satpathy M, Savic M, Sawhney M, Schaub MP, Schmidt MI, Schneider IJC, Schöttker B, Schwebel DC, Scott JG, Seedat S, Sepanlou SG, Servan-Mori EE, Shackelford KA, Shaheen A, Shaikh MA, Sharma R, Sharma U, Shen J, Shepard DS, Sheth KN, Shibuya K, Shin M-J, Shiri R, Shiue I, Shrimel MG, Sigfusdottir ID, Silva DAS, Silveira DGA, Singh A, Singh JA, Singh OP, Singh PK, Sivonda A, Skirbekk V, Skogen JC, Sligar A, Sliwa K, Soljak M, Søreide K, Sorensen RJD, Soriano JB, Sposato LA, Sreeramareddy CT, Stathopoulou V, Steel N, Stein DJ, Steiner TJ, Steinke S, Stovner L, Stroumpoulis K, Sunguya BF, Sur P, Swaminathan S, Sykes BL, Szoek CEI, Tabarés-Seisdedos R, Takala JS, Tandon N, Tanne D, Tavakkoli M, Taye B, Taylor HR, Ao BJT, Tedla BA, Terkawi AS, Thomson AJ, Thorne-Lyman AL,

Thrift AG, Thurston GD, Tobe-Gai R, Tonelli M, Topor-Madry R, Topouzis F, Tran BX, Truelsen T, Dimbuene ZT, Tsilimbaris M, Tura AK, Tuzcu EM, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Undurraga EA, Uneke CJ, Uthman OA, van Gool CH, Varakin YY, Vasankari T, Venketasubramanian N, Verma RK, Violante FS, Vladimirov SK, Vlassov VV, Vollset SE, Wagner GR, Waller SG, Wang L, Watkins DA, Weichenthal S, Weiderpass E, Weintraub RG, Werdecker A, Westerman R, White RA, Williams HC, Wiysonge CS, Wolfe CDA, Won S, Woodbrook R, Wubshet M, Xavier D, Xu G, Yadav AK, Yan LL, Yano Y, Yaseri M, Ye P, Yeboyo HG, Yip P, Yonemoto N, Yoon S-J, Younis MZ, Yu C, Zaidi Z, Zaki MES, Zeeb H, Zhou M, Zodpey S, Zuhlke LJ, Murray CJL. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 388: 1545-1602; 2016.

5. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, Casey DC, Charlson FJ, Chen AZ, Coates MM, Coggeshall M, Dandona L, Dicker DJ, Erskine HE, Ferrari AJ, Fitzmaurice C, Foreman K, Forouzanfar MH, Fraser MS, Fullman N, Gething PW, Goldberg EM, Graetz N, Haagsma JA, Hay SI, Huynh C, Johnson CO, Kassebaum NJ, Kinfu Y, Kulikoff XR, Kutz M, Kyu HH, Larson HJ, Leung J, Liang X, Lim SS, Lind M, Lozano R, Marquez N, Mensah GA, Mikesell J, Mokdad AH, Mooney MD, Nguyen G,

Nsoesie E, Pigott DM, Pinho C, Roth GA, Salomon JA, Sandar L, Silpakit N, Sligar A, Sorensen RJD, Stanaway J, Steiner C, Teeple S, Thomas BA, Troeger C, VanderZanden A, Vollset SE, Wanga V, Whiteford HA, Wolock T, Zoeckler L, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abera SF, Abreu DMX, Abu-Raddad LJ, Abyu GY, Achoki T, Adelekan AL, Ademi Z, Adou AK, Adsuar JC, Afanvi KA, Afshin A, Agardh EE, Agarwal A, Agrawal A, Kiadaliri AA, Ajala ON, Akanda AS, Akinyemi RO, Akinyemiju TF, Akseer N, Lami FHA, Alabed S, Al-Aly Z, Alam K, Alam NKM, Alasfoor D, Aldhahri SF, Aldridge RW, Alegretti MA, Aleman AV, Alemu ZA, Alexander LT, Alhabib S, Ali R, Alkerwi Aa, Alla F, Allebeck P, Al-Raddadi R, Alsharif U, Altirkawi KA, Martin EA, Alvis-Guzman N, Amare AT, Amegah AK, Ameh EA, Amini H, Ammar W, Amrock SM, Andersen HH, Anderson BO, Anderson GM, Antonio CAT, Aregay AF, Ärnlöv J, Arsenijevic VSA, Artaman A, Asayesh H, Asghar RJ, Atique S, Avokpaho EFGA, Awasthi A, Azzopardi P, Bacha U, Badawi A, Bahit MC, Balakrishnan K, Banerjee A, Barac A, Barker-Collo SL, Bärnighausen T, Barregard L, Barrero LH, Basu A, Basu S, Bayou YT, Bazargan-Hejazi S, Beardsley J, Bedi N, Beghi E, Belay HA, Bell B, Bell ML, Bello AK, Bennett DA, Bensenor IM, Berhane A, Bernabé E, Betsu BD, Beyene AS, Bhala N, Bhalla A, Biadgilign S, Bikbov B, Abdulhak AAB, Biroscak BJ, Biryukov S, Bjertness E, Blore JD, Blosser CD, Bohensky MA, Borschmann R, Bose D, Bourne RRA, Brainin M, Brayne CEG, Brazinova A,

Breitborde NJK, Brenner H, Brewer JD, Brown A, Brown J, Brugha TS, Buckle GC, Butt ZA, Calabria B, Campos-Nonato IR, Campuzano JC, Carapetis JR, Cárdenas R, Carpenter DO, Carrero JJ, Castañeda-Orjuela CA, Rivas JC, Catalá-López F, Cavalleri F, Cercy K, Cerda J, Chen W, Chew A, Chiang PP-C, Chibalabala M, Chibueze CE, Chimed-Ochir O, Chisumpa VH, Choi J-YJ, Chowdhury R, Christensen H, Christopher DJ, Ciobanu LG, Cirillo M, Cohen AJ, Colistro V, Colomar M, Colquhoun SM, Cooper C, Cooper LT, Cortinovis M, Cowie BC, Crump JA, Damsere-Derry J, Danawi H, Dandona R, Daoud F, Darby SC, Dargan PI, das Neves J, Davey G, Davis AC, Davitoiu DV, de Castro EF, de Jager P, Leo DD, Degenhardt L, Dellavalle RP, Deribe K, Deribew A, Dharmaratne SD, Dhillon PK, Diaz-Torné C, Ding EL, dos Santos KPB, Dossou E, Driscoll TR, Duan L, Dubey M, Duncan BB, Ellenbogen RG, Ellingsen CL, Elyazar I, Endries AY, Ermakov SP, Eshrati B, Esteghamati A, Estep K, Faghmous IDA, Fahimi S, Faraon EJA, Farid TA, Farinha CSeS, Faro A, Farvid MS, Farzadfar F, Feigin VL, Fereshtehnejad S-M, Fernandes JG, Fernandes JC, Fischer F, Fitchett JRA, Flaxman A, Foigt N, Fowkes FGR, Franca EB, Franklin RC, Friedman J, Frostad J, Fürst T, Futran ND, Gall SL, Gambashidze K, Gamkrelidze A, Ganguly P, Gankpé FG, Gebre T, Gebrehiwot TT, Gebremedhin AT, Gebru AA, Geleijnse JM, Gessner BD, Ghoshal AG, Gibney KB, Gillum RF, Gilmour S, Giref AZ, Giroud M, Gishu MD, Giussani G, Glaser E, Godwin WW, Gomez-Dantes H,

Gona P, Goodridge A, Gopalani SV, Gosselin RA, Gotay CC, Goto A, Gouda HN, Greaves F, Gugnani HC, Gupta R, Gupta R, Gupta V, Gutiérrez RA, Hafezi-Nejad N, Haile D, Hailu AD, Hailu GB, Halasa YA, Hamadeh RR, Hamidi S, Hancock J, Handal AJ, Hankey GJ, Hao Y, Harb HL, Harikrishnan S, Haro JM, Havmoeller R, Heckbert SR, Heredia-Pi IB, Heydarpour P, Hilderink HBM, Hoek HW, Hogg RS, Horino M, Horita N, Hosgood HD, Hotez PJ, Hoy DG, Hsairi M, Htet AS, Htike MMT, Hu G, Huang C, Huang H, Huiart L, Hussein A, Huybrechts I, Huynh G, Iburg KM, Innos K, Inoue M, Iyer VJ, Jacobs TA, Jacobsen KH, Jahanmehr N, Jakovljevic MB, James P, Javanbakht M, Jayaraman SP, Jayatilleke AU, Jeemon P, Jensen PN, Jha V, Jiang G, Jiang Y, Jibat T, Jimenez-Corona A, Jonas JB, Joshi TK, Kabir Z, Kamal R, Kan H, Kant S, Karch A, Karema CK, Karimkhani C, Karletsos D, Karthikeyan G, Kasaeian A, Katibeh M, Kaul A, Kawakami N, Kayibanda JF, Keiyoro PN, Kemmer L, Kemp AH, Kengne AP, Keren A, Kereselidze M, Kesavachandran CN, Khader YS, Khalil IA, Khan AR, Khan EA, Khang Y-H, Khera S, Khoja TAM, Kieling C, Kim D, Kim YJ, Kissela BM, Kissoon N, Knibbs LD, Knudsen AK, Kokubo Y, Kolte D, Kopec JA, Kosen S, Koul PA, Koyanagi A, Krog NH, Defo BK, Bicer BK, Kudom AA, Kuipers EJ, Kulkarni VS, Kumar GA, Kwan GF, Lal A, Lal DK, Laloo R, Lallukka T, Lam H, Lam JO, Langan SM, Lansingh VC, Larsson A, Laryea DO, Latif AA, Lawrynowicz AEB, Leigh J, Levi M, Li Y, Lindsay MP, Lipshultz SE,

Liu PY, Liu S, Liu Y, Lo L-T, Logroscino G, Lotufo PA, Lucas RM, Lunevicius R, Lyons RA, Ma S, Machado VMP, Mackay MT, MacLachlan JH, Razek HMAE, Magdy M, Razek AE, Majdan M, Majeed A, Malekzadeh R, Manamo WAA, Mandisarisa J, Mangalam S, Mapoma CC, Marcenes W, Margolis DJ, Martin GR, Martinez-Raga J, Marzan MB, Masiye F, Mason-Jones AJ, Massano J, Matzopoulos R, Mayosi BM, McGarvey ST, McGrath JJ, McKee M, McMahon BJ, Meaney PA, Mehari A, Mehndiratta MM, Mejia-Rodriguez F, Mekonnen AB, Melaku YA, Memiah P, Memish ZA, Mendoza W, Meretoja A, Meretoja TJ, Mhimbira FA, Micha R, Millea A, Miller TR, Mirarefin M, Misganaw A, Mock CN, Mohammad KA, Mohammadi A, Mohammed S, Mohan V, Mola GLD, Monasta L, Hernandez JCM, Montero P, Montico M, Montine TJ, Moradi-Lakeh M, Morawska L, Morgan K, Mori R, Mozaffarian D, Mueller UO, Murthy GVS, Murthy S, Musa KI, Nachega JB, Nagel G, Naidoo KS, Naik N, Naldi L, Nangia V, Nash D, Nejjari C, Neupane S, Newton CR, Newton JN, Ng M, Ngalesoni FN, de Dieu Ngirabega J, Nguyen QL, Nisar MI, Pete PMN, Nomura M, Norheim OF, Norman PE, Norrving B, Nyakarahuka L, Ogbo FA, Ohkubo T, Ojelabi FA, Olivares PR, Olusanya BO, Olusanya JO, Opio JN, Oren E, Ortiz A, Osman M, Ota E, Ozdemir R, Pa M, Pain A, Pandian JD, Pant PR, Papachristou C, Park E-K, Park J-H, Parry CD, Parsaeian M, Caicedo AJP, Patten SB, Patton GC, Paul VK, Pearce N, Pedro JM, Stokic LP, Pereira DM, Perico N, Pesudovs K, Petzold M, Phillips

MR, Piel FB, Pillay JD, Plass D, Platts-Mills JA, Polinder S, Pope CA, Popova S, Poulton
RG, Pourmalek F, Prabhakaran D, Qorbani M, Quame-Amaglo J, Quistberg DA, Rafay A,
Rahimi K, Rahimi-Movaghar V, Rahman M, Rahman MHU, Rahman SU, Rai RK, Rajavi
Z, Rajsic S, Raju M, Rakovac I, Rana SM, Ranabhat CL, Rangaswamy T, Rao P, Rao SR,
Refaat AH, Rehm J, Reitsma MB, Remuzzi G, Resnikoff S, Ribeiro AL, Ricci S, Blancas
MJR, Roberts B, Roca A, Rojas-Rueda D, Ronfani L, Roshandel G, Rothenbacher D, Roy
A, Roy NK, Ruhago GM, Sagar R, Saha S, Sahathevan R, Saleh MM, Sanabria JR, Sanchez-
Niño MD, Sanchez-Riera L, Santos IS, Sarmiento-Suarez R, Sartorius B, Satpathy M,
Savic M, Sawhney M, Schaub MP, Schmidt MI, Schneider IJC, Schöttker B, Schutte AE,
Schwebel DC, Seedat S, Sepanlou SG, Servan-Mori EE, Shackelford KA, Shaddick G,
Shaheen A, Shahraz S, Shaikh MA, Shakh-Nazarova M, Sharma R, She J, Sheikhhahaei S,
Shen J, Shen Z, Shepard DS, Sheth KN, Shetty BP, Shi P, Shibuya K, Shin M-J, Shiri R,
Shiue I, Shrimel MG, Sigfusdottir ID, Silberberg DH, Silva DAS, Silveira DGA, Silverberg
JI, Simard EP, Singh A, Singh GM, Singh JA, Singh OP, Singh PK, Singh V, Soneji S,
Søreide K, Soriano JB, Sposato LA, Sreeramareddy CT, Stathopoulou V, Stein DJ, Stein
MB, Stranges S, Stroumpoulis K, Sunguya BF, Sur P, Swaminathan S, Sykes BL, Szoeki
CEI, Tabarés-Seisdedos R, Tabb KM, Takahashi K, Takala JS, Talongwa RT, Tandon N,
Tavakkoli M, Taye B, Taylor HR, Ao BJT, Tedla BA, Tefera WM, Have MT, Terkawi AS,

Tesfay FH, Tessema GA, Thomson AJ, Thorne-Lyman AL, Thrift AG, Thurston GD, Tillmann T, Tirschwell DL, Tonelli M, Topor-Madry R, Topouzis F, Towbin JA, Traebert J, Tran BX, Truelsen T, Trujillo U, Tura AK, Tuzcu EM, Uchendu US, Ukwaja KN, Undurraga EA, Uthman OA, Dingenen RV, van Donkelaar A, Vasankari T, Vasconcelos AMN, Venketasubramanian N, Vidavalur R, Vijayakumar L, Villalpando S, Violante FS, Vlassov VV, Wagner JA, Wagner GR, Wallin MT, Wang L, Watkins DA, Weichenthal S, Weiderpass E, Weintraub RG, Werdecker A, Westerman R, White RA, Wijeratne T, Wilkinson JD, Williams HC, Wiysonge CS, Woldeyohannes SM, Wolfe CDA, Won S, Wong JQ, Woolf AD, Xavier D, Xiao Q, Xu G, Yakob B, Yalew AZ, Yan LL, Yano Y, Yaseri M, Ye P, Yebyo HG, Yip P, Yirsaw BD, Yonemoto N, Yonga G, Younis MZ, Yu S, Zaidi Z, Zaki MES, Zannad F, Zavala DE, Zeeb H, Zeleke BM, Zhang H, Zodpey S, Zonies D, Zuhlke LJ, Vos T, Lopez AD, Murray CJL. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* 388: 1459-1544; 2016.

6. Gibson PG, Simpson JL. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it? *Thorax* 64: 728-735; 2009.

7. Park SY, Jung H, Kim JH, Seo B, Kwon OY, Choi S, Oh B, Kwon HS, Cho YS, Moon HB, Won

- S, Park T, Kim TB. Longitudinal analysis to better characterize Asthma-COPD overlap syndrome: Findings from an adult asthma cohort in Korea (COREA). *Clin Exp Allergy* 49: 603-614; 2019.
8. Gibson PG, McDonald VM. Asthma-COPD overlap 2015: now we are six. *Thorax* 70: 683-691; 2015.
9. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 339: 1194-1200; 1998.
10. Hardin M, Silverman EK, Barr RG, Hansel NN, Schroeder JD, Make BJ, Crapo JD, Hersh CP, Investigators CO. The clinical features of the overlap between COPD and asthma. *Respir Res* 12: 127; 2011.
11. Soriano JB, Visick GT, Muellerova H, Payvandi N, Hansell AL. Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest* 128: 2099-2107; 2005.
12. Llanos JP, Ortega H, Germain G, Duh MS, Lafeuille MH, Tiggelaar S, Bell CF, Hahn B. Health characteristics of patients with asthma, COPD and asthma-COPD overlap in the NHANES database. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 13: 2859-2868; 2018.
13. Gao J, Zhou W, Chen B, Lin W, Wu S, Wu F. Sputum cell count: biomarkers in the differentiation of asthma, COPD and asthma-COPD overlap. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 12: 2703-2710; 2017.

14. Jon. Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance: A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 8: 99-104; 2012.
15. Milne J, Brand S. Occupational asthma after inhalation of dust of the proteolytic enzyme, papain. *Br J Ind Med* 32: 302-307; 1975.
16. Jiang N, Yin J, Wen L. Papain Induced Occupational Asthma with Kiwi and Fig Allergy. *Allergy Asthma Immunol Res* 8: 170-173; 2016.
17. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18581-18586; 2010.
18. Cai T, Qiu J, Ji Y, Li W, Ding Z, Suo C, Chang J, Wang J, He R, Qian Y, Guo X, Zhou L, Sheng H, Shen L, Qiu J. IL-17-producing ST2(+) group 2 innate lymphoid cells play a pathogenic role in lung inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 143: 229-244 e229; 2019.
19. Ishii T, Hosoki K, Nikura Y, Yamashita N, Nagase T, Yamashita N. IFN Regulatory Factor 3 Potentiates Emphysematous Aggravation by Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology* 198: 3637-3649; 2017.
20. Machado MN, Mazzoli-Rocha F, Casquilho NV, Maron-Gutierrez T, Ortenzi VH, Morales MM, Fortunato RS, Zin WA. Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Therapy in Papain-Induced Experimental Pulmonary Emphysema. *Front Physiol* 9: 121; 2018.

21. Secher T, Maillet I, Mackowiak C, Le Berichel J, Philippeau A, Panek C, Boury M, Oswald E, Saoudi A, Erard F, Le Bert M, Quesniaux V, Couturier-Maillard A, Ryffel B. The probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 prevents papain-induced respiratory barrier injury and severe allergic inflammation in mice. *Sci Rep* 8: 11245; 2018.
22. Jackson DJ, Sykes A, Mallia P, Johnston SL. Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention. *J Allergy Clin Immunol* 128: 1165-1174; 2011.
23. Gern JE. How rhinovirus infections cause exacerbations of asthma. *Clin Exp Allergy* 45: 32-42; 2015.
24. Wedzicha JA, Seemungal TAR. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet* 370: 786-796; 2007.
25. Mebratu YA, Smith KR, Agga GE, Tesfaigzi Y. Inflammation and emphysema in cigarette smoke-exposed mice when instilled with poly (I:C) or infected with influenza A or respiratory syncytial viruses. *Respir Res* 17: 75; 2016.
26. Lunding LP, Webering S, Vock C, Behrends J, Wagner C, Holscher C, Fehrenbach H, Wegmann M. Poly(inosinic-cytidylic) acid-triggered exacerbation of experimental asthma depends on IL-17A produced by NK cells. *J Immunol* 194: 5615-5625; 2015.
27. Tiotiu A. Biomarkers in asthma: state of the art. *Asthma Res Pract* 4: 10; 2018.
28. Sun WY, Bai B, Luo C, Yang K, Li D, Wu D, Feletou M, Villeneuve N, Zhou Y, Yang J, Xu A,

- Vanhoutte PM, Wang Y. Lipocalin-2 derived from adipose tissue mediates aldosterone-induced renal injury. *JCI Insight* 3; 2018.
29. Gao J, Iwamoto H, Koskela J, Alenius H, Hattori N, Kohno N, Laitinen T, Mazur W, Pulkkinen V. Characterization of sputum biomarkers for asthma-COPD overlap syndrome. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 11: 2457-2465; 2016.
30. Jo YS, Kwon SO, Kim J, Kim WJ. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a complementary biomarker for the asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap. *J Thorac Dis* 10: 5047-5056; 2018.
31. Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 45: 17-23; 1997.
32. de Llano LP, Cosio BG, Iglesias A, de Las Cuevas N, Soler-Cataluna JJ, Izquierdo JL, Lopez-Campos JL, Calero C, Plaza V, Miravittles M, Torrego A, Martinez-Moragon E, Soriano JB, Vina AL, Bobolea I. Mixed Th2 and non-Th2 inflammatory pattern in the asthma-COPD overlap: a network approach. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 13: 591-601; 2018.
33. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER, Structure AEJTFoQAoL. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 394-418; 2010.

34. Nair P, Martin JG, Cockcroft DC, Dolovich M, Lemiere C, Boulet LP, O'Byrne PM. Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Measurement and Clinical Relevance. *J Allergy Clin Immunol Pract* 5: 649-659 e642; 2017.
35. Shimura S, Takai T, Iida H, Maruyama N, Ochi H, Kamijo S, Nishioka I, Hara M, Matsuda A, Saito H, Nakae S, Ogawa H, Okumura K, Ikeda S. Epicutaneous Allergic Sensitization by Cooperation between Allergen Protease Activity and Mechanical Skin Barrier Damage in Mice. *J Invest Dermatol* 136: 1408-1417; 2016.
36. Kamijo S, Takeda H, Tokura T, Suzuki M, Inui K, Hara M, Matsuda H, Matsuda A, Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S, Sudo K, Suto H, Ichikawa S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. IL-33-mediated innate response and adaptive immune cells contribute to maximum responses of protease allergen-induced allergic airway inflammation. *J Immunol* 190: 4489-4499; 2013.
37. Nussbaum JC, Van Dyken SJ, von Moltke J, Cheng LE, Mohapatra A, Molofsky AB, Thornton EE, Krummel MF, Chawla A, Liang HE, Locksley RM. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 502: 245-248; 2013.
38. Iwamoto H, Gao J, Koskela J, Kinnula V, Kobayashi H, Laitinen T, Mazur W. Differences in plasma and sputum biomarkers between COPD and COPD-asthma overlap. *Eur Respir J* 43: 421-429; 2014.

39. Tamura K, Matsumoto K, Fukuyama S, Kan OK, Ishii Y, Tonai K, Tatsuta M, Enokizu A, Inoue H, Nakanishi Y. Frequency-dependent airway hyperresponsiveness in a mouse model of emphysema and allergic inflammation. *Physiol Rep* 6; 2018.
40. Wert SE, Yoshida M, LeVine AM, Ikegami M, Jones T, Ross GF, Fisher JH, Korfhagen TR, Whitsett JA. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5972-5977; 2000.
41. Miyamoto C, Kojo S, Yamashita M, Moro K, Lacaud G, Shiroguchi K, Taniuchi I, Ebihara T. Runx/Cbfbeta complexes protect group 2 innate lymphoid cells from exhausted-like hyporesponsiveness during allergic airway inflammation. *Nat Commun* 10: 447; 2019.
42. Ishii T, Muroi M, Horiguchi K, Tanamoto KI, Nagase T, Yamashita N. Activation through toll-like receptor 2 on group 2 innate lymphoid cells can induce asthmatic characteristics. *Clin Exp Allergy* 49: 1624-1632; 2019.
43. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Iikura M, Suto H, McKenzie AN, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting

- Regulatory T Cell Numbers. *Immunity* 43: 175-186; 2015.
44. Carlens J, Wahl B, Ballmaier M, Bulfone-Paus S, Forster R, Pabst O. Common gamma-chain-dependent signals confer selective survival of eosinophils in the murine small intestine. *J Immunol* 183: 5600-5607; 2009.
45. Vieira P, Rajewsky K. The half-lives of serum immunoglobulins in adult mice. *Eur J Immunol* 18: 313-316; 1988.
46. Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, Nishimura M. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax* 57: 405-411; 2002.
47. Morichika D, Miyahara N, Fujii U, Taniguchi A, Oda N, Senoo S, Kataoka M, Tanimoto M, Kakuta H, Kiura K, Maeda Y, Kanehiro A. A retinoid X receptor partial agonist attenuates pulmonary emphysema and airway inflammation. *Respir Res* 20: 2; 2019.
48. Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Kamata H, Shinoda H, Hasegawa N, Miyasho T, Satoh M, Takano H, Ishizaka A. Role of interleukin-6 in elastase-induced lung inflammatory changes in mice. *Exp Lung Res* 36: 362-372; 2010.
49. Wen Y, Reid DW, Zhang D, Ward C, Wood-Baker R, Walters EH. Assessment of airway inflammation using sputum, BAL, and endobronchial biopsies in current and ex-smokers with established COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 5: 327-334; 2010.

50. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 24-31; 2003.
51. Wrench C, Belchamber KBR, Bercusson A, Shah A, Barnes PJ, Armstrong-James D, Donnelly LE. Reduced Clearance of Fungal Spores by Chronic Obstructive Pulmonary Disease GM-CSF- and M-CSF-derived Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 58: 271-273; 2018.
52. Bai Y, Zhou Q, Fang Q, Song L, Chen K. Inflammatory Cytokines and T-Lymphocyte Subsets in Serum and Sputum in Patients with Bronchial Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Med Sci Monit* 25: 2206-2210; 2019.
53. Ghebre MA, Pang PH, Diver S, Desai D, Bafadhel M, Haldar K, Kebabze T, Cohen S, Newbold P, Rapley L, Woods J, Rugman P, Pavord ID, Johnston SL, Barer M, May RD, Brightling CE. Biological exacerbation clusters demonstrate asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap with distinct mediator and microbiome profiles. *J Allergy Clin Immunol* 141: 2027-2036 e2012; 2018.
54. Nakagome K, Nagata M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front Immunol* 9: 2220; 2018.
55. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil

- gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 276: 37258-37265; 2001.
56. Wang Y, Jia M, Yan X, Cao L, Barnes PJ, Adcock IM, Huang M, Yao X. Increased neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) promotes airway remodelling in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Sci (Lond)* 131: 1147-1159; 2017.
57. Karisola P, Lehto M, Kinaret P, Ahonen N, Haapakoski R, Anthoni M, Taniguchi M, Wolff H, Puustinen A, Alenius H. Invariant Natural Killer T Cells Play a Role in Chemotaxis, Complement Activation and Mucus Production in a Mouse Model of Airway Hyperreactivity and Inflammation. *PLoS One* 10: e0129446; 2015.
58. Melen E, Guerra S, Hallberg J, Jarvis D, Stanojevic S. Linking COPD epidemiology with pediatric asthma care: Implications for the patient and the physician. *Pediatr Allergy Immunol* 30: 589-597; 2019.
59. Just J, Bourgoin-Heck M, Amat F. Clinical phenotypes in asthma during childhood. *Clin Exp Allergy* 47: 848-855; 2017.
60. Hirai K, Shirai T, Suzuki M, Akamatsu T, Suzuki T, Hayashi I, Yamamoto A, Akita T, Morita S, Asada K, Tsuji D, Inoue K, Itoh K. A clustering approach to identify and characterize the asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap phenotype. *Clin Exp Allergy* 47: 1374-1382; 2017.

61. Pavord ID, Afzalnia S, Menzies-Gow A, Heaney LG. The current and future role of biomarkers in type 2 cytokine-mediated asthma management. *Clin Exp Allergy* 47: 148-160; 2017.
62. McDowell PJ, Heaney LG. Different endotypes and phenotypes drive the heterogeneity in severe asthma. *Allergy* 75: 302-310; 2020.
63. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295: L1-15; 2008.