

博士論文

論文題目 閉塞性肺疾患における自然免疫系活性化の  
役割についての解析

石井 崇史

## 目次

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 1. 要旨                        | 3  |
| 2. 略語                        | 4  |
| 3. 序文                        | 5  |
| 4. 方法                        | 10 |
| 5. 結果                        | 23 |
| 結果 1: IRF3KO マウスにおける肺気腫形成の抑制 | 23 |
| 結果 2: PPE+LPS 投与による炎症反応の差異   | 30 |
| 結果 3: PPE+LPS 投与による肺好中球機能の差異 | 35 |
| 6. 考察                        | 43 |
| 7. 謝辞                        | 51 |
| 8. 参考文献                      | 52 |

## 1 要旨

COPD 急性増悪の病態解明目的に、自然免疫系の賦活化に重要な役割を持つ転写因子 IRF3 に焦点を当てた。Elastase、LPS を用いたマウス COPD 急性増悪モデルを作成すると、IRF3KO マウスでは、野生型マウスと比較して、CT 上の経時的気腫拡大の抑制と病理上の肺胞腔拡大の抑制が認められた。急性期炎症所見は、IRF3KO マウスでの気管支肺胞洗浄液の好中球数の増多を認めたが、COPD に関与する肺の遺伝子発現量低下を認めた。機能比較では IRF3KO マウスに於ける好中球貪食能の低下とオートファジー機能低下を認め、IRF3 の抑制により好中球機能制御を介した肺気腫形成の緩和の可能性を示した。

## 2 略語

COPD, chronic obstructive pulmonary disease

IRF3, interferon regulatory factor 3

LPS, lipopolysaccharides

TLR, toll-like receptors

MyD88, myeloid differentiation factor 88

TRIF, TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$

PPE, elastase from porcine pancreas

TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha

MIP-1 $\alpha$ , macrophage inflammatory protein-1 alpha

MIP-2, macrophage inflammatory protein 2

MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1

IL-17A, interleukin-17A

KC, keratinocyte chemoattractant

### 3 序文

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)/肺気腫は不可逆的な気流制限を特徴的とし、臨床症状としては慢性的な咳、痰、呼吸困難を特徴とする慢性進行性肺疾患である。主症状である喀痰、咳嗽、呼吸困難や併発全身合併症はQOLにも影響を及ぼす(1) (2)。世界規模で患者数は増大しており、WHO では 2030 年までに主な死因の第三位、また身体障害の要因の第五位になると推測されている(3)。日本の喫煙者人口は男性で近年減少しているが開始年齢は若年齢化しており、諸先進国と比して依然喫煙率は高い。また COPD の診断率向上も考慮し COPD 患者数の増加は当面続くと考えられる。COPD の治療には主に気流制限の緩和を目的として抗コリン吸入剤、長時間作用型  $\beta 2$  刺激薬吸入剤等が使用されるが、根本的な治療は未だ無いのが現状である。

COPD 発症、進行には主に喫煙が関与しており、マクロファージ、好中球、リンパ球が肺胞腔に動員され炎症、アポトーシスを惹起され、肺胞隔壁の破壊が進行し気腫形成が起こる(4) (5) (6)。一方、COPD ではその経過中にしばしば急性増悪を起こす事が知られている、急性増悪は主にウイルスや細菌感染を契

機として発症し、しばしば重篤な呼吸不全を起こし COPD の主要死因の一つとなり、また回復してもその後の呼吸機能や QOL の低下をもたらす為(7)、その予防、治療は COPD の管理に重要である(8) (9)。上記の病態の様に COPD の発症や急性増悪には自然免疫系が関わっていると考えられ(10) 、その病態解明が新規治療薬に結びつく可能性がある。

Interferon regulatory factor 3 (IRF3)はウイルス感染における Type1 interferon 産生に関わる転写因子で、自然免疫受容体の刺激で活性化される(11, 12)。具体的には、ウイルスや細胞内寄生菌由来の二本鎖 RNA,DNA を RIG-1 like receptors を介して認識する経路や(13)、二本鎖 RNA やグラム陰性桿菌の内毒素として知られる Lipopolysaccharides (LPS)を各々 Toll-like receptors (TLR)3,4 を介して認識する経路で IRF3 は活性化される(12, 14)。各経路のシグナルは TANK-binding kinase-1 (TBK1)の活性化を通して細胞質内の IRF3 のリン酸化をもたらし、核内に移行し標的遺伝子の転写が起こる(15, 16)。

TLR4 活性化後のシグナル伝達経路には、IRF3 を介する経路とともに NF- $\kappa$ B を介する経路の二つ存在する。前者は TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF)を経由して転写因子 IRF3 を活性化する経路であり、後者は受容体

アダプタータンパク質 Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)を経由し、主に転写因子 NF- $\kappa$ B を最終的に活性化する経路である(17, 18)、LPS はいずれの経路も活性化し(19)(Fig.3-1)、NF- $\kappa$ B を介する経路についてはその存在が COPD 形成に必須であることが報告されているが、IRF3 についてはその役割が不明である。

COPD の急性増悪には上記の通り感染契機となる事が多く、LPS の関与が示唆される。LPS は経気道的な単回投与により好中球浸潤による肺障害、肺炎を起こすが(20)、短期間投与では肺気腫病態はほぼ惹起されない。一方、COPD の実験動物モデルに関しては肺の基本構造であるエラスチンを主に分解する elastase を経気道的投与するモデルが以前から知られている。elastase は主に好中球に含まれており、ヒトにおいても COPD との関連が示唆されている。喫煙によってもたらされるヒトの複雑な COPD の病態を完全に反映するかは議論が残るものの、用量依存的にかつ単回で早期に肺気腫を誘発でき機能形態的变化も比較的測定容易な為、頻用されている(21)。

今回、elastase の経気道的投与により肺気腫を形成し、その後に LPS を同様に投与し肺炎/肺障害を惹起させるマウスモデルを用いて、今回の研究目的として COPD/肺気腫の急性増悪における IRF3 の役割を解明する事を設定した。IRF3

機能解析においては、遺伝子ターゲティング法により遺伝子欠損マウスが作成されており(11)、主にウイルス感染や TLR 経路等の自然免疫系の解析において使用されている(22) (23)。今回の目的においても主に野生型マウスと IRF3KO マウスを用いて比較する事により解析する事とした。



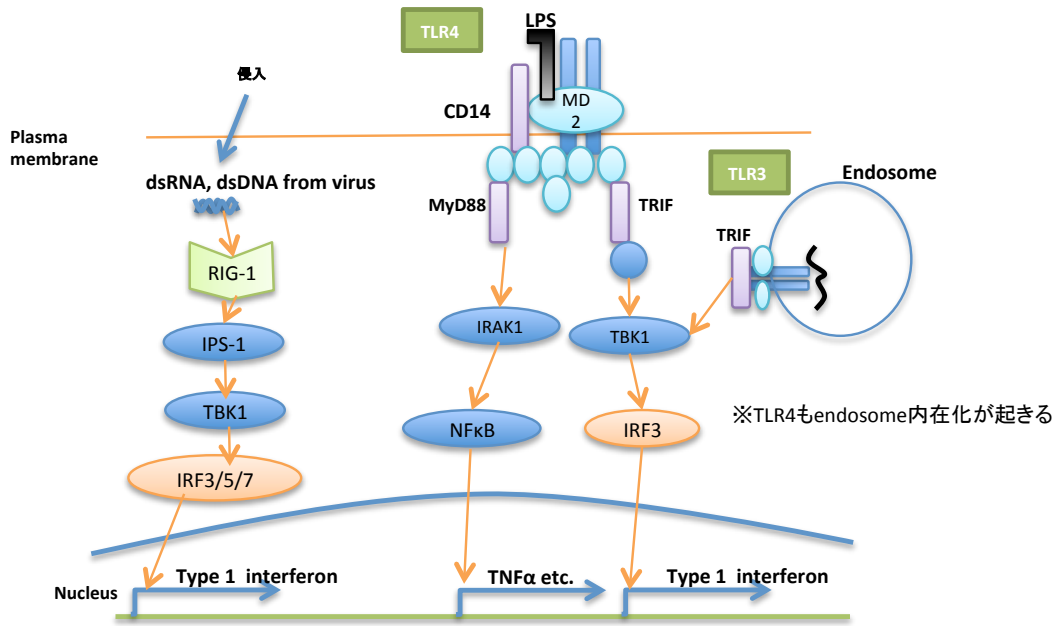


Figure 3-1 IRF3 を介する自然免疫受容体シグナル伝達経路

## 4 方法

### 4-1 試薬

LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4)、PPE (Elastase From Porcine Pancreas , Type III-A)、Latex beads (carboxylate-modified, fluorescent yellow-green)、Deoxyribonuclease I from bovine pancreas は Sigma-Aldrich (St.Louis, Missouri, USA)より購入した。Collagenase type I、Dispase IIは Wako Pure Chemical Industries (Osaka,Japan)、anti-mouse GAPDH antibody は GeneTex (Irvine, CA, USA)、anti-mouse LC3 antibody は Abcam (Cambridge, MA, USA)より購入した。Anti-Mouse CD16/CD32、Anti-Mouse Gr-1 biotin、Anti-Mouse CD11c APC、Streptavidin PE は eBioscience (San Diego, CA,USA)にて購入した。

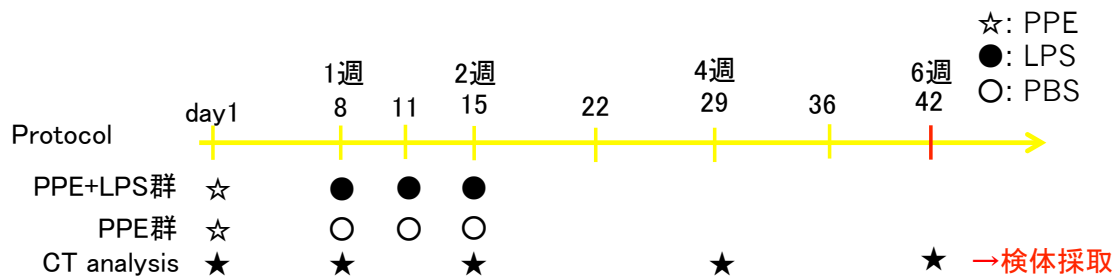
### 4-2 実験動物

野生型 (WT)としては、C57BL/6NCrSlc マウス (6-10 週齢, オス)を使用し、三共ラボサービス (Shizuoka, Japan)より入手した。IRF3 遺伝子欠損 (IRF3 KO)マウス (C57BL/6J background)は東京大学生産技術研究所 谷口維紹先生の承諾を頂

き、RIKEN BRC より購入した。実験は武蔵野大学実験動物委員会の承認を受け、動物実験等の実施に関する基本指針に従って Specific Pathogen Free: SPF 環境で自由採餌および水飲下で飼育された。

#### 4-3 マウス肺気腫/COPD モデルおよび増悪モデルの作成

PPE+LPS 群にはマウスを塩酸メドミジン(1 mg/kg), 塩酸ケタミン(90 mg/kg)で麻酔後、phosphate-buffered saline (PBS)に溶解した Pancreatic porcine elastase (PPE)を 0.5 U/50  $\mu$ l を経鼻投与した (day 1)。その後 day 8,11,15 に同麻酔後 PBS に溶解した LPS を 25  $\mu$ g/50  $\mu$ l 経鼻投与した。PPE 群には day 1 に PPE を投与し、以後は LPS の代わりに PBS を 50  $\mu$ l 経鼻投与した。経鼻投与により気道を介して肺胞領域まで感作される。評価法としては0週、1週、2週、4週、6週に micro-CT (Latheta LCT-200; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)による胸部 CT 撮影と 6 週後の肺組織病理像とした。以下に投与スケジュールを示す。



**Figure 4-1** PPE,LPS 投与と CT 撮影スケジュール

#### 4-4 CT を用いた肺気腫の定量

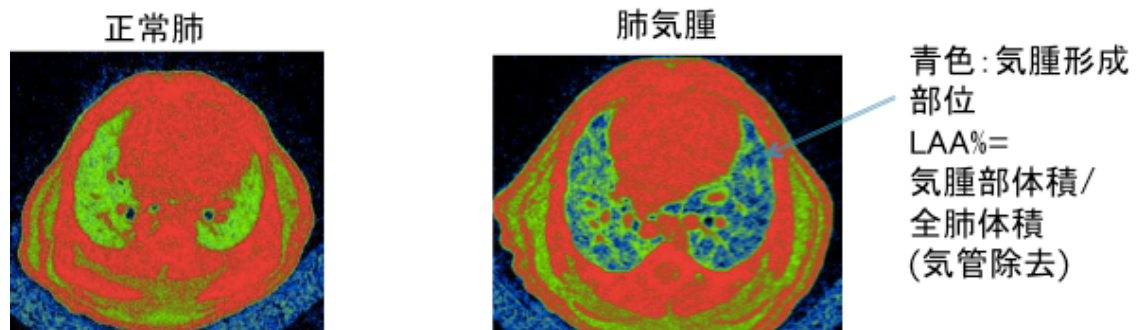
マウスを塩酸メドトミジン (1 mg/kg)、塩酸ケタミン (90 mg/kg)で麻酔後、仰臥位で固定し CT 撮影を行った。撮影条件を以下に示す。

| 撮影条件項目                   | 設定値            |
|--------------------------|----------------|
| 撮影視野                     | 48mm視野         |
| ピクセルサイズ( $\mu\text{m}$ ) | 48             |
| スライス厚( $\mu\text{m}$ )   | 96             |
| スライス間隔( $\mu\text{m}$ )  | 96             |
| 回転速度                     | 4回積算           |
| 回転角度                     | 360            |
| X線管電圧                    | 低(50kV, 0.5mA) |
| 投影方向数                    | 1592           |
| 同期撮影                     | 呼吸同期           |

**Figure 4-2** CT 撮影条件

撮影後、CT 値を基に画像解析を行った。代表的な画像を以下に示す。気腫肺体積の CT 値は含気成分の増加に伴い正常部より低下する。今回肺気腫部体積の CT 値を-871~-610 HU、全肺体積(肺血管部位を除いたもの)を-871~-250 HU とした(24, 25)。解析過程で気管体積も双方の項目に含まれてくる為、気管体積は

別に-871~-250 HUにて計算し、両数値より除いた。LAA% (low attenuation area %)を全肺体積に占める肺気腫部体積の割合として算出した。



**Figure 4-3** 代表的な CT 画像

左図が感作前の野生型マウス、右図が PPE+LPS 投与後野生型マウスの胸部 CT 画像を示す。気腫部位は主に青色部位として表示される。

#### 4-5 組織学的検討

マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔下で気管切開し、20 G 静脈留置カテーテルを挿入した。心臓採血により脱血後、経心臓的に PBS で灌流し、その後カテーテル部位より 4 %パラホルムアルデヒド液を 25 cm 水柱圧にて注入して気管部位を結紮しながらカテーテルを除去した。胸郭ごと摘出し 4 %パラホルムアルデヒド液に浸けて固定し一晩以上 4 °C で保管した。右肺検体でパラフィンブロックを作成し、回転式マイクロトームにて 5 μm 切片を切り出した。加熱処理と Histo-clear 液 (National diagnostics, Atlanta, USA)により脱パラフィンを行

った後、Mayer's hemalum solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)と 1 % Eosin-Y solution (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いて Hematoxylin-eosin 染色を行った。染色標本を光学顕微鏡にて観察し、FLOVEL Image Filing System (Flovel, Tokyo, Japan)にて画像撮影解析を行った。

評価法として、平均肺胞隔壁間距離(Mean linear intercept (Lm))値を用いた(26) (27) (28)。具体的には、肺組織画像上に無作為な線を引き、各肺胞壁によって分断された区間の長さの総和を求め、分断線の総数で除することによって求めた。1 肺葉あたり 4 区画 100 箇所以上の分断線を測定し、4 葉の平均値を算出する事で各個体の平均肺胞隔壁間距離とした。

#### 4-6 急性期炎症の解析

PPE+LPS 群では WT マウス、IRF3KO マウスに塩酸メデトミジン、塩酸ケタミン麻酔を用いて、day 1 に PPE0.5 U/ 50  $\mu$ l を経鼻投与後 day 8 に LPS 25  $\mu$ g/ 50  $\mu$ l を経鼻投与し、24 時間後に気管支肺胞洗浄液、肺を採取した。同様に PPE 群は day 1 に PPE 0.5 U/ 50  $\mu$ l 経鼻投与後、LPS 群は LPS 25  $\mu$ g /50  $\mu$ l 経鼻投与後、PBS 群は PBS 50  $\mu$ l 経鼻投与後に各群翌日に検体採取を行った。

#### 4-7 気管支肺胞洗浄

ペントバルビタールナトリウム麻酔下に気管切開し、20 G 静脈留置カテーテルを挿入した。カテーテルより生理食塩水 1 ml ずつ注入後回収し、計 3 回繰り返して気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) を吸引採取した。採取後細胞成分と上清を 4 °C 1500 rpm 10 分遠心分離し、細胞成分は PBS に浮遊させ、細胞数の計測をしたのち、Shandon Cytospin 4 (Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA)を用い 640 rpm 2 分にてサイトスピン標本を作製した。標本は Diff-Quik 染色液 (Sysmex, Hyogo, Japan)で染色し、細胞分画を解析した。

#### 4-8 RNA の抽出及び cDNA 合成

4-6 にてマウスから摘出した肺は液体窒素で凍結保存し、RNA の抽出に用いた。液体窒素より取り出した肺を速やかにマルチビーズショッカー (YASUI KIKAI, Osaka, Japan)にて粉砕後 Trizol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, California, USA)1 mL を加えて RNA を抽出した。RNA 抽出液を新チューブへ移し、クロロホルム 200  $\mu$ L 加え混和した後、遠心分離 (15000 rpm、25 °C、15 min) を行い、上層のみを採取し新チューブに移した。イソプロパノール 500 $\mu$ L 加え、

転倒混和し、遠心分離（12000 rpm、25 °C、10 min）を行った。遠心後、上清を取り除き、80%エタノールにて RNA ペレットを洗浄した。風乾後、DNase Buffer と dH<sub>2</sub>O で溶解し、TURBO DNase (Life Technologies)を加えてゲノム DNA を分解除去した（37 °C、1 hr）。EDTA 添加と熱変性処理（80°C、10min）にて DNase を不活化後、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Nano Drop technologies, Wilmington, De, USA)を用いて、各サンプルの RNA 濃度を測定した。

次に cDNA 合成を行った。Oligo dT、dNTP mix(Takara Bio Inc. Shiga, Japan)、抽出した RNA、および dH<sub>2</sub>O を加えて反応溶液とした。GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, CA, USA)を用いて熱変性後（65 °C、5 min）、Prime Script (Takara Bio)および付属の buffer、ribonuclease inhibitor、dH<sub>2</sub>O を加えて、同様に 42 °C、40 min にて反応させた。

#### **4-9 Quantitative PCR**

合成した cDNA を用いて各種 mRNA の発現量を、SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio)、Forward/Reverse Primer、cDNA を反応溶液とし、Light Cycler 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いてリアルタイム polymerase chain



reaction (PCR 法) にて測定した。反応条件は、アニーリングは 60 °C 10 s、DNA 伸長は 72 °C 10 s とし 45 サイクル繰り返した。結果は  $\beta$ -actin の mRNA 発現量で標準化した。各プライマー配列を Figure 4-3 に示す。

| Primer         | Forward (5' to 3')              | Reverse (5' to 3')           |
|----------------|---------------------------------|------------------------------|
| $\beta$ -actin | CTCCTAGCACCATGAAGATCA           | CCTGCTTGCTGATCCACATC         |
| TNF- $\alpha$  | CCCCAAAGGGATGAGAAGTT            | CACTTGGTGGTTTGCTACGA         |
| CXCL10         | GCTGCCGTCATTTTCTGC              | TCTCACTGGCCCGTCATC           |
| MIP-1 $\alpha$ | AGCGCCATATGGAGCTGAC             | TGCCGGTTTCTCTTAGTCAG-<br>GA  |
| MCP-1          | ATCCCAATGAGTAGGCTGGAGA          | TAATGTATGTCTGGACCCAT-<br>TCC |
| KC             | GACTCCAGCCACACTCCAAC            | TGACAGCGCAGCTCATTG           |
| MIP-2          | AAAATCATCCAAAAGATACTGA<br>-ACAA | CTTTGGTTCTTCCGTTGAGG         |
| IL-17A         | CGTCACCCTGGACTCTCCA             | CAGAATTCATGTGGTGGTCC<br>-A   |

**Figure 4-4** 使用した primer 配列

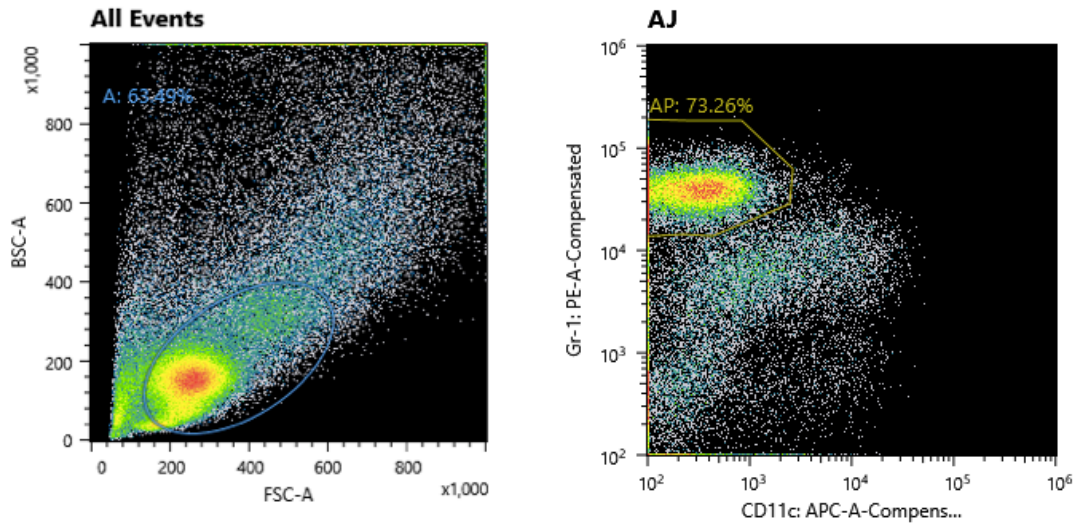
#### 4-10 肺由来の好中球、マクロファージのソーティング

4-6 にて取り出した PPE+LPS 群由来の肺を、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) に 0.2% Collagenase、0.1% Dispase、0.25% Deoxyribonuclease を溶解させた液中で剪刀にて細かく切断し、水浴にて 37 °C 1 時間インキュベート

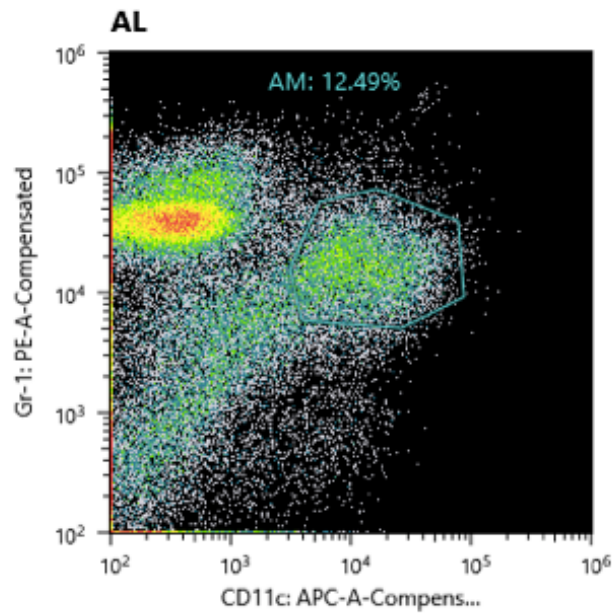
した(29)。溶液を 40  $\mu$ m cell strainer(Corning Inc. NY, USA)に通し、PBS で洗淨した。500 g, 10 min にて遠心後ペレットを Lysis Buffer (PharM Lyse, BD Biosciences, San Diego, CA,USA)にて懸濁し、室温にて 3 分放置後 PBS 洗淨し再遠心した。ペレットを 0.01% Deoxyribonuclease/ Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)にて 懸濁し室温 5 分間放置、DMEM/ F-12 にて洗淨後遠心し、ペレットを PBS/ 2% Fetal bovine serum (FBS)/1% Penicillin Streptomycin (PS)にて懸濁した。Anti-Mouse CD16/ CD32 にて Fc receptor ブロック後、Anti-Mouse Gr-1 biotin、Anti-Mouse CD11c APC を添加し、反応後遠心洗淨し Streptavidin PE を反応させた。遠心洗淨後 PBS/ 2%FBS/ PS に懸濁し懸濁液を再度 cell strainer に通してソーティング前懸濁液とした。直前に死細胞除去用の Propidium iodide (Sigma-Aldrich)を添加し Cell Sorter SH800 (Sony,Tokyo, Japan)にて解析した。好中球の展開のプロセスは、FSC,BSC (SSC) にて展開後標的細胞集団をゲーティング(Fig. 4-4(A))し、doublet と死細胞を除去後、Gr-1<sup>high</sup> CD11c<sup>low</sup> の集団を好中球とした(30) (31) (Fig. 4-4(A))。マクロファージは全集団から死細胞除去後 Gr-1<sup>int</sup> CD11c<sup>high</sup> の集団をゲーティングし(30) (Fig. 4-4(B))、doublet を除去して決定した。それぞれの純度はサイトスピン標本を作

製後、Diff-Quik 染色にて >95% を確認した。

(A)



(B)



**Figure 4-5** セルソーターによる好中球、マクロファージ分離のストラテジー

(A)好中球のソーティング過程。(B)マクロファージのソーティング過程。

#### 4-11 ミエロペルオキシダーゼ(MPO) 活性測定

肺組織検体は、PPE+LPS 投与後の凍結肺をマルチビーズショッカーにて粉碎後、hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer (50 mM KPO<sub>4</sub>, 0.5% HTAB, pH 6.0)を 1 ml 加えて攪拌、組織を溶解した。14,000 g, 30 min, 4 °Cにて遠心後上清を抽出し反応液とした。好中球培養液は、ソーティングした好中球を PBS/ 2%FBS にて  $5 \times 10^5$  /ml とし、96 well plate に 200  $\mu$ l ずつ分注して 2 h 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> にて培養後、遠心後上清を採取して反応液とした。96 well assay plate 上で肺組織反応液 10  $\mu$ l に tetramethylbenzidine (TMB) substrate (SurModics, MN 55344, USA)を 90  $\mu$ l 加え、1 分後に 0.5 mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加して反応停止させプレートリーダー(SUNRISE, TECAN JAPAN, Kanagawa, JAPAN)を使用して 450 nm 吸光度を測定、650 nm 波長をリファレンスとして算出した。好中球培養液では培養液 100  $\mu$ l に TMB100  $\mu$ l 添加し、5 分後に反応停止させて同様に算出した。

#### 4-12 ラテックスビーズ食食能の測定

4-10 にてソーティングした好中球を PBS/ 2 %FBS/ 1 %PS に懸濁して  $2 \times 10^5$  ずつ分注し、各々に Latex beads を加えて 2 時間 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> にて培養後、遠心

洗浄し、再懸濁して Cell Sorter SH800 にて細胞の蛍光度を測定した。Latex beads を貪食した細胞は FITC 陽性細胞として検出される。評価項目は全細胞の MFI (mean fluorescence intensity) と、全細胞中の FITC 陽性細胞の比率とした。同様の操作をマクロファージにても行った。また、細胞の一部はサイトスピン標本を作製後速やかに Mounting Medium with DAPI (Vectashield, Burlingame, CA, USA) にて核染色、封入し蛍光顕微鏡にて観察を行った。

#### 4-13 オートファジー活性測定

4-10 にてソーティングした好中球を HBSS にて  $2 \times 10^6$  /ml 懸濁後、Autophagy Watch (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO, Aichi, Japan) キットを用いて解析した。このキットはオートファジー活性を解析する時に用いられる LC3 の発現を同定するものである。オートファジーの本体であるオートファゴソームがリソソームと融合するのを阻害するクロロキンを半分の細胞集団に添加し、残り半分は添加せずに 2 時間 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> にて培養を行った。LC3 の発現の同定は免疫蛍光細胞染色法を用いた。

#### 4-14 免疫蛍光細胞染色 (ICC/IF)

4-13 にて得られた各細胞群を用いてサイトスピン標本作成に使用し、速やかに 4 % パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、洗浄後 3 % FBS/ PBS にて室温 1 時間ブロッキングした。Autophagy Watch (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO)キット添付の Anti-LC3 mAb を使用し、二次抗体は Anti mouse IgG FITC (eBioscience)1000 倍希釈して使用し室温 1 時間インキュベートした。洗浄後、Mounting Medium with DAPI (Vectashield) にて核染色、封入し蛍光顕微鏡にて観察した。

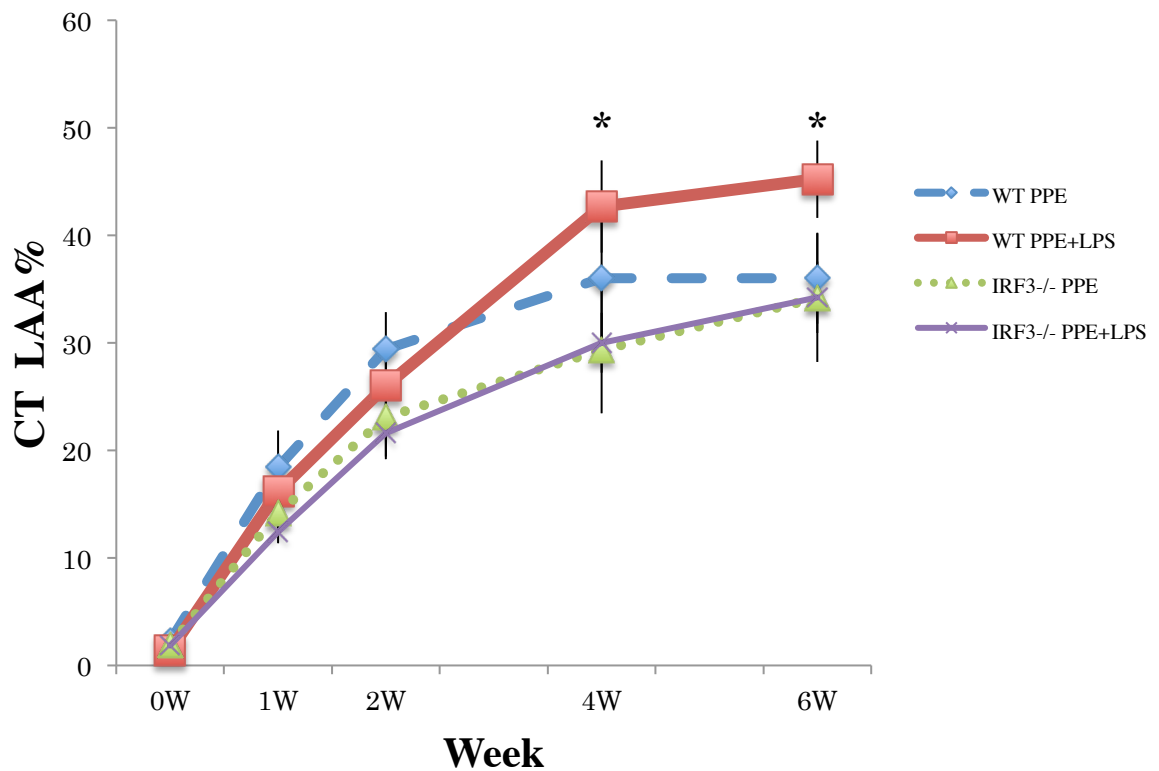
#### 4-15 解析

統計処理ソフトとしては JMP Pro11.2.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を使用し、二群間の比較は Student T 検定を用いた。多群間比較は analysis of variance (ANOVA)による分散分析で評価し、それぞれの群間比較は Tukey-Kramer's HSD 法を用いて検定した。データは平均値± SEM で示し、 $p < 0.05$  を有意水準とした。

## 5 結果

### 結果 1: IRF3KO マウスにおける肺気腫形成の抑制

方法 4-3 に記載したプロトコールにて PPE, LPS を点鼻投与し、COPD 増悪モデルを作成した。気腫性変化の定量を micro-CT にて経時的に行った所、IRF3KO 群では WT 群と比して、4 週以降で有意な肺気腫形成の抑制を認めた (Fig. 5-1)。



**Figure 5-1. CT LAA %による気腫性変化の定量と経時的変化**

WT マウス、 IRF3KO マウスに方法 4-3 プロトコルを用いて PPE、 LPS 点鼻を行い COPD 急性増悪モデルマウスを作成した。比較対照として PPE 投与群を各々作成し、経時的な気腫性変化の定量を micro-CT を用いて解析した。4 週以降で WT PPE+LPS 群と IRF3KO 群に有意差を認めた。

データは 3 回の実験を総合し、平均±SEM として示した。

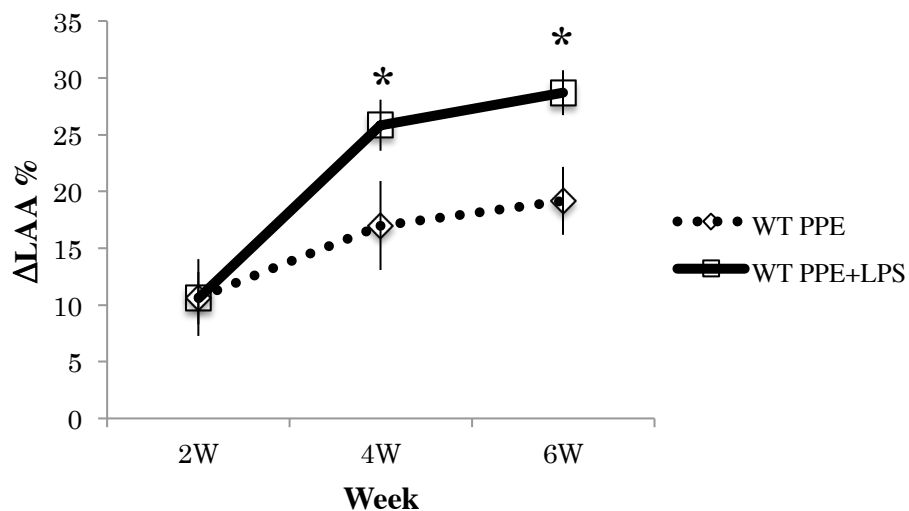
(\* p < 0.05 WT PPE+LPS vs. IRF3KO PPE+LPS; PPE+LPS 群 n=12-14, PPE 群 n=5-6)



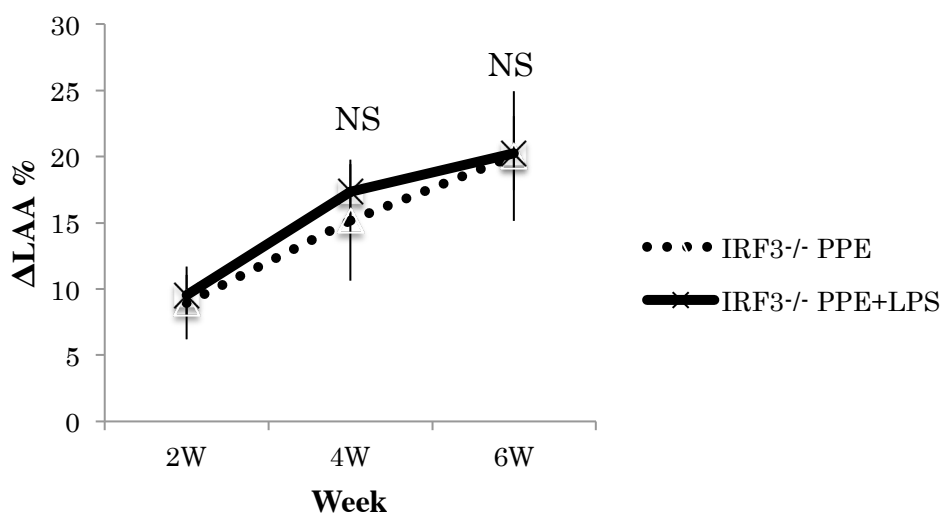
次に肺気腫形成に於ける LPS の役割を検証する為に、LPS 投与が初回となる 1 週目の LAA%をベースラインとした、その後の LAA%の変化を抽出した (Fig. 5-2)。

WT 群では 4 週以降で LPS による気腫形成拡大効果を認めたが、IRF3KO 群では同様の効果は認められなかった。

(A) WT



(B) IRF3KO



**Figure 5-2.** LPS 投与直前をベースラインとした LAA%の経時的変化

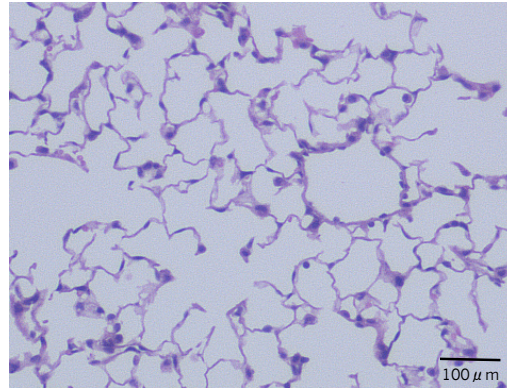
Fig 5-1. のグラフを基に、各個体 1 週目の LAA%を 2 週目以降の LAA%からそれぞれ引いて作成した。

(\* p < 0.05 WT PPE+LPS vs. WT PPE; PPE+LPS 群 n=12-14, PPE 群 n=5-6)

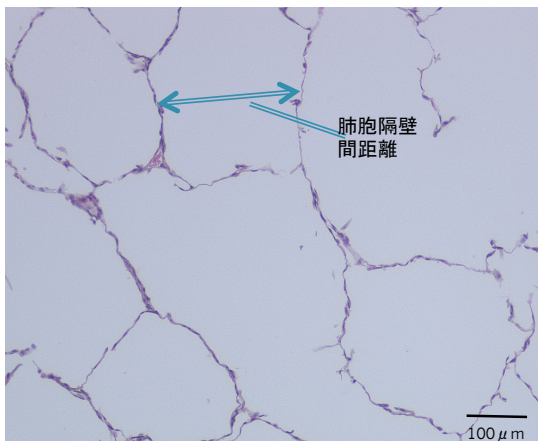
以上より micro-CT 上は IRF3KO 群に於いて PPE+LPS 投与による肺気腫形成の抑制を認め、また LPS 投与による PPE による肺気腫形成の増悪効果は WT 群のみに認められる事が判明した。実際の組織にて気腫形成がどの程度形成されているかを両群で比較確認する為に、PPE+LPS 投与開始 6 週後に肺を摘出し病理組織切片を作成し、Hematoxylin-eosin 染色にて観察を行った(Fig. 5-3)。両群とも正常コントロールと比して肺胞壁の破壊を伴う気腔の拡大が認められ、micro-CT 上の気腫性病変と合致した所見であった。また、肺胞隔壁間距離の平均を方法 4-5 に記載の通りに算出比較した所、IRF3KO 群では WT 群と比して有意な低下を認めた。肺気腫病変が高度であれば肺胞隔壁間距離は増加するので、組織学的にも IRF3KO PPE+LPS 群では WT 同群より気腫性変化が抑制されている事が裏付けられた。

(A)

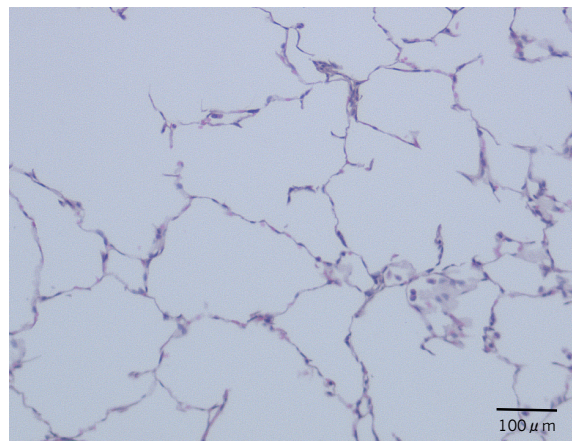
正常コントロール

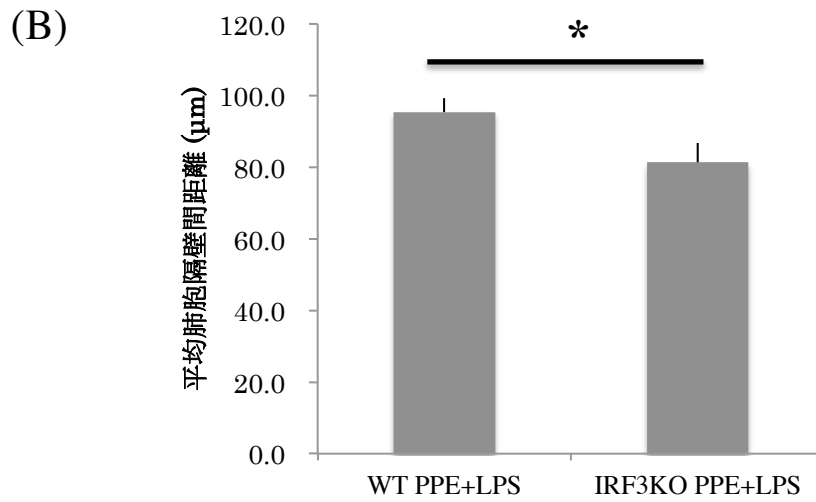


WT PPE+LPS



IRF3<sup>-/-</sup> PPE+LPS





**Figure 5-3.** 肺病理組織像による比較

(A) 肺組織病理像の代表的画像を示す。WT 群,IRF3KO 群共に肺胞隔壁の破壊を伴う肺胞腔の開大を認める。上図は正常肺コントロール群。HE 染色、40 倍拡大にて観察した。

(B) 肺胞隔壁間距離をランダムに測定し、平均値として算出した。各群 n=12 (\* p <0.05) データは平均±SEM として示した。

## 結果 2 : PPE+LPS 投与による炎症反応の差異

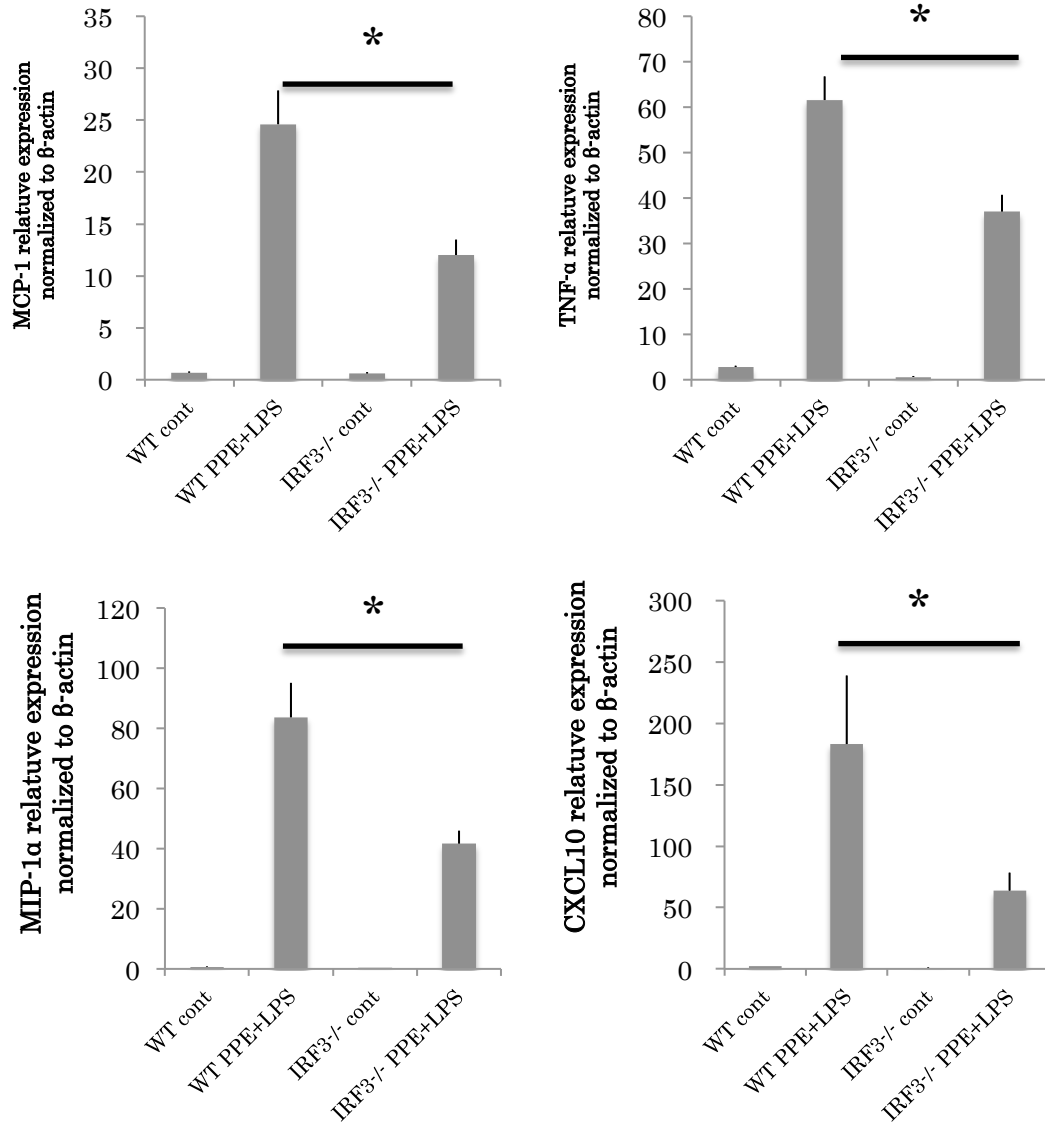
病変形成における初期の細胞浸潤、サイトカイン産生の差異について検討する目的で、PPE+LPS 投与により誘発される急性炎症に関して検討を行った。プロトコールの如く PPE を day 1 に投与後 day 8 に LPS を投与し、翌日に肺と BALF を回収した。比較対照群として PBS, PPE もしくは LPS 投与後翌日に回収した群も作成した(それぞれ control 群、 PPE 群、 LPS 群とした)。

まず、肺より抽出した RNA を用いたリアルタイム PCR 法により、 COPD や COPD 急性増悪に関わるとされるサイトカイン・ケモカインの発現解析を行った。MCP-1、 TNF- $\alpha$ 、 MIP-1 $\alpha$ 、 CXCL10 の発現解析では両群ともコントロール群からの発現上昇を認めたが、IRF3KO PPE+LPS 群では WT 同群と比して有意な発現低下を認めた(Fig.5-4 (A))。

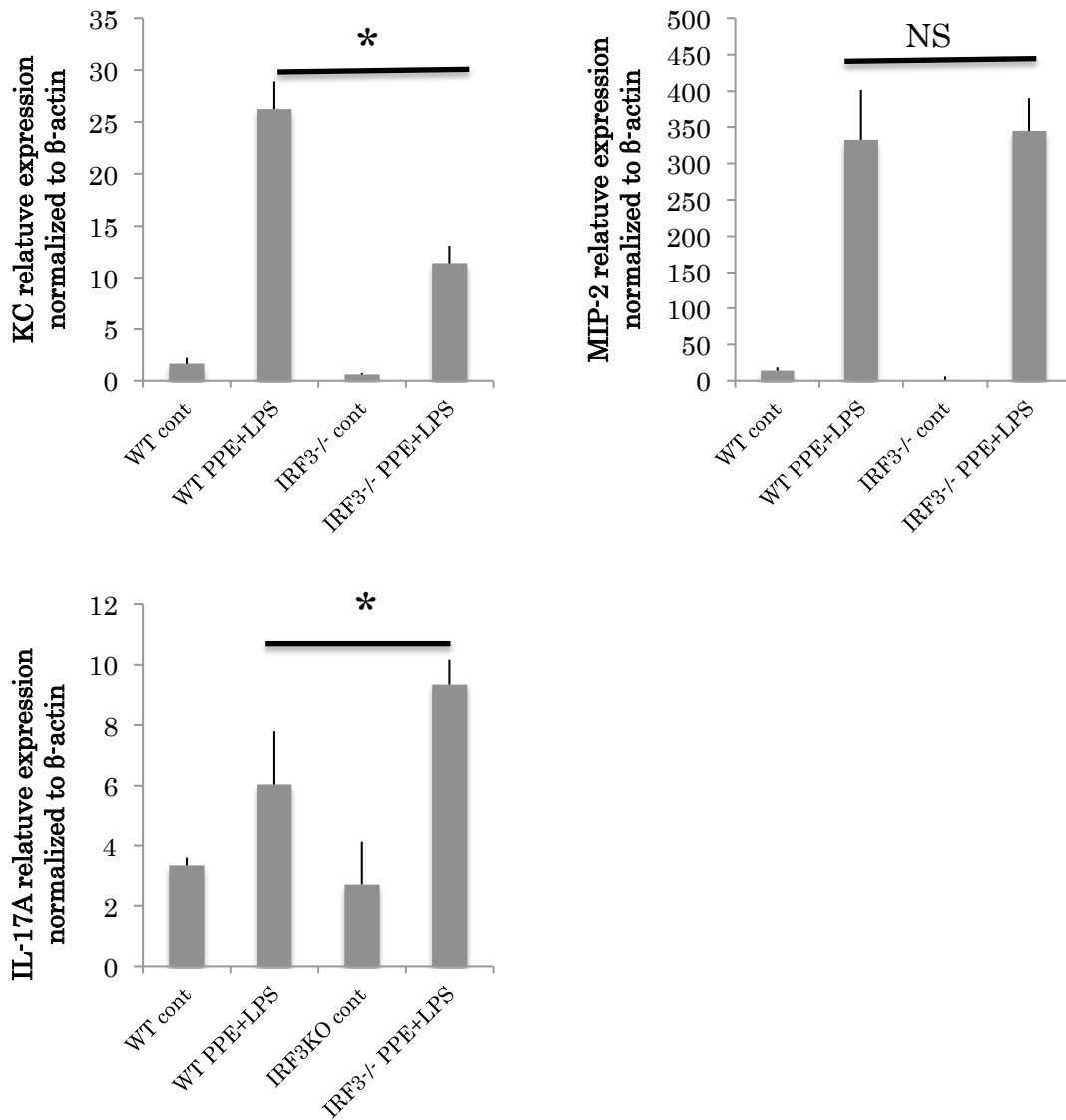
また、好中球遊走に関わる因子である KC、 MIP2、 IL-17A の発現解析を同様に行った。KC では KO 群での発現低下、 IL-17A では発現上昇、 MIP2 では発現に有意差は認められず、各液性因子により発現は異なっていた(Fig.5-4 (B))。

以上より、PPE+LPS にて誘導される液性因子のプロファイルは IRF3KO 群で低下する因子が多数であったが、MIP-2 や IL-17A では同等または発現上昇する事が示された。

(A)



(B)



**Figure 5-4.** 肺組織を用いた遺伝子発現量的解析

肺組織より RNA を抽出し、各遺伝子 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により定量し、 $\beta$ -actin の発現量で補正した。データは 2-3 回の実験を総合し、平均  $\pm$ SEM として示した。 (\*  $p < 0.05$ ) WT: n=6-10 IRF3KO: n=8-12

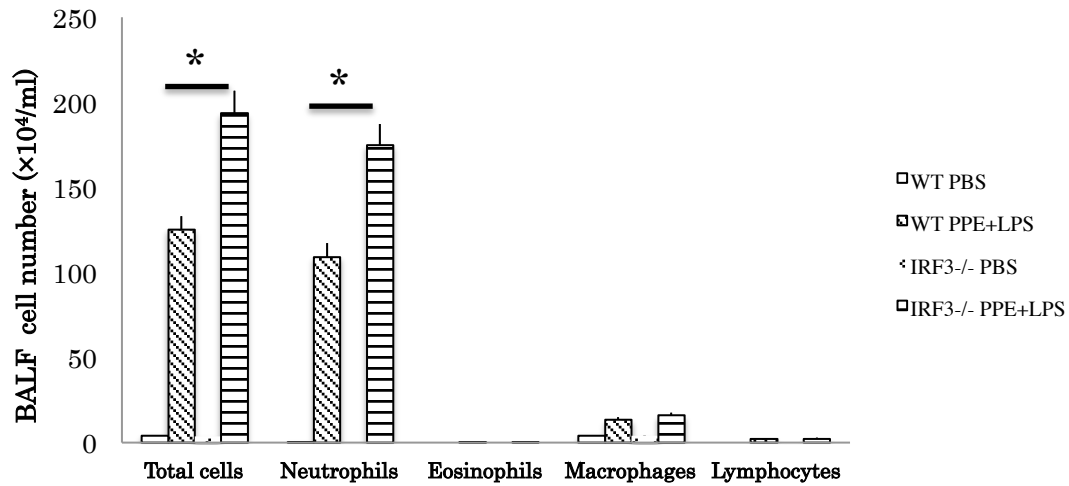
(A) COPD、COPD 急性増悪に関わるサイトカイン、ケモカインの発現を示す。

(B) 好中球遊走等に関わるサイトカイン、ケモカインの発現を示す。

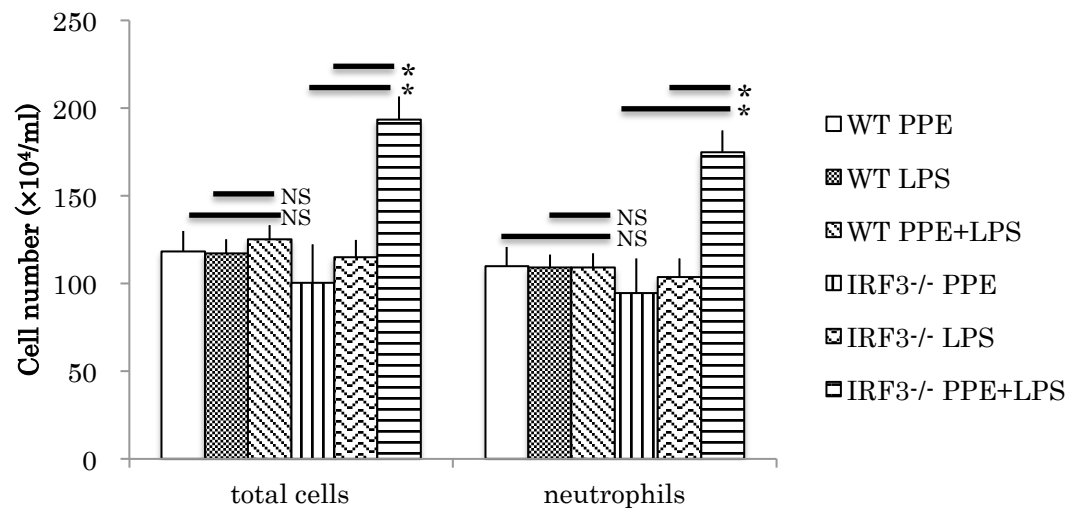


次に、BALF の細胞数、細胞分画の解析を行った。PPE+LPS 群では WT 群、IRF3KO 群とも PBS 群と比して総細胞数、好中球数の上昇を認めたが、IRF3KO 群の方が WT 群より上昇が顕著であった(Fig.5-5 (A))。また、PPE 単独,LPS 単独群との比較でも、IRF3KO 群では PPE+LPS 群に於ける総細胞数、好中球の上昇を認めたが、WT 群では有意差は認められなかった(Fig.5-5 (B))。以上より PPE+LPS 双方投与による好中球数増多効果は IRF3KO 群のみに認められると考えられた。

(A)



(B)



**Figure 5-5.** BALF の総細胞数、細胞分画解析

各種刺激後、各個体より BALF を採取し、細胞数、分画解析を行った。(\*  $p < 0.05$ )

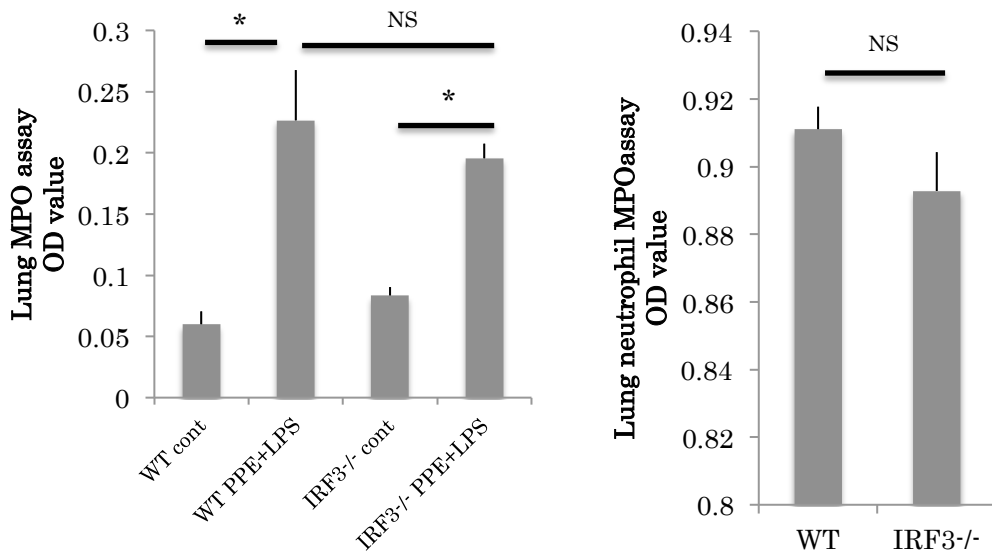
(A) PBS 投与、PPE+LPS 投与後の WT 群、IRF3KO 群の総細胞数、細胞分画の比較。PBS 群:各群  $n=3$  PPE+LPS 群: WT 群  $n=12$ ; IRF3KO 群  $n=13$

(B) PPE+LPS 投与と PPE 単独もしくは LPS 単独投与間での WT 群、IRF3KO 群それぞれの総細胞数、好中球数の比較。PPE 群: WT  $n=8$ ; IRF3KO 群  $n=7$  LPS 群: 各群  $n=8$

### 結果 3: PPE+LPS 投与による肺好中球機能の差異

前結果から PPE+LPS 投与により、IRF3KO 群の方が BALF の総細胞数、好中球が増多している事が分かった。この結果は同投与により IRF3KO PPE+LPS 群では WT 同群より気腫性病変が緩和される結果と相反する事柄であったため、次に好中球機能の解析を行った。

まず好中球が放出する細胞障害物質であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を PPE+LPS 投与後の肺組織(Fig.5-6 左図)、PPE+LPS 投与後に肺よりソーティングした好中球(Fig.5-6 右図)を一定時間培養後の上清を用いて行った。いずれにおいても WT、IRF3KO 群での有意差は認められなかった。



**Figure 5-6** 肺組織、肺組織由来好中球の MPO 活性

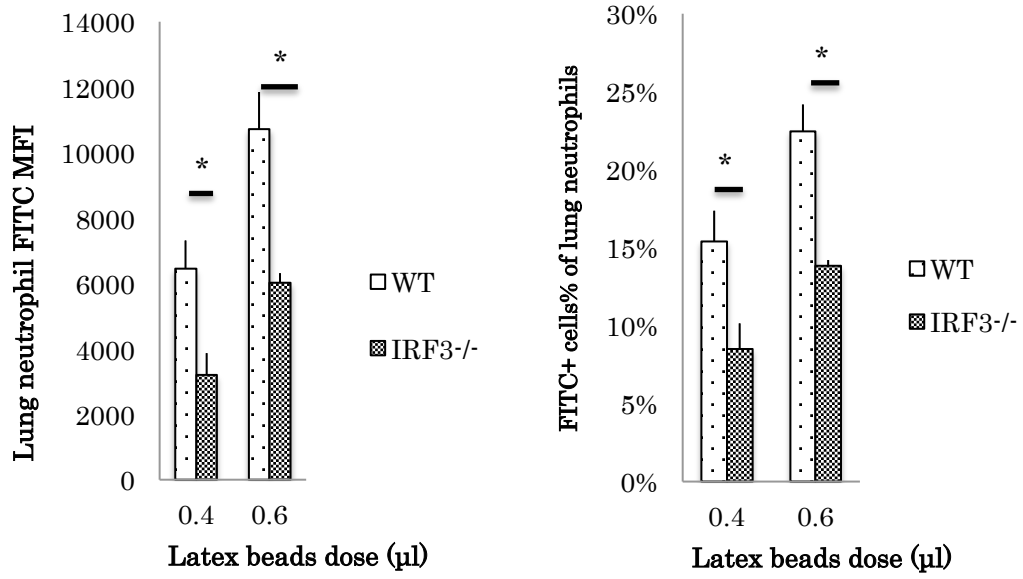
PPE+LPS 投与後、各個体より肺組織を採取し、凍結肺全体もしくは肺よりソーティングした好中球の培養上清を用いて MPO 活性を測定した。 (\* p <0.05)

肺(左図)では各々PBS コントロール肺と比して PPE+LPS 投与による MPO 活性の上昇を認めたが、WT 群と IRF3KO 群での差は認められなかった。好中球(右図)に於いても同様の結果であった。凍結肺: control 各群 n=3 PPE+LPS 各群 n=5 好中球:各群 n=5

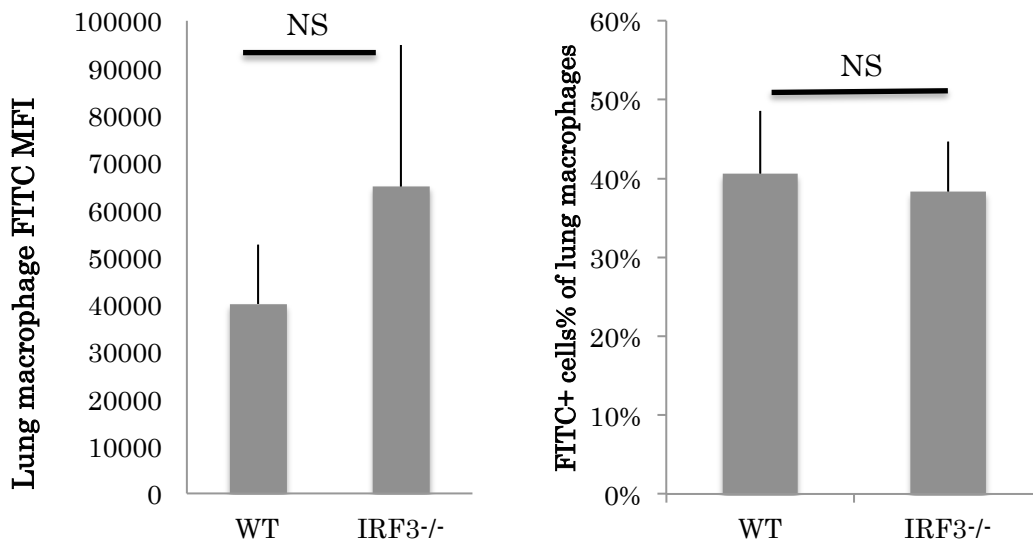
次に蛍光ラテックスビーズ貪食能の測定を行った。肺由来の好中球もしくはマクロファージを一定時間ラテックスビーズと培養した。貪食後の細胞は FITC 陽性の細胞として検出可能であり、ビーズを貪食した細胞の程度(MFI、左図)と割合(右図)をフローサイトメトリーにて測定した。好中球では IRF3KO 群において MFI、蛍光細胞の割合いずれも低下を認めた(Fig.5-7(A))。一方、マクロファージに於いては両群で有意差は認められなかった(Fig.5-7(B))。

さらに、貪食後の細胞をサイトスピン標本として核染色後に観察したが、好中球では IRF3KO 群でのビーズ貪食量は WT 群より少なく(Fig.5-8(A))、一方肺胞マクロファージではほぼ同等の所見であった(Fig.5-8(B))。貪食能の顕微鏡像もフローサイトメトリー所見と矛盾しないものであり、以上より PPE+LPS 処理後肺の好中球では IRF3KO 群において貪食能が低下している事が考えられた。

(A)



(B)



**Figure 5-7** 肺組織由来好中球、肺胞マクロファージのラテックスビーズ貪食能活性

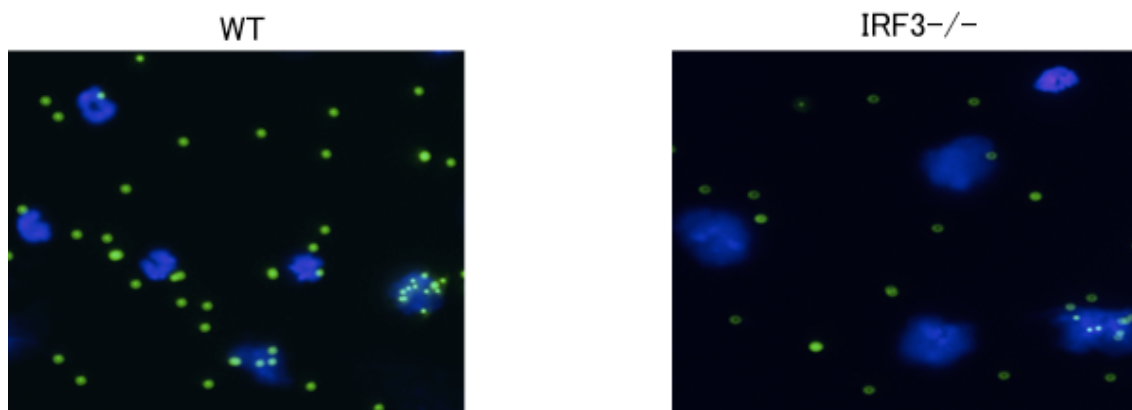
WT 群もしくは IRF3KO 群の肺組織よりソーティングにより単離した好中球、肺胞マクロファージを用いて蛍光ラテックスビーズを貪食させ、各細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーにて解析した。ラテックスビーズ貪食細胞は FITC 陽性細胞として検出される。各々左図が全細胞の FITC の平均蛍光強度、右図が FITC 陽性細胞の割合を示す。各実験は 3 回ずつ行い、平均 $\pm$ SEM として示した。

(\* p <0.05)

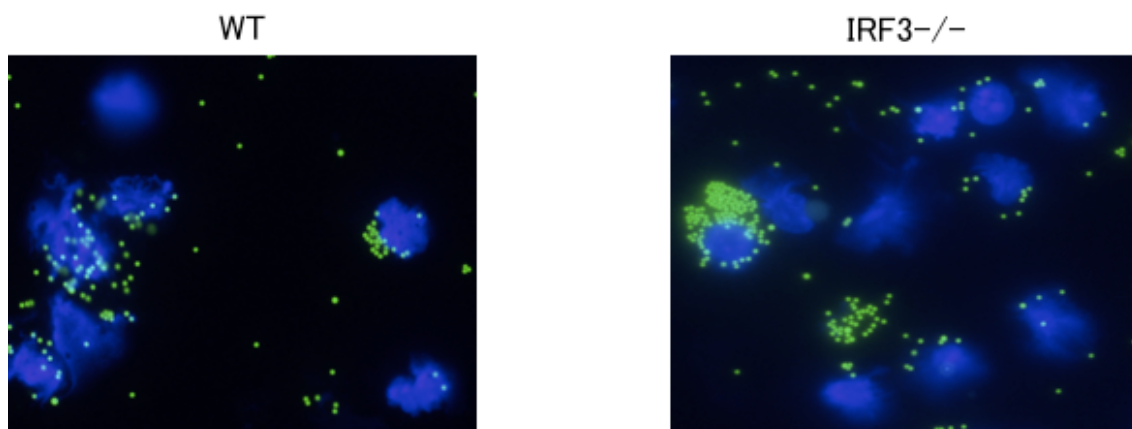
(A) 好中球を  $2 \times 10^5$  ずつ分注し、ラテックスビーズ (0.4  $\mu$ l, 0.6  $\mu$ l) と 2 時間インキュベートした後、洗浄して測定した。

(B) 肺胞マクロファージを  $2 \times 10^5$  ずつ分注し、ラテックスビーズ(1.0  $\mu$ l)と 2 時間インキュベートした後、洗浄して測定した。

(A)



(B)



**Figure 5-8 好中球、肺胞マクロファージの貪食像**

(A)ラテックスビーズ(緑)を貪食させた好中球のサイトスピン標本を作成後 DAPI で核を染色(青)し、蛍光顕微鏡にて観察した。WT 群(左)と比して IRF3KO 群(右)では貪食活性の低下が認められる。

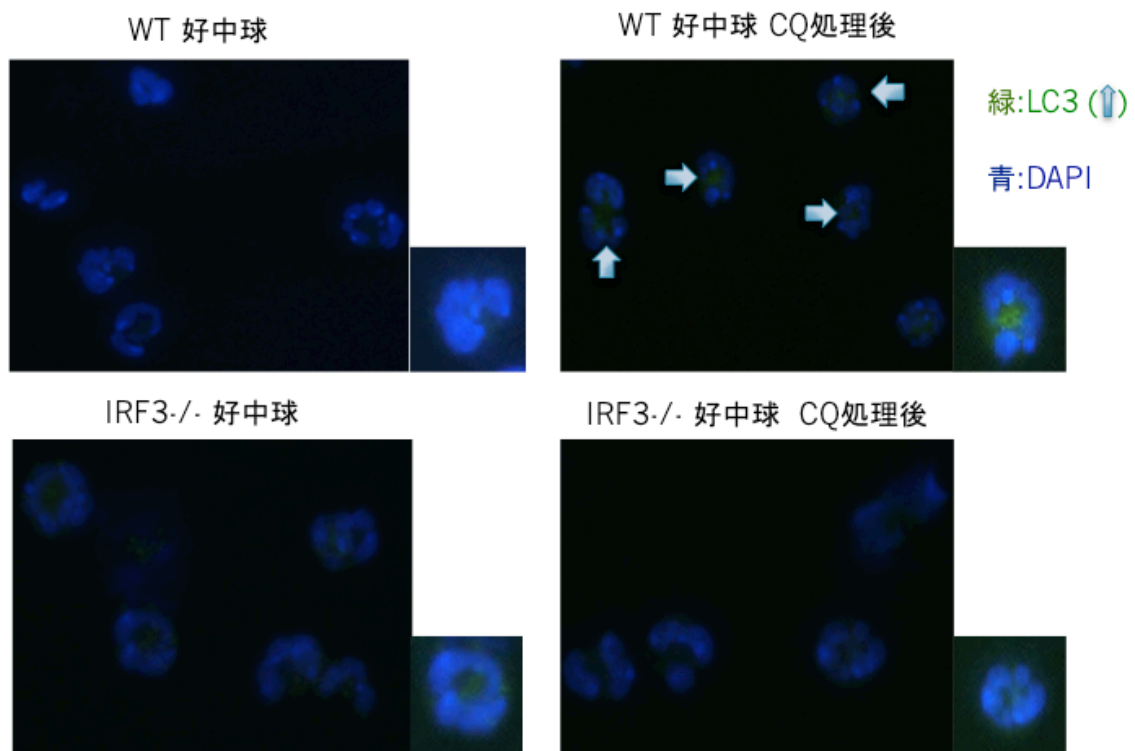
(B)同様に肺胞マクロファージを用いて観察したもの。こちらは両者ほぼ同等の所見であった。

(A)、(B)とも 400 倍で観察した。



以上より、IRF3KO 群では WT 群と比して、PPE+LPS 投与後の肺好中球貪食能が低下している事が示唆された。次に、同じく細胞の貪食機能であるオートファジー活性を調べた。オートファジー活性測定として用いられる、オートファゴソーム上に発現するタンパク質 LC3-II のクロロキン(CQ) 処理前後による発現変化の解析を行った。

免疫細胞染色(Fig.5-9)により、WT 群好中球での CQ 処理による LC3 の発現上昇が観察されたが、IRF3KO 群好中球では発現上昇は明白でなかった。PPE+LPS 処理後好中球のオートファジー活性は IRF3KO 群において低下している事が示唆された。



**Figure 5-9 PPE+LPS 投与マウス肺由来好中球における LC3 の発現**

肺よりソーティングした好中球、マクロファージを 2 分割し、オートファゴソームを蓄積させるクロロキン(CQ)処理による LC3 の発現量変化を解析した。各細胞群を LC3 (緑、矢印)で免疫染色後、DAPI で核を染色(青)し、蛍光顕微鏡にて観察した。WT 群(上段)では CQ 処理後に LC3 の蓄積が観察されるが、IRF3KO 群(下段)では LC3 の蓄積は明らかでなかった。全て 400 倍にて観察した。

## 6 考察

本研究では COPD 急性増悪の病態と自然免疫系の関わりを調べるにあたり、グラム陰性桿菌の内毒素である LPS を認識する自然免疫受容体 TLR4 の活性化経路の下流にある転写因子 IRF3 に着目して、マウス病態モデルを用いて COPD 急性増悪の病態における IRF3 の役割を解析した。micro-CT を用いた気腫性病変定量評価では、IRF3KO 群では WT 群と比して気腫性病変が緩和する事、また、PPE 単独投与に加え LPS 投与する事による気腫病変の増悪効果は WT 群のみで見られる事が判明した。

臨床の現場において肺気腫病態評価には CT が広く使われており、呼吸機能や予後にも関連する(32) (33)。近年では COPD 動物モデルにおいても micro-CT が使用されており、気腫の定量的評価が可能でありまた病理像とも良く相関し、経時的病態評価において良い方法である(24)。今回も病理像において IRF3KO 群において肺胞腔の拡大が緩和される事が確認でき、micro-CT、病理像の双方の観点から IRF3KO 群における PPE+LPS 誘発肺気腫の緩和が示された。PPE 後の LPS 投与による気腫病変の増悪効果は単回の LPS 投与により PPE 投与後 12 週で認められる事が示されているが(25)、今回 LPS を反復投与する事で、4 週とい

うより短期間で気腫病変の増悪効果が得られる事を初めて示した。

LPS は TLR4 により認識されるが、TLR4 はマクロファージ、樹状細胞のような免疫細胞と、上皮細胞や線維芽細胞、内皮細胞のような構造細胞にも発現する(34)。PPE により肺胞構造の破壊、上皮/内皮障害や細胞外基質の分解、炎症性サイトカイン産生や酸化ストレスの増大が起こり、肺気腫が形成されるが(35)、その後に LPS にて経気道的に感作する事により前述の免疫細胞や構造細胞が TLR4 を介して刺激され(36)、炎症性サイトカインの産生やアポトーシス、酸化ストレスの増大等が再度惹起されるため肺気腫腔の増大がもたらされ、これらに IRF3 が関与する事が考えられた。NF- $\kappa$ B に関してはその活性化と共に IL-1 $\beta$  や IL-6、TNF- $\alpha$  等が上昇する事が COPD 急性増悪の患者において認められている(37)が、IRF3 に関しては今回初めてその関与が認められた。

上記仮説を踏まえ、次に PPE+LPS 投与により誘発される急性期炎症を解析する為、LPS 投与後翌日における肺組織由来のサイトカイン・ケモカイン産生や浸潤する BALF を用いた炎症細胞数・分画の比較を行った。Fig5-4 に示された様に、COPD や COPD 急性増悪に関わる液性因子の低下を認めた。今回測定した因子は MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、CXCL10 である。MCP-1 は肺胞上皮細胞

等から分泌され、単球・マクロファージの遊走因子として作用し、COPD患者でのBALF(38)や痰(39)での発現上昇が指摘されている。MIP-1 $\alpha$ はマクロファージや好中球、線維芽細胞や上皮細胞で産生され、TNF- $\alpha$ 等他サイトカインの分泌を制御(40)し、COPD患者痰での発現上昇(41)が認められる。TNF- $\alpha$ は、喫煙COPD患者での血中や痰での発現上昇(42)(43)やそのTNF- $\alpha$ 遺伝子多型とCOPD感受性との関係が指摘されている(44)。CXCL10はマクロファージ、上皮細胞、線維芽細胞等から分泌され、COPDを有する喫煙患者の末梢気道での発現上昇(45)や、COPD増悪患者での血中濃度の上昇が指摘されている(46)。これらの液性因子の低下が肺気腫形成の抑制に関与する事が考えられた。

LPSの受容体としてTLR4があり、経気道的投与においても多種のサイトカイン、ケモカインが短時間で産生されてくる(47)。その後のシグナル伝達経路はFig.3-1で示すようにMyD88-NF- $\kappa$ Bを最終的に活性化する経路、TRIFを經由して転写因子IRF3を活性化する経路がある。前者は細胞膜上にてシグナルが起こるが、後者のシグナル伝達はLPS結合蛋白であるCD14を介して、TLR4がエンドソーム膜上に内在化する事で誘発される(48)。CXCL10はMyD88非依存的に転写調節が行われるが(49)、MCP-1やMIP-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ のように主にMyD88～

NF- $\kappa$ Bにより調節されている因子(49) (50) (17)も IRF3KO 群において発現低下を認めた。この理由としてはNF- $\kappa$ B のサブユニットである p65 と IRF-3 が結合し、協調してプロモーター上のNF- $\kappa$ B もしくはIRF3 結合部位に作用して転写調節を行い、二つのシグナル経路が最終的に交絡している事が考えられている(51) (52) (53)。実際に MyD88 非依存的経路も遅発性に NF- $\kappa$ B 経路を活性化する事が示唆されており(54)、IRF3 を欠損させる事により両経路の活性が阻害される事が今回の結果でも考えられた。

また、KC や MIP-2、 IL-17A は主に好中球の遊走に関わるサイトカインであるが、その発現は PPE+LPS 投与により WT 群、 IRF3KO 群いずれも上昇していたが、KC では WT 群で高値、MIP-2 は両者で有意差は無く、 IL-17A はむしろ IRF3KO 群で高値を示していた。このうち MIP-2 は MyD88-dependent である(49) が、IL-17A で IRF3KO 群において高値になった背景としては、IL-17A 産生に関わる転写因子 ROR $\gamma$ t は IRF3 と結合して IL-17A プロモーター活性が抑制され、転写抑制がかかるが、IRF3KO の状態では ROR $\gamma$ t の結合率の上昇を介して転写量が増加する(55)事が考えられる。気道においても IL-17A により IL-8 や MIP-2 と関連して好中球が遊走してくる事が示されており(56)、実際に PPE+LPS 投与

時の BALF 総細胞数と好中球数は IRF3KO 群において増加を認めた。

この IRF3KO 群における BALF 好中球数の増加は、PPE+LPS 投与による肺気腫形成が WT 群より抑制される結果と一見矛盾する物であったため、IRF3KO 群では PPE+LPS 投与後の好中球の活性化が WT 群より抑制されているという仮説を立てて、次に好中球機能の解析を行った。まず PPE+LPS 投与後肺組織を用いた MPO 活性を測定したが、両群で有意差は認められなかった。一方で、PPE+LPS 投与後のマウス肺よりソーティングした好中球、マクロファージを用いたラテックスビーズ貪食能は IRF3KO 群好中球において WT 群好中球と比して低下を認めた。LPS にて感作後の腹腔マクロファージにおける大腸菌貪食能亢進は IRF3 依存性である事(57)、また大腸菌による TLR4 を介したファゴソーム上への IRF3 の移動と活性化が起こる事がヒト単球にて観察されている(58)が、好中球の貪食に関する IRF3 の関与に関しての言及は未だ無く、また COPD 急性増悪時の貪食能に関してはマクロファージに関しての言及はあるが好中球に関しては未だ無い(59)。今回好中球では貪食能に差があり、マクロファージにて貪食能の差が認められなかったのは、好中球の貪食能は自身の活性状態自体に強く影響を受ける一方で、肺胞マクロファージにおいては活性状態の影響が少な

く元々非特異的貪食機能が高い可能性が考えられる。好中球の活性状態の差は、Fig.5-4のようなPPS+LPS投与後の各種液性因子の両群発現差に基づく事が示唆された。

最後にPPE+LPS投与後肺由来の好中球において、免疫細胞染色による細胞質内でのLC3の発現上昇をWT群において観察し、IRF3KO群では同様の発現変化は減弱している事が観察された。LC3はオートファジーの主体であるオートファゴソーム上に発現し、活性化型であるLC3-IIとして存在している(60)。LC3-II発現とオートファジー活性は相関しており(61)、PPE+LPS投与後肺好中球におけるオートファジー活性の亢進がWT群で起こるが、IRF3KO群では減弱している事が考えられた。COPDとオートファジーに関してはマウスモデルにおいてもその関与が示唆されているが(62)、COPD急性増悪の病態とオートファジーに関しては未だ言及はない。LPSによるオートファジー活性化は以前に示唆されており、TLR4-TRIF経路依存性かつTLR4-MyD88経路とは非依存性、RIP1やp38 MAPKが関与している事が示されている(63)。また、緑膿菌によるTLR4を介したオートファジー活性化もTRIF依存性とされている(64)。また、好中球におけるオートファジー活性化と機能に関しては、骨髄系細胞のみでオートファ



ジー関連タンパク質の Atg4 が欠損したマウスでは好中球性の炎症もしくは自己免疫疾患が減弱し、Atg4 欠損好中球では NADPH オキシダーゼによる活性酸素種の産生低下が見られ、脱顆粒低下との関連が示唆されている(65)。今回の好中球におけるオートファジー活性化が直接 TLR4 活性化を介するか、液性因子を介した間接的事象かは更なる検討が必要である。

これまで IRF3 は *in vivo* の実験においてウイルス、細胞内寄生菌感染や敗血症のモデル、アルコール性肝障害(66)や肝・脳における虚血再還流性障害における役割(67) (68)等が他疾患で報告されている。今回新しく COPD の急性増悪の病態において IRF3 が促進的に関与し、その機序として COPD 増悪に関わる種々の液性因子低下を背景とした特に好中球における貪食能、オートファジー活性の変化が関与する可能性を *in vivo* モデルで示した。COPD のような多数の細胞、サイトカインやケモカインが複雑に絡む疾患では単一分子を抑制する治療での病態改善は困難と考えられ、IRF3 のような複数の液性因子の発現を調節する転写因子のレベルで治療介入を行う事がより効果的であると考えられる。今後、このような液性因子の差異をもたらす細胞の特定や好中球機能と肺胞上皮細胞の細胞死との関連、好中球等と TLR4 との直接的な関連等に関して更なる検討を

進める予定である。

## 7 謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究の遂行においてご指導，ご鞭撻を賜り，勉学機会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 教授に深謝申し上げます。

本研究を行う機会を与えていただき，終始ご支援、ご指導・ご鞭撻を賜りました武蔵野大学薬学部薬物療法学 山下直美 教授に深謝申し上げます。また，研究室にて度重なるご助言とご協力をくださいました新倉雄一 講師，細木敬祐 先生に，この場をお借りしてお礼申し上げます。

## 8 参考文献

1. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *The European respiratory journal* 2009; 33: 1165-1185.
2. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013; 187: 347-365.
3. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet (London, England)* 2006; 367: 1747-1757.
4. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001; 164: 469-473.
5. Gorska K, Maskey-Warzechowska M, Krenke R. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Current opinion in pulmonary medicine* 2010; 16: 89-96.
6. Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord JM, Insall RH, Stockley RA. Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011; 183: 1176-1186.
7. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002; 57: 847-852.
8. Wedzicha JA, Seemungal TA. COPD exacerbations: defining their cause

- and prevention. *Lancet (London, England)* 2007; 370: 786-796.
9. Spencer S, Calverley PM, Burge PS, Jones PW. Impact of preventing exacerbations on deterioration of health status in COPD. *The European respiratory journal* 2004; 23: 698-702.
  10. Veeramachaneni SB, Sethi S. Pathogenesis of bacterial exacerbations of COPD. *Copd* 2006; 3: 109-115.
  11. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 2000; 13: 539-548.
  12. Sakaguchi S, Negishi H, Asagiri M, Nakajima C, Mizutani T, Takaoka A, Honda K, Taniguchi T. Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochemical and biophysical research communications* 2003; 306: 860-866.
  13. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005; 23: 19-28.
  14. Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R, Cheng G. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002; 17: 251-263.
  15. Perry AK, Chow EK, Goodnough JB, Yeh WC, Cheng G. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *The Journal of experimental medicine* 2004; 199: 1651-1658.
  16. Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology* 1998; 18: 2986-2996.
  17. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate

- immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
18. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 644-658.
  19. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2001; 167: 5887-5894.
  20. Szarka RJ, Wang N, Gordon L, Nation PN, Smith RH. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. *Journal of immunological methods* 1997; 202: 49-57.
  21. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L1-15.
  22. Goriely S, Molle C, Nguyen M, Albarani V, Haddou NO, Lin R, De Wit D, Flamand V, Willems F, Goldman M. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood* 2006; 107: 1078-1084.
  23. Kiyotani K, Sakaguchi T, Kato A, Nagai Y, Yoshida T. Paramyxovirus Sendai virus V protein counteracts innate virus clearance through IRF-3 activation, but not via interferon, in mice. *Virology* 2007; 359: 82-91.
  24. Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2008; 31: 1434-1438.
  25. Kobayashi S, Fujinawa R, Ota F, Kobayashi S, Angata T, Ueno M, Maeno T, Kitazume S, Yoshida K, Ishii T, Gao C, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Betsuyaku T, Kida K, Taniguchi N. A single dose of lipopolysaccharide into mice with emphysema mimics human chronic obstructive pulmonary disease exacerbation as assessed by micro-computed tomography. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49: 971-977.

26. Thurlbeck WM. Internal surface area and other measurements in emphysema. *Thorax* 1967; 22: 483-496.
27. Robbesom AA, Versteeg EM, Veerkamp JH, van Krieken JH, Bulten HJ, Smits HT, Willems LN, van Herwaarden CL, Dekhuijzen PN, van Kuppevelt TH. Morphological quantification of emphysema in small human lung specimens: comparison of methods and relation with clinical data. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2003; 16: 1-7.
28. Niikura Y, Ishii T, Hosoki K, Nagase T, Yamashita N. Ovary-dependent emphysema augmentation and osteopontin induction in adult female mice. *Biochemical and biophysical research communications* 2015; 461: 642-647.
29. Tsukui T, Ueha S, Abe J, Hashimoto S, Shichino S, Shimaoka T, Shand FH, Arakawa Y, Oshima K, Hattori M, Inagaki Y, Tomura M, Matsushima K. Qualitative rather than quantitative changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology* 2013; 183: 758-773.
30. Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Kendall PL, Segal BH, Weller KP, Tighe RM, Blackwell TS. Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49: 180-189.
31. Hall JD, Woolard MD, Gunn BM, Craven RR, Taft-Benz S, Frelinger JA, Kawula TH. Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112. *Infection and immunity* 2008; 76: 5843-5852.
32. Xie X, de Jong PA, Oudkerk M, Wang Y, Ten Hacken NH, Miao J, Zhang G, de Bock GH, Vliegenthart R. Morphological measurements in computed tomography correlate with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease: systematic review and meta-analysis. *European radiology* 2012; 22: 2085-2093.
33. Johannessen A, Skorge TD, Bottai M, Grydeland TB, Nilsen RM, Coxson H, Dirksen A, Omenaas E, Gulsvik A, Bakke P. Mortality by level of emphysema and airway wall thickness. *American journal of*

- respiratory and critical care medicine* 2013; 187: 602-608.
34. Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature reviews Microbiology* 2005; 3: 36-46.
  35. Stockley JA, Walton GM, Lord JM, Sapey E. Aberrant neutrophil functions in stable chronic obstructive pulmonary disease: the neutrophil as an immunotherapeutic target. *International immunopharmacology* 2013; 17: 1211-1217.
  36. Martin TR. Recognition of bacterial endotoxin in the lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 128-132.
  37. Kersul AL, Iglesias A, Rios A, Noguera A, Forteza A, Serra E, Agusti A, Cosio BG. Molecular mechanisms of inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Archivos de bronconeumologia* 2011; 47: 176-183.
  38. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, Lusuardi M, Donner CF. Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *The European respiratory journal* 1999; 14: 160-165.
  39. Traves SL, Culpitt SV, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE. Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax* 2002; 57: 590-595.
  40. Shanley TP, Schmal H, Friedl HP, Jones ML, Ward PA. Role of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) in acute lung injury in rats. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1995; 154: 4793-4802.
  41. Ravi AK, Khurana S, Lemon J, Plumb J, Booth G, Healy L, Catley M, Vestbo J, Singh D. Increased levels of soluble interleukin-6 receptor and CCL3 in COPD sputum. *Respiratory research* 2014; 15: 103.
  42. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996; 153: 530-534.
  43. Takabatake N, Nakamura H, Inoue S, Terashita K, Yuki H, Kato S,



- Yasumura S, Tomoike H. Circulating levels of soluble Fas ligand and soluble Fas in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine* 2000; 94: 1215-1220.
44. Sakao S, Tatsumi K, Igari H, Shino Y, Shirasawa H, Kuriyama T. Association of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001; 163: 420-422.
45. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, Turato G, Buonsanti C, Baraldo S, Bellettato CM, Papi A, Corbetta L, Zuin R, Sinigaglia F, Fabbri LM. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002; 165: 1404-1409.
46. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, McCormick M, Haldar K, Keadze T, Duvoix A, Lindblad K, Patel H, Rugman P, Dodson P, Jenkins M, Saunders M, Newbold P, Green RH, Venge P, Lomas DA, Barer MR, Johnston SL, Pavord ID, Brightling CE. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011; 184: 662-671.
47. Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, Worthen GS. Transcriptional profiling of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Infection and immunity* 2004; 72: 7247-7256.
48. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature immunology* 2008; 9: 361-368.
49. Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T. LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Trp12-ERK axis in macrophages. *FEBS letters* 2012; 586: 1540-1546.
50. Ekman AK, Fransson M, Rydberg C, Adner M, Cardell LO. Nasal

- challenge with LPS stimulates the release of macrophage inflammatory protein 1alpha. *International archives of allergy and immunology* 2009; 149: 154-160.
51. Leung TH, Hoffmann A, Baltimore D. One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell* 2004; 118: 453-464.
  52. Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, Hoffmann A, Subramaniam S, David M, Rosenfeld MG, Glass CK. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 2005; 122: 707-721.
  53. Wietek C, Miggin SM, Jefferies CA, O'Neill LA. Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR) 4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF-kappa. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 50923-50931.
  54. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 2010; 11: 373-384.
  55. Ysebrant de Lendonck L, Tonon S, Nguyen M, Vandevenne P, Welsby I, Martinet V, Molle C, Charbonnier LM, Leo O, Goriely S. Interferon regulatory factor 3 controls interleukin-17 expression in CD8 T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: E3189-3197.
  56. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Linden A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1999; 162: 2347-2352.
  57. Deng T, Feng X, Liu P, Yan K, Chen Y, Han D. Toll-like receptor 3 activation differentially regulates phagocytosis of bacteria and apoptotic neutrophils by mouse peritoneal macrophages. *Immunol Cell Biol* 2013; 91: 52-59.
  58. Husebye H, Aune MH, Stenvik J, Samstad E, Skjeldal F, Halaas O, Nilsen NJ, Stenmark H, Latz E, Lien E, Mollnes TE, Bakke O, Espevik T. The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced

- activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* 2010; 33: 583-596.
59. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CM, Tudhope SJ, Wedzicha JA, Barnes PJ, Donnelly LE. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *The European respiratory journal* 2010; 35: 1039-1047.
60. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO journal* 2010; 29: 1792-1802.
61. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140: 313-326.
62. Hou HH, Cheng SL, Chung KP, Kuo MY, Yeh CC, Chang BE, Lu HH, Wang HC, Yu CJ. Elastase induces lung epithelial cell autophagy through placental growth factor: a new insight of emphysema pathogenesis. *Autophagy* 2014; 10: 1509-1521.
63. Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 2007; 27: 135-144.
64. Jabir MS, Ritchie ND, Li D, Bayes HK, Tourlomousis P, Puleston D, Lupton A, Hopkins L, Simon AK, Bryant C, Evans TJ. Caspase-1 cleavage of the TLR adaptor TRIF inhibits autophagy and beta-interferon production during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Cell host & microbe* 2014; 15: 214-227.
65. Bhattacharya A, Wei Q, Shin JN, Abdel Fattah E, Bonilla DL, Xiang Q, Eissa NT. Autophagy Is Required for Neutrophil-Mediated Inflammation. *Cell Rep* 2015; 12: 1731-1739.
66. Petrasek J, Dolganiuc A, Csak T, Nath B, Hritz I, Kodys K, Catalano D, Kurt-Jones E, Mandrekar P, Szabo G. Interferon regulatory factor 3 and type I interferons are protective in alcoholic liver injury in mice by way of crosstalk of parenchymal and myeloid cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2011; 53: 649-660.
67. Loi P, Yuan Q, Torres D, Delbauve S, Laute MA, Lalmand MC, Petein M,

- Goriely S, Goldman M, Flamand V. Interferon regulatory factor 3 deficiency leads to interleukin-17-mediated liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2013; 57: 351-361.
68. Stevens SL, Leung PY, Vartanian KB, Gopalan B, Yang T, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Multiple preconditioning paradigms converge on interferon regulatory factor-dependent signaling to promote tolerance to ischemic brain injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2011; 31: 8456-8463.