

# 博士論文

論文題目 気道上皮細胞における Interleukin-17A 及び  
ウイルス double-stranded RNA によるケモカイン産生  
の影響と細胞内シグナリングの研究

氏名 松崎 博崇

気道上皮細胞における Interleukin-17A 及び  
ウイルス double-stranded RNA によるケモカイン産生の影響と  
細胞内シグナリングの研究

松崎 博崇

目次	
要旨	4
序文	5
目的	10
方法	11
試薬	11
細胞株及び培養	11
ケモカインアレイアッセイ	12
定量的 RT-PCR	13
ELISA	14
small interfering RNA (siRNA) experiment	15
Western blot analysis	16
抗体及び希釈倍率	16
Nuclear extraction	17
ルシフェラーゼレポーターアッセイ	18
Actinomycin D chase experiment	19
統計解析	19
結果	21

考察	44
謝辞	54
引用文献	55

## 要旨

慢性炎症性呼吸器疾患の急性増悪はウイルス感染を主因とし、好中球性気道炎症を特徴とする。IL-17A は上記疾患患者の肺組織で高発現しており、好中球性気道炎症への関与が示唆されている。本研究では急性増悪の病態における IL-17A の関与を検討した。ウイルス感染モデルとして poly(I:C) を使用し、気道上皮細胞でのケモカイン産生を解析した。IL-17A, poly(I:C) 共刺激で相乗的に CXCL8 や CXCL1 が産生された。CXCL8 産生における相乗効果は p38, Erk1/2 経路の活性化や mRNA の安定化が誘導されることによると判明した。IL-17A は急性増悪中の気道炎症に関与することが示唆された。

## 序文

気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患といった慢性炎症性呼吸器疾患は、世界的に罹患率が高く、現在もなお高い死亡率で推移しており、気管支喘息が原因で 25 万人、慢性閉塞性肺疾患が原因で 300 万人の患者が毎年死亡している[1-3]。このような慢性炎症性呼吸器疾患の病態、機序は各々の疾患で異なっており、極めて複雑多様である。気管支喘息は、気道過敏性の亢進、可逆性を持った様々な程度の気流制限を特徴する慢性炎症性気道疾患であり、発作性の咳嗽、喘鳴、呼吸困難といった症状を呈する[4]。一方、慢性閉塞性肺疾患は、主要な原因を喫煙として、末梢気道病変と肺の気腫性病変が様々な程度で複合的に作用し不可逆な気流制限を呈し、通常は進行性の疾患であり、慢性的な喀痰、咳嗽及び労作時呼吸困難などの症状をきたす[5, 6]。疾患の病態の形成の過程で、気道炎症の存在が極めて重要であることが知られているが、その気道炎症を惹起する細胞やケミカルメディエータの種類も疾患により各々異なっている。例えば、気管支喘息の気道炎症は、CD4 陽性 T リンパ球、好酸球、肥満細胞が主に関与しているとされ、サイトカインでは CD4 陽性である T helper (Th) type 2 細胞より産生される Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13 が主に関係していると報告されている[7]。一方、慢性閉塞性肺疾患における気道炎症は、CD8 陽性 T リンパ球、マクロファージ、好中球が主に関与しているとされ、Interferon-gamma や Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  や IL-6, CXC chemokine ligand

(CXCL)8 などが主に関与することが報告されている[8]。

慢性炎症性呼吸器疾患の病態の一つである急性増悪は、主にウイルス感染が主因となり、その疾患の重症度と共に頻度が増加する。急性増悪は、患者の呼吸機能や全身状態を悪化させ、またステロイド等の治療に抵抗性でありそれが高い死亡率の誘因となっている[9-13]。しかしながら、急性増悪の病態は、いまだ十分に解明されていない。その中で、過去に様々な、急性増悪中における気道炎症の病態の評価に関する研究報告がある。例えば、気管支喘息患者の急性増悪においては、喀痰中の CC chemokine ligand (CCL)11 といった好酸球遊走性ケモカイン及び好酸球の上昇の報告に加えて、喀痰や気道吸引物中の好中球走化性ケモカインである CXCL8、好中球が高度に増加し、気道吸引物中の CXCL8 の増加が人工呼吸器離脱期間の延長に有意に相関していたという報告がある[14-16]。一方慢性閉塞性肺疾患患者の急性増悪時の喀痰中には IL-1, IL-6, CXCL8, IL-10, TNF- $\alpha$  などのサイトカインの増加に加えて、CD8 陽性 T リンパ球、好中球が増加しており[17-21]、喀痰中の好中球の増加が増悪時における呼吸機能の低下や低酸素血症といった重症度を示す指標と相関することが報告されている[22, 23]。このように気管支喘息及び慢性閉塞性肺疾患の急性増悪に共通する特徴として、気道中の CXCL8 及び好中球の増加、それに引き続く好中球性の気道炎症が挙げられ、治療抵抗性・難治性の病態と関連していることが示唆されている。

IL-17 は分子量が約 21KDa のポリペプチドから成るホモ二量体の糖蛋白質で、1995 年に T 細胞より産生されるサイトカインとして発見され、主に Th17 細胞より産生される[24]。IL-17 は、その後の研究で、6 つのファミリー (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17 E, IL-17F) から成り、各々が異なった機能を果たすことが明らかになった[25]。中でも、IL-17A は、T 細胞のプライミング、B 細胞の抗体産生の促進の他に、マクロファージ、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、滑膜細胞等から炎症性サイトカインの誘導や好中球の遊走を促す機能を持っており[25]、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症などの様々な慢性炎症性疾患の病態の形成に関与することが報告されている[26, 27]。近年の報告で IL-17A は種々の呼吸器疾患の病態にも関与することが示唆されており[28]、気管支喘息患者や慢性閉塞性肺疾患患者の肺組織に IL-17A が高発現していること、呼吸機能の低下とその発現が相関していることが報告されている[29, 30]。気道炎症の形成においても、IL-17A は気道上皮細胞から好中球走化性因子である CXCL8 の産生を促進することが分かっており、また喘息患者の喀痰中での IL-17A と CXCL8 の発現や好中球数が相関していることが報告されている[31-34]。IL-17A 欠損マウスを用いた実験では、アデノウイルス感染後の気管支肺胞洗浄液を分析したところ、野生型マウスに比べて IL-17A 欠損マウスの気管支肺胞洗浄液において好中球増加が抑制されたとの報告もある[35]。このようなことから、IL-17A は好中球性の気道炎症に関与することが考えられるが、



前述のように好中球性の気道炎症を特徴とする慢性炎症性呼吸器疾患の急性増悪との関連は、いまだ十分な解明に至っていない。

Toll-like receptors (TLRs)は自然免疫において、細菌やウイルスの構成成分を認識する受容体蛋白質であり、炎症性サイトカインやケモカインを誘導することにより免疫応答の誘導に重要な役割を担っている[36]。TLRsのうちTLR1, 2, 4, 5, 6は細胞表面に局在し、病原体の表層成分を認識する一方、TLR3, 7, 8はエンドソーム、リソソーム、滑面小胞体などの細胞小器官に局在し、これらは、エンドソームでリガンドを認識し、シグナリングを伝達することが知られている[37]。TLR3はウイルス由来の double-stranded (ds) RNA を認識することで、その後の免疫応答を誘導することが知られている[38]。また、TLR3はds RNA 以外に single-stranded RNA も認識するという報告があり、障害された細胞やウイルス感染細胞由来の RNA を感知し、速やかに免疫系を発動させていることが推測されている[39]。過去に呼吸器内科領域においては、気道感染の原因として頻度が高く重要であるライノウイルスやインフルエンザ A ウイルスによる感染に伴う気道上皮細胞からの CXCL8 を含めた炎症性サイトカインの産生に TLR3 のシグナリングが関与するという報告がある[40, 41]。また、マウスモデルにおいては、TLR3 欠損マウスは野生型マウスに比べて、ライノウイルス感染後の肺組織における CXCL1 や CXCL2 等の好中球遊走性サイトカインの発現や好中球数が減少していた[42]。このような報告からも、TLR3

は呼吸器感染において重要なウイルスの感染に伴う炎症性サイトカインの産生や好中球の誘導などの免疫応答に関与していることが示唆されている。Poly(I:C)はウイルス ds RNA のアナログであり、TLR3 のリガンドの働きがあり、ウイルス感染のモデルとして使用されている。過去に poly(I:C)の刺激により気道上皮細胞から CXCL8 を含めた炎症性サイトカインの発現が誘導され、またマウスに対する poly(I:C)投与でマウス肺に好中球の誘導をきたしたことが報告されており、好中球性気道炎症を惹起することが示唆されている[43, 44]。

以上の経緯より、本研究では、外界から経気道的に侵入したウイルスに最初に暴露され、豊富な炎症性サイトカインの供給源となる気道上皮細胞に着目し、ウイルス感染に伴う慢性炎症性呼吸器疾患の急性増悪時にみられる好中球性炎症の病態に IL-17A がどのように関与するかを解明することとした。

## 目的

IL-17A がウイルス感染によって生じる慢性炎症性呼吸器疾患の急性増悪における病態において、TLR3 シグナリングとの相互作用で気道上皮細胞からのケモカイン産生に関与すると仮説を置き、IL-17A 及び poly(I:C)の刺激により、気道上皮細胞から産生されるケモカインを評価し、ケモカイン産生における細胞内シグナリング、mRNA の安定性を含めた内部の機構について研究を行うことを目的とした。

## 方法

### 1. 試薬

Recombinant human IL-17A は R&D (Minneapolis, MN, USA)より、poly(I:C) sodium salt は Tocris (Bristol, UK)より購入した。MEK1/2 選択的阻害薬(Erk1/2 リン酸化酵素阻害)の U0126 (10  $\mu$ M)、JNK-1,-2,-3 選択的阻害薬の SP600125 (10  $\mu$ M)、p38 MAPK 選択的阻害薬の SB203580 (25  $\mu$ M)は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)から購入し、IkB $\alpha$  選択的阻害薬の BAY11-7082 (10  $\mu$ M)は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より、MK-2 及び MK-3 の選択的阻害薬の MK-2 inhibitor III (7  $\mu$ M) は Santa Cruz (Dallas, TX, USA)より、MNK1/2 の選択的阻害薬の ETP-45835 (5  $\mu$ M) は Calbiochem (Billerica, MA, USA)より、MSK1/2, protein kinase A, protein kinase B, ribosomal S6 kinase and p70<sup>S6K</sup> の選択的阻害薬の SB747651A (5  $\mu$ M)は Tocris より購入した。全ての阻害薬は dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解した。

### 2. 細胞株及び培養

BEAS-2B 細胞 (非癌患者の気道上皮より分離され、不死化された細胞株であり、気道上皮細胞の機能解析に広く用いられている) は the American Type Culture Collection (Manassas, VA. USA)より購入した。ヒト気道上皮細胞(NHBE: normal human bronchial epithelial cells)は Takara Bio Inc. (Tokyo, Japan)より購入した。細胞は

collagen type 1 で覆われたディッシュ(Iwaki, Tokyo, Japan)に撒き、37°C の加湿された5% CO<sub>2</sub>を含む大気圧のインキュベーターで培養を行った。培養液は専用の serum free の上皮増殖培地である Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) (Cambrex, Walkersville, MD, USA)に添加因子(0.5 ng/mL human recombinant epidermal growth factor, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 10 µg/mL transferrin, 0.5 µg/mL epinephrine, 5 µg/mL insulin, 50 µg/mL bovine pituitary extract, 0.1 ng/mL retinoic acid, 6.5 ng/mL triiodothyronine, 50 µg/mL gentamicin, 0.1 ng/mL amphotericin B 含有)である Bullet Kit (Cambrex)を混和し使用した。細胞の刺激の前日には、Bullet Kit を添加しない BEGM 培地に換え、培養を行った。

### 3. ケモカインアレイアッセイ

ケモカインアレイアッセイは、RayBio Human Chemokine Array C1 kit (AAH-CHE-1; RayBiotech, Inc., Norcross, GA)を使用した。手順としては、細胞の培地の上清をメンブレンに添加し2時間 incubate を行った。上清を吸引、洗浄した後に、Biotinylated Antibody Cocktail を加え、2時間 incubate を行った。さらに Biotinylated Antibody Cocktail を吸引、洗浄し、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin を加え、2時間 incubate を行った。その後、HRP-streptavidin を吸引、洗浄し、メンブレンを 1X detection buffers C and D で処理し、画像を冷却 CCD カメラの使用によ

り撮影した。各プロットのデンシトメトリーの評価は CS Analyzer 3.0 (ATTO, Tokyo, Japan)を使用して行った。デンシトメトリーの強度はバックグラウンドを差し引くことで標準化を行った。

#### 4. 定量的 RT-PCR

Total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan)をプロトコールに従い、使用し抽出を行った。抽出した RNA 濃度は Smart Spec 3000 (Bio-Rad, Hercules, CA)にて測定し、純度は A260/A280 で確認した。その後、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて cDNA を合成した。定量的 RT-PCR は、Mx-3000P (Stratagene, La Jolla, CA)を用い、QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen)で行った。相対的な mRNA の発現は  $\Delta\Delta C_t$  法を用いて、計算した。サンプル間の cDNA 量の変動を補正するために glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を内部コントロールとして用いた。用いたプライマーの配列を次のページの Table. 1 に示す。

Primer	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
GAPDH	CACCATCTTCCAGGAGCGAG	CCTTCTCCATGGTGGTGAAG AC
CXCL8	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC	AACCCCTCTGCACCCAGTTTT
CXCL1	TCTTTCTGGCTTAGAACAAAGGGG C	AGTAAAGGTAGCCCTTGTTT CCCCC
TLR3	AGAGTTGTCATCGAATCAAATTAA AG	AATCTTCCAATTGCGTGAAA A
TRIF	CCGGATCCCTGATCTGCTTG	ATGTCGAAGGCGCTAGGAAG

(TRIF: TIR domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ )

**Table. 1** 使用した primer 配列

## 5. ELISA

BEAS-2B 細胞及び NHBE 細胞を  $1.0 \times 10^5$ /well ずつ 24 ウェルプレートに撒いた。その 48 時間後に無刺激群、IL-17A (100 ng/mL) 及び poly(I:C) (2.5  $\mu$ g/mL) を単独もしくは同時に刺激する群の 4 群に分け、刺激を行った。阻害薬は刺激の 1 時間前に予め加えた。刺激の 24 時間後に培地の上清を回収した。上清中の CXCL8 蛋白濃度は PeliKine Compact human CXCL8 ELISA kit (Sanquin, Amsterdam, Netherlands) で、CXCL1 蛋白濃度は human CXCL1/GRO alpha Quantikine ELISA kit (R&D) で各々プロトコールに従い測定した。

## 6. small interfering RNA (siRNA) experiment

TLR3 及び TRIF に対する siRNA を Invitrogen (Tokyo, Japan) より購入した (TLR3: #1: HSS110815; #2: HSS110816; #3: HSS110817, TRIF: #1: HSS152364; #2: HSS152365; #3: HSS175528) (Stealth RNAi™ Pre-Designed siRNAs; Invitrogen)。また、negative control として Stealth RNAi™ Negative Control Duplexes (#12935-300, Invitrogen) を使用した。BEAS-2B 細胞は、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) を用いて 20nM の siRNA をトランスフェクションした。ノックダウン効率は、トランスフェクションの 72 時間後に qRT-PCR 及び Western blotting を用いて確認を行った。使用した siRNA sequence を下の Table. 2 に示す。

Set	Sense	Antisense
TLR3 #1	AAUAAAUGGGACCACCA GGGUUUGC	GCAAACCCUGGUGGCCAUU UAUU
TLR3 #2	AAAGGUAGUGGCUUGAC AGCUCAGG	CCUGAGCUGUCAAGCCACUAC CUUU
TLR3 #3	AAGAAAGUUGUAUUGC UGGUGGUGG	CCACCACCAGCAAUACAACUU UCUU
TRIF #1	CCAUGAUGAGCAACCUC ACGCGACA	UGUCGCGUGAGGUUGCUCauc AUGG
TRIF #2	CCCAUUGACGGUGUUUC GGACUGGA	UCCAGUCCGAAACACCGUCA UGGG
TRIF #3	CCAUCACUCCUAGCGC CUUCGACA	UGUCGAAGGCGCUAGGAAGUG AUGG

**Table. 2** siRNA sequence: Invitrogen より予め設計された配列を購入した



## 7. Western blot analysis

細胞は、lysis buffer solution (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)で溶解し、SDS 化後、電気泳動(SDS-PAGE)で蛋白の分離を行った。すべてのサンプルは BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて濃度を統一し、泳動を行った。泳動後蛋白はセミドライ式で PVDF メンブレンに転写を行った。その後、ブロッキングバッファーとして、2% ECL Prime Blocking Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)を TBS-T バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)で希釈したものを使用し、メンブレンを 1 時間浸してブロッキングを行った。ブロッキング後に、一次抗体反応及び二次抗体反応を行った。抗体反応の際には、一次抗体、二次抗体をブロッキングバッファーで希釈したものを使用した。希釈倍率は「8. 抗体及び希釈倍率」の項目に示す。検出には、ECL Prime Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)を用い、冷却 CCD camera (EZ-Capture MG; ATTO)により撮影を行った。

## 8. 抗体及び希釈倍率

使用した抗体と希釈倍率を示す。Rabbit anti-TLR3 antibody (1:1000), rabbit anti-TRIF antibody (1:1000), rabbit anti-Erk1/2 antibody (1:1000), rabbit

anti-phospho-Erk1/2 antibody (1:1000), rabbit anti-phospho-p38 MAPK antibody (1:1000), rabbit anti-p38 MAPK antibody (1:1000), rabbit anti-phospho-stress-activated protein kinases/JNK antibody (1:1000), rabbit anti-stress-activated protein kinases/JNK antibody (1:1000), mouse anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody (1:1000), mouse anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody (1:1000), rabbit anti-nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-p65 antibody (1:1000)を一次抗体として用い、anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (1:10000)及び anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (1:10000)を二次抗体として用いた。上記の抗体はすべて、Cell Signaling Technology より購入した。蛋白量の確認は内部コントロールとして、全細胞溶解液には、mouse anti- $\alpha$ -tubulin antibody (1:5000) (Sigma-Aldrich)を用い、核抽出物に関しては、rabbit anti-histone H3 antibody (1:1000) (Cell Signaling Technology)を使用した。

## 9. Nuclear extraction

BEAS-2B 細胞を 10-cm ディッシュに培養し、無刺激群、IL-17A (100 ng/mL)及び poly(I:C) (2.5  $\mu$ g/mL)を単独もしくは同時刺激する群の 4 群に分け、刺激を行った。刺激の 1 時間後に nuclear extraction kit (Active Motif, Tokyo, Japan)をプロトコールに従って用い、核の抽出を行った。

## 10. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

転写因子活性の解析は、pathway profiling system kit (BD Biosciences Clontech, UK)及び activator protein 1 (AP-1) luciferase reporter vector kit (Iwai, Tokyo, Japan)を用いて行った。Pathway profiling system kit の中には、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に特異的な *cis-acting* DNA 配列(エンハンサーエレメント)を有したルシフェラーゼレポーターベクターが複数含まれており、またネガティブコントロールとして、ルシフェラーゼ遺伝子の上流にエンハンサーエレメントを含有しないpTALベクターも含まれている。トランスフェクション効率を標準化するために内部コントロールとして pRL-TK Renilla luciferase (pRL-TK-Rluc)を二重トランスフェクションした。BEAS-2B 細胞へのトランスフェクションは、FuGENE HD transfection reagent (Promega, Tokyo, Japan)をプロトコールに従って用いることで行った。BEAS-2B 細胞は 48 ウェルプレートで培養し、0.2 µg のレポーターベクターと 0.01µg の pRL-TK-Rluc をトランスフェクションした。トランスフェクションの 48 時間後に細胞を無刺激群、IL-17A (100 ng/mL)及び poly(I:C) (2.5 µg/mL)を単独または同時に刺激する群の 4 群に分けて刺激を行い、刺激の 24 時間後に細胞を回収した。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System 試薬(Promega)及び計測装置としてルミノメーター(Luminescencer-Octa, AB-2270; ATTO)をプロトコールに従い、使用することで行った。相対的なルシフェラーゼ活性を triplicate で評価し、Renilla

luciferase で標準化を行った。

## 11. Actinomycin D chase experiment

BEAS-2B 細胞を 6 ウェルプレートに培養し、poly(I:C) (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 単独刺激群と IL-17A (100 ng/mL) 及び poly(I:C) (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の共刺激群の 2 群に分けて、刺激を行った。刺激を行った 3 時間後に actinomycin D (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma-Aldrich) を新規の mRNA の転写を阻害する目的で加えた。Actinomycin D を加えた 0, 30, 60, 120, 180 分後に各々の刺激群における CXCL8 及び CXCL1 の mRNA の発現について qRT-PCR を用いて解析を行った。経時的な mRNA の発現をプロットしたグラフの AUC は台形法で計算した。

## 12. 統計解析

結果は少なくとも 3 回実験を施行して確認し、データは平均 $\pm$ 標準誤差で表示した。統計解析は JMP(version 10.0.2; SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan) ソフトウェアを使用した。多群解析を 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。相乗効果の有無は、two-way ANOVA 法で交互作用を検定することにより評価を行った。コントロ

ールに対する比を取った値の群間の比較は Wilcoxon's rank-sum test を用いて行った。

$p < 0.05$  を有意差ありとした。

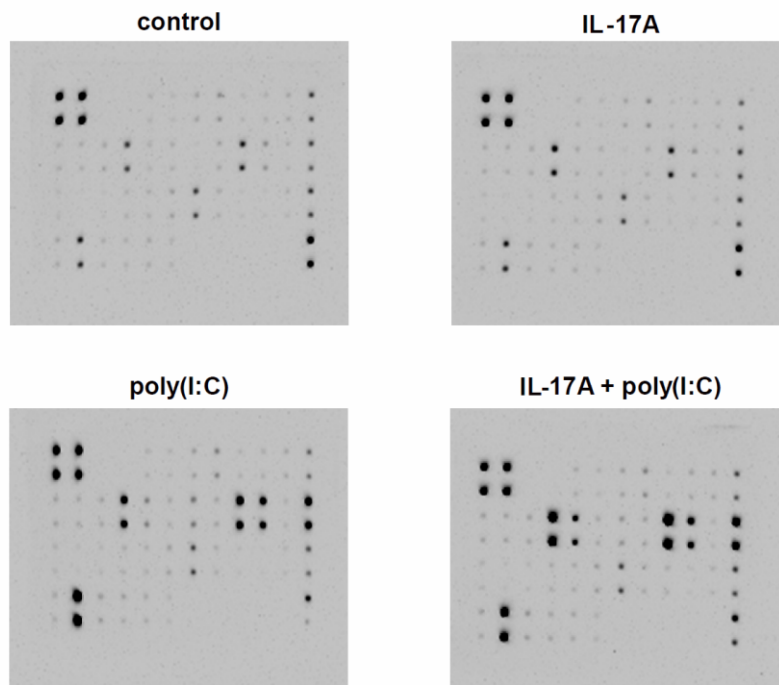
## 結果

**IL-17A と poly(I:C)の刺激で気道上皮細胞から相乗的にケモカインの産生が起きた。**

最初に、IL-17A 及び poly(I:C)の刺激に伴う気道上皮細胞のケモカインの産生について評価した。まず、ケモカインアレイアッセイを行い、刺激に伴う BEAS-2B 細胞からのケモカインの産生について網羅的に評価を行った(Fig. 1A)。デンシトメトリー解析の結果、IL-17A 単独刺激群では GRO (CXCL1, CXCL2, CXCL3 から成る), CXCL1, CCL1 などのケモカインで、軽度の上昇を認めたが、無刺激群に比べて 3 倍以上の上昇を示すケモカインは認めなかった。一方、poly(I:C)単独刺激群では、Fig. 1B の色付き（青色及び灰色）のセルで示されるように、GRO, CXCL1, CCL1, CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL5 などのケモカインで無刺激群に比べて 3 倍以上の上昇を認めた。さらに、それらのケモカインのうち、IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激群では、灰色で示された GRO, CXCL1, CXCL8 の 3 つのケモカインにおいて poly(I:C)単独刺激群に比べて 3 倍以上の上昇を認めた。ケモカインアレイアッセイのデンシトメトリーのデータの詳細は、Table. 3 に示す。

**Figure. 1**

A)



B)

POS	POS	NEG	NEG	CXCL13	CCL28	CCL23	CCL27	CXCL16	CXCL5	CCL11	CCL24
POS	POS	NEG	NEG	CXCL13	CCL28	CCL23	CCL27	CXCL16	CXCL5	CCL11	CCL24
CCL26	CX3CL1	CXCL6	GRO	CXCL1	CCL16	CCL1	CXCL11	CXCL8	CXCL10	XCL1	CCL2
CCL26	CX3CL1	CXCL6	GRO	CXCL1	CCL16	CCL1	CXCL11	CXCL8	CXCL10	XCL1	CCL2
CCL8	CCL7	CCL13	CCL22	CXCL9	CCL3	CCL4	CCL15	CCL20	CCL19	CCL23	CXCL7
CCL8	CCL7	CCL13	CCL22	CXCL9	CCL3	CCL4	CCL15	CCL20	CCL19	CCL23	CXCL7
CCL18	CCL5	CXCL12 $\alpha$	CXCL12 $\beta$	CCL17	CCL25	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	POS
CCL18	CCL5	CXCL12 $\alpha$	CXCL12 $\beta$	CCL17	CCL25	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	POS

**Figure. 1 IL-17A 及び poly(I:C)による気道上皮細胞からのケモカイン産生**

BEAS-2B 細胞を IL-17A (100 ng/mL), poly(I:C) (2.5  $\mu$ g/mL)で刺激し、24 時間後に上清を回収し、ケモカインアレイアッセイを施行した。

(A) 各々の刺激条件下でメンブレンに検出されたシグナルを示している。

(B) アレイマッピングとデンストメトリーの増減の識別を色で示している。

色付きのセル(青色+灰色):無刺激群に比べて3倍以上発現が亢進したもの。

灰色:無刺激群に比べて3倍以上発現が亢進し、かつ poly(I:C)単独刺激群に比べて3倍以上発現が亢進したもの。

略称: POS, positive control; NEG, negative control; GRO, growth-related oncogene

	NC	IL-17A / NC	poly(I:C) / NC	IL-17A + poly(I:C) / NC	IL-17A + poly(I:C) / poly(I:C)
CXCL1	1	1.44	5.11	22.6	<b>4.42</b>
GRO	1	1.60	3.07	11.9	<b>3.86</b>
CXCL8	1	1.04	3.59	13.6	<b>3.78</b>
CCL20	1	1.26	1.50	2.98	1.99
CXCL5	1	0.861	0.911	1.51	1.66
CCL2	1	1.09	6.53	10.7	1.63
CXCL13	1	0.828	0.960	1.53	1.60
CCL19	1	0.906	1.94	2.88	1.48
CCL11	1	0.900	1.07	1.58	1.48
CCL24	1	0.746	0.734	1.05	1.43
CXCL7	1	0.890	0.672	0.959	1.43
CCL3	1	0.819	0.865	1.204	1.39
CCL22	1	1.04	1.10	1.52	1.38
CCL23	1	0.944	0.910	1.24	1.36
CXCL11	1	0.835	0.927	1.23	1.33
CXCL12 $\alpha$	1	1.41	2.11	2.80	1.33
CX3CL1	1	0.839	1.18	1.52	1.29
CCL13	1	1.30	3.94	5.07	1.29
CCL15	1	1.12	0.882	1.10	1.25
CXCL6	1	1.06	1.42	1.74	1.22
CXCL9	1	1.06	0.931	1.11	1.12
CCL17	1	1.35	1.17	1.37	1.17
CXCL12 $\beta$	1	1.21	1.58	1.84	1.17
CCL25	1	1.22	1.16	1.34	1.16
CCL26	1	1.38	1.84	2.08	1.13
CCL8	1	0.826	1.53	1.66	1.09
CXCL10	1	0.908	9.90	10.2	1.03
CCL4	1	0.951	1.03	1.02	0.995
XCL1	1	0.333	0.801	0.763	0.953
CXCL16	1	1.02	1.33	1.27	0.953
CCL23	1	0.924	1.14	1.07	0.941
CCL27	1	1.03	1.40	1.31	0.938
CCL16	1	0.926	1.19	0.984	0.830
CCL5	1	0.992	9.31	7.17	0.770



CCL28	1	0.955	1.43	1.02	0.713
CCL1	1	2.89	<b>73.0</b>	<b>38.9</b>	0.533
CCL7	1	0.277	not detected	not detected	not detected
CCL18	1	0.939	<b>4.51</b>	1.45	0.321

**Table. 3** ケモカインアレイのデンシトメトリー解析の詳細な結果

この Table は Figure. 1 のデンシトメトリー解析の詳細な結果を示している。一番左の列に今回評価したケモカインを示している。そこから右 3 列は IL-17A 単独刺激群、poly(I:C)単独刺激群、共刺激群の各々のケモカインのデンシトメトリーの無刺激群に対する比を示しており、3 倍を超えた数字はイタリック体で表記している。一番右側の列は、共刺激群の poly(I:C)単独刺激群に対する比を示しており、3 倍を超えた数字は太字で表記している。

続いて、IL-17A や poly(I:C)で刺激に伴う BEAS-2B 細胞や NHBE 細胞における CXCL8 及び CXCL1 の mRNA の発現や蛋白の産生について、qRT-PCR 及び ELISA を用いることで評価を行った。共刺激に伴うケモカインの mRNA 発現増強を確認するために、共刺激による BEAS-2B 細胞からの CXCL8 及び CXCL1 の mRNA の発現の推移を経時変化で評価した。両者の mRNA の発現が共刺激後 6 時間でピークを迎えたため、刺激 6 時間後に mRNA の発現を評価することとした(Fig. 2)。IL-17A 単独刺激群では、BEAS-2B 細胞より CXCL8 mRNA の発現を軽度誘導した(無刺激群に対して 7.2 倍) (Fig. 3A)。Poly(I:C)単独刺激群では過去に報告されているように強力に CXCL8 mRNA の発現を誘導した[43, 44]。

そして、Fig. 3A 及び 3B に示したように、IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激は BEAS-2B 細胞より相乗的に CXCL8 mRNA の発現と蛋白の産生を誘導した( $p < 0.05$ , two-way ANOVA)。また、上記と同様の結果が NHBE 細胞でも得られた(Fig. 3C,3D)。

また、IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激は CXCL8 の場合と同じく、BEAS-2B 細胞及び NHBE 細胞より相乗的に CXCL1 mRNA の発現と蛋白の産生を誘導した( $p < 0.05$ , two-way ANOVA) (Fig. 4A–D)。

Figure. 2

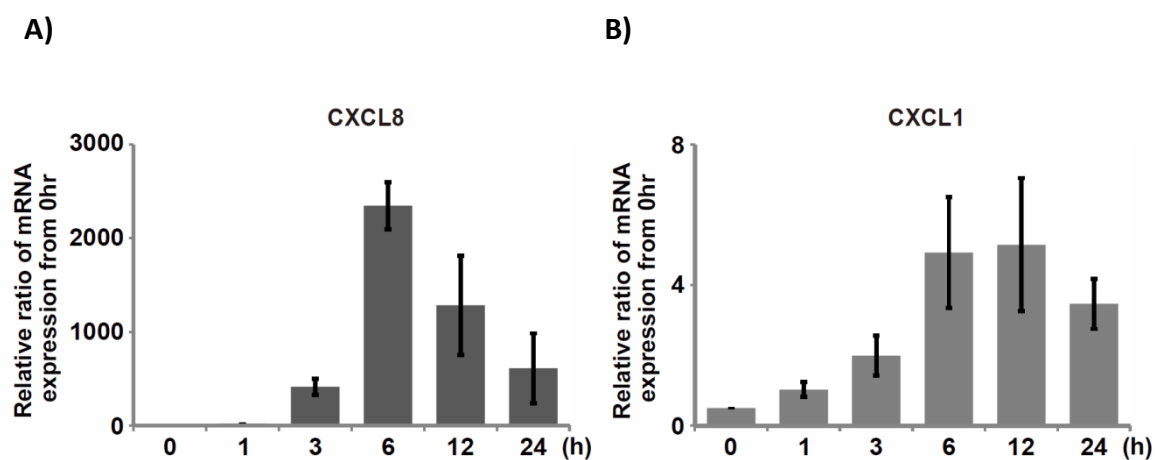


Figure. 2 IL-17A 及び poly(I:C)共刺激後の BEAS-2B 細胞における CXCL8 及び CXCL1 mRNA の経時的発現

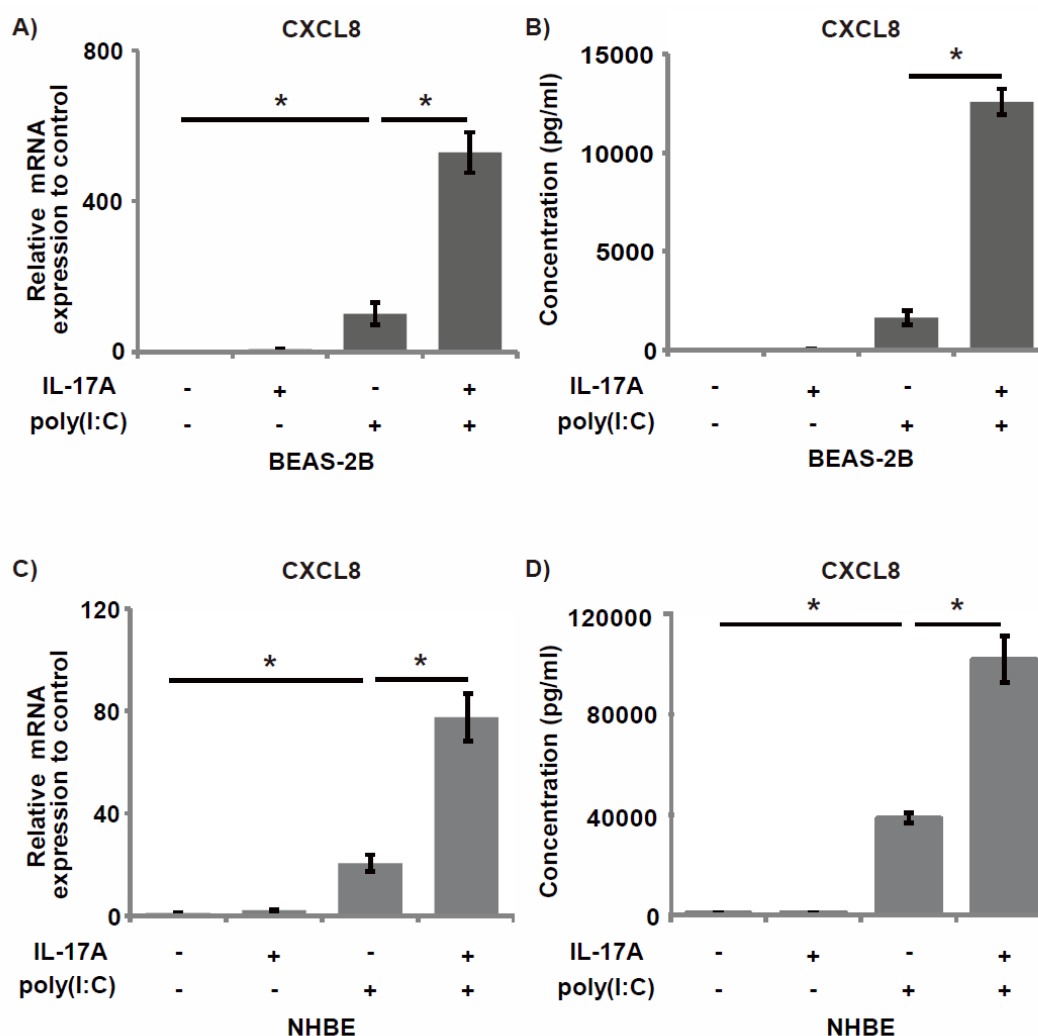
IL-17A (100 ng/mL)及び poly(I:C) (2.5  $\mu$ g/mL)共刺激に伴う BEAS-2B 細胞における CXCL8 及び CXCL1 mRNA の発現を刺激後 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間後に解析した。

A) 共刺激後の BEAS-2B 細胞における CXCL8 mRNA 発現量の刺激前群に対する比の経時的推移を示している。

B) 共刺激後の BEAS-2B 細胞における CXCL1 mRNA 発現量の刺激前群に対する比の経時的推移を示している。

n = 3 separate experiments.

Figure. 3



**Figure. 3 IL-17A 及び poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞及び NHBE 細胞における CXCL8 mRNA の発現及び蛋白の産生**

無刺激群、IL-17A (100 ng/mL)単独刺激群、poly(I:C) (2.5 µg/mL)単独刺激群、共刺激群の4群に分け、刺激を行い、刺激の6時間後の mRNA の発現を解析した。また、刺激の24時間後の培地の上清を回収し ELISA を施行した。

A) 各刺激に伴う BEAS-2B 細胞における CXCL8 mRNA の発現量のコントロール群に対する比を示している。

B) 各刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 蛋白の産生を示している。

C), D) NHBE 細胞において A), B)と同様の項目を見たものを示している。

n = 3 separate experiments. \*:  $p < 0.05$  vs poly(I:C)

Figure. 4

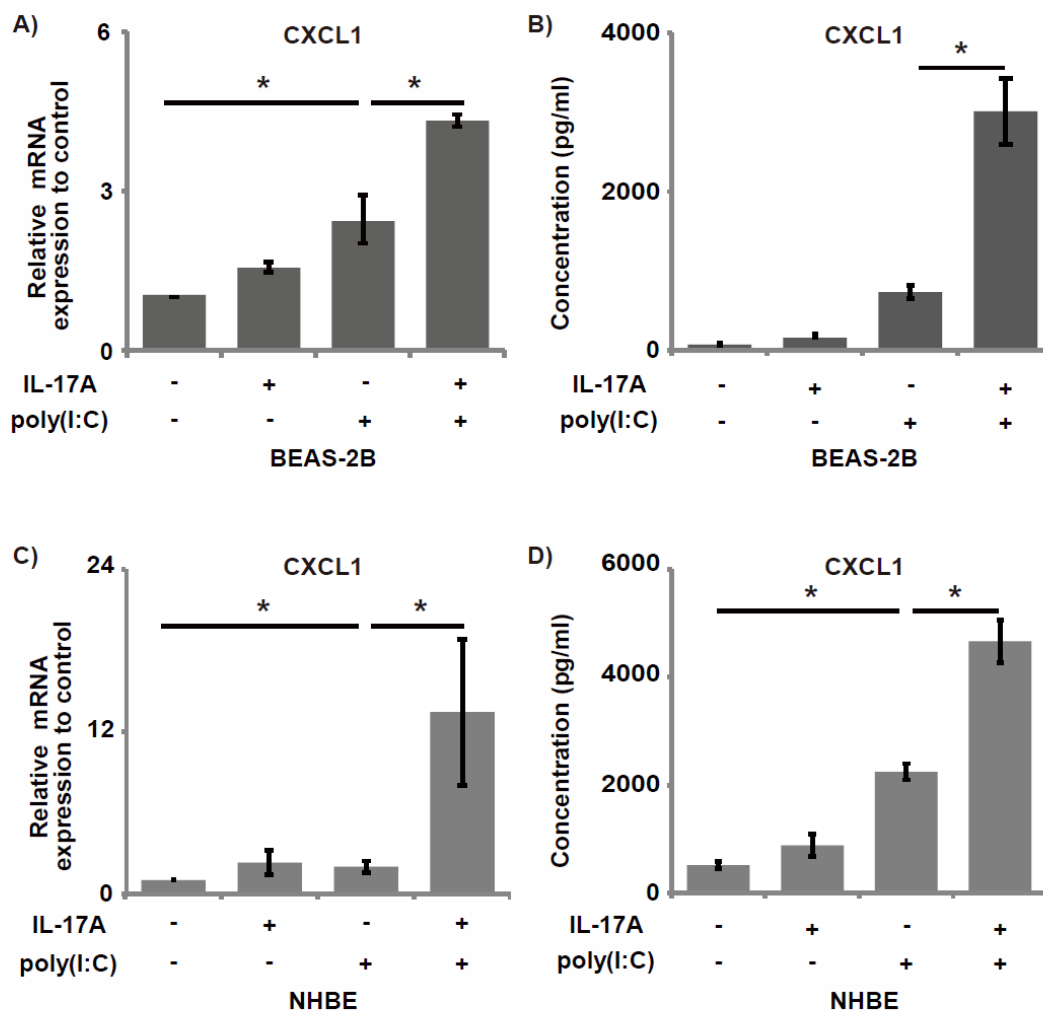


Figure. 4 IL-17A 及び poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞及び NHBE 細胞における CXCL1 mRNA の発現及び蛋白の産生

無刺激群、IL-17A (100 ng/mL)単独刺激群、poly(I:C) (2.5 µg/mL)単独刺激群、共刺激群の4群に分け、刺激を行い、刺激の6時間後の mRNA の発現を解析した。また、刺激の24時間後の培地の上清を回収し ELISA を施行した。

A) 各刺激に伴う BEAS-2B 細胞における CXCL1 mRNA の発現量の無刺激群に対する比を示している。

B) 各刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL1 蛋白の産生を示している。

C), D) NHBE 細胞において A), B)と同様の項目を見たものを示している。

n = 3 separate experiments. \*:  $p < 0.05$  vs poly(I:C)

**Poly(I:C)**は主に **TLR3/TRIF** 経路を介して、気道上皮細胞からケモカイン産生を誘導した。

IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激による気道上皮細胞からの相乗的なケモカイン産生のメカニズムを調べるために、ケモカイン産生に関わる細胞内シグナリングについて評価を行った。

細胞内シグナリングの評価は正常気道上皮細胞と同様の動態を示すと想定して BEAS-2B 細胞に統一して実験を行った。また、シグナリングの検討においては急性増悪時に発現の上昇が報告されており、好中球性気道炎症の主たるメディエーターである CXCL8 に対する関与を主に検討した。

まず、poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からのケモカイン産生における TLR3 の関与について、TLR3 を標的とした 3 組の siRNA を用いて検討した。siRNA を BEAS-2B 細胞にトランスフェクションすることにより、十分に細胞の TLR3 mRNA の発現及び TLR3 蛋白レベルが抑制されることを確認した(Fig. 5A, 5B)。続いて、TLR3 をノックダウンすることにより poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 及び CXCL1 mRNA の発現が有意に抑制された(Fig. 5C)。

次に TLR3 の重要なアダプター分子である TRIF を介したシグナルのケモカイン産生における関与について TRIF を標的とした siRNA を用いて評価した。まず、siRNA が十分に TRIF mRNA の発現及び蛋白の産生を抑制することを確認した(Fig.

6A, 6B)。さらに、TRIF をノックダウンすることにより poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 及び CXCL1 mRNA の発現が有意に抑制された(Fig. 6C)。

Figure. 5

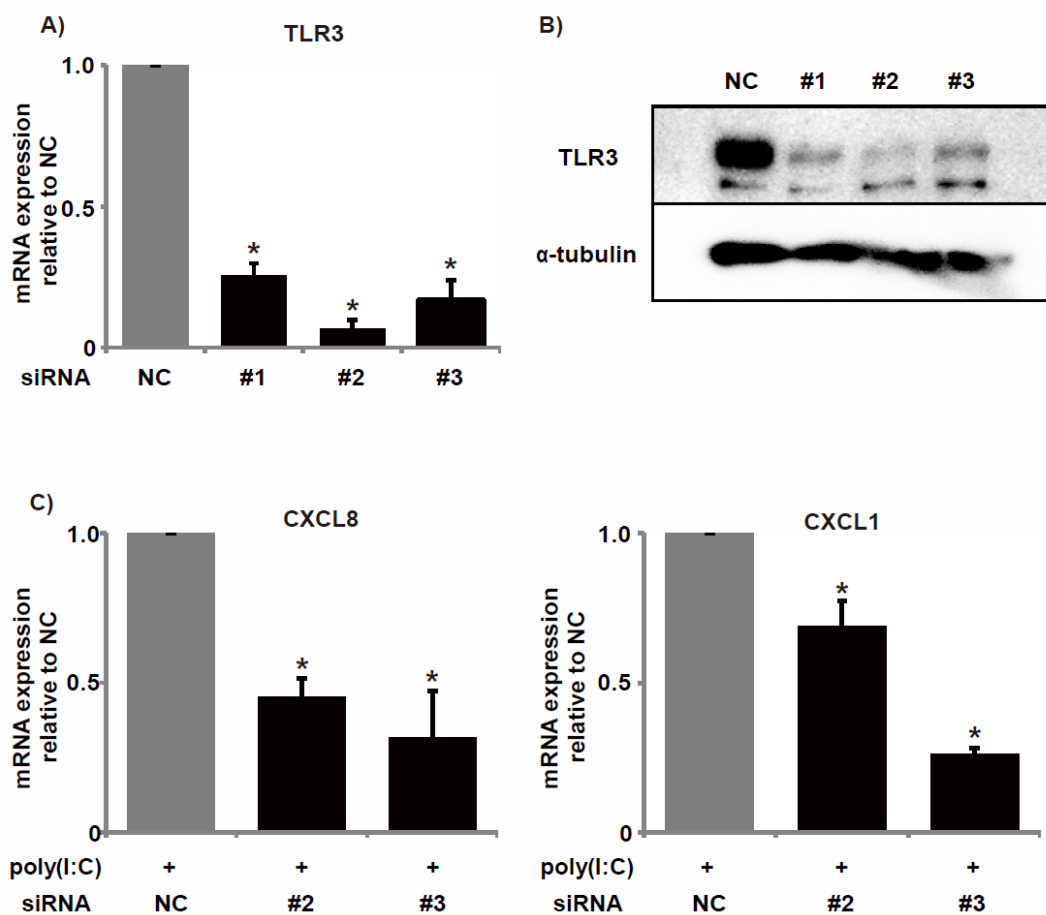


Figure. 5 Poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からのケモカイン産生に対する TLR3 siRNA の影響

A) Negative Control (NC) siRNA 及び 3 組の TLR3 siRNA (#1-#3)をトランスフェクションし、72 時間後に定量的 RT-PCR で mRNA のノックダウン効率を確認した。

B) A)と同様の 4 種類の siRNA をトランスフェクションし、72 時間後での蛋白のノックダウン効率を Western blotting で確認した。

C) A)でノックダウン効率の高かった 2 種類の siRNA (#2, #3)及び NC siRNA を BEAS-2B 細胞にトランスフェクションした。72 時間後に poly(I:C) (2.5  $\mu$ g/mL)で刺激を行い、刺激 6 時間後の CXCL8 及び CXCL1 の mRNA の発現を解析した。

n = 3 separate experiments. \*:  $p < 0.05$  vs NC



Figure. 6

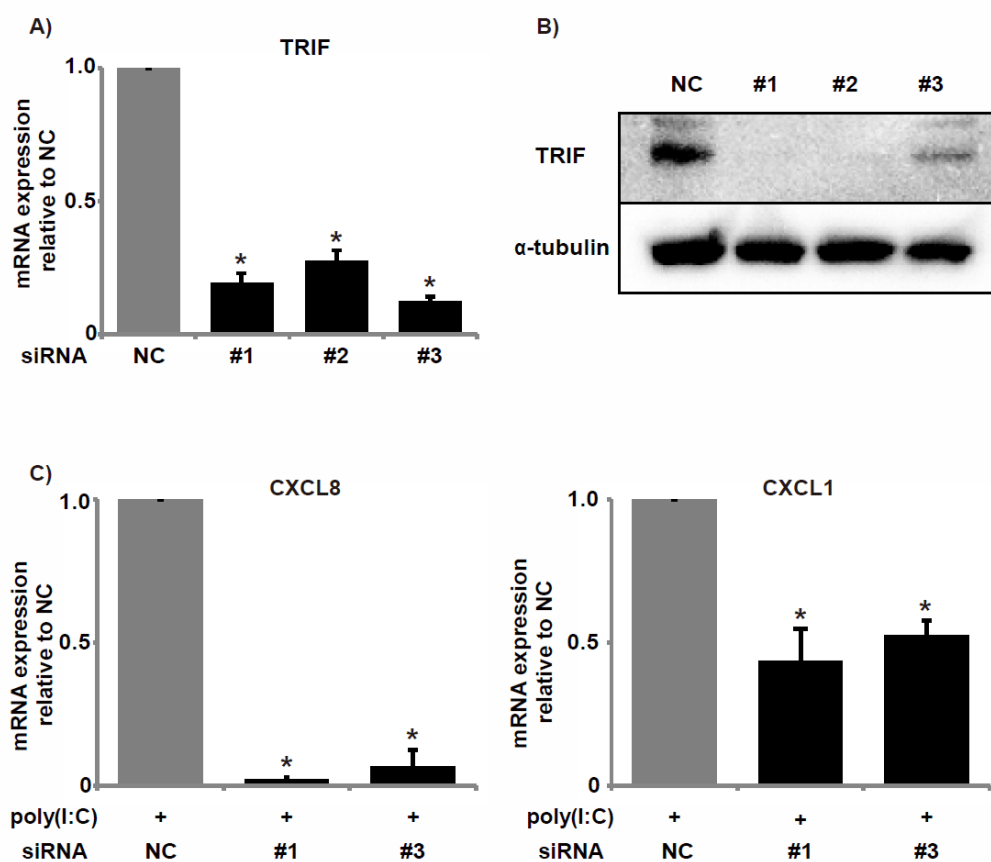


Figure. 6 Poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からのケモカイン産生に対する TRIF siRNA の影響

A) NC siRNA 及び 3 組の TRIF siRNA (#1-#3)をトランスフェクションし、72 時間後に定量的 RT-PCR で mRNA のノックダウン効率を確認した。

B) A)と同様の 4 種類の siRNA をトランスフェクションし、72 時間後での蛋白のノックダウン効率を Western blotting で確認した。

C) A)でノックダウン効率の高かった 2 種類の siRNA (#1, #3)及び NC siRNA を BEAS-2B 細胞にトランスフェクションした。72 時間後に poly(I:C) (2.5  $\mu$ g/mL)で刺激を行い、刺激 6 時間後の CXCL8 及び CXCL1 の mRNA の発現を解析した。

n = 3 separate experiments. \*:  $p < 0.05$  vs NC

BEAS-2B 細胞において、IL-17A 及び poly(I:C)の刺激により p38, Erk1/2, I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が促進された。

次に、IL-17A 及び poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 の産生における MAPK 及び NF- $\kappa$ B の関与について検討した。まず、MAPK 及び I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化について解析した。BEAS-2B 細胞を IL-17A 及び poly(I:C)双方で刺激を行うと p38, Erk1/2, I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が誘導された(Fig. 7A, 7B)。その一方で、JNK のリン酸化は誘導されなかった(Fig. 7C)。

p38 及び Erk1/2 のリン酸化が特に際立って誘導されたため、次に IL-17A 単独刺激群、poly(I:C)単独刺激群におけるリン酸化との比較を行った。その結果、単独刺激群に比べて共刺激群において著しく p38 及び Erk1/2 のリン酸化が誘導された(Fig. 7A)。単独刺激群及び共刺激群における p38 及び Erk1/2 のリン酸化の程度を解析したデンストメトリーの結果を Fig. 8 に示す。リン酸化した p38 及び Erk1/2 の割合の刺激前からの経時的な推移を見た。IL-17A 単独刺激群では、経時的に明らかな変化は認められず、poly(I:C)単独刺激群では各々15分をピークにリン酸化の割合の上昇を認めた。共刺激群では、単独刺激群に比べてより強いリン酸化が認められた。

Figure. 7

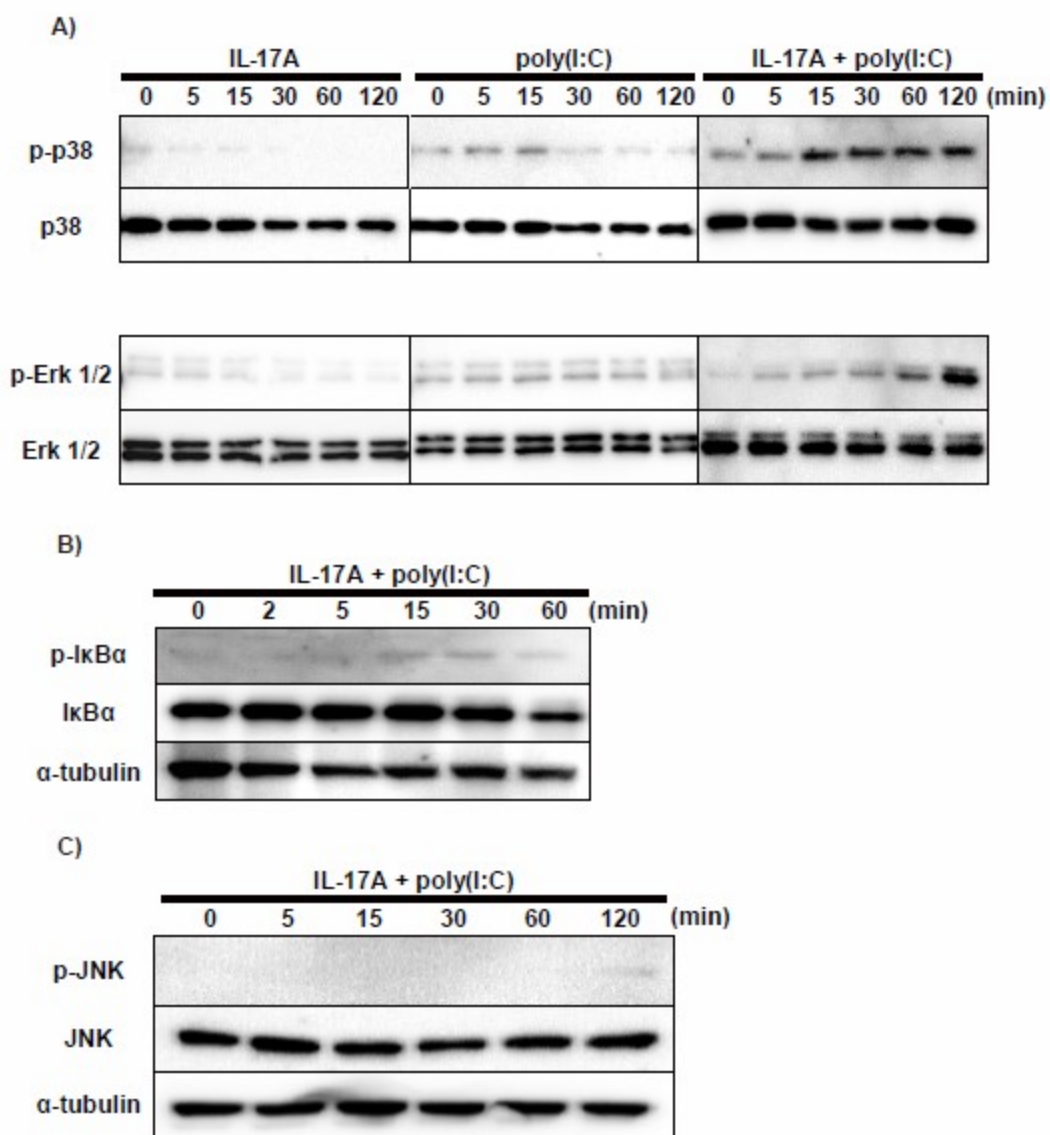


Figure. 7 IL-17A 及び poly(I:C)刺激後の BEAS-2B 細胞の MAPK 及び IκBα のリン酸化

A) IL-17A 単独刺激群、poly(I:C)単独刺激群、共刺激群に分け刺激を行い、刺激後の 0, 5, 15, 30, 60, 120 分後の p38 及び Erk1/2 のリン酸化を示している。

B) IL-17A 及び poly(I:C)共刺激後の 0, 2, 5, 15, 30, 60 分後の IκBα のリン酸化を示している。

C) IL-17A 及び poly(I:C)共刺激後の 0, 5, 15, 30, 60, 120 分後の JNK のリン酸化を示している。

n = 3 separate experiments.

Figure. 8

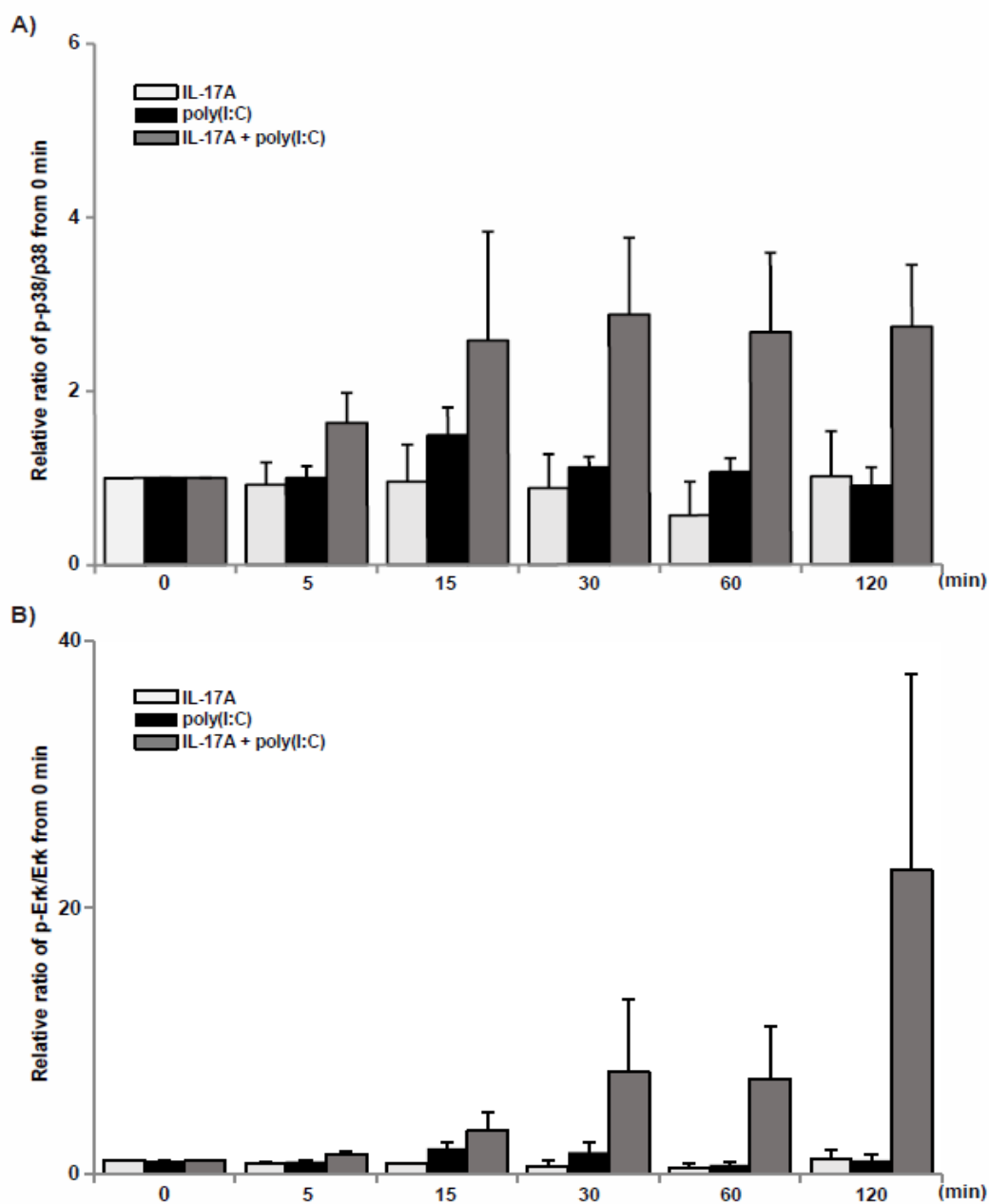


Figure. 8 IL-17A 及び poly(I:C)刺激後の BEAS-2B 細胞の p38 及び Erk1/2 のリン酸化のデンストメトリー解析

A) Figure.7A に示した各群における p-p38/p38 の刺激前に対する比の経時的推移を示している。

B) A)と同様に各群における p-Erk/Erk の刺激前に対する比の経時的推移を示している。

n = 3 separate experiments

**IL-17A 及び poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 の産生は、p38, Erk1/2, IκBα のリン酸化阻害薬で抑制され、特に前 2 者で著しく抑制を認めた。**

次に、IL-17A 及び poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 の産生における MAPK の選択的阻害薬(SB203580, U0126, SP600125)及び IκBα リン酸化阻害薬(BAY11-7082)の影響について評価した。

SB203580, U0126, BAY11-7082 はそれぞれ、有意に IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激に伴う CXCL8 の産生を抑制し、特に SB203580 及び U0126 では、著しくその産生を抑制した。一方、JNK 選択的阻害薬である SP600125 は有意な抑制は認めず、逆に共刺激により産生は軽度の増加を認めた(Fig. 9)。

Figure. 9

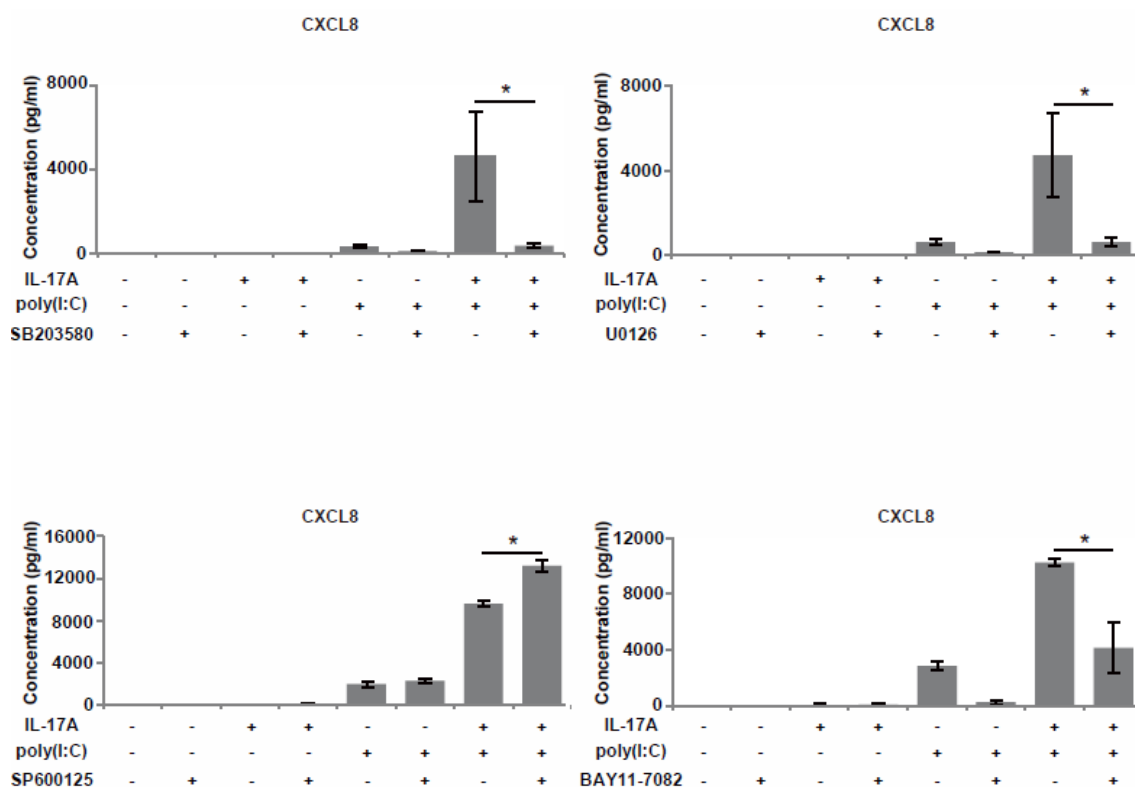


Figure.9 IL-17A 及び poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 の産生における MAPK 選択的阻害薬及び I $\kappa$ B $\alpha$  リン酸化阻害薬の影響

BEAS-2B 細胞を無刺激群、IL-17A (100 ng/mL)単独刺激群、poly(I:C) (2.5  $\mu$ g/mL)単独刺激群、共刺激群の 4 群に分け、刺激を行い、刺激の 1 時間前に阻害薬を加える群、加えない群に分けた。刺激の 24 時間後に培地の上清を回収し、ELISA で CXCL8 の蛋白の産生について評価を行った。

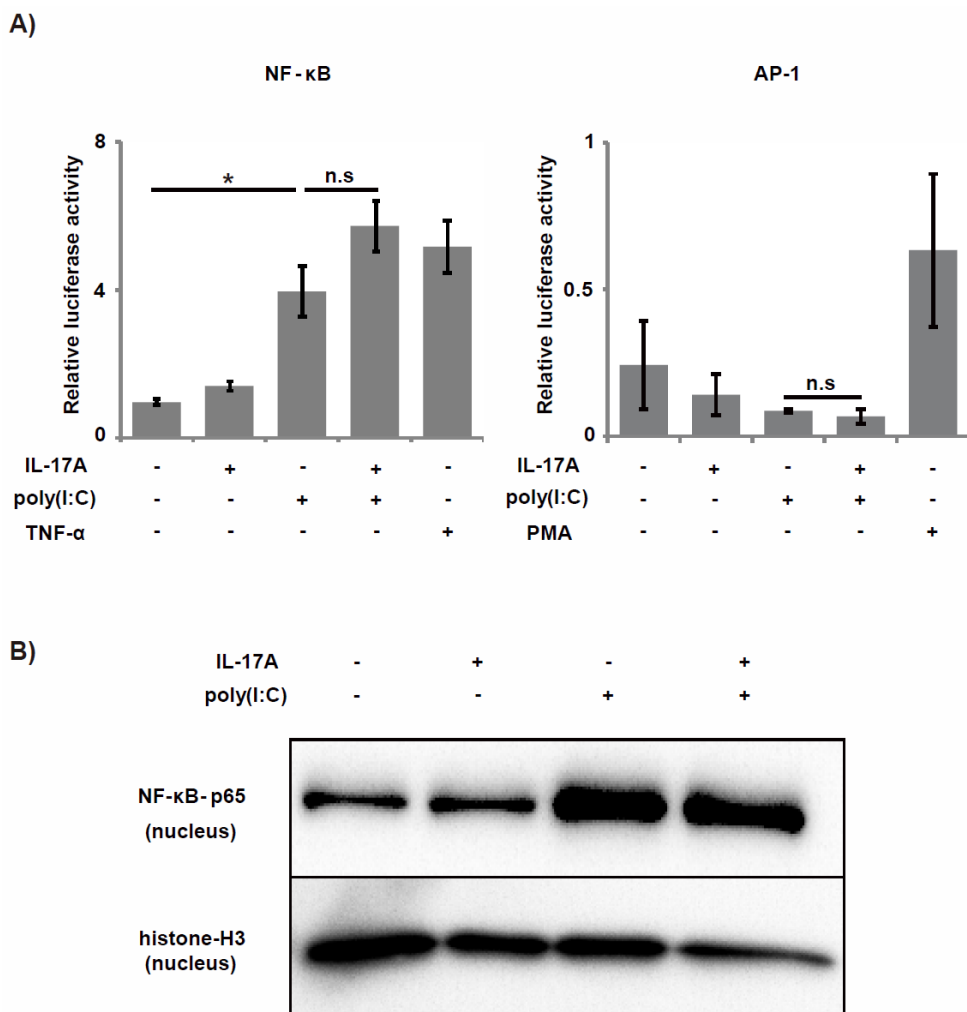
n = 3 separate experiments. \*:  $p < 0.05$  vs no inhibitor

**IL-17A 及び poly(I:C)共刺激に伴う BEAS-2B 細胞における NF- $\kappa$ B, AP-1 の転写活性は poly(I:C)単独刺激群の場合と有意差は認めなかった。**

通常、TLR3 刺激によって誘導される炎症性サイトカインの産生に関する転写因子として NF- $\kappa$ B 及び AP-1 が挙げられる[13, 45, 46]。そのため、IL-17A, poly(I:C) 刺激後の BEAS-2B 細胞におけるそれらの転写活性についてルシフェラーゼレポーターアッセイを行うことで評価した。IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激により BEAS-2B 細胞の NF- $\kappa$ B の活性は無刺激群や IL-17A 単独刺激群に比べて有意な増強を認めたが、poly(I:C)単独刺激群とは有意な差を認めなかった(Fig. 10A)。次に、AP-1 の転写活性についても、共刺激群で有意な転写活性の増強は認めなかった(Fig. 10A)。

また、刺激後の NF- $\kappa$ B の核内移行について、核抽出物内の NF- $\kappa$ B-p65 を Western blotting で解析することで評価したが、共刺激群と poly(I:C)単独刺激群では大きな差を認めなかった(Fig. 10B)。

**Figure. 10**



**Figure. 10 IL-17A, poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞における NF-κB, AP-1 の転写活性及び NF-κB の核内移行**

A) BEAS-2B 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を含むベクターを導入し、48 時間後に無刺激群、IL-17A (100 ng/mL) 単独刺激群、poly(I:C) (2.5 μg/mL) 単独刺激群、共刺激群の 4 群に分け、刺激を行った。刺激 24 時間後に細胞を回収し転写因子活性を反映するルシフェラーゼ活性を測定した。TNF-α (10 ng/mL), PMA (10 ng/mL) 刺激群をポジティブコントロールとしておいた。

n = 9 separate experiments for NF-κB; n = 3 separate experiments for AP-1. \*:  $p < 0.05$  vs poly(I:C)

(B) BEAS-2B 細胞を A) と同様の 4 群に分け刺激を行い、刺激 1 時間後に核を抽出し、Western blotting で核内にある NF-κB-p65 を評価した。

n = 3 separate experiments.



**IL-17A は poly(I:C)刺激後に産生される CXCL8 mRNA の安定化をもたらした。**

Actinomycin D chase study を施行し、ケモカイン産生の増強に IL-17A の転写後調節が関与しているか評価した。Fig. 11A で示されるように、BEAS-2B 細胞に actinomycin D を加えた後も IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激群では、poly(I:C)単独刺激群に比べて経時的に高値の CXCL8 mRNA の発現を維持した。AUC も有意差をもって共刺激群が高値であった( $79.0 \pm 4.3$  vs.  $48.8 \pm 6.0$ ,  $p < 0.05$ )。一方、CXCL1 mRNA に関しては、actinomycin D 投与後の各々の計測時間における mRNA の発現や AUC に有意差を認めなかった( $120.5 \pm 10.0$  vs.  $132.8 \pm 12.8$ ) (Fig. 11B)。この結果により、IL-17A は、CXCL8 に関しては mRNA の安定化により継続的な CXCL8 mRNA の発現の維持をもたらしたと考えられる。

Figure. 11

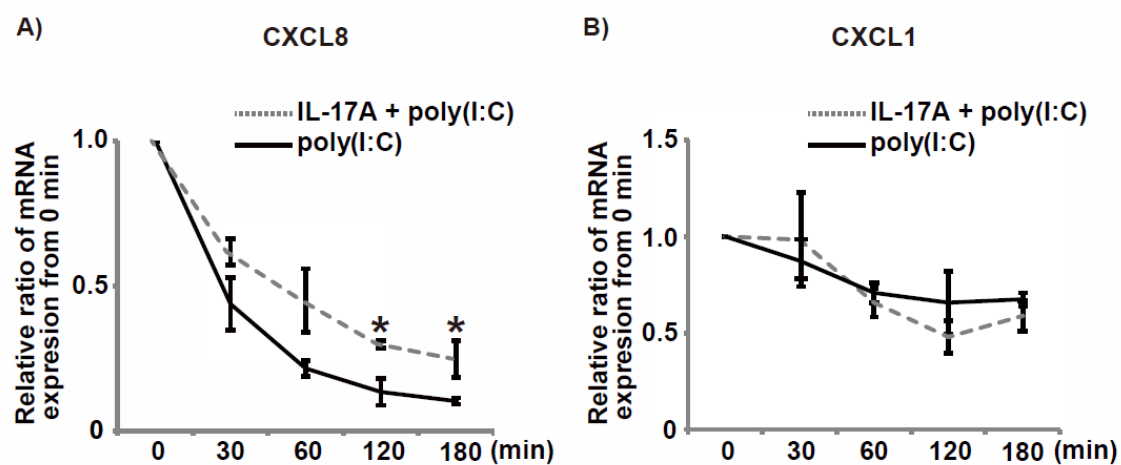


Figure. 11 poly(I:C)刺激後の BEAS-2B 細胞からのケモカイン産生における IL-17A の転写後調節

BEAS-2B 細胞を使用し、poly(I:C) (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 単独刺激群と IL-17A (100  $\text{ng}/\text{mL}$ ) との共刺激群に分けた。刺激 3 時間後に actinomycin D を加え、その 0, 30, 60, 120, 180 分後の CXCL8 及び CXCL1 mRNA の発現を経時評価した。

n = 3 separate experiments. \*:  $p < 0.05$  vs poly(I:C)

**IL-17A 及び poly(I:C)共刺激に伴う CXCL8 の産生は、MK2, MNK1/2, MSK1/2 リン酸化阻害薬では抑制されなかった。**

最後に、p38 シグナル系の下流にあり、mRNA の翻訳、転写や mRNA の安定化に重要な役割を果たす MK2, MNK1/2, MSK1/2 のケモカイン産生における関与についてリン酸化阻害薬を使用することで評価した。

Figure. 12 に示すように、IL-17A, poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 の産生は MK-2 inhibitor III, ETP-45835, SB747651A では有意な抑制は認めなかった。

Figure. 12

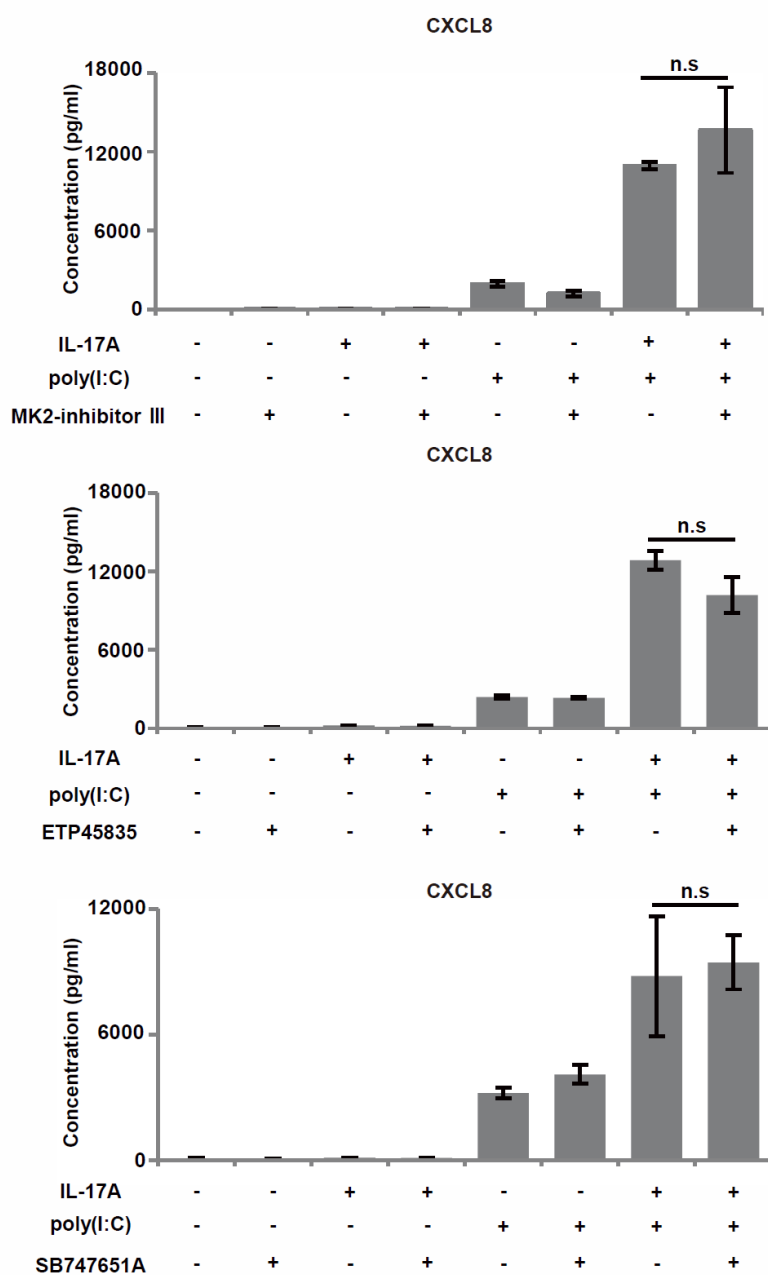


Figure. 12 IL-17A, poly(I:C)刺激に伴う気道上皮細胞からの CXCL8 蛋白産生に対する阻害剤の影響

BEAS-2B 細胞を無刺激群、IL-17A (100 ng/mL)単独刺激群、poly(I:C) (2.5 µg/mL)単独刺激群、共刺激群の 4 群に分け、刺激を行い、刺激の 1 時間前に阻害薬を加える群、加えない群に分けた。刺激の 24 時間後に培地の上清を回収し、ELISA で CXCL8 の蛋白の産生について評価を行った。

n = 3 separate experiments.

## 考察

慢性炎症性呼吸器疾患の急性増悪における好中球性炎症に関して、IL-17A と poly(I:C)刺激に伴う気道上皮細胞からのケモカイン産生を評価し、さらに細胞内シグナリングや mRNA の安定化を含めた機構について解析を行った。まず、IL-17A 及び poly(I:C)の刺激により BEAS-2B 細胞及び NHBE 細胞から相乗的に CXCL8 及び CXCL1 の mRNA の発現及び蛋白の産生が誘導されるのを見出した。Poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からのケモカイン産生は主に TLR3/TRIF 経路を介して行われた。IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激は p38 及び Erk1/2 経路を著しく活性化させる一方、NF- $\kappa$ B の核内移行や NF- $\kappa$ B, AP-1 の転写因子の活性は poly(I:C)単独刺激群と比べてほぼ違いを認めなかった。さらに IL-17A は poly(I:C)刺激によって発現する BEAS-2B 細胞からの CXCL8 mRNA の安定化をもたらした。

IL-17A は健常人では、喀痰中での発現はほとんどが検出感度以下であったことが報告されている[47]一方、慢性呼吸器疾患患者の肺組織、喀痰中で高発現しており、呼吸機能低下と相関することが報告されている[29, 30, 47]。IL-17A は、p38 及び Erk1/2 経路を介して気道上皮細胞から CXCL8, CXCL1, CXCL6 などの好中球走化性のケモカインを誘導することが報告されており[31-33]、また、慢性呼吸器疾患患者の気道中の CXCL8 の発現は気道中の好中球数と相関することも報告されている[34, 48, 49]。さらに、気道中の好中球は慢性炎症性肺疾患の重症度やステロイドに対する治療抵抗性に関係する[50-52]ことが報告されている。そのため、

IL-17A/CXCL8 axis は、気道炎症性疾患において、重症度や治療抵抗性に関して重要な役割を果たしていると考えられる。治療抵抗性という側面において、IL-17A と慢性呼吸器疾患の治療薬であるステロイドとの関連を調べた過去の研究では Th17 細胞からの IL-17A の産生はステロイドにより抑制されなかったと報告されている[53]。また Th17 細胞が注入されたマウスでは、卵白アルブミンで誘発された気管支喘息に対してステロイド投与を行った後も気管支肺胞洗浄液中では好酸球やリンパ球が減少している一方、IL-17A は減少せず好中球遊走性ケモカインや好中球の増加を認め、気道過敏性が改善しなかったという報告がある[53]。このように、IL-17A はステロイド投与では産生が抑制されず、好中球性炎症を通じてステロイド治療抵抗性と関与することが示唆されている。慢性炎症性肺疾患患者の急性増悪は、ウイルス感染により惹起されることが多く、死亡率が高く治療抵抗性であり、また原疾患の重症度とともにその頻度が増加する。急性増悪では様々な炎症性細胞やメディエーターが関与するが、中でも気道中の好中球増加や CXCL8 の発現の増加が急性増悪の特徴であると報告されている[17-21]。以上から本実験では、IL-17A が高発現している環境下を想定し、IL-17A の刺激を行い、さらにウイルス感染モデルとして poly(I:C)の刺激を行い、気道上皮細胞からのケモカインの発現を評価した。前述のように慢性炎症性肺疾患患者で高発現を認めている IL-17A であるが、ヒトの局所での発現濃度の報告は無い。過去の研究では、IL-17A を 1, 10, 100,

1000 ng/ml の濃度で気道上皮細胞に刺激した所、濃度上昇と共に CXCL8 蛋白の産生が増加したことが報告されており[54]、気道上皮細胞の多くの研究で過去に使用されている濃度(100 ng/ml)に則って、本実験では IL-17A の刺激を行った[31, 55, 56]。また、poly(I:C)の濃度は予備実験で 1, 2.5, 5, 10, 50 $\mu$ g/mL に濃度を振り刺激を行ったが、2.5  $\mu$ g/mL を超えた濃度では CXCL8 の mRNA 発現がそれ以上増加しなかったため、2.5  $\mu$ g/mL の濃度で刺激を行った。今回、IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激が相乗的に CXCL1, CXCL8 を誘導することを示した。これらのことから、IL-17A の存在はウイルス感染時に気道上皮細胞から好中球走化性のケモカインの産生を相乗的に促進することで、ウイルス感染によって引き起こされる慢性呼吸器疾患の急性増悪の好中球性炎症の病態に重要な役割を果たすことが示唆された。

さらに、IL-17A 存在下での poly(I:C)刺激による CXCL8 産生の相乗作用をきたす機序を解明するために、各受容体からの細胞内シグナリングの評価および mRNA の安定化に関する解析を行った。IL-17 受容体は種々の細胞で恒常的に発現しており、IL-17A によって惹起される炎症は、主に IL-17 receptor A と IL-17 receptor C からなるヘテロダイマー受容体を介して起こることが知られている[57, 58]。従来の報告より IL-17A は気道上皮細胞を介して CXCL8 産生を誘導することは知られているが、本実験の検討では IL-17A による CXCL8 の産生は、poly(I:C)による CXCL8 の産生より弱く、そのため、IL-17A の存在下での poly(I:C)刺激による CXCL8 産生

の相乗効果は、poly(I:C)の細胞内シグナルに影響する可能性が高いと考えた。そこで、次いで poly(I:C)の受容体に関して検討した。Poly(I:C)の受容体として知られる TLR3 をターゲットにした siRNA をまず使用したところ、TLR3 をノックダウンすることで poly(I:C)刺激に伴う気道上皮細胞からの CXCL8, CXCL1 の mRNA の発現が抑制されることを確認した。さらに、TRIF は TLR3 の重要なアダプター分子であり、TRIF を介した経路が TLR3 による炎症性サイトカインや type I interferon の産生に重要であることが知られている[59, 60]ため、TRIF を介したシグナリングに関しても評価を行った。TRIF をターゲットにした siRNA を用いて、CXCL8, CXCL1 mRNA の発現の解析を行った。TRIF を siRNA でノックダウンすることにより、明らかに poly(I:C)刺激による気道上皮細胞からの CXCL8, CXCL1 の mRNA の発現が抑制された。以上より、poly(I:C)刺激に伴う気道上皮細胞からのケモカインの産生は主に TLR3/TRIF 経路を介すると考えられた。他に poly(I:C)刺激では、retinoic acid-inducible gene 1, melanoma differentiation-associated gene 5, double-stranded RNA-dependent protein kinase といった複数の受容体を介することも知られている[61, 62]が、過去の研究においてこれらの受容体を siRNA でノックダウンを行っても、poly(I:C)刺激に伴う気道上皮細胞からのケモカイン産生に影響しなかったことも報告されており[63]、今回の結果を支持しているものと考えられる。

次に MAPK 及び NF- $\kappa$ B 経路の関与について検討した。従来報告では、IL-17A



による気道上皮細胞からの CXCL8 の産生には、p38 および Erk1/2 が関与することが示唆されている[31-33]が、本研究の実験系では IL-17A 単独刺激による CXCL8 の産生は微量であり、また、細胞内シグナル伝達経路でも IL-17A 単独では p38 および Erk1/2 のリン酸化も明らかでなかった。一方、TLR3 を介する poly(I:C)においても、過去に poly(I:C)単独刺激による気道上皮細胞からの CXCL8 産生には、p38 及び Erk1/2 経路を介することが報告されている[64]。本実験では、poly(I:C)単独刺激で p38 および Erk1/2 のリン酸化は 15 分をピークに誘導され、IL-17A 単独刺激群に比べてリン酸化は高度であった。また、各々のリン酸化阻害剤による CXCL8 産生抑制も確認できた。さらに、IL-17A および poly(I:C)での共刺激下では明らかに IL-17A の存在により単独刺激群に比べて、p38 および Erk1/2 のリン酸化の誘導が增強され、その阻害剤で産生が高度に抑制されることが確認できた。共刺激では、Erk1/2 が遅れて 120 分頃から高度にリン酸化を認めている。この現象に関しては IL-17A の存在下で、poly(I:C)単独刺激時に比べて直接的な経路以外に特定のある経路が活性化され、そこから二次的に Erk1/2 が活性化された可能性が示唆される。

以上のことから、本実験で IL-17A 及び poly(I:C)刺激に伴う気道上皮細胞からの相乗的なケモカインの産生において p38 及び Erk1/2 経路が極めて重要であることが分かった。一方、通常、TLR3 刺激によって誘導される炎症性サイトカインの産生に関係する転写因子として NF- $\kappa$ B 及び AP-1 が挙げられる[13, 45, 46]。そのた

め、本実験では両者の転写活性及び TLRs の刺激に誘導される NF- $\kappa$ B-p65 の核内移行[65]に関して各々の条件で比較検討を行ったが、IL-17A, poly(I:C)共刺激群では poly(I:C)単独刺激群に比べて転写活性に有意差はなく、また NF- $\kappa$ B-p65 の核内移行も poly(I:C)単独刺激群に比べて大きな差は認めなかった。以上より、NF- $\kappa$ B 経路はケモカイン産生における相乗効果には関与しないことが今回の結果から示唆された。

IL-17A は様々な刺激、細胞種において mRNA の安定化によってケモカインの産生を増強することが過去に報告されている[66-68]。本実験での actinomycin D chase experiments では、IL-17A は poly(I:C)刺激に伴う BEAS-2B 細胞からの CXCL8 mRNA の安定化をもたらした。過去に mRNA の分解や安定化において 3'非翻訳領域の AU rich element に結合する AU rich element binding proteins (AUBps)が関与していることが報告されており、AUBps には TTP, AUF-1, HuR, KHSRP, TIA-1, TIAR が ある[69]。また、その他に microRNA が 3'非翻訳領域を介した mRNA 分解に関与していることが報告されている[70]。ヒト肺粘液性類表皮癌由来の肺上皮様細胞を用いた実験では、IL-17A の存在下で microRNA-16 の発現が抑制され、mRNA 分解に関わる TTP や KHSRP との複合体形成が抑制されるという機序やまた mRNA 安定化に関わる AUF-1 の mRNA への結合を促進するという機序で、TNF- $\alpha$  の刺激に伴い発現した CXCL8 mRNA の安定化をもたらしたと報告されている[69]。一方、

IL-17A による CXCL1 mRNA の安定化は TTP や KHSRP とは独立した機序で[71]、3'非翻訳領域に結合する TRAF5 や ASF が関係していると報告されている[72]。このように mRNA の安定化に関与する分子はケモカインによって異なる。今回の実験において、CXCL8 や CXCL1 mRNA の安定化に関与する分子の影響は検討していないが、poly(I:C)刺激によって変動した細胞内の condition において安定化に関与する分子の活性に違いが生じ、CXCL8 mRNA のみ安定化が生じたのではないかと推測している。IL-17A による mRNA の stabilization の効果は、今回の poly(I:C)および IL-17A による CXCL8 産生の相乗作用に影響している可能性があると考えられる。

今回の結果の中で、特に p38 及び Erk1/2 のリン酸化の阻害薬が著明に CXCL8 の産生を抑制したことから、さらにその下流の経路に注目した。過去に IL-17A または poly(I:C)の単独刺激は、p38 及び Erk1/2 経路を介してケモカイン産生をすることが報告されている[31, 33, 64]が今回の結果から、IL-17A 及び poly(I:C)の共刺激は単独刺激に比べて著しく p38 及び Erk1/2 のリン酸化をもたらした。そこで、p38 及び Erk1/2 経路に関係する分子がこの相乗的なケモカインの産生のメカニズムに関与するのではないかと推測した。従って、p38 シグナル系の下流にあり、mRNA の翻訳、転写や mRNA の安定化に重要な役割を果たす MK2, MNK1/2, MSK1/2[73-76] のケモカイン産生における関与についてリン酸化阻害薬を使用することで評価し

たが、これらのリン酸化阻害薬では有意なケモカインの抑制は見られず、これら以外の経路によると考えられた。

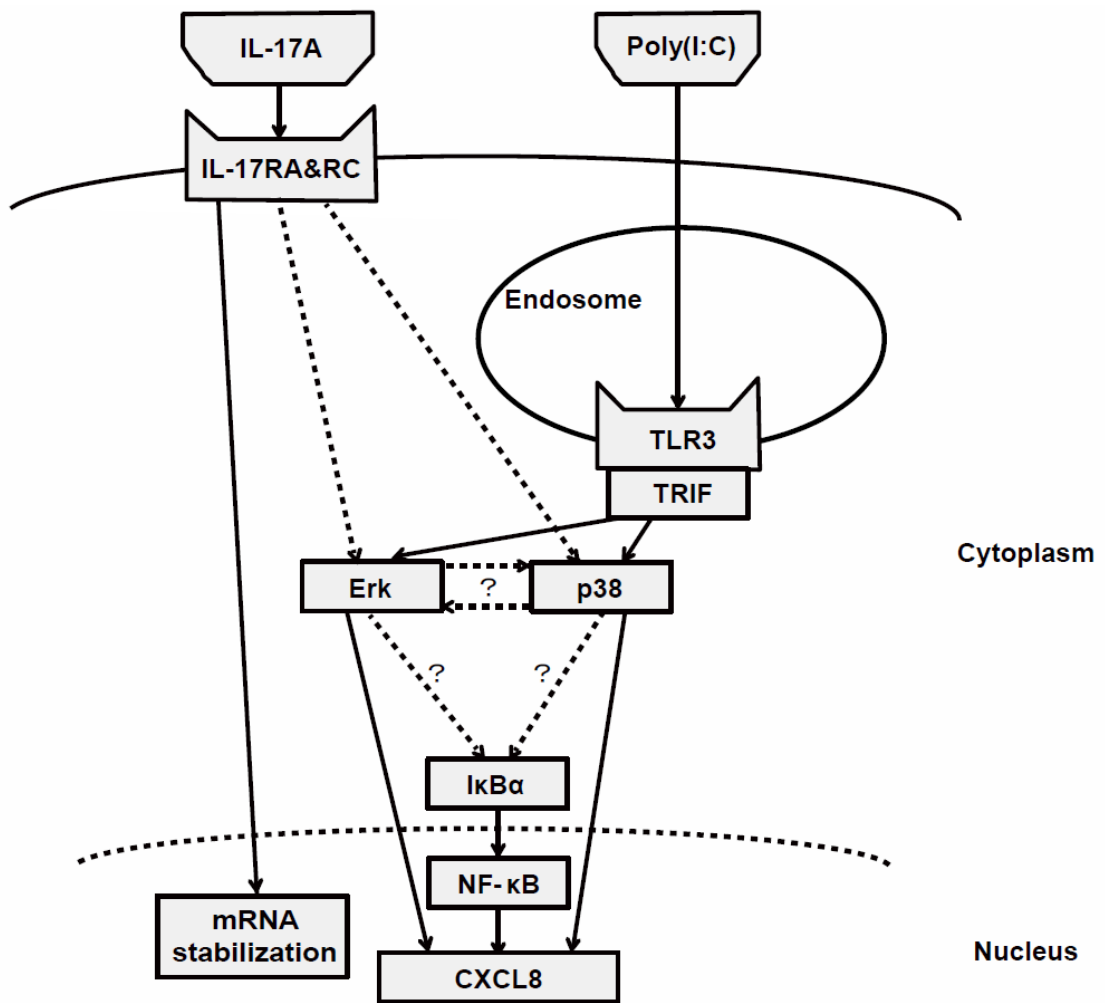
以上から、IL-17A は poly(I:C)刺激に伴う気道上皮細胞からのケモカイン産生を mRNA stabilization を伴いながら主に p38, Erk1/2 経路を介して促進させることが判明した。それに加えて、p38 及び Erk1/2 間の相互作用や p38 及び Erk1/2 の下流の何らかの分子が相乗的なケモカイン産生の機構に関与しているのではないかと推測している(Fig. 13)。

本実験では、ウイルス感染病態下での気道上皮細胞からのケモカイン産生における IL-17A の関与を評価するにあたって、細胞に IL-17A と poly(I:C)を同時に刺激することで解析を行った。しかし、予め IL-17A に細胞が暴露された条件下で poly(I:C)刺激を行う実験系は検討していない。今後、IL-17A に予め暴露された環境下にある気道上皮細胞からの poly(I:C)の刺激に伴うケモカイン産生の検討や IL-17A に暴露された細胞が遺伝子レベルでどのような変化をきたし、それがウイルス感染病態下でのケモカイン産生に関与してくるか検討していく必要があると考えられる。また、今回はケモカイン産生におけるシグナル経路の解析でリン酸化阻害薬を使用した。過去の研究で広く使用されている特異性の高い阻害薬を選択しているが、非特異的な阻害の要素を除外しきれていない。今後は、siRNA によるシグナル経路に関わる分子のノックダウンなどさらに精度の高いシグナルの関与の

解析を行っていきたい。また、今回は p38 及び Erk1/2 の経路に関係した MK2, MNK1/2, MSK1/2 のみ検討したが、共刺激による細胞内の分子の発現・活性について網羅的な解析がさらに必要と考えられた。

今後の実臨床における治療への応用として、他分野では例えば尋常性乾癬や乾癬性関節炎の治療薬として2014年に抗IL-17Aモノクローナル抗体が世界で初めて承認された。乾癬性関節炎に対しては、2015年9月に抗IL-17A抗体の一つであるセクキヌマブが第3相試験で、その有効性及び忍容性が確認されている[77]。本実験の結果から、将来的に気道中のIL-17Aが高発現している慢性炎症性肺疾患患者に対して、IL-17Aや受容体をターゲットとした治療を導入することでウイルス感染に伴う急性増悪時における好中球性気道炎症を抑制し、それによる早期の症状、予後の改善がもたらされることが期待される。

Figure. 13



**Fig. 13** 本実験から推定される IL-17A 及び poly(I:C) 刺激に伴う CXCL8 産生の細胞内シグナリング

Poly(I:C) 刺激に伴うケモカイン産生は主に TLR3/TRIF 経路を介する。IL-17A は poly(I:C) 刺激に伴う気道上皮細胞からのケモカイン産生を mRNA stabilization を伴いながら主に p38, Erk1/2 経路を介して促進させる。

実線: 本実験で示された pathway

点線: 本実験の結果から推定される pathway

## 謝辞

本研究の遂行を御支援、御指導頂きました指導教官である東京大学大学院医学系研究科内科学専攻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、本研究全般に渡り、御指導及び御協力いただきました東京大学 山内康宏 講師、帝京大学医学部附属溝口病院第四内科 幸山正 教授、杏林大学医学部第一内科学 滝澤始 教授に感謝申し上げます。

## 引用文献

1. Diaz-Guzman E, Mannino DM: **Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Chest Med*, **35**:7-16;2014.
2. Braman SS: **The global burden of asthma.** *Chest*, **130**:4S-12S;2006.
3. Pawankar R: **Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action.** *World Allergy Organ J*, **7**:12;2014.
4. Ukena D, Fishman L, Niebling WB: **Bronchial asthma: diagnosis and long-term treatment in adults.** *Dtsch Arztebl Int*, **105**:385-394;2008.
5. Pauwels RA, Rabe KF: **Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).** *Lancet*, **364**:613-620;2004.
6. Barnes PJ: **Small airways in COPD.** *N Engl J Med*, **350**:2635-2637;2004.
7. Lemanske RF, Jr., Busse WW: **Asthma: clinical expression and molecular mechanisms.** *J Allergy Clin Immunol*, **125**:S95-102;2010.
8. Larsson K: **Aspects on pathophysiological mechanisms in COPD.** *J Intern Med*, **262**:311-340;2007.
9. MacIntyre N, Huang YC: **Acute exacerbations and respiratory failure in chronic obstructive pulmonary disease.** *Proc Am Thorac Soc*, **5**:530-535;2008.
10. Dougherty RH, Fahy JV: **Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology**



- and the exacerbation-prone phenotype. *Clin Exp Allergy*, **39**:193-202;2009.**
11. Yang M, Kumar RK, Foster PS: **Pathogenesis of steroid-resistant airway hyperresponsiveness: interaction between IFN-gamma and TLR4/MyD88 pathways.** *J Immunol*, **182**:5107-5115;2009.
  12. Dewan NA, Rafique S, Kanwar B, Satpathy H, Ryschon K, Tillotson GS, Niederman MS: **Acute exacerbation of COPD: factors associated with poor treatment outcome.** *Chest*, **117**:662-671;2000.
  13. Milara J, Morell A, Ballester B, Sanz C, Freire J, Qian X, Alonso-Garcia M, Morcillo E, Cortijo J: **Roflumilast improves corticosteroid resistance COPD bronchial epithelial cells stimulated with toll like receptor 3 agonist.** *Respir Res*, **16**:12;2015.
  14. Maneechotesuwan K, Essilfie-Quaye S, Kharitonov SA, Adcock IM, Barnes PJ: **Loss of control of asthma following inhaled corticosteroid withdrawal is associated with increased sputum interleukin-8 and neutrophils.** *Chest*, **132**:98-105;2007.
  15. Ordonez CL, Shaughnessy TE, Matthay MA, Fahy JV: **Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance.** *Am J Respir Crit Care Med*, **161**:1185-1190;2000.

16. Daldegan MB, Teixeira MM, Talvani A: **Concentration of CCL11, CXCL8 and TNF-alpha in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation.** *Braz J Med Biol Res*, **38**:1359-1365;2005.
17. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, Dales RE: **Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med*, **163**:349-355;2001.
18. 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.** *Arch Bronconeumol*, **47**:176-183;2011.
19. Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Chung KF: **Cytokine inhibition in the treatment of COPD.** *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, **9**:397-412;2014.
20. Fujimoto K, Yasuo M, Urushibata K, Hanaoka M, Koizumi T, Kubo K: **Airway inflammation during stable and acutely exacerbated chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J*, **25**:640-646;2005.
21. Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Atmar RL, Hattotuwa K, Guntupalli KK, Jeffery PK: **Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in**

- severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, **168**:968-975;2003.
22. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, Fabbri LM, Johnston SL: **Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations.** *Am J Respir Crit Care Med*, **173**:1114-1121;2006.
23. Quint JK, Wedzicha JA: **The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease.** *J Allergy Clin Immunol*, **119**:1065-1071;2007.
24. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT: **Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.** *Nat Immunol*, **6**:1123-1132;2005.
25. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S: **Functional specialization of interleukin-17 family members.** *Immunity*, **34**:149-162;2011.
26. Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, Naves R, Han M, Zhong F, Castellanos JG, Mair R, Christakos A, Kolkowitz I, Katz L, Killestein J, Polman CH, de Waal Malefyt R, Steinman L, Raman C: **T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and**

- experimental encephalomyelitis.** *Nat Med*, **16**:406-412;2010.
27. Kirkham BW, Kavanaugh A, Reich K: **Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis.** *Immunology*, **141**:133-142;2014.
28. Bullens DM, Decraene A, Seys S, Dupont LJ: **IL-17A in human respiratory diseases: innate or adaptive immunity? Clinical implications.** *Clin Dev Immunol*, **2013**:840315;2013.
29. Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, Desai D, Mistry V, Rugman P, McCormick M, Woods J, May R, Sleeman MA, Anderson IK, Brightling CE: **Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD.** *Chest*, **138**:1140-1147;2010.
30. Roos AB, Sanden C, Mori M, Bjermer L, Stampfli MR, Erjefalt JS: **IL-17A is Elevated in End-stage COPD and Contributes to Cigarette Smoke-induced Lymphoid Neogenesis.** *Am J Respir Crit Care Med*;2015.
31. Laan M, Lotvall J, Chung KF, Linden A: **IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases.** *Br J Pharmacol*, **133**:200-206;2001.
32. Jones CE, Chan K: **Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8,**

- growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26:748-753;2002.**
33. Prause O, Laan M, Lotvall J, Linden A: **Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2-, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells. *Eur J Pharmacol*, 462:193-198;2003.**
34. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, Ceuppens JL: **IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res*, 7:135;2006.**
35. McCarthy MK, Zhu L, Procaro MC, Weinberg JB: **IL-17 contributes to neutrophil recruitment but not to control of viral replication during acute mouse adenovirus type 1 respiratory infection. *Virology*, 456-457:259-267;2014.**
36. Xagorari A, Chlichlia K: **Toll-like receptors and viruses: induction of innate antiviral immune responses. *Open Microbiol J*, 2:49-59;2008.**
37. Mogensen TH: **Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 22:240-273, Table of Contents;2009.**
38. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG: **The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13:453-460;2013.**
39. Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T, Matsumoto M: **Toll-like receptor 3**

- recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA.** *Nat Commun*, **4**:1833;2013.
40. Slater L, Bartlett NW, Haas JJ, Zhu J, Message SD, Walton RP, Sykes A, Dahdaleh S, Clarke DL, Belvisi MG, Kon OM, Fujita T, Jeffery PK, Johnston SL, Edwards MR: **Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium.** *PLoS Pathog*, **6**:e1001178;2010.
41. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, Si-Tahar M: **Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells.** *J Immunol*, **178**:3368-3372;2007.
42. Wang Q, Miller DJ, Bowman ER, Nagarkar DR, Schneider D, Zhao Y, Linn MJ, Goldsmith AM, Bentley JK, Sajjan US, Hershenson MB: **MDA5 and TLR3 initiate pro-inflammatory signaling pathways leading to rhinovirus-induced airways inflammation and hyperresponsiveness.** *PLoS Pathog*, **7**:e1002070;2011.
43. Koarai A, Sugiura H, Yanagisawa S, Ichikawa T, Minakata Y, Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu K, Ichinose M: **Oxidative stress enhances toll-like receptor 3 response to double-stranded RNA in airway epithelial cells.** *Am J Respir Cell*

- Mol Biol*, **42**:651-660;2010.
44. Stowell NC, Seideman J, Raymond HA, Smalley KA, Lamb RJ, Egenolf DD, Bugelski PJ, Murray LA, Marsters PA, Bunting RA, Flavell RA, Alexopoulou L, San Mateo LR, Griswold DE, Sarisky RT, Mbow ML, Das AM: **Long-term activation of TLR3 by poly(I:C) induces inflammation and impairs lung function in mice.** *Respir Res*, **10**:43;2009.
  45. Kawai T, Akira S: **TLR signaling.** *Semin Immunol*, **19**:24-32;2007.
  46. Broering R, Lu M, Schlaak JF: **Role of Toll-like receptors in liver health and disease.** *Clin Sci (Lond)*, **121**:415-426;2011.
  47. Zhang L, Cheng Z, Liu W, Wu K: **Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients.** *COPD*, **10**:459-465;2013.
  48. Barnes PJ: **The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.** *J Clin Invest*, **118**:3546-3556;2008.
  49. Perng DW, Huang HY, Chen HM, Lee YC, Perng RP: **Characteristics of airway inflammation and bronchodilator reversibility in COPD: a potential guide to treatment.** *Chest*, **126**:375-381;2004.
  50. Gernez Y, Tirouvanziam R, Chanez P: **Neutrophils in chronic inflammatory**

- airway diseases: can we target them and how?** *Eur Respir J*, **35**:467-469;2010.
51. Tillie-Leblond I, Gosset P, Tonnel AB: **Inflammatory events in severe acute asthma.** *Allergy*, **60**:23-29;2005.
52. Bafadhel M, McCormick M, Saha S, McKenna S, Shelley M, Hargadon B, Mistry V, Reid C, Parker D, Dodson P, Jenkins M, Lloyd A, Rugman P, Newbold P, Brightling CE: **Profiling of sputum inflammatory mediators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.** *Respiration*, **83**:36-44;2012.
53. McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A, Henry A, Irvin CG, Piganelli JD, Ray A, Kolls JK: **TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice.** *J Immunol*, **181**:4089-4097;2008.
54. 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.** *J Immunol*, **162**:2347-2352;1999.
55. Nagarkar DR, Poposki JA, Comeau MR, Biyasheva A, Avila PC, Schleimer RP, Kato A: **Airway epithelial cells activate TH2 cytokine production in mast cells through IL-1 and thymic stromal lymphopoietin.** *J Allergy Clin Immunol*, **130**:225-232 e224;2012.



56. Kawaguchi M, Kokubu F, Kuga H, Tomita T, Matsukura S, Hoshino H, Imai T, Adachi M: **[Effect of IL-17 on ICAM-1 expression of human bronchial epithelial cells, NCI-H 292].** *Aerugi*, **48**:1184-1187;1999.
57. McAllister F, Henry A, Kreindler JL, Dubin PJ, Ulrich L, Steele C, Finder JD, Pilewski JM, Carreno BM, Goldman SJ, Pirhonen J, Kolls JK: **Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis.** *J Immunol*, **175**:404-412;2005.
58. Jin W, Dong C: **IL-17 cytokines in immunity and inflammation.** *Emerging Microbes & Infections*, **2**;2013.
59. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S: **Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.** *Science*, **301**:640-643;2003.
60. Matsumoto M, Seya T: **TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C).** *Adv Drug Deliv Rev*, **60**:805-812;2008.
61. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M,

- Taira K, Akira S, Fujita T: **The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.** *Nat Immunol*, **5**:730-737;2004.
62. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M: **Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**:8459-8464;2006.
63. Matsukura S, Kokubu F, Kurokawa M, Kawaguchi M, Ieki K, Kuga H, Odaka M, Suzuki S, Watanabe S, Homma T, Takeuchi H, Nohtomi K, Adachi M: **Role of RIG-I, MDA-5, and PKR on the expression of inflammatory chemokines induced by synthetic dsRNA in airway epithelial cells.** *Int Arch Allergy Immunol*, **143 Suppl 1**:80-83;2007.
64. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M: **Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus.** *J Biol Chem*, **280**:5571-5580;2005.
65. Hacker H, Tseng PH, Karin M: **Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator.** *Nat Rev Immunol*, **11**:457-468;2011.

66. Hartupee J, Liu C, Novotny M, Li X, Hamilton T: **IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization.** *J Immunol*, **179**:4135-4141;2007.
67. Henness S, van Thoor E, Ge Q, Armour CL, Hughes JM, Ammit AJ: **IL-17A acts via p38 MAPK to increase stability of TNF-alpha-induced IL-8 mRNA in human ASM.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **290**:L1283-1290;2006.
68. Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL: **Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment.** *J Leukoc Biol*, **76**:135-144;2004.
69. Chowdhury S, Dijkhuis A, Steiert S, Lutter R: **IL-17 attenuates degradation of ARE-mRNAs by changing the cooperation between AU-binding proteins and microRNA16.** *PLoS Genet*, **9**:e1003747;2013.
70. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W: **Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs.** *Annu Rev Biochem*, **79**:351-379;2010.
71. Datta S, Novotny M, Pavicic PG, Jr., Zhao C, Herjan T, Hartupee J, Hamilton T: **IL-17 regulates CXCL1 mRNA stability via an AUUUA/tristetraprolin-independent sequence.** *J Immunol*, **184**:1484-1491;2010.
72. Sun D, Novotny M, Bulek K, Liu C, Li X, Hamilton T: **Treatment with IL-17**

- prolongs the half-life of chemokine CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF).** *Nat Immunol*, **12**:853-860;2011.
73. Zarubin T, Han J: **Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway.** *Cell Res*, **15**:11-18;2005.
74. Gurgis FM, Ziaziaris W, Munoz L: **Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in neuroinflammation, heat shock protein 27 phosphorylation, and cell cycle: role and targeting.** *Mol Pharmacol*, **85**:345-356;2014.
75. Roux PP, Topisirovic I: **Regulation of mRNA translation by signaling pathways.** *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**;2012.
76. Vermeulen L, Vanden Berghe W, Beck IM, De Bosscher K, Haegeman G: **The versatile role of MSKs in transcriptional regulation.** *Trends Biochem Sci*, **34**:311-318;2009.
77. McInnes IB, Mease PJ, Kirkham B, Kavanaugh A, Ritchlin CT, Rahman P, van der Heijde D, Landewe R, Conaghan PG, Gottlieb AB, Richards H, Pricop L, Ligozio G, Patekar M, Mpofo S, Group FS: **Secukinumab, a human anti-interleukin-17A monoclonal antibody, in patients with psoriatic arthritis (FUTURE 2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.** *Lancet*, **386**:1137-1146;2015.