

博士論文

上皮間葉転換による A549 細胞の外来由来抗原に対する
反応性亢進について

小林 宏一

目次

要旨.....	2
序文.....	4
方法.....	9
1.試薬.....	9
2.細胞と細胞培養.....	10
3.EMT の誘導.....	11
4.細胞の形態観察.....	11
5.フローサイトメトリーによる解析.....	12
6.上清中サイトカイン濃度の測定.....	14
7.Real-time quantitative PCR	15
8. Western blot analysis	16
9.統計解析.....	17
結果.....	18
考察.....	51
結論.....	59
謝辞.....	60
引用文献.....	61

論文タイトル 上皮間葉転換による A549 細胞の外来由来抗原に対する反応性
亢進について

所属 医学系研究科内科学専攻

指導教員名 長瀬 隆英

申請者名 小林 宏一

要旨

上皮間葉転換は、間質性肺炎、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息におけるリモデリングといった多様な呼吸器疾患における病態に関与するが、上皮間葉転換とこれらの急性増悪の一因である呼吸器感染症とのかかわりは明らかでない。ヒト肺胞上皮癌由来細胞株 A549 細胞を TGF- β 1 と共に培養して上皮間葉転換を誘導した後に CpG ODN で刺激したところ、上皮間葉転換が誘導された A549 細胞においてのみ CpG ODN の取り込みが亢進し、IL-6、IL-8、MCP-1 の産生が増強した。上皮間葉転換による外来由来抗原への反応性亢進が呼吸器疾患の急性増悪に関与している可能性が示唆された。

Keywords :

A549 細胞, CpG ODN, 上皮間葉轉換, TGF- β , TLR9

略語一覧 :

asthma COPD overlap; ACO, chronic obstructive pulmonary disease; COPD, CpG oligodeoxynucleotides; CpG ODN, Cigarette Smoke Extract; CSE, Epidermal growth factor; EGF, Epithelial-mesenchymal transition; EMT, Fibroblast growth factor; FGF, Idiopathic interstitial pneumonias; IIPs, Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF, pathogen-associated molecular patterns; PAMPs, pattern recognition receptors; PRRs, single-nucleotide polymorphisms; SNPs, Transforming growth factor; TGF, Toll-like receptors; TLRs,

序文

上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) は、上皮細胞がその特性、すなわち細胞極性、細胞間接着といった上皮系細胞に特有の性質を失い、間葉系細胞の特性を獲得する現象である[1-2]。EMTは3タイプに分類され、type1は発生の過程において、type2は臓器の再生および線維化において、type3は腫瘍の浸潤および転移において認められる[1-3]。これらのうち、type2のEMTは呼吸器疾患における多様な病態に関与することが報告されている。

気管支喘息は気道炎症を背景として生ずる可逆性の気道狭窄と気道過敏性の亢進を特徴とする気道疾患であり、罹患者は世界で3億3千4百万人にも上ると推計される公衆衛生上重要な呼吸器疾患である[4]。吸入ステロイド薬の普及に伴い大多数の症例では病状のコントロールが可能になってきたものの、重症・難治症例においては依然として病状コントロールが困難かつ致命的となる場合がある。重症・難治症例における気道の病理学的特徴の一つとして、気道のリモデリング、すなわち、杯細胞過形成、上皮下線維化、基底膜肥厚、細胞外基質の沈着、平滑筋細胞の増加と肥大、といった気道の構造変化が挙げられ[5]、気道リモデリングは不可逆的な気流制限と気道過敏性を引き起こすことで気管支喘息の病態の悪化に寄与する[6-7]。この気道リモデリングにEMTが重要な役割を果たしている可能性が示唆されている[2,8-11]。外因性ストレス、気道上皮

障害、炎症性メディエーター、Transforming growth factor; TGF、Fibroblast growth factor; FGF、Epidermal growth factor; EGF をはじめとした成長因子の作用により、上皮細胞間接着の減弱と間葉系遺伝子の発現亢進が引き起こされること[8]、喘息モデルマウスにおける検討では気道リモデリングに関与する半数弱の肺線維芽細胞は上皮由来であると考えられたこと[9]、強力な EMT-inducer として知られている TGF- β [2, 10]およびその下流シグナルの活性化がリモデリングに関与していること[11]、が報告されている。

慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease; COPD)は不可逆的な気流制限、小気道の炎症、気腫化を伴う肺胞構造の破壊を特徴とし、タバコ煙を主とした有害物質の長期吸入曝露で発症する呼吸器疾患である。また近年、気管支喘息と COPD のオーバーラップする病態、asthma COPD overlap; ACO の存在も注目されている[12]。COPD の病理学的変化として、小気道の線維化と閉塞が気腫化に先行して認められる所見とされ、気流障害を引き起こす主因と考えられているが、これらの病理学的変化に重要な役割を果たす肺線維芽細胞および肺筋線維芽細胞の起源の一つに EMT の関与が示唆されている[13]。また、COPD 患者の気道上皮において TGF- β が過剰発現していること、TGF- β の過剰発現は線維化を伴う小気道のリモデリングと関連すること、COPD の発症リスクと TGF- β 遺伝子に見られる single-nucleotide polymorphisms; SNPs との間に関連が

みられること、COPD の主要な原因である喫煙が TGF- β を誘導することなどから、気管支喘息と同様に COPD の病態にも強力な EMT 誘導因子である TGF- β が深く関与していると考えられる[14]。

原因が特定できない間質性肺炎を特発性間質性肺炎(idiopathic interstitial pneumonias; IIPs)と総称し、その半数以上は進行性の線維化を特徴とする予後不良の特発性肺線維症(Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)が占めている[15]。IPF の発生機序として、従来は慢性炎症が想定されてきたが、現在は肺胞上皮細胞の傷害とそれに対する修復異常が主要なメカニズムと考えられている[16]。IPF において、線維化の中心的な役割を担う肺線維芽細胞の起源として、肺間質に *in situ* で存在する線維芽細胞、循環中の前駆細胞である *fibrocyte*、そして肺胞上皮細胞からの EMT による線維芽細胞の発生が想定されており[17]、TGF- β がこれらの細胞に作用することで、病巣への線維芽細胞の動員、筋線維芽細胞への分化誘導、細胞外器質の産生誘導と間質への過剰沈着、II 型肺胞上皮細胞から線維芽細胞への EMT 誘導、を引き起こすことが示されている[16]。IPF を対象とした臨床試験においても、ステロイドによる抗炎症治療の有効性は示されていない一方[18]、抗線維化薬である Pirfenidone[19]および Nintedanib[20]においては呼吸機能低下の進行抑制が証明されており、さらに Pirfenidone の作用機序の一部は TGF- β に対する抑制作用であることが示唆されている[21]。このように、IPF

の病態にも EMT[17]および TGF- β [16]が重要な役割を果たしていると考えられる。

EMT および TGF- β が病態に関与する上記呼吸器疾患に共通して認められる現象として、感染症を契機とした急性増悪が挙げられる。重症例では、急性増悪により致命的な経過をたどることも多く、臨床上大きな問題となっている。急性増悪の誘因となる病原体として、気管支喘息[22]、COPD[23]、IPF[24]いずれにおいても細菌感染が占める割合が非常に大きい現状がある。

生体内に侵入した病原微生物を迅速に認識し、病原体排除に必要な生体反応を惹起する自然免疫反応は、下気道における生体防御において非常に重要な役割を果たしている[25]。病原体由来の pathogen-associated molecular patterns; PAMPs を認識する pattern recognition receptors; PRRs は、迅速に自然免疫を誘導することで第一線の生体防御機構として機能する[26]。中でも最初に同定された PRRs である Toll-like receptors; TLRs はヒトにおいて 10 種類が同定され、各 TLRs のリガンドやその特性が明らかにされている[25, 27]。シトシンとグアニンがホスホジエステル結合された DNA 配列は CpG モチーフと言われ、特に非メチル化 CpG は細菌および一部のウイルスに認められる一方、哺乳類では見られない DNA 配列として知られている[28]。この非メチル化 CpG は TLR9 に認識され、PAMPs としての活性を有する [28-30]。今回我々が用いた CpG oligodeoxynucleotides; CpG ODN は非メチル化 CpG モチーフを含有する合成デ

オキシヌクレオチドで、自然界に存在する非メチル化 CpG DNA と同様に TLR9 に対する賦活作用を有することが示されている[31]。

先述のとおり EMT は気管支喘息におけるリモデリング、COPD、IPF の病態に深く関与していることが明らかにされてきたが、EMT がこれらの疾患における急性増悪の重要な要因である呼吸器感染症に対してどのような影響を与えるかについては明らかにされていない。そこで本研究は、上述の呼吸器疾患において EMT に密接に関与していると考えられる TGF- β で EMT 誘導したヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞を用いて、CpG ODN に対する反応性の変化を解析し、EMT による病原菌由来抗原に対する反応性変化を検討した。また、その反応性変化が TGF- β 以外の EMT 誘導因子でも認められる現象であるか否かを明らかにするため、タバコ煙抽出液(Cigarette Smoke Extract; CSE)を用いて EMT 誘導した A549 細胞についても解析した。

方法

1. 試薬

Recombinant human TGF- β 1 は PEPRO TECH 社(Rocky Hill, NJ, USA)および Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) から、ODN 2006 (B-class ODN, 5'tgctgcttttgctgcttttgctgctt3'), control ODN (5'tgctgcttttgctgcttttgctgctt3'), ODN H154 (5'cctcaagcttgagggg3'), FAM-conjugated CpG ODN は Sigma-Aldrich 社から、Phosphate buffered saline (PBS)、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)、fetal bovine serum (FBS))、alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG、alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG は Thermo Fisher Scientific 社(Waltham, MA, USA)から、D-MEM/Ham's F-12 medium、ethanol、acetone、RIPA buffer、actinomycin D は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)から、Mayer's Hematoxylin は Muto Pure Chemical Industries (Tokyo, Japan)から、プロテアーゼ阻害剤カクテルは nacalai tesque (Kyoto, Japan)から購入した。

PE-conjugated mouse anti-human E-cadherin mAb (IgG1 κ , clone 67A4)、PE-conjugated mouse anti-human vimentin mAb (IgG1, clone RV202) は BD Biosciences 社(San Jose, CA, USA)から、APC-conjugated mouse anti-human N-cadherin mAb (IgG1 κ , clone 8C11)、APC-conjugated rat anti-human TLR9 mAb (IgG2 α κ , clone eB72-1665)、APC-conjugated mouse anti-human CD14 mAb (IgG1 κ ,

clone 61D3)、PE-conjugated mouse IgG1 κ (clone P3.6.2.8.1)、APC-conjugated mouse IgG1 κ (clone P3.6.2.8.1)、および APC-conjugated rat IgG2 α κ (clone eBR2a)は eBioscience 社(San Diego, CA, USA)から、PE-Cy7-conjugated mouse anti-human CD205 mAb (IgG1 κ , clone HD30)は Miltenyi Biotec 社(Bergisch Gladbach, Germany) から、PE-Cy7-conjugated mouse IgG1 κ (clone MOPC-21)は BioLegend 社(San Diego, CA, USA)から、mouse anti-human GAPDH mAb(IgG1, clone 686613)は R&D Systems 社(Minneapolis, MN, USA)から、rabbit anti-human I κ B α mAb(IgG, clone 44D4)は Cell Signaling Technology 社(Beverly, MA, USA)から購入した。

CSE の作成は以下の手順で作成した ; 市販の紙巻タバコ(セブンスター[®], JT, Japan)からフィルターを除去し閉鎖回路に接続、着火後、1本あたり2分間かけて持続吸引し、水溶性成分を5mlのPBSに溶解した。同様の作業を2本分施行した。作成した CSE は分注後使用時まで-80 $^{\circ}$ Cで保存し、一連の実験は同一の CSE で施行した。

2.細胞と細胞培養

ヒト肺胞上皮癌由来細胞である A549 細胞を、5% FBS、100 U/ml penicillin、および 100 μ g/ml streptomycin 含有の DMEM/Ham's F-12 medium を使用し、37 $^{\circ}$ C の

5% CO₂ 含大気圧のインキュベーター内で培養した。

3.EMT の誘導

24 ウェル細胞培養プレートに 1.25×10^4 cells/well の密度で A549 細胞を播種し、5% FBS、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin および 10 ng/ml TGF- β 1 または 10% CSE 含有の DMEM/Ham's F-12 medium で 72 時間、先述と同条件のインキュベーター内で培養した。

4.細胞の形態観察

チャンバースライド II (IWAKI, Tokyo, Japan)に 1.25×10^4 cells/well の密度で A549 細胞を播種し、5% FBS、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin および 10 ng/ml TGF- β 1 または 10% CSE 含有の DMEM/Ham's F-12 medium で 72 時間、先述と同条件下のインキュベーター内で培養した。その後上清を吸引、acetone で 2 分間固定し、PBS に続き純水で洗浄後、Mayer's Hematoxylin に 1 分間浸して核染色した。水道水で 5 分間洗浄し、封入した後に光学顕微鏡 BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan)で観察、撮影した。

5.フローサイトメトリーによる解析

5-1. E-cadherin、N-cadherin の細胞表面発現

先述の条件下で EMT 誘導した A549 細胞および EMT 誘導しなかった A549 細胞 1×10^5 cells を FACS buffer (3% FBS 含有 PBS) で洗浄し、ヒトモノクローナル IgG 1 $\mu\text{g/ml}$ で 15 分間ブロッキングした後、PE-conjugated mouse anti-human E-cadherin mAb 25 $\mu\text{g/ml}$ および APC-conjugated mouse anti-human N-cadherin mAb 25 $\mu\text{g/ml}$ 、または同濃度の isotype control 抗体を含んだ FACS buffer に懸濁して氷上で 30 分間インキュベートした。FACS buffer で洗浄後、再懸濁して FACSVerse (BD Biosciences) で測定した。各サンプルは少なくとも 10,000 カウントのデータを測定した。ドットプロットおよびヒストグラムの解析には FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR) を用いた。

5-2. CD14、CD205 の細胞表面発現

先述の条件下で EMT 誘導した A549 細胞および EMT 誘導しなかった A549 細胞 1×10^5 cells を FACS buffer (3% FBS 含有 PBS) で洗浄し、ヒトモノクローナル IgG 1 $\mu\text{g/ml}$ で 15 分間ブロッキングした後、APC-conjugated mouse anti-human CD14 mAb 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、PE-Cy7-conjugated mouse anti-human CD205 mAb 10 $\mu\text{g/ml}$ 、または同濃度の isotype control 抗体を含んだ FACS buffer に懸濁して氷上で 30 分間インキュベートした。FACS buffer で洗浄後、再懸濁して FACSVerse (BD

Biosciences)で測定した。FACS buffer で洗浄後、再懸濁して先述と同様の方法で測定、解析した。

5-3. TLR9、vimentin の細胞内発現

先述の条件下で EMT 誘導した A549 細胞および EMT 誘導しなかった細胞 1×10^5 cells を FACS buffer で洗浄し、ヒトモノクローナル IgG $1 \mu\text{g/ml}$ で 15 分間ブロッキングした後、Fixation/Permeabilization Solution (BD Biosciences)を用いて氷上で 20 分間インキュベートして固定、透過処理した。細胞を FACS buffer で洗浄後、APC-conjugated rat anti-human TLR9 mAb $20 \mu\text{g/ml}$ 、PE-conjugated mouse anti-human vimentin mAb $25 \mu\text{g/ml}$ 、または同濃度の isotype control 抗体を含んだ Perm/Wash buffer (BD Biosciences) に懸濁し氷上で 30 分間インキュベートした。Perm/Wash buffer 、FACS buffer で洗浄後、FACS buffer で再懸濁して先述と同様の方法で測定、解析した。

5-4. CpG の細胞内取り込み

先述の条件下で EMT 誘導した A549 細胞および EMT 誘導しなかった細胞を FAM-conjugated CpG ODN $10 \mu\text{g/ml}$ または同濃度の unconjugated CpG ODN を含む D-MEM/Ham's F-12 medium で、遮光した上で先述と同条件のインキュベーター内で 24 時間培養した。細胞 1×10^5 cells を FACS buffer で洗浄後、再懸濁して同様に測定、解析した。

6.上清中サイトカイン濃度の測定

6-1.濃度依存性の解析

先述の条件下で EMT 誘導した A549 細胞および EMT 誘導しなかった A549 細胞を、上清除去の上 HBSS で洗浄後、CpG ODN 1、3、10、30 $\mu\text{g/ml}$ 、control ODN 30 $\mu\text{g/ml}$ の各条件で 48 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を Cytometric Bead Assay; CBA(BD Biosciences, 測定感度 10-2500 pg/ml)で測定した。検体は測定感度内に入るよう必要に応じて希釈後測定し、希釈倍率をかけ戻して希釈前濃度を算出した。上清は測定まで-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

6-2.時間依存性の解析

同様に EMT 誘導した A549 細胞および EMT 誘導しなかった A549 細胞を、上清除去の上 HBSS で洗浄後、CpG ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ 、control ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ の各条件で 6、12、24、48 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を CBA で測定した。上清は測定まで-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

6-3.TLR9 の阻害実験

同様に EMT 誘導し上清除去の上 HBSS で洗浄した A549 細胞を、CpG ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ 単独、または CpG ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ と TLR9 の特異的な suppressive ODN である ODN H154 1、3、10、30、100 $\mu\text{g/ml}$ 併用で 24 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を CBA で測定した。上清は測定まで-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

6-4.NFκB、MAP キナーゼ経路の阻害実験

96 ウェル細胞培養プレートに 5×10^3 cells/well の密度で A549 細胞を播種し、5% FBS、100 U/ml penicillin、100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin および 10 ng/ml TGF- β 1 含有の DMEM/Ham's F-12 medium で 72 時間培養した。上清除去、HBSS で洗浄後、control ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ 、CpG ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ 、または CpG ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ + BAY11-7082 5 μM 、SP600125 10 μM 、SB203580 10 μM 、U0126 10 μM の各条件で 24 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を CBA で測定した。上清は測定まで -80°C で保存した。

7. Real-time quantitative PCR

先述の条件下で EMT 誘導した A549 細胞および EMT 誘導しなかった A549 細胞を、CpG ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ または control ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ で 4 時間刺激した後、これらの細胞から total RNA を抽出した。mRNA 安定性の解析は、同様にして EMT 誘導した A549 細胞を CpG ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ または control ODN 10 $\mu\text{g/ml}$ で 4 時間刺激した後、actinomycin D 10 $\mu\text{g/ml}$ を添加して転写を停止させ、actinomycin D 投与前、投与後 30 分、90 分に total RNA を抽出した。Total RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてプロトコールに従い施行した。抽出した total RNA 中に含まれる mRNA から cDNA への逆転写を iScript cDNA

Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いてプロトコール通りに施行した。Real-time PCR には Thermo Fisher Scientific 社作成の primers および Taqman probes を使用し、レファレンス遺伝子を β -actin として $\Delta\Delta C_t$ 法で相対定量した。Relative quantitation (RQ)値は次の計算式で算出した： $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

8. Western blot analysis

6 ウェル細胞培養プレートに、培養時間が 24 時間の場合は 4×10^5 cells/well、48 時間の場合は 2×10^5 cells/well、72 時間の場合は 1×10^5 cells/well の密度で A549 細胞を播種し、細胞を各条件で刺激後、lysis buffer (RIPA buffer にプロテアーゼ阻害剤カクテルをプロトコール通りに添加)で溶解し、測定まで -80°C で保存した。泳動前に TaKaRa BCA Protein Assay Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)でタンパク濃度を測定し、各サンプル中のタンパク濃度を統一した。各サンプルを SDS 化、還元熱処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を施行した後、ウェット式で polyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写した(XCell SureLock™ミニセル電気泳動システム, Thermo Fisher Scientific)。ブロッキング、および抗体の希釈には Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan)を用い、各抗体の希釈濃度は推奨プロトコール通りに行った。Novex™ AP Chemiluminescent Substrate (CDP-Star™) (Thermo Fisher Scientific)で化学発光し、

Amersham Imager 600 (GE Healthcare Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)で撮影した。

9.統計解析

連続変数の二群間比較は対応なしの両側 t 検定で、多群間比較は分散分析後に Tukey 検定で評価し、統計学的有意差は $P < 0.05$ とした。mRNA 安定性の解析は、各群の Area Under Curve; AUC で評価した。統計解析ソフトは GraphPad Prism (Version 5; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を使用した。すべての実験は少なくとも 3 回は施行し、データの表示は平均値 \pm 標準偏差で示した。

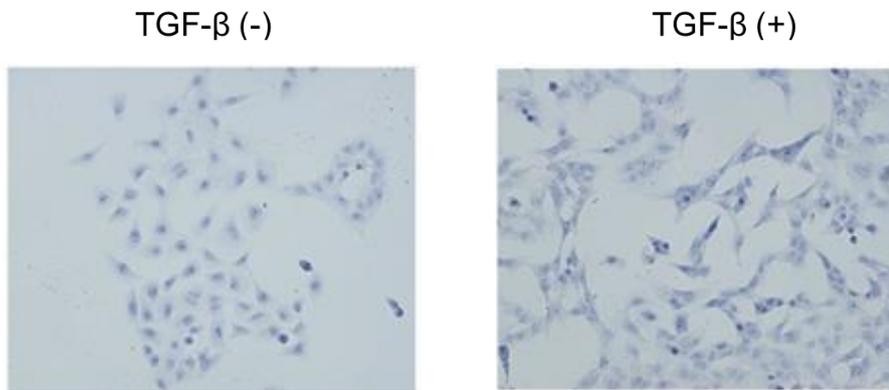
結果

TGF- β 1 による EMT の誘導

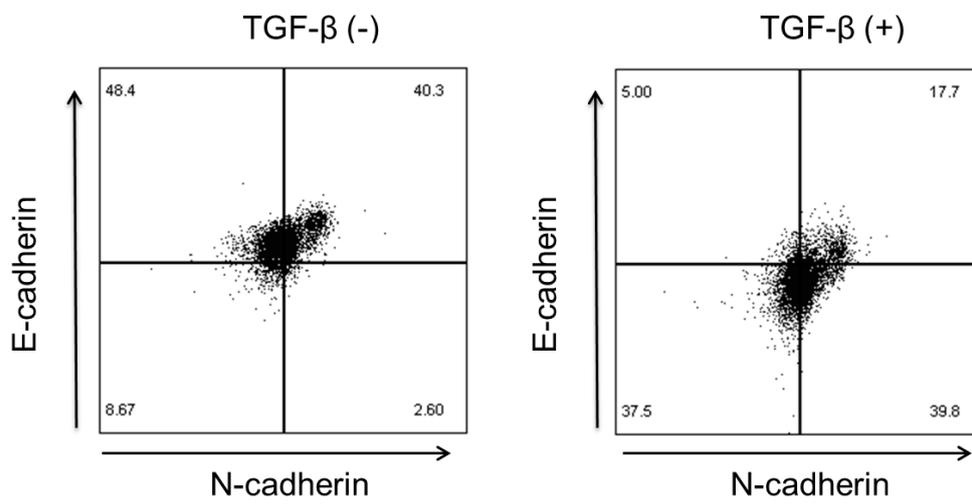
TGF- β 1 を用いた *in vitro* での EMT 誘導は A549 細胞において既に確立されているため[10]、本研究も TGF- β 1 と A549 細胞を用いて実験を行った。A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で 72 時間培養すると、A549 細胞は細胞極性の喪失、周囲細胞との接着の減弱、紡錘状の形態を示し、間葉系の特性を示した(Fig. 1A)。また、フローサイトメトリーで細胞表面の E-cadherin および N-cadherin の発現を解析したところ、上皮系マーカーである E-cadherin[10,32,33]の発現が低下し、間葉系マーカーである N-cadherin[10,33]の発現が増強した(Fig. 1B)。さらに、E-cadherin 低値かつ N-cadherin 高値の細胞の割合は有意に増加していた(Fig. 1C)。これらの結果から、本実験系においても先行文献[10]と同様に EMT が誘導されていると考えられた。

Figure 1

A)



B)



C)

E-cadherin-low and N-cadherin-high cells

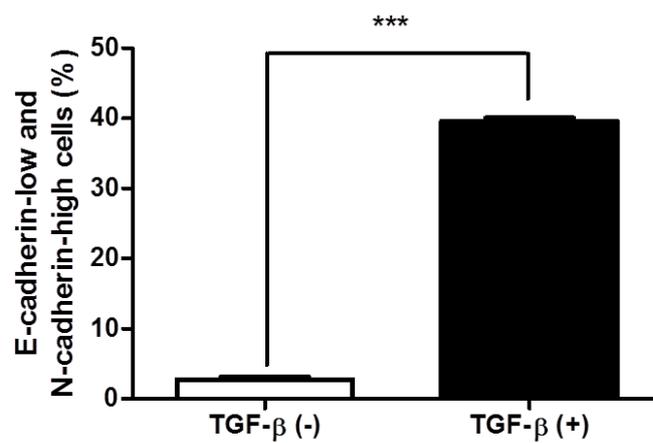


Figure 1. TGF- β 1 による EMT の誘導

A: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml の有無別に 72 時間培養し、Mayer's Hematoxylin で核染色した後、光学顕微鏡で形態学的変化を観察した(X40)。

B: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml の有無別に 72 時間培養した後、PE-conjugated anti-E-cadherin 抗体および APC-conjugated anti-N-cadherin 抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。代表的な二次元ドットプロットを示す(n=3)。E-cadherin と N-cadherin の発現量の高低別に 4 分画に分けた。数字は各分画に属する細胞数の全細胞数に対するパーセンテージを示す。

C: E-cadherin 低値かつ N-cadherin 高値の細胞の割合を Figure 1B の分画を基に計測した。

エラーバーは標準偏差(n = 3)を示す。

*** P<0.001

EMT 誘導による CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答の亢進

次に、EMT 誘導による CpG ODN 刺激への反応性の変化を検討した。

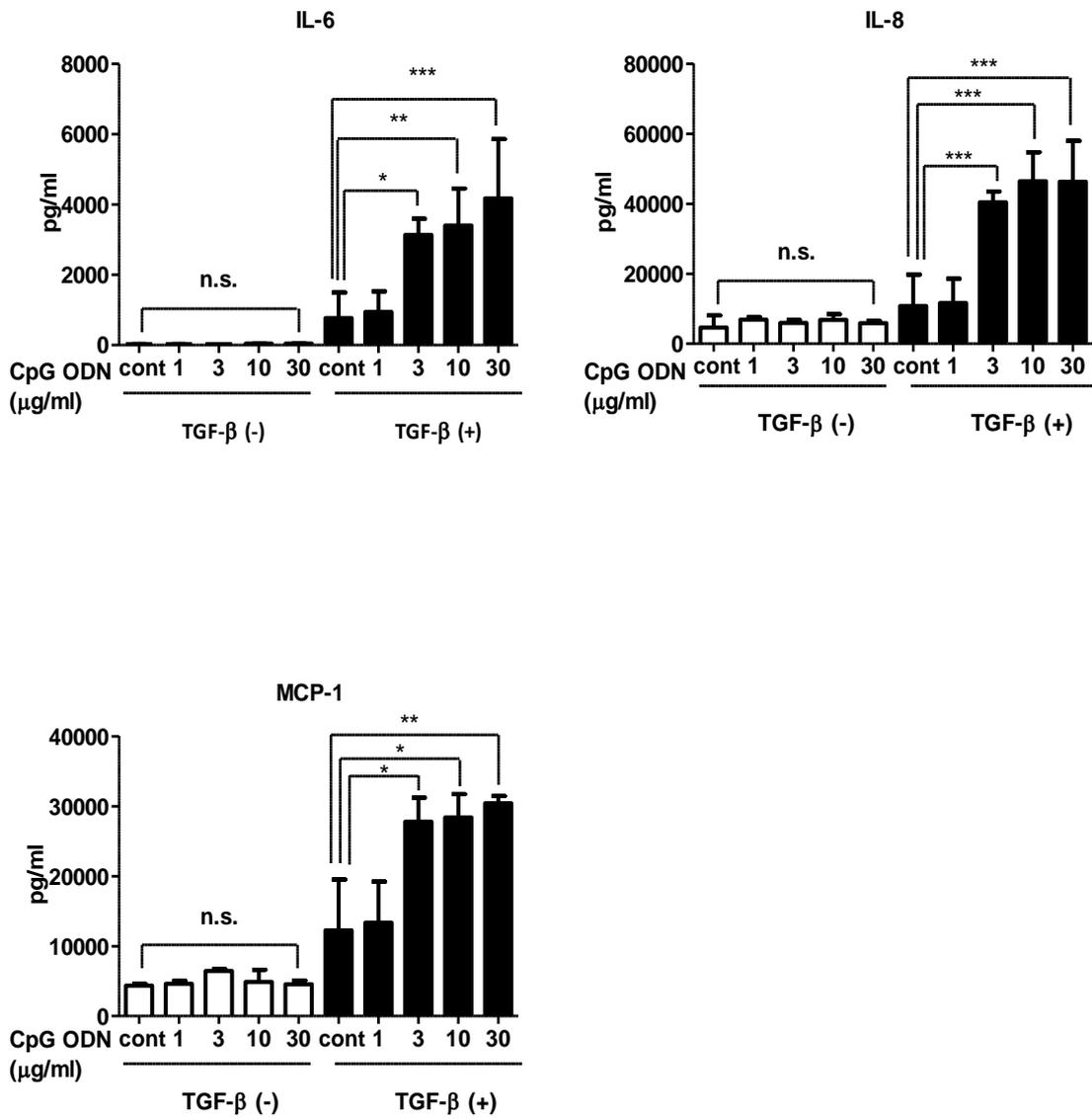
先述と同様に EMT 誘導した A549 細胞: EMT(+)群を CpG ODN で刺激したところ、IL-6、IL-8、MCP-1 の産生が有意に増加した(Fig. 2A)。一方、EMT 誘導のない群: EMT(-)群では CpG ODN 刺激によるこれらのサイトカインの有意な産生増加は認められなかった(Fig. 2A)。CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生は時間依存的に増加し、control ODN との差は刺激 48 時間後まで継時的に拡大した(Fig. 2B)。同様に IL-6、IL-8、MCP-1 の mRNA レベルでの発現量も、EMT(+)群で CpG ODN 刺激 4 時間後には有意に増強した(Fig. 2C)。一方、EMT(-)群では有意な増強は認められなかった(Fig. 2C)。

統計学的有意ではなかったものの、EMT 誘導のみでベースラインのサイトカイン産生が増加傾向であった(Fig. 2A,C)。TGF- β 1 処理と CpG ODN 刺激の interaction はいずれのサイトカインについても統計学的有意であり (Fig. 2A, $P < 0.001$) (Fig. 2C, $P < 0.01$)、EMT 誘導によるベースラインのサイトカイン産生増加を考慮に入れたとしても、EMT 誘導と CpG ODN 刺激の間には有意な相乗効果が認められると考えられた。

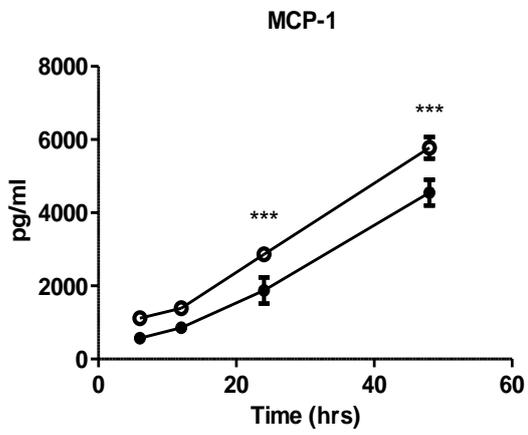
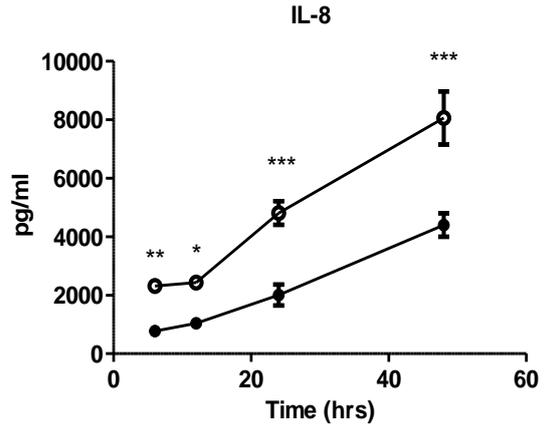
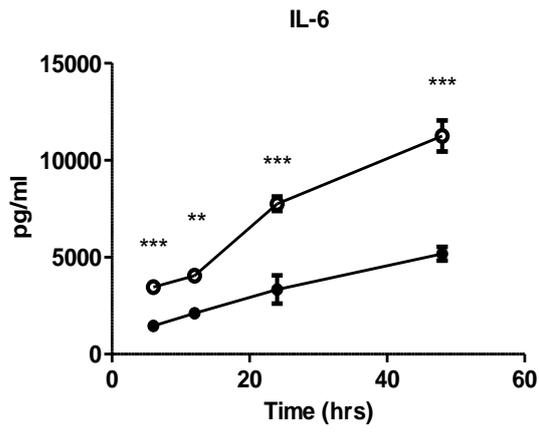
以上の結果から、EMT 誘導により CpG ODN 刺激に対する IL-6、IL-8、MCP-1 の産生応答が亢進すると考えられた。

Figure 2

A)



B)



C)

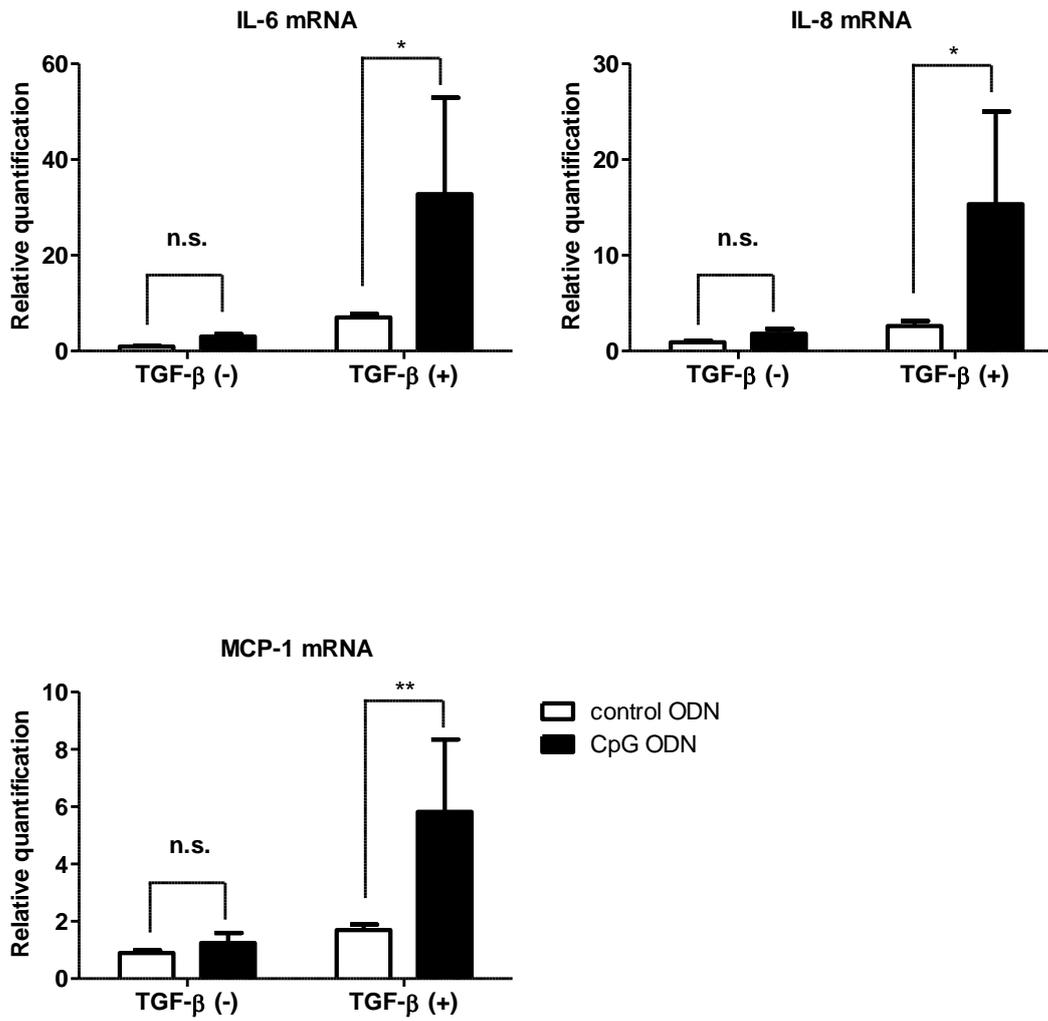


Figure 2. EMT 誘導による CpG ODN 刺激に対する IL-6、IL-8、MCP-1 の産生応答の変化

A: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml の有(■)無(□)別に 72 時間培養した後、図中に示す各濃度の CpG ODN で 48 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を測定した。

エラーバーは標準偏差(n = 3)を示す。

cont, control ODN; n.s., not significant

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

B: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で 72 時間培養した後、CpG ODN (○) 10 μ g/ml または control ODN (●) 10 μ g/ml で 6、12、24、48 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を測定した。

エラーバーは標準偏差(n = 4)を示す。

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. control ODN

C: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml の有無別に 72 時間培養した後、CpG ODN (■) 10 μ g/ml または control ODN (□) 10 μ g/ml で 4 時間刺激し、IL-6、IL-8、MCP-1 の mRNA 発現量を測定した。

エラーバーは標準偏差(n = 4)を示す。

n.s., not significant

*P<0.05; **P<0.01

ODN H154 による EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答の抑制

TLR9 は CpG DNA および CpG モチーフを含有する CpG ODN の受容体として機能し、免疫応答を引き起こすことが知られている[27-31]。前項で認められた EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答亢進における TLR9 の関与を確認するため、TLR9 の特異的な suppressive ODN である ODN H154[34, 35]を用いて阻害実験を行った。ODN H154 の添加により、EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対する IL-6、IL-8、MCP-1 の産生応答亢進は著明に抑制された(Fig. 3)。

これらの結果から、EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答亢進は TLR9 を介しており、TLR9 は EMT 誘導後 CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生においても必須のレセプターであると考えられた。

Figure 3

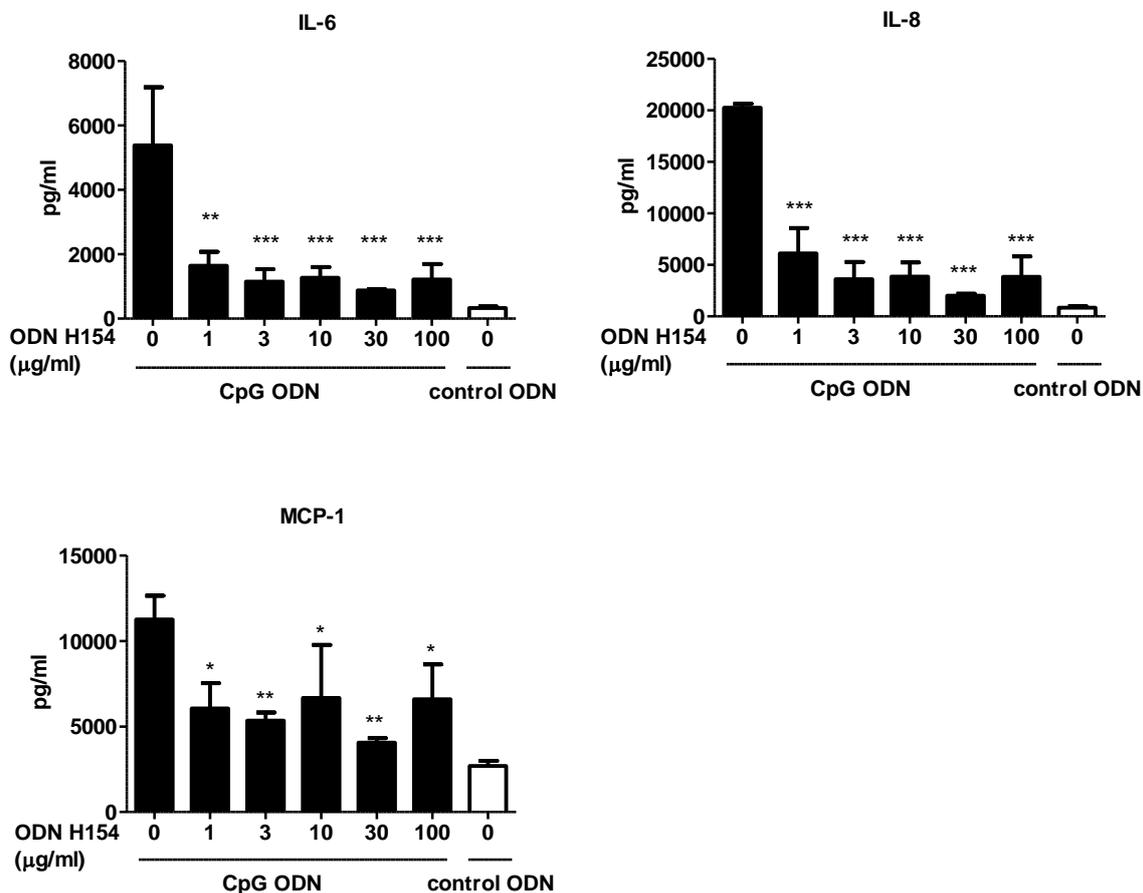


Figure 3. ODN H154 による EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答亢進の抑制

TGF-β1 で EMT 誘導後、図中に示した各濃度の ODN H154 と共に CpG ODN 10 µg/ml または control ODN 10 µg/ml で 24 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を測定した。

エラーバーは標準偏差(n = 3)を示す。

n.s., not significant

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. cells stimulated with CpG ODN but without ODN H154

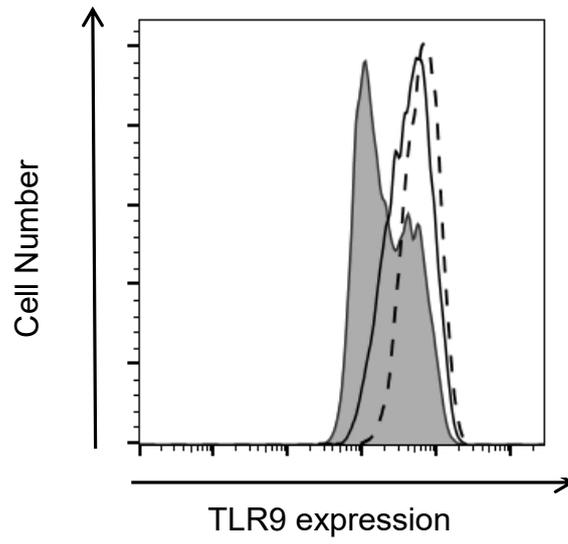
EMT 誘導による A549 細胞の TLR9 発現レベルの変化

前項で、EMT 誘導による CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答亢進の機序として、TLR9 が必須であることが明らかになったため、EMT 誘導による A549 細胞の TLR9 発現レベルの変化を検討した。TLR9 は細胞内エンドソームに存在しているため[30]、特異抗体による細胞内染色を行いフローサイトメトリーで測定した。

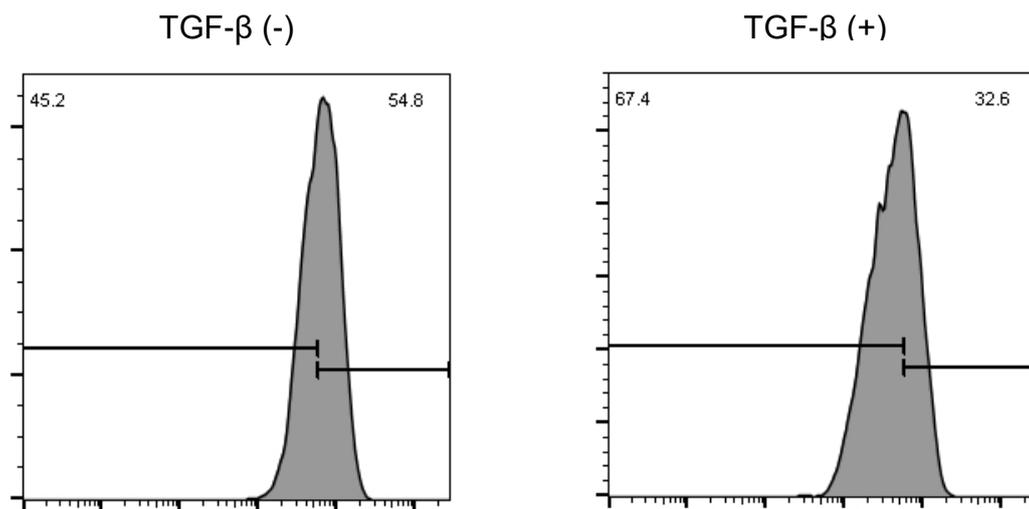
予想に反し、EMT 誘導した A549 細胞において、EMT 誘導しなかった A549 細胞と比べ TLR9 の発現レベルが軽度ではあるものの有意に低下していた(Fig. 4A-C)。また、mRNA レベルでの TLR9 発現量も TGF- β 1 刺激 48 時間の時点で有意に低下していた(Fig. 4D)。以上の結果から、TLR9 は EMT 誘導後 CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生応答において必須の要素であるにもかかわらず、EMT 誘導によりその発現が蛋白および mRNA レベルで低下することが明らかになった。

Figure 4

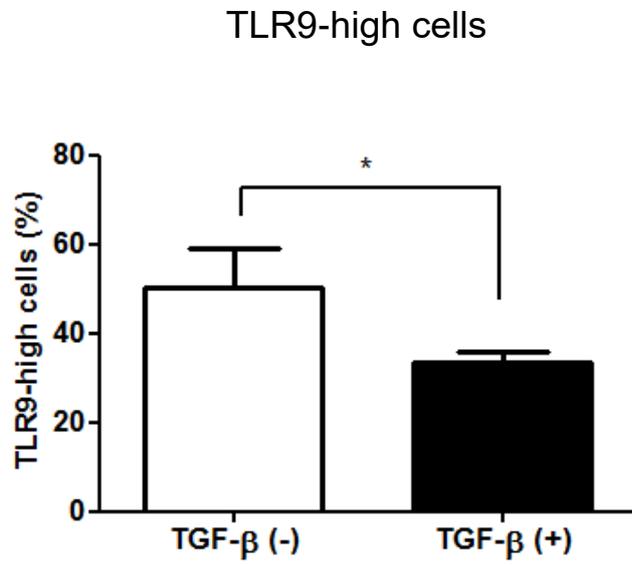
A)



B)



C)



D)

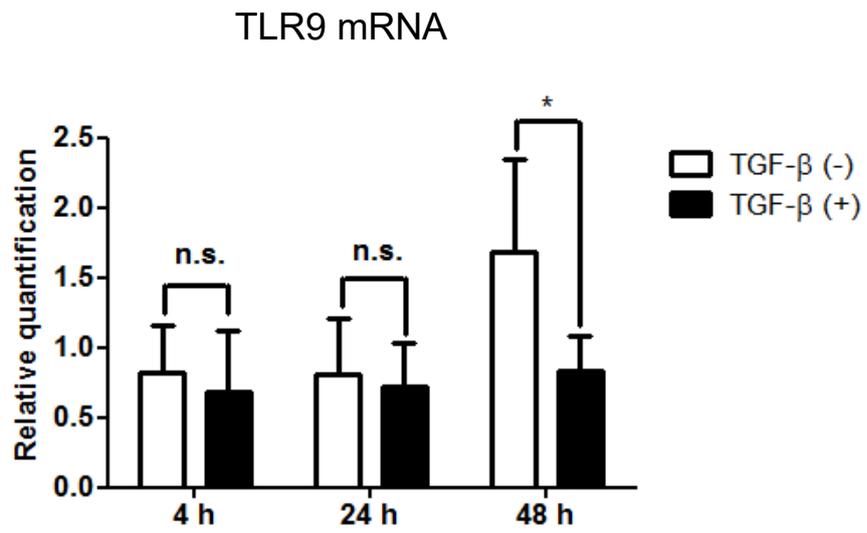


Figure 4. EMT 誘導による TLR9 発現の変化

A: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml 有(実線)無(破線)別に 72 時間培養後、固定・透過処理し APC-conjugated anti-TLR9 抗体で染色して、フローサイトメトリーで測定した。代表的なヒストグラムを図示する(n=3)。陰影部分はコントロール抗体で染色した細胞群を示す。

B: Fig. A のヒストグラムを TGF- β 1 の有無別に表示し、TLR9 を高発現している細胞群をゲートした。数字は各ゲートに属する細胞数の総細胞数に対するパーセンテージを示す。

C: Fig. B でゲートした TLR9 高発現細胞群のパーセンテージの平均を示す。エラーバーは標準偏差(n = 4)を示す。

*P<0.05

D: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml 有(■)無(□)別に 4、24、48 時間培養後、total RNA を抽出し、Real time PCR で TLR9 の mRNA 発現量を相対定量した。エラーバーは標準偏差(n = 3-6)を示す。

n.s., not significant

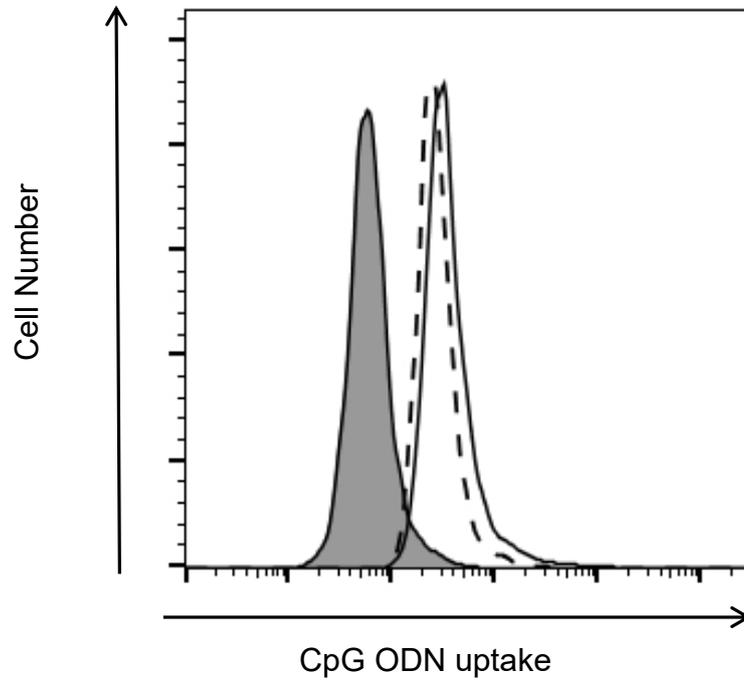
*P<0.05

EMTによる CpG ODN の A549 細胞内取り込みの亢進

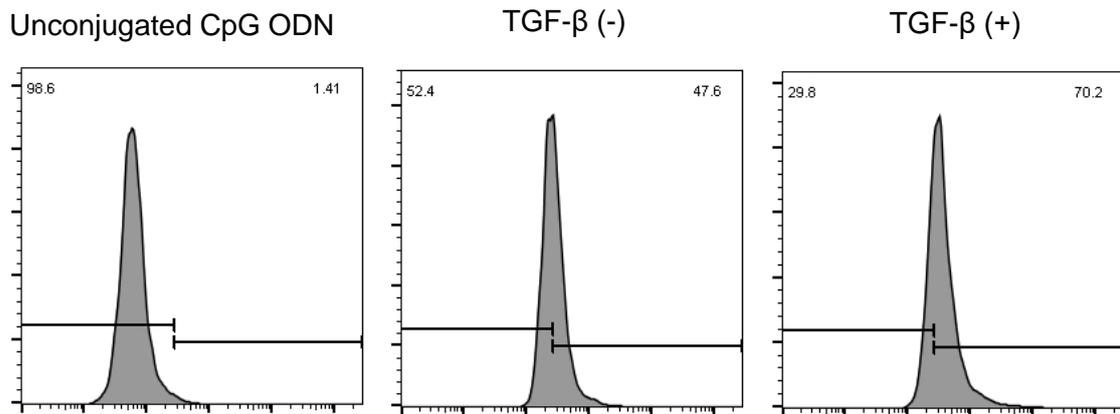
EMT 誘導により A549 細胞の TLR9 発現レベルは亢進せずむしろ低下していたことから、EMT 誘導後 CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生応答には別の機序が関与することが推測された。TLR9 は細胞内エンドソームに存在しているため、CpG ODN による TLR9 の活性化には CpG ODN のエンドサイトーシスとエンドソームへの輸送が必要となる[36]。そこで、EMT 誘導による CpG ODN の A549 細胞内取り込みを解析したところ、Figure 5 に示すとおり EMT 誘導により CpG ODN の取り込みが有意に亢進していた。

Figure 5

A)



B)



C)

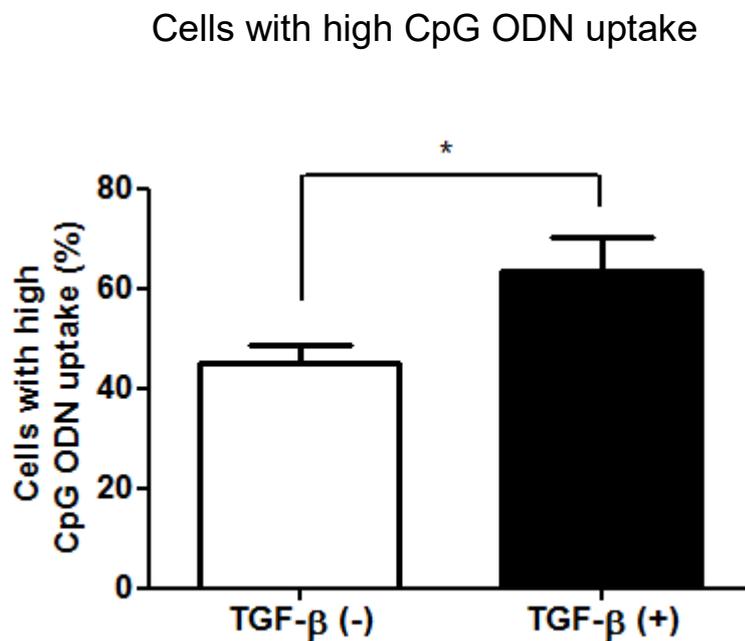


Figure 5. EMT 誘導による CpG ODN の A549 細胞内取り込みの亢進

A: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml 有(実線)無(破線)別に 72 時間培養後、FAM-conjugated CpG ODN 10 μ g/ml と共に 24 時間培養し、フローサイトメトリーで測定した。代表的なヒストグラムを図示する(n=3)。陰影部分は unconjugated CpG ODN 10 μ g/ml と共に 24 時間培養した細胞群を示す。

B: Fig. A のヒストグラムを別個に表示し、CpG の取り込みが高い細胞群をゲートした。数字は各ゲートに属する細胞のパーセンテージを示す。

C: Fig. B でゲートした CpG 取り込み高値の細胞群のパーセンテージの平均を示す。

エラーバーは標準偏差(n = 3)を示す。

*P<0.05

EMT 誘導による A549 細胞の CD14、CD205 の発現レベルの変化

CpG ODN の細胞内への取り込みに関与する受容体として、CD14[37]、CD205[38]、mannose receptor/CD206[36]が報告されている。そこで、前項で見られた EMT 誘導による CpG ODN の取り込み亢進に、これらの受容体発現レベルの変化が関係している可能性を考え、EMT 誘導の有無によるこれら受容体の発現レベルを解析した。

CD206 は TGF- β 1 刺激の有無にかかわらず mRNA レベルでの発現が認められなかったため、蛋白レベルでの解析は行わなかった。EMT 誘導の有無による CD14 と CD205 の細胞表面発現の変化をフローサイトメトリーで測定した。Figure 6 に示すとおり、CD14 の細胞表面発現は感度以下であり、CD205 の細胞表面発現は EMT 誘導の有無により変化しなかった。

Figure 6

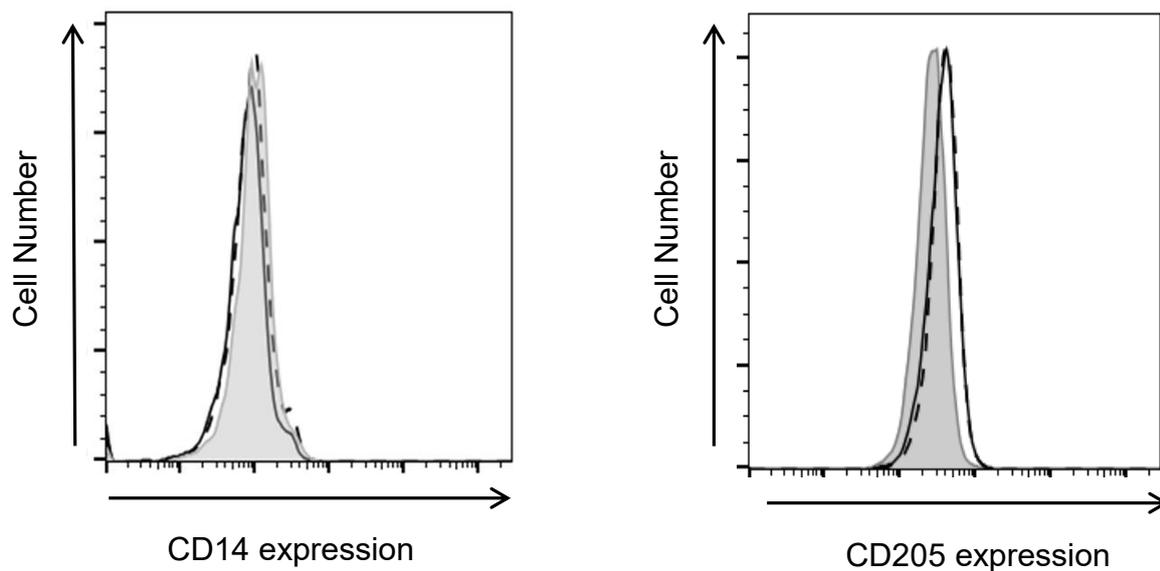


Figure 6. EMT 誘導による CD14、CD205 の A549 細胞表面発現レベルの変化

A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml 有(実線)無(破線)別に 72 時間培養後、APC-conjugated mouse anti-human CD14 抗体、PE-Cy7-conjugated mouse anti-human CD205 抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。代表的なヒストグラムを図示する(n=3)。陰影部分はコントロール抗体で染色した細胞群を示す。

EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答における

NFκB および MAP キナーゼ経路の関与

NFκB は今回我々が測定したサイトカインいずれの発現にも関与する転写因子であることから[39-41]、EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答における NFκB の関与について検討した。NFκB の特異的阻害である BAY11-7082[42]を使用し阻害実験を行ったところ、EMT 誘導後 CpG ODN 刺激による IL-6、IL-8、MCP-1 の産生はいずれも BAY11-7082 添加により有意に抑制され(Fig. 7A)、EMT 誘導後 CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生は NFκB 依存的であると考えられた。

NF-κB の他、TLR9 の下流シグナルとして MAP キナーゼ経路が知られており[43]、TGF-β の非古典経路も MAP キナーゼ経路を活性化することから[16]、代表的な MAP キナーゼ経路である JNK 経路、p38 経路、および ERK 経路の関与についても検証した。JNK、p38 MAPK、MEK1/2 に対する特異的阻害剤である SP600125[44]、SB203580[45]、U0126[46]を使用して阻害実験を行ったところ、IL-6 と MCP-1 の産生は JNK 経路の阻害で部分的に低下する傾向が見られ、p38 経路の阻害で有意に低下したが、IL-8 の産生はこれらの経路の阻害で抑制されず、ERK 経路の阻害で部分的に低下する傾向が見られた(Fig. 7B)。

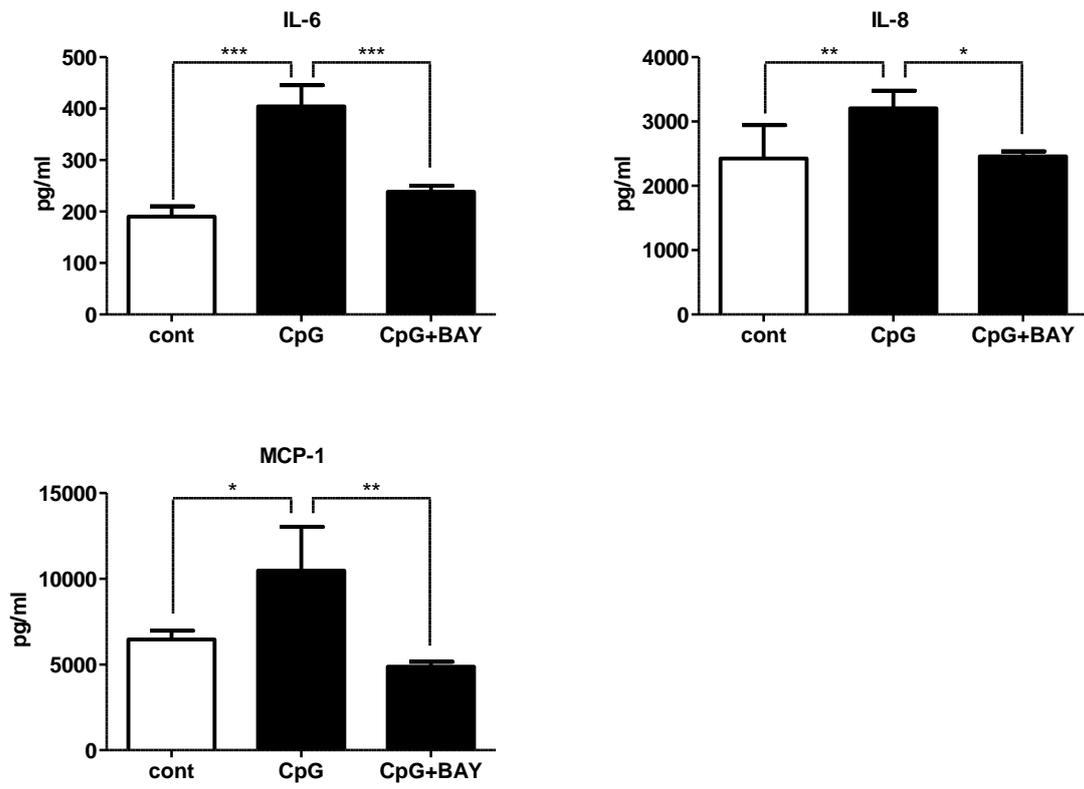
続いて、NF-κB の核内移行・転写活性の阻害因子である IκBα の発現量が、TGF-β1 によりどのように影響を受けるかを、Western blot analysis で解析した。IκBα の発現量は TGF-β1 刺激により有意に低下し(Fig. 7C)、TGF-β1 によるペー

スラインでのサイトカイン産生亢進は、I κ B α の発現量低下による NF- κ B の活性化によるものと考えられた。一方、TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞に CpG ODN 刺激を加えても、I κ B α の発現量に変化は見られなかった(Fig. 7D)。

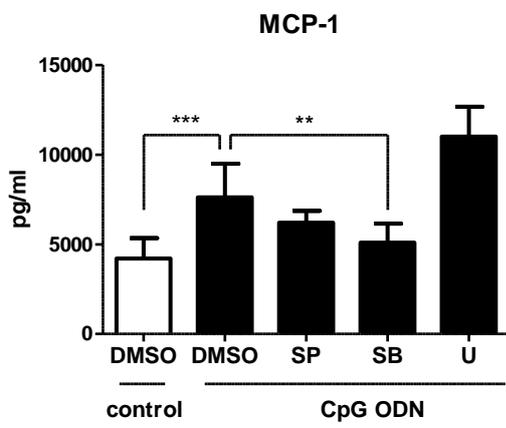
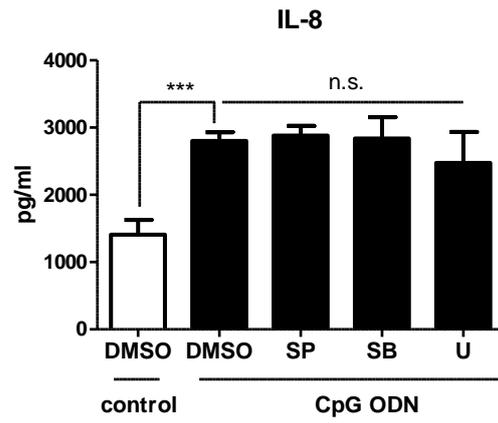
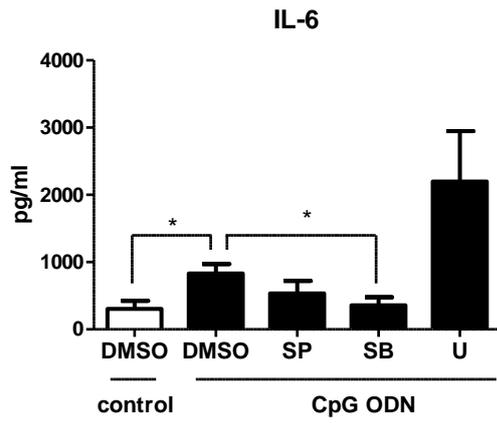
以上の結果から、NF- κ B は IL-6、IL-8、MCP-1 いずれの産生にも関与しており、TGF- β 1 は NF- κ B を活性化しベースラインのサイトカイン産生を亢進させることが明らかになった。一方、CpG ODN の下流シグナルについては明らかにならず、IL-6、IL-8、MCP-1 いずれの産生にも共通して関与する MAP キナーゼ経路は認められなかった。

Figure 7

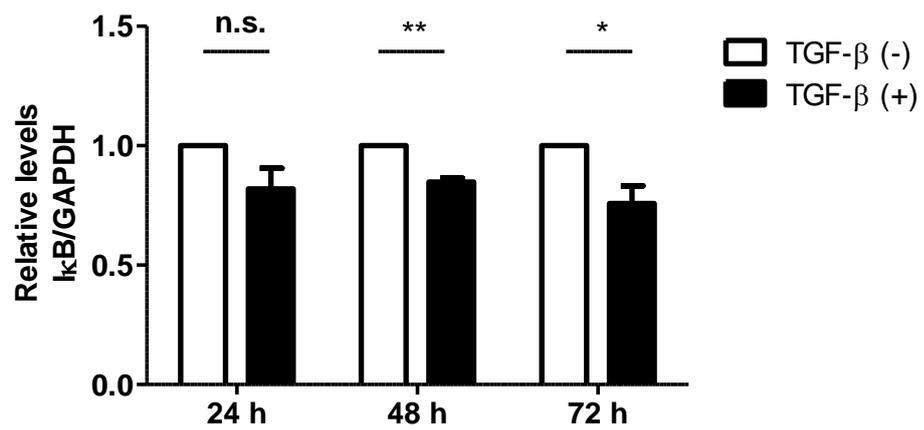
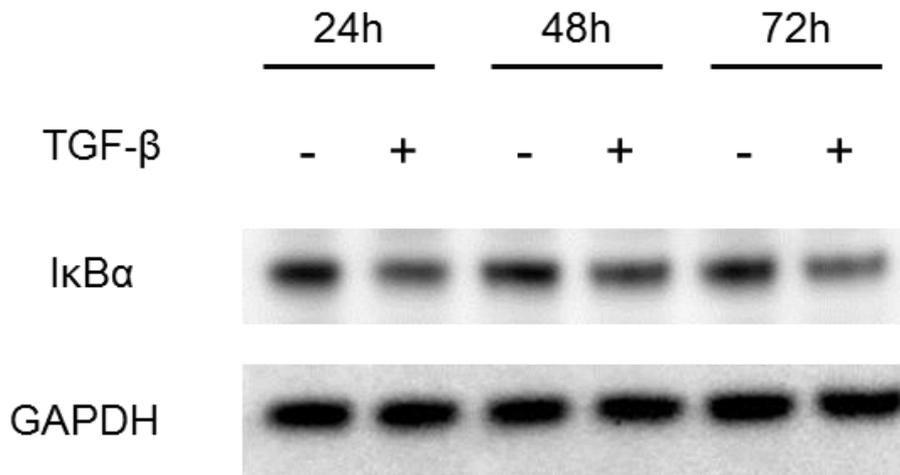
A)



B)



C)



D)

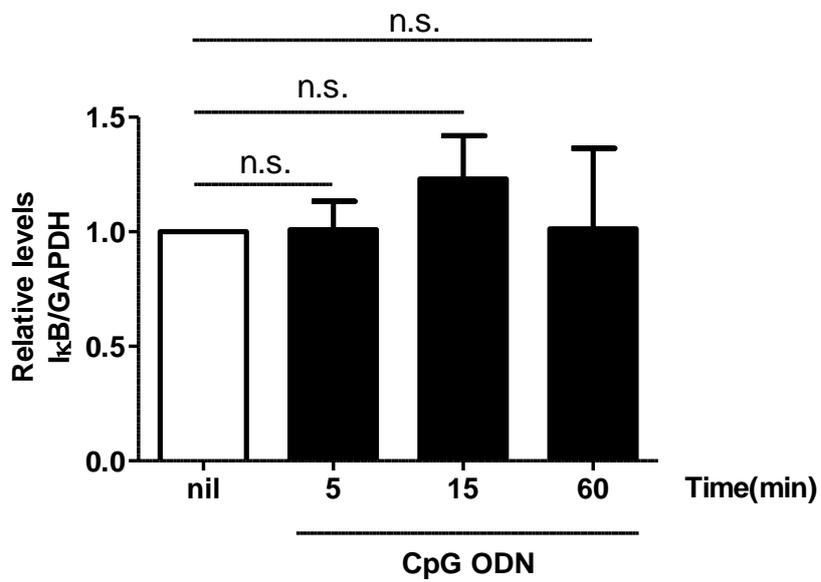
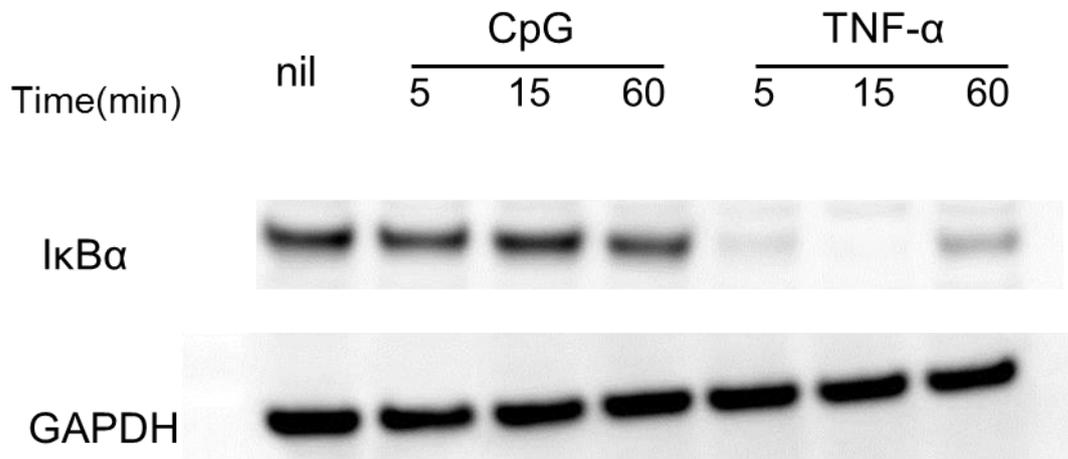


Figure 7. EMT 誘導後 A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答における NF κ B および MAP キナーゼ経路の関与

A: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で 72 時間培養した後、図中に示す各条件下で 24 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を測定した。

エラーバーは標準偏差(n=3-6)を示す。

cont, control ODN; CpG, CpG ODN; BAY, BAY11-7082

n.s., not significant; **P<0.01; ***P<0.001 vs. cells stimulated with control ODN

B: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で 72 時間培養した後、図中に示す各条件下で 24 時間刺激し、上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を測定した。

エラーバーは標準偏差(n=3-9)を示す。

cont, control ODN; CpG, CpG ODN; SP, SP600125; SB, SB203580; U, U0126

C: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で継時的に刺激した後、whole cell lysate を回収し、I κ B α の発現を Western blot analysis で解析した。I κ B α のバンドシグナルを GAPDH で標準化した後、TGF- β 1 無刺激に対する相対値で図示した。

エラーバーは標準偏差(n=3-6)を示す。

n.s., not significant; *P<0.05; **P<0.01

D: A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で 72 時間培養し、CpG ODN 10 μ g/ml または陽性コントロールとして TNF- α 10 ng/ml で 5、15、60 分間刺激した後、whole cell lysate を回収し、I κ B α の発現を Western blot analysis で解析した。I κ B α のバンドシグナルを GAPDH で標準化した後、無刺激に対する相対値で図示した。

エラーバーは標準偏差(n=4)を示す。

n.s., not significant

CpG ODN による mRNA 安定化への影響

CpG ODN が炎症性サイトカイン産生を誘導する別の機序として、炎症性サイトカインの mRNA 安定化が報告されているため[47]、EMT 誘導後の A549 細胞における作用を検討した。TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞に actinomycin D を添加し転写を停止させた後、IL-6、IL-8、MCP-1 の mRNA 発現量を測定したところ、mRNA の継時的な減少は CpG ODN により有意な影響を受けなかった (Fig. 8) (AUC 平均 \pm 標準偏差/ Control ODN vs. CpG ODN: IL6 34.8 \pm 3.4 vs. 40.9 \pm 11.2, IL-8 48.7 \pm 13.6 vs. 57.6 \pm 5.5, MCP-1 71.0 \pm 14.7 vs. 80.6 \pm 5.6)。これらの結果から、EMT 誘導後の A549 細胞において CpG ODN は mRNA の安定性に影響を与えないと考えられた。

Figure 8

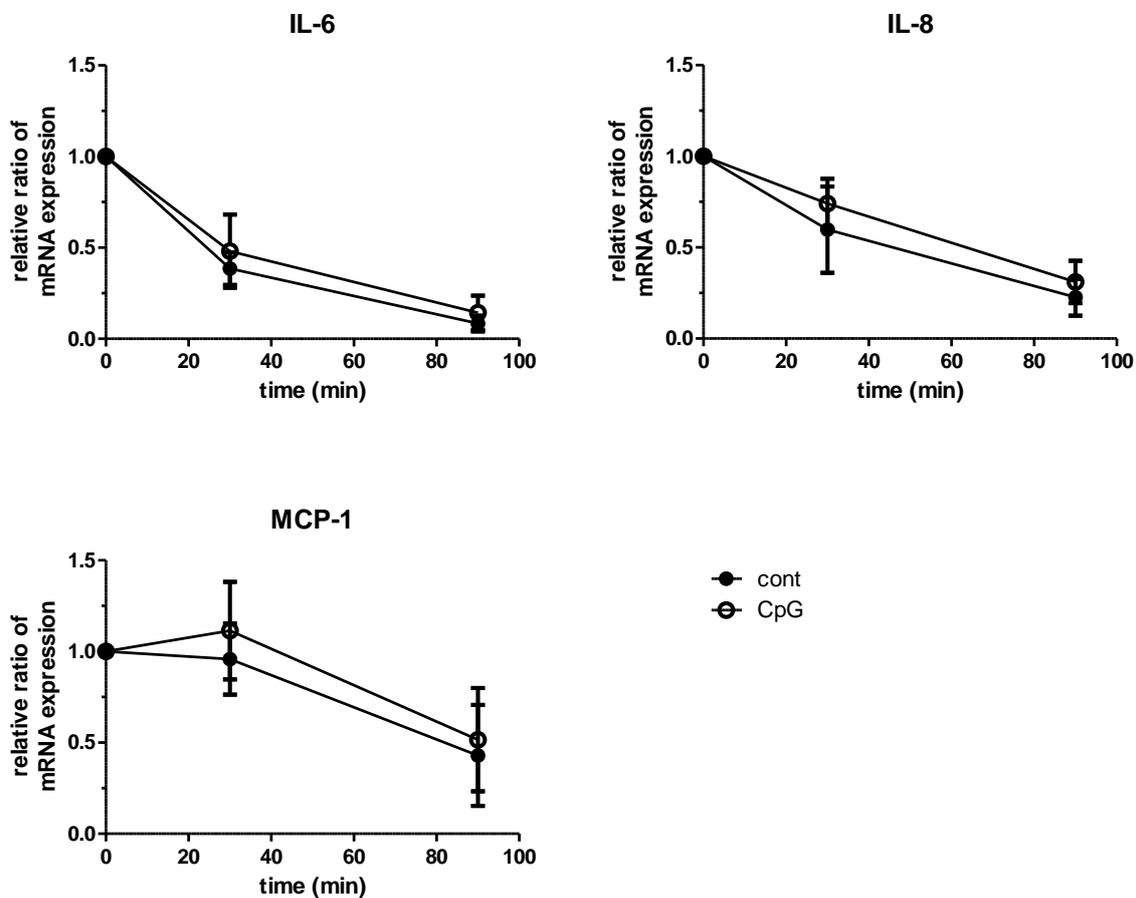


Figure 8. CpG ODN による mRNA 安定化への影響

A549 細胞を TGF- β 1 10 ng/ml で 72 時間培養した後、CpG ODN 10 μ g/ml で 4 時間刺激した。続いて、actinomycin D 10 μ g/ml の添加により転写を阻害した 30 分、および 90 分後に total RNA を抽出し、real time PCR で IL-6、IL-8、MCP-1 の mRNA 発現量を相対定量した。Control ODN (●)と CpG ODN (○)ごとに、0 分時点の mRNA 発現量に対する相対値で示した。エラーバーは標準偏差(n = 3)を示す。

CSE による A549 細胞の EMT 誘導と CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生

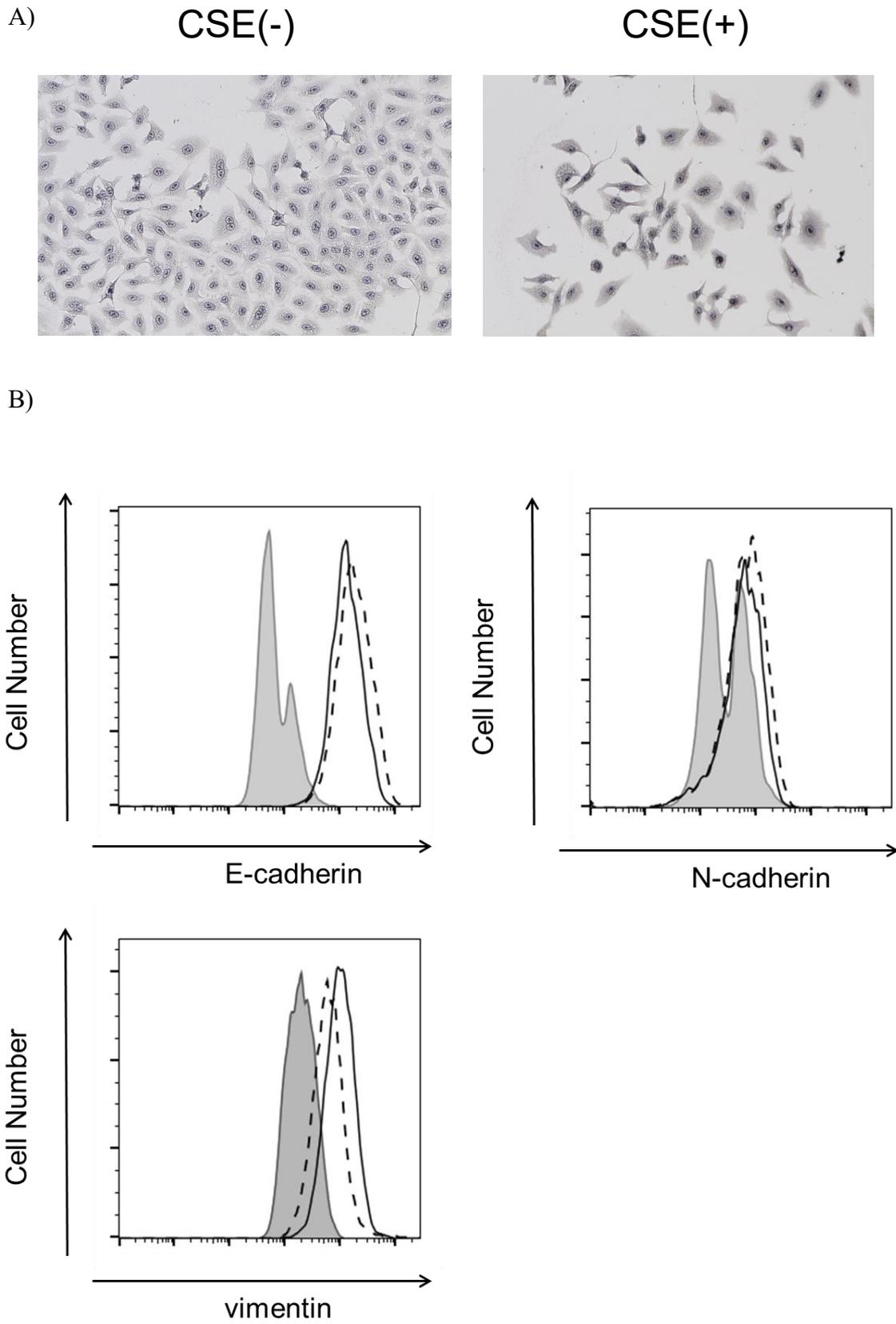
応答の変化

CSE は A549 細胞およびヒト気道上皮細胞に TGF- β signaling 非依存的に EMT を誘導することができる[48]。EMT による CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答の亢進が、TGF- β 1 以外の EMT 誘導因子でも認められる現象であるか否かを明らかにするため、CSE で EMT 誘導した A549 細胞の CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答を解析した。

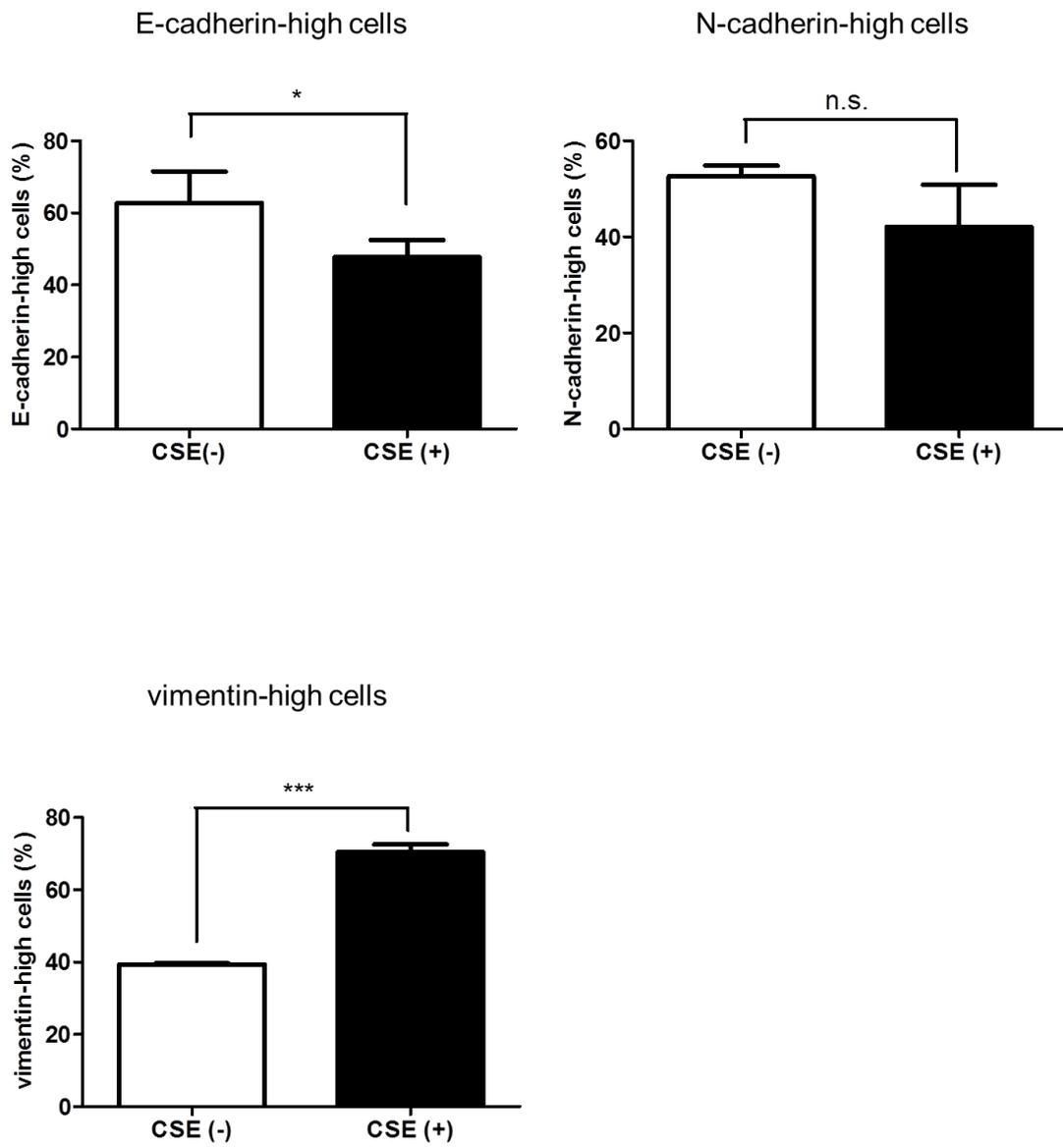
CSE により 72 時間刺激したところ、A549 細胞は細胞極性の喪失、周囲細胞との接着の減弱、紡錘状の形態を示し、TGF- β 1 による EMT 誘導時と同様の形態学的変化を示した(Fig. 9A)。細胞表面の E-cadherin の発現は CSE 刺激により有意に低下したが、N-cadherin の発現は TGF- β 1 による EMT 誘導時と異なり有意な変化を認めなかった(Fig. 9B-C)。一方、別の間葉系マーカーである vimentin の有意な発現亢進を認めた(Fig. 9B-C)。

同様に CSE で EMT 誘導した A549 細胞を、CpG ODN 10 μ g/ml で 48 時間刺激し培養上清中の IL-6、IL-8、MCP-1 濃度を測定したところ、TGF- β 1 による EMT 誘導時とは異なり、これらのサイトカインの有意な産生増強は認めなかった(Fig. 9D)。

Figure 9



C)



D)

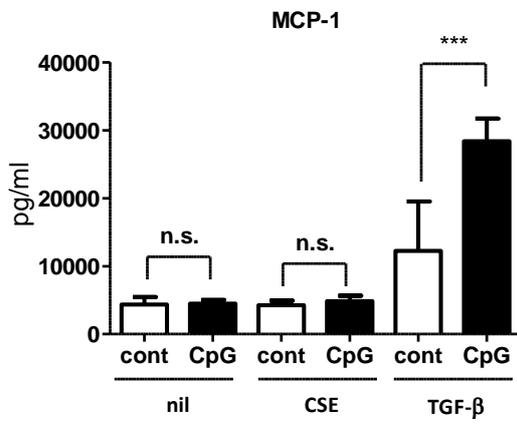
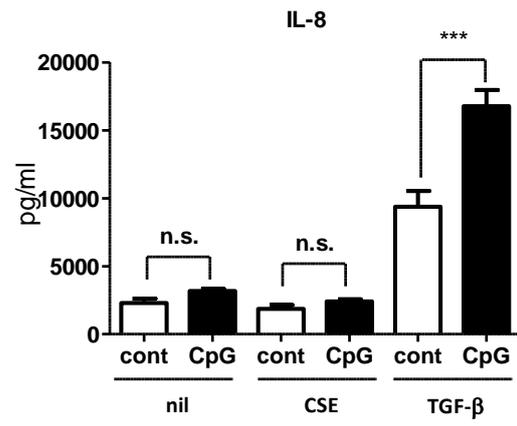
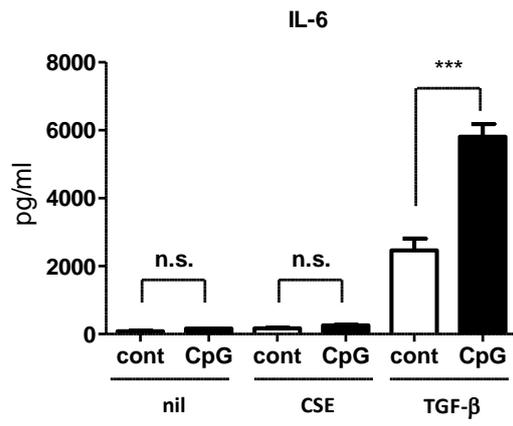


Figure9. CSEによるEMT誘導とCpG ODN刺激に対するサイトカイン産生応答の変化

A: A549細胞を10% CSEの有無別に72時間培養し、Mayer's Hematoxylinで核染色した後、光学顕微鏡で形態学的変化を観察した。

B: A549細胞を10% CSEの有(実線)無(破線)別に72時間培養した後、PE-conjugated anti-E-cadherin抗体およびAPC-conjugated anti-N-cadherin抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。また、同様に培養した後、固定・透過処理に続いてPE-conjugated anti-vimentin抗体で染色し、フローサイトメトリーで測定した。代表的なヒストグラムを図示する(n=3)。陰影部分はコントロール抗体で染色した細胞群を示す。

C: E-cadherin、N-cadherin、およびvimentinを高発現する細胞の割合をFigure 4Bと同様にして計測した。

エラーバーは標準偏差(n=3-4)を示す。

n.s., not significant

*P<0.05; ***P<0.001

D: A549細胞を10% CSEの有無別およびTGF-β1 10 ng/ml存在下で72時間培養した後、CpG ODN 10 μg/mlで48時間刺激し、上清中のIL-6、IL-8、MCP-1濃度を測定した。

エラーバーは標準偏差(n=3-6)を示す。

cont, control ODN; n.s., not significant

***P<0.001

考察

気管支喘息症例の大部分は吸入ステロイド薬の普及に伴い病状のコントロールが可能になってきたものの、重症・難治症例の克服が課題として残されている。気管支喘息の重症・難治化の機序の一つとして、不可逆的な気流制限と気道過敏性を引き起こす気道リモデリングが重要な役割を果たすと考えられており[5-7]、気道リモデリングには TGF- β を含めた種々の成長因子の作用とそれにより引き起こされる EMT の関与が示唆されている[8,11]。気管支喘息の他、COPD や IPF といった呼吸器系の common disease においても EMT およびその主要なメディエーターとして TGF- β の関与が示されている[13-17,21]。これら EMT および TGF- β がその病態に関与する呼吸器疾患において、呼吸器感染症を契機とした急性増悪が共通にみられることは興味深く、臨床上も重要な課題となっている[22-24]。

本研究では、TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞において、CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答が亢進し、IL-6、IL-8、MCP-1 の産生がタンパクおよび mRNA レベルで亢進することを初めて明らかにした(Fig. 2A-C)。IL-6 は広く知られた多機能性の炎症性サイトカインであり、気管支喘息や COPD といった気道炎症性疾患[49]や IPF の急性増悪[50]において重要な役割を果たしていると考えられる。また、Th1/Th2 バランスの Th2 への偏向[51]、CD4+CD25+

regulatory T cell の機能抑制による末梢性トレランスの抑制[52]、上皮下の線維化を伴う気道リモデリングの誘発[53]が報告されており、これらの機序で気管支喘息の悪化に関与している可能性がある。IL-8 は好中球の走化因子としての活性を有し[54]、好中球性炎症は気管支喘息におけるステロイド抵抗性と重症化に関連している[55,56]。また、血清および気管支肺胞洗浄液中の IL-8 高値と肺組織における好中球性炎症は COPD と IPF に共通してみられる特徴的な所見であり[57-60]、両疾患の急性増悪時には血清中 IL-6 と共に IL-8 の有意な増加が報告されている[50,61]。さらに、IPF の急性増悪における死亡リスクと血清 IL-6、IL-8 濃度の間には正の相関がみられている[50]。MCP-1 は Chemokine (C-C motif) ligand 2(CCL2)としても知られ、IL-8 と同様に好中球の走化因子としての活性を有するのみでなく[62]、単球、マスト細胞、fibrocyte、Th17 細胞といった炎症、アレルギー反応、線維化、に関与する多様な細胞の走化因子として作用する[63-66]。特に、Th17 細胞は好中球性炎症を惹起することで、気管支喘息や COPD におけるステロイド抵抗性に関与する可能性が指摘されている[67]。また、MCP-1 は走化因子として作用するのみでなく、マスト細胞における脱顆粒や気道過敏性の誘導も引き起こす [68,69]。以上のように、IL-6、IL-8、MCP-1 は種々の呼吸器疾患の病態悪化に様々な機序で関与しており、TGF- β 1 による EMT 誘導が CpG 刺激に対するサイトカイン産生応答を亢進させることで、リモデリン

グを伴う気管支喘息、COPD、IPF といった呼吸器疾患の急性増悪に関与している可能性が考えられる。

呼吸器疾患に対する EMT の影響として、感染による急性増悪だけでなく、疾患の難治化や炎症の持続作用にも注目すべきである。気管支喘息においては、炎症反応の程度にかかわらず気道リモデリング自体が気道過敏性を悪化させる。これは正常気道において気道を狭窄させない程度の平滑筋収縮でも、リモデリングにより肥厚した気道壁では容易に狭窄または閉塞に至ることに起因し[7]、本研究で得られた知見である EMT による外来抗原に対するサイトカイン産生応答の亢進に起因するものではない。したがって、気道リモデリングによる気管支喘息の重症・難治化は、従来から指摘されている物理的機序と、本研究で示された機序の両面から引き起こされている可能性がある。また、TGF- β 1 による EMT 誘導のみでベースラインのサイトカイン産生が上昇する傾向(Fig. 2A, C)を認めたことも注目に値する。TGF- β 1 を作用させ EMT 誘導した A549 細胞において、IL-6 の mRNA 発現が亢進することは既に報告されているが[70]、IL-8 と MCP-1 を含むサイトカインのタンパクレベルでの発現亢進を確認した報告はない。EMT によるベースラインのサイトカイン産生の亢進により、たとえ気道感染がコントロールされている状態においても、重症・難治喘息における好中性気道炎症や COPD における全身性の炎症[57]が引き起こされている可能性も

考えられる。

EMT 誘導が CpG 刺激に対するサイトカイン産生応答亢進を引き起こす機序として TLR9 の発現亢進を想定したが、TLR9 の発現は EMT によりむしろ低下した(Fig. 4A-D)。一方、EMT による CpG ODN の A549 細胞内取り込み亢進(Fig. 5A-C)は、CpG ODN 刺激に対するサイトカイン産生応答亢進の一つの説明になり得ると思われた。CpG ODN の取り込みに関わる既知の受容体、すなわち CD14[37]および CD205[38]の発現は EMT 誘導後も変化せず、EMT による CpG ODN の取り込み亢進の機序については明らかにできなかった。

TGF- β 1 による EMT 誘導と、EMT により A549 細胞内への取り込みが亢進した CpG ODN が、どのようなシグナル経路を介して相乗的なサイトカイン産生応答に結びついているかも、重要な検討課題である。NF κ B は今回我々が測定したサイトカインいずれの発現にも関与する転写因子として報告されており[39-41]、本研究でも A549 細胞の EMT 後 CpG ODN 刺激によるサイトカイン産生は NF κ B 依存的であることが示された(Fig. 7A)。また、TGF- β 1 刺激のみで I κ B α の発現が有意に減少していたことから(Fig. 7C)、TGF- β 1 による NF κ B の活性化がベースラインでのサイトカイン産生亢進(Fig. 2A,C) に関与していると考えられた。TGF- β 1 はリン酸化を介した I κ B α の分解だけでなく、48-72 時間程度の長時間刺

激時には mRNA レベルでも I κ B α の発現を低下させ、それに引き続く NF- κ B の核内移行と転写活性を通して炎症性サイトカイン産生を亢進させることが知られており[71]、TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞においてもこれらの機序が作用していた可能性がある。CpG ODN も TLR9 依存的な NF- κ B の活性化により炎症性サイトカインの産生を促進することが報告されているが[43]、本研究では少なくとも I κ B α の発現レベルに有意な変化は認められなかった(Fig. 7D)。NF- κ B の転写活性は RelA/p65 のアセチル化やリン酸化によっても修飾されるため[72,73]、CpG ODN がこれらの修飾を通じて NF- κ B の転写活性を亢進させた可能性についても、今後検討していく必要があると考えられる。MAP キナーゼ経路についてはサイトカイン毎に異なる経路が関与している可能性があるが部分的であり(Fig. 7B)、CpG ODN の post-transcriptional regulation による mRNA 安定化作用[47]は認められなかった(Fig. 8)。以上を踏まえると、CpG ODN -TLR9 の下流シグナルが TGF β -1 による NF- κ B 活性化とどのように作用し合い相乗的なサイトカイン産生に結びついているのかは明らかにできなかったが、EMT が関与する呼吸器疾患における感染を契機とした急性増悪治療・予防のターゲットとしては、TGF β -1-NF- κ B の経路が一つの候補になり得ると考えられた。また、上記以外のシグナル経路の関与について検討するため、microarray や RNA sequence を用いた網羅的解析も検討すべきと考えられた。

EMT 誘導による CpG 刺激に対するサイトカイン産生応答亢進が TGF- β 1 以外の EMT 誘導因子でも認められる現象か否かを検証するため、TGF- β signaling 非依存的に EMT を誘導することが報告されている CSE[48]で EMT 誘導し CpG ODN 刺激を行ったが、TGF- β 1 による EMT 誘導で認めた相乗効果は認められなかった(Fig. 9C)。CSE の組成は、タバコの銘柄、溶媒の種類と量、吸引速度等の多様な要因により影響を受けるため、異なる試料を使用した実験間の比較には注意を要する。本研究では、Irene M. J. Eurlings らが報告した N-cadherin の発現増加[48]は認められず、濃度または組成の異なる CSE によって EMT 誘導した場合では EMT の誘導状況が異なる可能性がある。EMT 誘導による CpG 刺激に対するサイトカイン産生応答亢進が TGF- β 1 特異的な現象であるか確証を得るためには、sphingosine-1-phosphate[74]等他の EMT 誘導因子による検討を重ねる必要がある。

本研究では、*in vitro* での EMT 誘導が確立されていることから、上皮細胞として A549 細胞を、TGF- β のアイソフォームのうち TGF- β 1 を用いた[10]。これらを使用することで、本実験系においても EMT 誘導が再現できていると考えられた(Fig. 1A-C)。しかし、E-cadherin および N-cadherin の発現変化の程度は均一ではなく、TGF- β 1 刺激群と無刺激群が明確に分離されていなかったことを考慮

すると(Fig. 1A)、完全に EMT が誘導された細胞のみを分離して解析することで EMT による影響をより厳密に評価することが望ましく、今後の検討課題と考えられた。また、本研究結果が普遍的に認められる現象であるかを確認するために、ヒト正常気道上皮細胞および肺胞上皮細胞を使用し同様の現象が認められるか検証する必要がある。

今回の研究で使用した CpG ODN は B-class ODN、すなわちパリンドロームを持たない 18~28 塩基長の線状構造の ODN であり、B 細胞の IL-6 産生を強力に誘導するが、パリンドロームを有する A-class や C-class ODN と異なり IFN- α の産生誘導は弱い。このように CpG ODN の class 間で作用が異なることが知られている[75]。したがって、A/C-class ODN についても検証する必要があると考えられる。

本研究では細菌感染症を想定し、TLR9 のアゴニストである CpG ODN を用いたが、他の TLR アゴニストについての解析も重要な課題である。グラム陰性桿菌の細胞壁構成成分であり、TLR4 により PAMPs として認識されるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) [25]を用いて本研究と同様の解析を行ったところ、CpG ODN と同様に TGF- β 1 を用いた EMT により LPS 刺激に対するサイトカイン産生応答の亢進が認められた[76]。実際、临床上も呼吸器疾患の急性増悪においてグラム陰性桿菌は重要な要因の一つであり[77,78]、EMT を背景とした呼吸器疾

患における細菌感染症契機の急性増悪においては、CpG DNA のみでなく LPS も重要な PAMPs として関与している可能性がある。また、ウイルス感染も細菌感染と同様に呼吸器疾患における急性増悪の原因として重要である。原因ウイルスの大部分は DNA ウイルスではなく RNA ウイルスであるため、TLR9 とは別の機構で認識されることに注意する必要がある。例えば、気管支喘息の急性増悪において最も高頻度に検出される感染体であるライノウイルス[79,80]は、TLR2、TLR7、および TLR8 を介して生体に認識される[81]。CpG DNA や LPS 以外にも、これらウイルス由来抗原を認識するレセプター刺激についても EMT によるサイトカイン産生応答に対する影響の有無を解析する必要がある。

結論

本研究により、TGF- β 1 で EMT 誘導した A549 細胞では、CpG ODN の細胞内取り込みと、それに続くサイトカイン産生応答が亢進していることが初めて明らかになった。これらの現象は CSE による EMT 誘導では認められなかった。TGF- β 1 による EMT 誘導が外来由来抗原への反応性を亢進させ、リモデリングを伴う気管支喘息、COPD、IPF といった呼吸器疾患の急性増悪に関与している可能性が示唆された[82]。

謝辞

本研究の遂行をご指導くださいました指導教官である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 教授に感謝申し上げます。

また、本研究全般にわたり懇切丁寧にご指導ご協力くださいました独立行政法人国立病院機構東京病院臨床研究部 鈴木 真穂 先生をはじめ、本研究の共同研究者である小山 壱也 先生、テクニックの基本を一からご指導いただいた五十嵐 彩夏 さん、橋本 充恵 さん、素晴らしい研究環境を整備してくださった吉澤 真理子 さん、浅里 功 さん、円滑な研究室運営を指揮してくれた荒川 さやか 先生、様々な角度から素晴らしいアドバイスを下さった田下 浩之 先生、松井 弘稔 先生、同院病理部 蛇澤 晶 先生、同院呼吸器内科 成本 治 先生、CSE 作成をご指導下さった東京大学医学部呼吸器内科 三上 優 先生、そして東京病院臨床研究部初の大学院生受け入れを実現して下さった東京病院院長 大田 健 先生に心から感謝申し上げます。

引用文献

1. Kalluri R and Weinberg RA. **The basics of epithelial-mesenchymal transition.** *Journal of Clinical Investigation.* vol. 119: 1420-8; 2009.
2. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, and Nieto MA. **Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease.** *Journal of Clinical Investigation.* vol. 119: 1438-49; 2009.
3. Zeisberg M and Neilson EG. **Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions.** *Journal of Clinical Investigation.* vol. 119: 1429-37; 2009.
4. The Global Asthma Report 2014. Auckland, New Zealand: Global Asthma Network, 2014. www.globalasthmanetwork.org
5. Trejo Bittar HE, Yousem SA, and Wenzel SE. **Pathobiology of severe asthma.** *Annual Review of Pathology.* vol. 10: 511-45; 2015.
6. Brown PJ, Greville HW, and Finucane KE. **Asthma and irreversible airflow obstruction.** *Thorax.* vol. 39: 131-6; 1984.
7. James AL, Pare PD, and Hogg JC. **The mechanics of airway narrowing in asthma.** *American Review of Respiratory Disease.* vol. 139: 242-6; 1989.
8. Hackett TL. **Epithelial-mesenchymal transition in the pathophysiology of**

- airway remodelling in asthma.** *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology.* vol. 12: 53-9; 2012.
9. Bartis D, Mise N, Mahida RY, Eickelberg O, and Thickett DR. **Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important?** *Thorax.* vol. 69: 760-5; 2014.
10. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, and Zhang Z. **TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT).** *Respiratory Research.* vol. 6: 56; 2005.
11. Hironori Sagara, Takanori Okada, Ko Okumura, Hideoki Ogawa, Chisei Ra, Takeshi Fukuda, and Atsuhito Nakao. **Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* vol. 110: 249-54; 2002.
12. Stephen Bujarski, Amit D. Parulekar, Amir Sharafkhaneh, and Nicola A. Hanania. **The Asthma COPD Overlap Syndrome (ACOS).** *Current Allergy and Asthma Reports.* vol. 15: 509; 2015.
13. Sukhwinder Singh Sohal, Malik Quasir Mahmood, and Eugene Haydn Walters. **Clinical significance of epithelial mesenchymal transition (EMT) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): potential target for prevention of**

- airway fibrosis and lung cancer.** *Clinical and Translational Medicine.* vol. 3: 33; 2014.
14. Morty RE, Königshoff M, and Eickelberg O. **Transforming growth factor- β signaling across ages: from distorted lung development to chronic obstructive pulmonary disease.** *Proceedings of the American Thoracic Society.* vol. 6: 607–613; 2009.
15. Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, Myers JL, Tazelaar HD, Schroeder DR, and Offord KP. **Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* vol. 157: 199-203; 1998.
16. Yael Aschner and Gregory P. Downey. **Transforming Growth Factor- β : Master Regulator of the Respiratory System in Health and Disease.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* vol. 54: 647-55; 2016.
17. Hardie WD, Glasser SW, and Hagood JS. **Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis.** *The American journal of pathology.* vol. 175: 3-16; 2009.
18. Luca Richeldi, Huw Richard H R Davies, Paolo Spagnolo, and Fabrizio Luppi. **Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis.** *Cochrane Database Systematic Reviews.* vol. 3: CD002880; 2003.

19. Talmadge E. King, Jr., Williamson Z. Bradford, Socorro Castro-Bernardini, Elizabeth A. Fagan, Ian Glaspole, Marilyn K. Glassberg, Eduard Gorina, Peter M. Hopkins, David Kardatzke, Lisa Lancaster, David J. Lederer, Steven D. Nathan, Carlos A. Pereira, Steven A. Sahn, Robert Sussman, Jeffrey J. Swigris, and Paul W. Noble. **A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.** *New England Journal of Medicine.* vol. 370: 2083-2092; 2014.
20. Luca Richeldi, Roland M. du Bois, Ganesh Raghu, Arata Azuma, Kevin K. Brown, Ulrich Costabel, Vincent Cottin, Kevin R. Flaherty, David M. Hansell, Yoshikazu Inoue, Dong Soon Kim, Martin Kolb, Andrew G. Nicholson, Paul W. Noble, Moisés Selman, Hiroyuki Taniguchi, Michèle Brun, Florence Le Maulf, Mannaïg Girard, Susanne Stowasser, Rozsa Schlenker-Herceg, Bernd Disse, and Harold R. Collard. **Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis.** *New England Journal of Medicine.* vol. 370: 2071-2082; 2014.
21. Katrin Hostettler, Jun Zhong, Michael Tamm, Didier Lardinois, Michael Roth. **Effect of pirfenidone on TGF- β -induced pro-fibrotic effects in primary human lung cells derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis.** *European Respiratory Journal.* vol. 44: 763; 2014.
22. Motoyasu Iikura, Masayuki Hojo, Rikiya Koketsu, Sho Watanabe, Ayano Sato,

Haruka Chino, Shoki Ro, Haruna Masaki, Junko Hirashima, Satoru Ishii, Go Naka, Jin Takasaki, Shinyu Izumi, Nobuyuki Kobayashi, Sachiko Yamaguchi, Susumu Nakae, and Haruhito Sugiyama. **The importance of bacterial and viral infections associated with adult asthma exacerbations in clinical practice.** *PLoS One*. vol. 10: e0123584; 2015.

23. Sanjay Sethi. **Bacteria in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: phenomenon or epiphenomenon?** *Proceedings of the American Thoracic Society*. vol. 1: 109-14; 2004.

24. Mohamed M. Metwally, Heba G. Rashed, and Mohamed Z. Abokrishna. **Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: the possible role of bacterial infection and the pattern of its antibiotic resistance in patients admitted to hospital.** *Chest*. vol. 136: 116S-117S; 2009.

25. Pankaj Baral, Sanjay Batra, Rachel L. Zemans, Gregory P. Downey, and Samithamby Jeyaseelan. **Divergent Functions of Toll-like Receptors during Bacterial Lung Infections.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. vol. 190: 722-32; 2014.

26. Rahul Suresh and David M. Mosser. **Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology.** *Advances in Physiology*

- Education*. vol. 37: 284–291; 2013.
27. Aderem A and Ulevitch RJ. **Toll-like receptors in the induction of the innate immune response.** *Nature*. vol. 406: 782-7; 2000.
28. Arthur M. Krieg. **CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.** *Annual Review of Immunology*. vol. 20: 709-60; 2002.
29. Hiroaki Hemmi, Osamu Takeuchi, Taro Kawai, Tsuneyasu Kaisho, Shintaro Sato, Hideki Sanjo, Makoto Matsumoto, Katsuaki Hoshino, Hermann Wagner, Kiyoshi Takeda, and Shizuo Akira. **A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.** *Nature*. vol. 408: 740-5; 2000.
30. Fumihiko Takeshita, Cynthia A. Leifer, Ihsan Gursel, Ken J. Ishii, Saoko Takeshita, Mayda Gursel, and Dennis M. Klinman. **Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells.** *The Journal of Immunology*. vol. 167: 3555-8; 2001.
31. Stefan Bauer, Carsten J. Kirschning, Hans Häcker, Vanessa Redecke, Susanne Hausmann, Shizuo Akira, Hermann Wagner, and Grayson B. Lipford. **Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. vol. 98: 9237-42; 2001.

32. Jan Theys, Barry Jutten, Roger Habets, Kim Paesmans, Arjan J. Groot, Philippe Lambin, Brad G. Wouters, Guido Lammering, and Marc Vooijs. **E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells.** *Radiotherapy and Oncology*. vol. 99: 392-7; 2011.
33. Karsten Gravdal, Ole J. Halvorsen, Svein A. Haukaas, and Lars A. Akslen. **A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer.** *Clinical Cancer Research*. vol. 13: 7003-11; 2007.
34. Hiroshi Yamada, Ihsan Gursel, Fumihiko Takeshita, Jackie Conover, Ken J. Ishii, Mayda Gursel, Saoko Takeshita, and Dennis M. Klinman. **Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation.** *The Journal of Immunology*. vol. 169: 5590-4; 2002.
35. Trieu A., Roberts T.L., Dunn J.A., Sweet M.J., and Stacey K.J. **DNA Motifs suppressing TLR9 responses.** *Critical Reviews in Immunology*. vol. 26: 527-44; 2006.
36. Annie Park Moseman, E. Ashley Moseman, Stephen Schworer, Irina Smirnova, Tatyana Volkova, Ulrich von Andrian, and Alexander Poltorak. **Mannose receptor (MRC1) mediates cellular uptake and endosomal delivery of CpG-ODN.** *The*

Journal of Immunology. vol. 191: 5615-24; 2013.

37. Christoph L. Baumann, Irene M. Aspalter, Omar Sharif, Andreas Pichlmair, Stephan Blüml, Florian Grebien, Manuela Bruckner, Pawel Pasierbek, Karin Aumayr, Melanie Planyavsky, Keiryn L. Bennett, Jacques Colinge, Sylvia Knapp, and Giulio Superti-Furga. **CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9.**

The Journal of Experimental Medicine. vol. 207: 2689-701; 2010.

38. Mireille H. Lahouda, Fatma Ahmet, Jian-Guo Zhang, Simone Meuter, Antonia N. Policheni, Susie Kitsoulis, Chin-Nien Lee, Meredith O’Keeffe, Lucy C. Sullivan, Andrew G. Brooks, Richard Berry, Jamie Rossjohn, Justine D. Mintern, Javier Vega-Ramos, Jose A. Villadangos, Nicos A. Nicola, Michel C. Nussenzweig, Katryn J. Stacey, Ken Shortman, William R. Heath, and Irina Caminschi. **DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. vol. 109: 16270-75; 2012.

39. T A Libermann and D Baltimore. **Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor.** *Molecular Cell Biology*. vol. 10: 2327-34; 1990.

40. C Kunsch and C A Rosen. **NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter.** *Molecular Cell Biology*. vol. 13: 6137-46; 1993.

41. A Ueda, K Okuda, S Ohno, A Shirai, T Igarashi, K Matsunaga, J Fukushima, S Kawamoto, Y Ishigatsubo, and T Okubo. **NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene.** *The Journal of Immunology.* vol. 153: 2052-63; 1994.
42. Jacqueline W. Pierce, Robert Schoenleber, Gary Jesmok, Jennifer Best, Sarah A. Moore, Tucker Collins, and Mary E. Gerritsen. **Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo.** *The Journal of Biological Chemistry.* vol. 272: 21096-21103; 1997.
43. Eun-Jung Lim, Sun-Hye Lee, Jin-Gu Lee, Jae-Ryong Kim, Sung-Su Yun, Suk-Hwan Baek, and ChuHee Lee. **Toll-like receptor 9 dependent activation of MAPK and NF- κ B is required for the CpG ODN-induced matrix metalloproteinase-9.** *Experimental & Molecular Medicine.* vol. 39: 239-245; 2007.
44. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, and Anderson DW. **SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* vol. 98: 13681–13686; 2001.

45. Ana Cuenda, John Rouse, Yair N. Doza, Roger Meier, Philip Cohen, Timothy F. Gallagher, Peter R. Young, and John C. Lee. **SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1.** *Federation of European Biochemical Societies Letters*. vol. 364: 229-233; 1995.
46. Margaret F. Favata, Kurumi Y. Horiuchi, Elizabeth J. Manos, Andrea J. Daulerio, Deborah A. Stradley, Wendi S. Feeser, Drew E. Van Dyk, William J. Pitts, Richard A. Earl, Frank Hobbs, Robert A. Copeland, Ronald L. Magolda, Peggy A. Scherle, and James M. Trzaskos. **Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.** *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 273: 18623; 1998.
47. N William Parilla, Valerie S Hughes, Kristin M Lierl, Hector R Wong, and Kristen Page. **CpG DNA modulates interleukin 1 β -induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial (16HBE14o-) cells.** *Respiratory Research*. vol. 7: 84; 2006.
48. Irene M. J. Eurlings, Niki L. Reynaert, Twan van den Beucken, Harry R. Gosker, C. C. de Theije, Fien M. Verhamme, Ken R. Bracke, Emiel F. M. Wouters, and Mieke A. Dentener. **Cigarette Smoke Extract Induces a Phenotypic Shift in Epithelial**

- Cells; Involvement of HIF1a in Mesenchymal Transition.** *PLoS One.* vol. 9: e107757; 2014.
49. Mercedes Rincon, and Charles G. Irvin. **Role of IL-6 in Asthma and Other Inflammatory Pulmonary Diseases.** *International Journal of Biological Sciences.* vol. 8: 1281–1290; 2012.
50. Ioannis Tomos, Effrosyni Manali, Anna Karakatsani, Aris Spathis, Ioanna Korbila, Antonis Analitis, Petros Karakitsos, and Spyros Papiris. **IL-6 and IL-8 in stable and exacerbated IPF patients and their association to outcome.** *European Respiratory journal.* vol. 48: PA3890; 2016.
51. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, and Flavell RA. **Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells.** *The Journal of Experimental Medicine.* vol. 185: 461–469; 1997.
52. Doganci A, Sauer K, Karwot R, and Finotto S. **Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice.** *Clinical Reviews in Allergy & Immunology.* vol. 28: 257-70; 2005.
53. Charles Kuhn III, Robert J. Homer, Zhou Zhu, Nicholas Ward, Richard A. Flavell, Gregory P. Geba, and Jack A. Elias. **Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice. Morphologic correlates in mice overexpressing**

- interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* vol. 22: 289-95; 2000.
54. Ribeiro RA, Flores CA, Cunha FQ, and Ferreira SH. **IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism.** *Immunology.* vol. 73: 472-7; 1991.
55. Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, and Pavord ID. **Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids.** *Thorax.* vol. 57: 875-9; 2002.
56. Jatakanon A, Uasuf C, Maziak W, Lim S, Chung KF, and Barnes PJ. **Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* vol. 160: 1532-9; 1999.
57. W Q Gan, S F P Man, A Senthilselvan, and D D Sin. **Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis.** *Thorax.* vol. 59: 574–580; 2004.
58. Kim Hoenderdos and Alison Condliffe. **The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* vol. 48: 531-9; 2013.

59. Ziegenhagen MW, Zabel P, Zissel G, Schlaak M, and Müller-Quernheim J. **Serum level of interleukin 8 is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and indicates disease activity.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* vol. 157: 762-8; 1998.
60. G W Hunninghake, J E Gadek, T J Lawley, and R G Crystal. **Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis.** *Journal of Clinical Investigation.* vol. 68: 259–269; 1981.
61. Akbulut H.H., Ozden M., Deveci F., and Muz M. H. **IL-6 And IL-8 Levels In Patients With Acute Exacerbation Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* vol. 3: 1285-1288; 2009.
62. Gayathriy Balamayooran, Sanjay Batra, Theivanthiran Balamayooran, Shanshan Cai, and Samithamby Jeyaseelan. **Monocyte Chemoattractant Protein 1 Regulates Pulmonary Host Defense via Neutrophil Recruitment during Escherichia coli Infection.** *Infection and Immunity.* vol. 79: 2567–2577; 2011.
63. Yong Gyu Lee, Jong Jin Jeong, Sharmilee Nyenhuis, Evgeny Berdyshev, Sangwoon Chung, Ravi Ranjan, Manjula Karpurapu, Jing Deng, Feng Qian, Elizabeth A. B. Kelly, Nizar N. Jarjour, Steven J. Ackerman, Viswanathan Natarajan, John W. Christman, and Gye Young Park. **Recruited alveolar macrophages, in response to**

- airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein 1/CCl2, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma.** *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. vol. 52: 772-84; 2015.
64. Sarah J. Collington, Jenny Hallgren, James E. Pease, Tatiana G. Jones, Barrett J. Rollins, John Westwick, K. Frank Austen, Timothy J. Williams, Michael F. Gurish, and Charlotte L. Weller. **The role of the CCL2/CCR2 axis in mouse mast cell migration in vitro and in vivo.** *The Journal of Immunology*. vol. 184: 6114-23; 2010.
65. S R Singh, A Sutcliffe, D Kaur, S Gupta, D Desai, R Saunders, and C E Brightling. **CCL2 release by airway smooth muscle is increased in asthma and promotes fibrocyte migration.** *Allergy*. vol. 69: 1189-97; 2014.
66. Wang A, Wang Z, Cao Y, Cheng S, Chen H, Bunjhoo H, Xie J., Wang C., Xu Y., and Xiong W. **CCL2/CCR2-dependent recruitment of Th17 cells but not Tc17 cells to the lung in a murine asthma model.** *International Archives of Allergy and Immunology*. vol. 166: 52-62; 2015.
67. John F. Alcorn, Christopher R. Crowe, and Jay K. Kolls. **TH17 cells in asthma and COPD.** *Annual Review of Physiology*. vol. 72: 495-516; 2010.
68. Emma M. Campbell, Israel F. Charo, Steven L. Kunkel, Robert M. Strieter, Landin

- Boring, Jennifa Gosling, and Nicholas W. Lukacs. **Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2^{-/-} mice: the role of mast cells.** *The Journal of Immunology*. vol. 163: 2160-7; 1999.
69. Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, Lincoln P, Chensue SW, and Kunkel SL. **Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation.** *The Journal of Immunology*. vol. 158: 4398-404; 1997.
70. Ohbayashi M, Kubota S, Kawase A, Kohyama N, Kobayashi Y, and Yamamoto T. **Involvement of epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-induced pulmonary fibrosis.** *The Journal of Toxicological Sciences*. vol. 39: 319-30; 2014.
71. Zhi-Yuan Li, Zhao-Li Chen, Ting Zhang, Chao Wei, and Wei-Yun Shi. **TGF- β and NF- κ B signaling pathway crosstalk potentiates corneal epithelial senescence through an RNA stress response.** *Aging*. vol. 8; 2337-2354; 2016.
72. Hajime Ishinaga, Hirofumi Jono, Jae Hyang Lim, Kensei Komatsu, Xiangbin Xu, Jiyun Lee, Chang-Hoon Woo, Haidong Xu, Xin-Hua Feng, Lin-Feng Chen, Chen Yan, and Jian-Dong Li. **Synergistic induction of nuclear factor- κ B by transforming growth factor- β and tumour necrosis factor- α is mediated by**

- protein kinase A-dependent RelA acetylation.** *Biochemical Journal.* vol. 417: 583-591; 2009.
73. Xu Jiang, Naoko Takahashi, Nobuo Matsui, Toshifumi Tetsuka, and Takashi Okamoto. **The NF- κ B Activation in Lymphotoxin β Receptor Signaling Depends on the Phosphorylation of p65 at Serine 536.** *The Journal of Biological Chemistry.* vol. 278: 919-926; 2003.
74. Ye Zeng, Xing-Hong Yao, Zhi-Ping Yan, Jing-Xia Liu, and Xiao-Heng Liu. **Potential signaling pathway involved in sphingosine-1-phosphate-induced epithelial-mesenchymal transition in cancer.** *Oncology Letters.* Vol. 12: 379-382; 2016.
75. Jörg Vollmer, Risini Weeratna, Paul Payette, Marion Jurk, Christian Schetter, Meike Laucht, Tanja Wader, Sibylle Tluk, Ming Liu, Heather L. Davis, and Arthur M. Krieg. **Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities.** *European Journal of Immunology.* vol. 34: 251–262; 2004.
76. Takafumi Kato, Koichi Kobayashi, Maho Suzukawa, Minako Saito, Kenichi Okuda, Kazuya Koyama, Sayaka Igarashi, Sayaka Arakawa, Nobuharu Ohshima, Hirotohi Matsui, Takahide Nagase, and Ken Ohta. **Epithelial-mesenchymal transition of**

- human lung adenocarcinoma A549 cells up-regulates cytokine production upon LPS stimulation.** *Allergology International*. vol66: S56-58; 2017.
77. R.I.M. ElKorashy and R.H. El-Sherif. **Gram negative organisms as a cause of acute exacerbation of COPD.** *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*. vol 63: 345-349; 2014.
78. Philip L. Molyneaux, Michael J Cox, Athol U. Wells, Ho Cheol Kim, Wonjun Ji, William O. C. Cookson, Miriam F. Moffatt, Dong Soon Kim, and Toby M. Maher. **Changes in the respiratory microbiome during acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis.** *Respiratory Research*. vol 18: 29; 2017.
79. Robert L. Atmar, Elizabeth Guy, Kalpalatha K. Guntupalli, Janice L. Zimmerman, Venkata D. Bandi, Barbara D. Baxter, and Stephen B. Greenberg. **Respiratory tract viral infections in inner-city asthmatic adults.** *Archives of Internal Medicine*. vol. 158: 2453-9; 1998.
80. S. L. Johnston, P. K. Pattemore, G. Sanderson, S. Smith, F. Lampe, L. Josephs, P. Symington, S. O'Toole, S. H. Myint, and D. A. Tyrrell. **Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children.** *British Medical Journal*. vol. 310: 1225-9; 1995.
81. Triantafilou K, Vakakis E, Richer EA, Evans GL, Villiers JP, and Triantafilou M.

Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by Toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic pro-inflammatory immune response. *Virulence*. vol. 2: 22-9; 2011.

82. Koichi Kobayashi, Kazuya Koyama, Maho Suzukawa, Sayaka Igarashi, Akira Hebisawa, Takahide Nagase, and Ken Ohta. **Epithelial-mesenchymal transition promotes reactivity of human lung adenocarcinoma A549 cells to CpG ODN.** *Allergology International*. vol. 65: S45-S52; 2016.