

博士論文

論文題目 Tumor necrosis factor superfamily member 14
(TNFSF14; LIGHT)

による気道系上皮細胞からの CXCL8 の産生と

上皮間葉転換の誘導

氏 名 三上 優

Tumor necrosis factor superfamily member 14

(TNFSF14; LIGHT)

による気道系上皮細胞からの CXCL8 の産生と

上皮間葉転換の誘導

三上 優

目次

要旨	4
序文	6
序文 1:肺線維化および気道リモデリングに対する LIGHT の関与と上皮間葉転換の解明	6
序文 2:気道上皮細胞からの CXCL8 産生を介した重症喘息への関与の解明	10
方法	13
1.試薬	13
2.細胞および細胞培養	13
3. Gel contraction assay	14
4.定量的 RT(reverse transcriptional) PCR (RT-PCR)	15
5.免疫細胞染色	17
6. Western blot analysis	18
7.使用した抗体と希釈率	18
8. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	19
9.細胞表面受容体解析	20
10.small interfering RNA (siRNA)の細胞への導入	20
11.統計解析	21
結果および考察	22

結果 1:LIGHT による上皮間葉転換の誘導	22
結果 1 についての考察.....	35
結果 2:LIGHT による気道上皮細胞からの CXCL8 産生	38
結果 2 についての考察.....	51
まとめ	55
謝辞	56
文献.....	56

要旨

近年、腫瘍壊死因子スーパーファミリーLIGHTの気道リモデリング・重症喘息への関与がマウス喘息モデルを用いた研究において示唆されている。しかし、LIGHTが線維化に関与する機序や重症喘息に関与する機序は不明な点が多い。我々はLIGHTが上皮間葉転換を誘導し線維化に関与する可能性とサイトカイン・ケモカインの産生、特にCXCL8に着目し解析した。LIGHTはErk1/2経路を活性化し、上皮間葉転換を誘導した。また、LT β Rを介してErk1/2活性化およびNF- κ Bを誘導することでCXCL8を産生することを解明した。LIGHTは上皮間葉転換やサイトカイン・ケモカイン産生を通じて肺の線維化や重症喘息に関与している可能性が示唆された。

Keywords: LIGHT(TNFSF14)、気道上皮細胞、上皮間葉転換、気管支喘息、CXCL8

略語

EMT: epithelial mesenchymal transition

LIGHT: homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression and competes with

HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes

TNFSF: Tumor Necrosis Factor Superfamily

TGF: Transforming growth factor

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

FBS: fetal bovine serum

α -SMA: α -smooth muscle actin

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

序文

序文 1:肺線維化および気道リモデリングに対する LIGHT の関与と上皮間葉転換の解明

線維芽細胞(fibroblast)が活性化することで過剰な細胞外基質(ECM)を産生することで生じる線維化は組織における創傷、炎症、ストレスに対する異常な修復反応が引き金になっていると考えられている [1]。正常な組織修復は ECM 産生と分解および再上皮化のバランスが重要となるが、異常な組織修復と線維化は、肺線維症、肝硬変、強皮症などの慢性疾患の病因に関与していると言われている [2]。肺の線維化を生じる疾患として特発性間質性肺炎があげられ、現在 7 タイプに分類されているが、その内の一つで特発性肺線維症(Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF)は[3]最も難治性で、診断後の平均生存期間が 2-3 年の予後不良な疾患である。拘束性換気障害の進行による慢性呼吸不全、感冒などに続発する急激な呼吸不全(急性増悪)、肺癌の合併が三大死因とされており、現在生存期間を延長する有効な治療法はない [4]。IPF は病理学的に線維芽細胞巣(fibroblastic foci)の形成と早期からの蜂巢肺を認め、線維芽細胞巣の数と疾患の活動性は相関を示し、線維芽細胞巣の増加は IPF の急速な進行を反映すると考えられている[5, 6]。特発性肺線維症をはじめとする肺線維症の肺に集積する線維芽細胞のソースとして、肺の間質に元々存在している線維芽細胞の他に、循

環中の線維細胞(fibrocyte)が関与していると考えられていたが、近年上皮細胞が間葉系細胞の形質を獲得する上皮間葉転換(EMT)が線維芽細胞の新たなソースとして考えられてきている [7]。

上皮間葉転換は上皮細胞が E-cadherin といった上皮細胞系マーカーの発現を減弱し、vimentin や α smooth muscle actin といった間葉系マーカーの発現を増強することで接着能の低下、遊走といった間葉系細胞の性質を獲得することである。もともと胎生期の発生プロセスで生じることや、癌細胞の浸潤や転移において知られており [8, 9]、近年上皮間葉転換が腎臓[10]や肺組織[11]の線維化、さらに重症の気管支喘息の気道リモデリング[12]に関与する可能性が示唆されている。気道リモデリングとは喘息患者の気道において上皮の脱落や形態変化、上皮下の線維化、気道平滑筋の増生と肥大、杯細胞の増殖、粘液腺の肥大、血管増生と気道浮腫、軟骨の変化を生じるもので、本来可逆的な気道閉塞状態を非可逆性に変化させることで喘息を重症化させる一因と考えられている[13]。気道リモデリングには好酸球から分泌された transforming growth factor (TGF)- β が重要な分子であると考えられており、気道の上皮下の線維化や線維芽細胞の筋線維芽細胞(myofibroblasts)への分化促進に関与していると考えられている[14]。

上皮間葉転換は TGF- β 、fibroblast growth factor-2、epidermal growth factor、hepatocyte growth factor といった成長因子(growth factor)によって生じ、これらの

成長因子は組織の修復機転および線維化を引き起こす慢性炎症を来す疾患の組織内で増強していることが報告されている[15]。腫瘍壊死因子- α (Tumor necrosis factor – alpha; TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β)といった炎症性サイトカインは上皮間葉転換を増強することが知られており [16-18]、慢性炎症が TGF- β による上皮間葉転換を増強し、組織の線維化を助長することが示唆されている。

腫瘍壊死因子のスーパーファミリーである LIGHT (TNFSF14; homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes [19])は2型膜タンパクの一種で、活性化 T 細胞(他に単球、顆粒球、樹状細胞)から生成される。当初は HVEM に HSV グリコプロテイン D と競合的に結合することを見いだされたことから命名された[20]、14番目の腫瘍壊死因子スーパーファミリー(TNFSF14)である。主な機能として T 細胞の増殖や[19]様々な癌細胞のアポトーシスを生じる[21]と考えられているが、近年リウマチや炎症性腸疾患などの炎症性疾患に関与している可能性が示唆されている[22, 23]。呼吸器領域においては、2011年に Doherty らはハウスダストダニ(house dust mite; HDM)誘発喘息マウスモデルに LIGHT 抗体を使用することで気道の線維化および平滑筋過形成といった気道リモデリングや気道過敏性の亢進が減弱することを示し、さらに LIGHT ノックアウトマウスにおいて気道リモデリングの減弱だけでなく TGF- β と IL-13 といった気道

リモデリングに関与するサイトカインの肺での発現低下を認めたことを報告した[24]。実際の臨床においては、中等症以上の喘息患者の喀痰中で軽症患者と比較して LIGHT 濃度の増加を認め、喀痰中の LIGHT 濃度と%FEV1 は負の相関を示し、LIGHT と喘息の重症度との間に関連がある可能性が報告されている[25]。また、肺線維症を生じた強皮症患者の気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid ;BALF)中の LIGHT 濃度が健常人及び肺線維症を生じていない強皮症患者と比較して上昇していることから、肺の線維化関与している可能性が示唆されている[26]。これらの背景から重症喘息および肺線維症の新たな治療ターゲットとして注目されている。

以上のように、LIGHT が組織線維化、気道リモデリングに深く関与している可能性が示唆されているものの、線維化・気道リモデリングの一因であると考えられている上皮間葉転換にどのように関与しているかは明らかでない。

上皮間葉転換が慢性炎症下の組織において組織の線維化に関与している可能性が示唆されていることと LIGHT が気道炎症に深く関与していることが示唆されていることから、我々は LIGHT が上皮間葉転換を生じることで気道の線維化を生じていると仮説を立て、検証を行った。まず、LIGHT が TGF- β 1 による気道上皮細胞の上皮間葉転換-つまり、気道上皮細胞の形態変化(敷石状の上皮細胞の形態から紡錘形の間葉系細胞様の形態への変化)-および間葉系細胞の機能

である収縮能の獲得-に影響を与えるかどうか検討し、その後 LIGHT が単独で上皮間葉転換を生じるかどうかを検証した。そして、LIGHT による上皮間葉転換の細胞内メカニズムについて検討した。

序文 2:気道上皮細胞からの CXCL8 産生を介した重症喘息への関与の解明

気管支喘息は、気道過敏性の亢進と種々の程度の気道狭窄と気道リモデリングによる組織変化を特徴とする気道の慢性炎症性疾患である。日本における有病率は近年増加傾向にあり成人(22-44 歳)例で約 5.4%とされている。臨床的には、感染や温度変化、運動などを契機に繰り返し起こる発作性の呼吸困難や咳、可逆性の気道閉塞症状を特徴である。喘息の治療は 1900 年代初めから 1980 年代までは β 刺激薬をはじめとする気管支拡張薬の投与が中心であったが、喘息の病態が気道炎症であることが次第に明らかになり、1970 年代後半にステロイドの有用性が証明[27, 28]されるようになった。その後我が国では 1990 年代より治療の中心は吸入ステロイド薬(ICS)と変遷していった。ICS の普及は喘息治療を大きく変え、喘息患者の症状を著しく改善させ、喘息死が激減した。

喘息における気道炎症は一般的に T-helper (Th) type リンパ球の免疫応答による好酸球炎症と、それに伴う様々な炎症性細胞からのサイトカイン、ケモカインの産生によるものと考えられている[29]。これらの気道炎症は通常コルチコステロイドに反応性である[30]。しかし、炎症状態によっては時にステロイドに依

存性・抵抗性を示し、重症喘息/難治性喘息として臨床的に認識される。重症喘息は WHO の定義[31]において①未治療の重症喘息②治療困難な重症喘息③治療抵抗性の重症喘息の 3 つのパターンに分類されている。このうち③は A)推奨されている最高の治療を行ってもコントロールを達成できない難治性喘息 (refractory asthma)、ステロイド抵抗性喘息、B)最高レベルの治療によってのみコントロールが維持できる群に分類され、A)が狭義の重症喘息とされている。

重症喘息の病態は様々であるが、慢性的な持続する気道炎症とそれに引き続く、気道リモデリングの結果として生じる非可逆的な気流制限と考えられている[32, 33]。以前から好酸球、T 細胞、マスト細胞、好中球、樹状細胞などから放出される様々なサイトカインとケモカインが重症喘息の気道炎症に関与しており、特に好酸球は気道炎症に重要な役割を演じていると考えられている[34]。

近年、重症喘息患者の喀痰中の好中球数が軽症・中等症患者の喀痰と比較して有意に増加していること[35]や、喀痰中の好中球数と一秒量が負の相関を示すことが報告され[36]、好中球が重症喘息の病態に深く関与していると注目されている。一般的に気道の好酸球は吸入ステロイド、全身性のステロイド投与で減少し、ステロイド感受性と考えられている。しかし、好中球性の炎症はステロイドに抵抗性を示し、さらに、気道リモデリングを誘導することで喘息の病態をより悪化させることも示唆されている[37, 38]。また、好中球の主要な

chemoattractant である[39]Interleukin-8(IL-8/CXCL8)が重症患者の気道で増加していることが明らかになっている[40]。

前述の通り、LIGHT は気管支喘息における気道過敏性の亢進や気道リモデリングに関与していることが示唆されている。また、以前の研究で、LIGHT が滑膜の線維芽細胞から CXCL8 分泌を誘導し、滑膜の炎症および好中球の集簇に関与することが報告されて[22]おり、LIGHT が CXCL8 産生を通じて好中球性炎症を来す可能性が示唆されている。しかし、気道上皮細胞において、LIGHT が CXCL8 産生に及ぼす影響についてはよくわかっておらず、産生機序についても完全には明らかになっていない。

このため、我々は LIGHT が気道上皮細胞からの CXCL8 産生を通じて重症喘息における好中球炎症に関与していると仮説を立て、LIGHT による CXCL8 産生について検討し、細胞内の CXCL8 産生メカニズムについて解明した。

方法

1. 試薬

Recombinant human LIGHT は R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN)から購入し、Recombinant human TGF- β 1 は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO)から、MEK1/2 選択的阻害剤(Erk1/2 リン酸化酵素阻害)の U0126 (10 μ M)、JNK-1,-2,-3 選択的阻害薬の SP600125 (25 μ M)、p38 MAPK 選択的阻害薬の SB203580 (25 μ M)および phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase 選択的阻害薬の LY294002 (50 μ M)は Cell Signaling Technology 社 (Beverly, MA)から購入し dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し 10 mM の濃度で調製した。Gel contraction assay で使用した Cellmatrix type I-A collagen gel は新田ゼラチン (Osaka, Japan) より購入した。

2. 細胞および細胞培養

上皮間葉転換の研究においては、肺の上皮細胞としてヒト肺胞上皮癌由来細胞である A549 細胞を用いた。A549 細胞は肺胞上皮癌由来細胞であるが、肺上皮細胞の機能解析で広く使用されている代表的な細胞株である。A549 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA)より入手し、培養液は GIBCO 社 (Life Technologies, Grand Island, NY)から購入した。細胞は 6-well 細胞カルチャープレートに 5.0×10^5 /well の細胞密度で播き、培養液には 10% fetal bovine serum

(FBS)および 100-U/ml penicillin/ 100- μ g/ml streptomycin を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用い、37°Cの加湿された 5%CO₂を含む大気圧のインキュベーターで培養した。

CXCL8 産生についての研究には不死化ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B 細胞および正常ヒト気道上皮細胞 (NHBE 細胞)を用いた。BEAS-2B 細胞は非癌患者由来のヒト気道上皮細胞株で、気道上皮細胞の機能解析に広く使われている。BEAS-2B 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA)より購入し、NHBE 細胞はタカラバイオ株式会社(Tokyo, Japan)より購入した。細胞は collagen type 1 coated 6-well dish (Iwaki, Tokyo, Japan)に培養し、培養液は専用の血清フリーの上皮増殖培地である BEGM(Cambrex, Walkersville, Md., USA) に添加因子 (0.5 ng/ml human recombinant epidermal growth factor, 0.5 μ g/ml hydrocortisone, 10 μ g/ml transferrin, 0.5 μ g/ml epinephrine, 5 μ g/ml insulin, 50 μ g/ml bovine pituitary extract, 0.1 ng/ml retinoic acid, 6.5 ng/ml triiodothyronine, 50 μ g/ml gentamicin, 0.1 ng/ml amphotericin B 含有)である Bullet Kit (Cambrex)を混和し使用した。

3. Gel contraction assay

上皮間葉転換による間葉系細胞の機能獲得の確認として、一般に収縮能の評価として用いられている gel contraction assay によって評価した。Gel contrac-

tion assay は培養細胞をコラーゲンで作られた gel 内で三次元的に培養し、細胞収縮に伴い全体の gel サイズが収縮する原理により、細胞の収縮能を評価する方法として確立されている方法[41, 42]である。type I-A collagen gel を ddH₂O、4×DMEM と細胞を混ぜ、collagen 濃度が 1.75 mg/ml、細胞濃度が 3.0×10⁵ cells/ml、1×DMEM となるように細胞混和液を作成した。作成後直ちに 24-well tissue culture plates に 500μL ずつ分注し、室温で 20 分間安置して collagen を含む細胞混和液をゲル化させた。ゲル化した細胞混和液をスパチュラを用いて well から注意深くはがし、DMEM plain 5ml の入った 60mm ペトリディッシュに浮遊させた状態でインキュベーター内で培養した。Gel のサイズは内部の細胞収縮に伴って収縮し、サイズ(上から見た面積)を計測することで収縮能の定量化を行った。gel サイズはイメージ解析システム”Densitograph ATTO version 3.00”を用いて gel を浮遊させた直後および 72 時間後に計測した。

4.定量的 RT(reverse transcriptional) PCR (RT-PCR)

Total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を用いてプロトコル通りに抽出した。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。Complementary DNA (cDNA)は 1 μg の total RNA から SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用してプロ

トコルに従い合成(1 μg の total RNA に 1 μl の 10-mM dNTP Mix (10 mM の dATP, dGTP, dCTP と dTTP ミックス)と 1 μl of oligo(dT)20 プライマーを混和し、サーマルサイクラーで 65°C で 5 分間インキュベート後 SuperScript III Reverse Transcriptase を加えて 50°C で 60 分間インキュベート、その後 70°C で 15 分間インキュベート)した。Real time PCR は QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen)を使い、Mx-3000P (Stratagene, La Jolla, CA)にて行った。PCR の条件は以下の通りである:95°C で 10 分間 HotStar Taq DNA polymerase を活性化後、アニーリングは 55°C で 60 秒として、DNA 伸長は 72°C で 30 秒間とした。プライマーは E-cadherin、vimentin、snail (snail homolog 1; Snail, SNA, SNAH, SLUGH2, dJ710H13.1), TGF- β 1、CXCL8、Lymphotoxin beta receptor(LT β R)、IL-6 と GAPDH を使用した。配列を Table1 に示す。

Primer	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
E-cadherin	CCCATCAGCTGCCAGAAAAT GAA	AAACAG- GATGGCTGAAGGTGACAG
Vimentin	GACAATGCGTCTCTGGCAC- GTCTT	AAGAACCTGCAG- GAGGCAGAAGAA
Snail	ACCCAATCGGAAGCCTAACT	AGATGAGCATT4GGCAGCGA
TGF- β 1	GGCCAGATCCTGTCCAAGC	CACGATTACCACCTTTGGGTG
GAPDH	GGTGAAGGTCGGAGTCAAC- GCA	TCTTCCAGGAGGAGCGA- GATCCCTG
CXCL8	ACTGAGAGTGATTGAGAG- TGGAC	AACCCTCTGCACCCAGTTTT
LT β R	GTTGAATCTGGCAGCCAAACC	ATGGAGGCACCTTTAATTGA- GA
IL-6	ACTCACCTCTTCAGAAC- GAATTG	CCATCTTT- GGAAGGTTTCAGGTTG

Table1. 使用した primer 配列

内部コントロールとして GAPDH を使い、 $\Delta\Delta Ct$ 法にて相対定量を行った。無刺激のコントロールのサンプルを 1 として各条件の発現の相対比を表した。

5.免疫細胞染色

チャンバースライド(IWAKI)上で細胞を培養し無刺激、TGF- β 1 5 ng/ml 単独、LIGHT 10 ng/ml 単独、TGF- β 1 5 ng/ml と LIGHT 10 ng/ml 併用の条件で 48 hr 刺激を行った後、Phosphate-buffered saline(PBS)で二回洗浄し Acetone: Methanol 60:40 で 7 分間固定した。免疫細胞染色は LSAB2 Kit/HRP(Dako, Carpinteria, CA)を用いて行った。染色方法の概略は、まず内因性の peroxidase をブロックするために 0.03%過酸化水素で 5 分間前処置を行い、1 次抗体として抗ヒト E-cadherin ウサギ抗体 (1:40 で希釈)および抗ヒト vimentin ウサギ抗体 (1:80 で希釈)で 60 分間インキュベートした。PBS-Tween にて 1 次抗体を洗浄後キットに付属の 2 次抗体 (peroxidase-labeled polymer conjugated to goat anti-rabbit and anti-mouse mixed immunoglobulin)で 30 分間インキュベートを行った。2 次抗体洗浄後 DAB(3,3'-Diaminobenzidine) (Dako)で 2 分インキュベートし可視化した。核は Haematoxylin 染色した。

6. Western blot analysis

細胞を lysis buffer solution (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.5% Nonidet P-40)にて溶解し,SDS 化後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後タンパクはセミドライ式で polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。ブロッキングバッファーとして TBS-T バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20)に 2%となるように ECL Prime Blocking Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)を溶解しメンブレンを 1 時間浸してブロッキングを行った。1 次抗体および 2 次抗体の種類および希釈率は以下の抗体の項目を参照。なお、すべてのサンプルは BCA protein assay kit(Thermo Scientific, Waltham, MA)を用いて濃度を統一し、泳動を行った。

検出は ECL Prime Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)を添付のプロトコル通りに使用し、冷却 CCD カメラシステム(EZ-Capture MG; ATTO, Tokyo, Japan)で撮影した。

7.使用した抗体と希釈率

使用した抗体と希釈率は抗ヒト E-cadherin ウサギ抗体(Cell Signaling)1:3000、抗ヒト vimentin ウサギ抗体(Cell Signaling)1:5000、抗 smad2 ウサギ抗体(Cell Signaling)1:2000、抗ヒトリン酸化 smad2 ウサギ抗体(Cell Signaling)1:3000、

抗 p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) extracellular signal-regulated kinase (Erk) 1/2 ウサギ抗体(Cell Signaling)1:3000、抗リン酸化 Erk1/2 ウサギ抗体(Cell Signaling)1:3000、抗ヒトリン酸化-p38 MAPK ウサギ抗体(Cell Signaling Technology)1:1000、抗ヒト p38 MAPK ウサギ抗体(Cell Signaling Technology)1:1000、抗ヒトリン酸化 SAPK/JNK ウサギ抗体(Cell Signaling Technology)1:1000、抗ヒト SAPK/JNK ウサギ抗体(Cell Signaling Technology)1:1000、抗ヒトリン酸化 I κ B α (Inhibitor of κ B alpha) マウス抗体(Cell Signaling Technology)1:1000、抗ヒト I κ B α マウス抗体(Cell Signaling Technology)1:1000、抗ヒト LTBR, N-末端ウサギ抗体 (Sigma-Aldrich)1:1000、抗ヒト NF- κ B (Nuclear factor- κ B) p65 ウサギ抗体 (Cell Signaling Technology)1:1000 として用い、2次抗体として抗ウサギ IgG, HRP-linked 抗体(Cell Signaling)1:15000 および抗マウス IgG HRP-linked 抗体を 1:15000 で用いた。

タンパク量の確認は内部コントロールとして抗 α -tubulin (Sigma-Aldrich) マウス抗体を 1:5000 の希釈率で用いた。

8. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

A549 細胞を 24-well プレートに培養し血清を抜いた培地で 24 時間血清飢餓状態にした後刺激を与え、上清を回収した。上清中の TGF- β 1 濃度は Quantikine ELISA

human TGF- β 1 immunoassay (R&D Systems)キットを用い、プロトコルに従い測定した。吸光度は microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA)で測定し、キット付属のスタンダードを用いてスタンダードカーブを作成し、サンプルの濃度を定量した。定量にあたってはプレートリーダーに付属の Microplate Manager III data analysis software (Bio-rad)を使用した。

9.細胞表面受容体解析

添付のプロトコルに従い、Phycoerythrin (PE)-conjugated 抗ヒトマウス Lymphotoxin β R (LT β R) 抗体(R&D systems Inc.), fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled 抗ヒトマウス Herpes virus entry mediator (HVEM)抗体(Medical & Biological laboratories Co., Ltd. Nagoya, Japan)で LT β R および HVEM を標識し、EPICS XL flow cytometer (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA) と付属の System II ソフトウェアで受容体の発現を解析した

10.small interfering RNA (siRNA)の細胞への導入

LT β R の siRNA を三種類 Invitrogen (Tokyo, Japan)より購入した。ノックダウン効率を確認するために、まず三種類の LT β R siRNA duplexes (LT β R #1-#3) sets (Stealth RNAi™ Pre-Designed siRNAs)を使用した。それぞれの配列は Table2 の通りである

Sets	Sense	Antisense
LTβ R #1	AGGCCCAUCCAUAUACUCCCCU- GACUU	AAGUCAGGGAAGUAUG- GAUGGGCCU
LTβ R #2	UCUACAUCUACAAUGGAC- CAGUACU	AGUACUGGUCCAUUGUAGAU- GUAGA
LTβ R #3	UGCAAGGCAGGGCACU- UCCAGAAUA	UAUUCUGGAAGUG- CCCUGCCUUGCA

Table2. siRNA sequence: Invitrogen より予め設計された配列を購入した

ネガティブコントロールとして Stealth™ RNAi Negative Control Duplexes (Invitrogen)を使用した(配列は販売元から非公表)。細胞への導入はリポフェクション法を用い、導入試薬として Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen)を使用し、siRNA duplexes 最終濃度が 10 nM となるように添付のプロトコルに従い導入した。導入後 72 時間後に real-time RT-PCR および Western blotting でノックダウン効率を確認した。

11.統計解析

結果は少なくとも三回以上試行し、データは平均値±標準誤差で表示した。

統計解析は JMP (Version 10; SAS Institute Inc., Tokyo, Japan)ソフトウェアを使用し、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。p <0.05 を有意差ありとした。

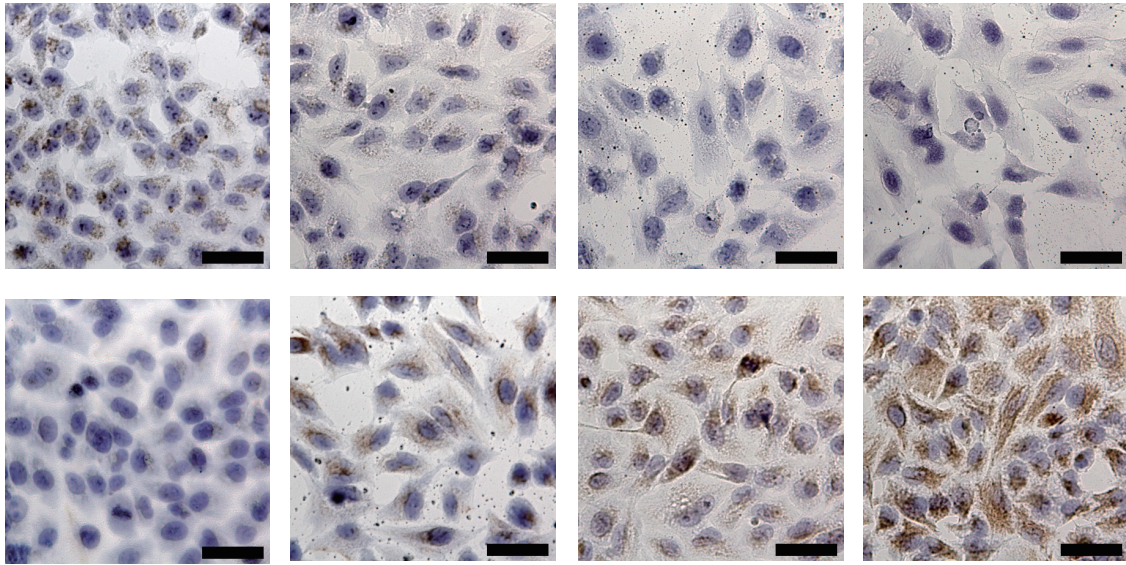
結果および考察

結果 1: LIGHT による上皮間葉転換の誘導

LIGHT は A549 細胞において TGF- β 1 による上皮間葉転換を増強する

A549 細胞を TGF- β 1 (5 ng/ml)+LIGHT (10 ng/ml)で 48 時間刺激した。位相差顕微鏡像で刺激を受けた細胞は上皮間葉転換を生じ、上皮細胞の特徴である敷石状の形態から間葉系細胞のような紡錘型の細胞へ変化した。免疫細胞染色では上皮のマーカーである E-cadherin の発現が減弱し、間葉系細胞のマーカーである vimentin の発現が増強した(Fig.1)。

Figure 1



E-cadherin	CTRL	LIGHT	TGF-β1	TGF-β1+LIGHT
vimentin	CTRL	LIGHT	TGF-β1	TGF-β1+LIGHT

Figure 1. LIGHT およびTGF-β1刺激による細胞の形態変化と免疫染色

A549細胞をLIGHT(10 ng/ml)およびTGF-β1 (5 ng/ml)で刺激し、48時間後にE-cadherin (上図)とvimentin (下図)の免疫細胞染色を行った。共刺激により敷石状の形態(CTRL)から紡錘形の間葉系細胞様に変化(TGFβ1+LIGHT)し、E-cadherinの発現減弱とvimentinの発現増強を認めた。スケールバーは50μm

加えて、TGF- β 1 と LIGHT を共刺激した群は単独刺激群と比べ、より細長い紡錘形の形態に変化した。Western blotting で確認したところ、共刺激群においてより E-cadherin の発現が減弱し vimentin の発現は増強した(Fig. 2A)。次に、形態的变化と遺伝子発現の関連を評価するために、定量的 RT-PCR で刺激後 48 時間での E-cadherin と vimentin の遺伝子発現を確認した。Fig. 2B に示すように TGF- β 1 単独刺激において、過去の文献 [43]と同様に有意に E-cadherin mRNA 発現減弱と vimentin mRNA 発現増強を示した。さらに、TGF- β 1 と LIGHT で共刺激された群で TGF- β 1 単独群と比較して有意に E-cadherin mRNA の減弱と vimentin mRNA の発現を増強した。このことから、LIGHT は TGF- β 1 による上皮間葉転換を増強すると考えられた。

続いて、上皮間葉転換を生じた細胞が間葉系細胞の機能である収縮能を獲得したかどうかを gel contraction assay で評価した。gel contraction assay は線維芽細胞を type I collagen 中で三次元培養を行う方法で正常な創傷治癒および線維化で認められる組織収縮の *in vitro* モデルである[44]。このアッセイにおいて、間葉系細胞はインテグリンの作用でコラーゲン線維と結合し、機械的な張力を生じる。この張力は組織において組織収縮で認められるもので、gel サイズを縮小するように働く。Fig. 3 に示すように、無刺激と比較して TGF- β 1 は有意に gel サイズを縮小した。

Figure 2

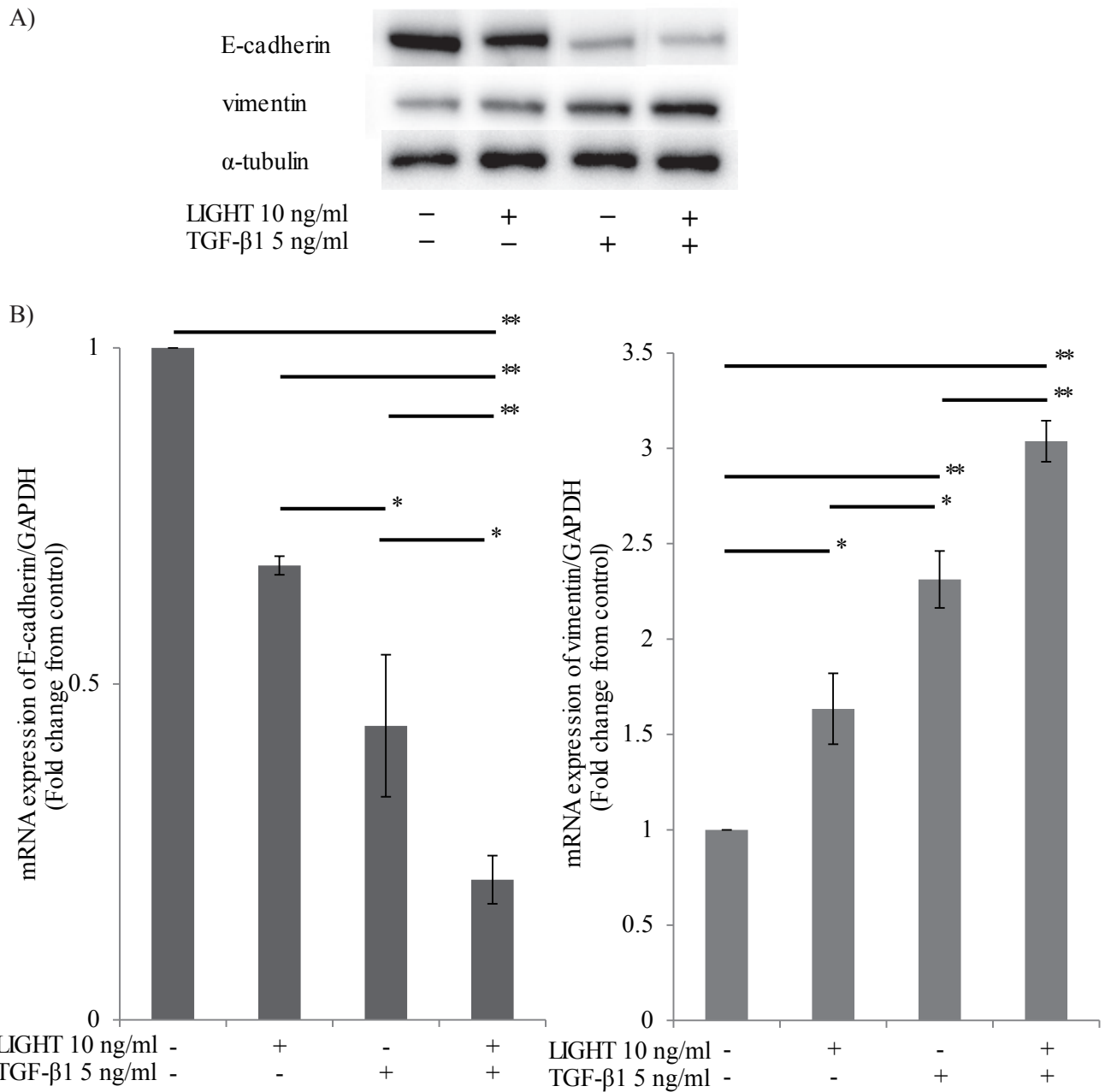


Figure 2. LIGHTによるA549細胞のTGF- β 1による上皮間葉転換の増強

(A)上図:E-cadherin、下図:vimentin発現をWestern blottingにて評価した。

LIGHT (10 ng/ml) \pm TGF- β 1 (5 ng/ml)でA549細胞を48時間刺激した。

(B) (A)と同条件におけるmRNA発現を検討した。

共刺激においてTGF- β 1単独刺激と比較して有意にE-cadherin発現を抑制しvimentin発現を亢進した。

n = 5 separate experiments. *: P<0.05; **: P<0.01

Figure 3

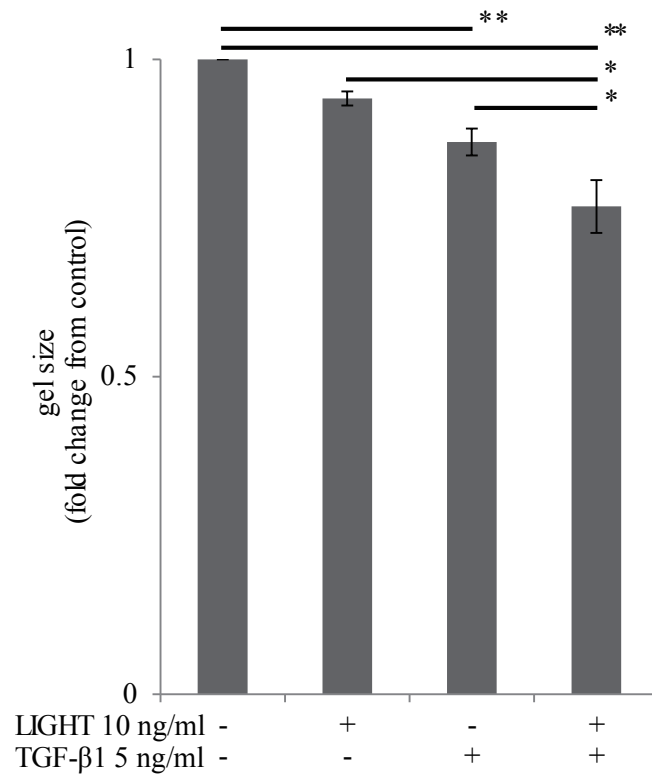


Figure3.上皮間葉転換による間葉系細胞としての機能

Gel contraction assayで間葉系細胞としての機能である収縮能の評価を行った。LIGHTとTGF-β1共刺激によってgelサイズはTGF-β1単独と比較して有意に縮小した。n = 6 separate experiments. *: P<0.05; **: P<0.01

LIGHT と TGF- β 1 の共刺激においては TGF- β 1 単独と比較して有意に gel サイズを縮小した。このことから LIGHT は TGF- β 1 によって生じた上皮間葉転換細胞の収縮能を増強することが示された。

以上の結果をまとめると LIGHT は形態学的、タンパク発現、機能の面から TGF- β 1 による上皮間葉転換を増強することが示唆された。

LIGHT は A549 細胞において上皮間葉転換を誘導する

前項において LIGHT が TGF- β 1 による上皮間葉転換を増強することを示した。次に我々は LIGHT が単独で上皮間葉転換を生じるかどうかを調べた。まず上皮間葉転換マーカーに対する LIGHT の濃度依存的な効果について 0.1-50ng/ml の濃度で刺激を行い 48 時間後にタンパクの発現を Western blotting で評価した。Fig. 4A に示すように LIGHT は濃度依存的に上皮のマーカーである E-cadherin の発現を減弱し、間葉系のマーカーである vimentin, N-cadherin, α -SMA の発現を増強した。続いて E-cadherin mRNA と vimentin mRNA を定量的 RT-PCR で評価したところ、LIGHT は濃度依存的に有意に E-cadherin mRNA 発現を抑制し、vimentin mRNA 発現を増強した。以上から、LIGHT は単独で上皮間葉転換を生じることが示唆された(Fig.4B)。

Figure 4

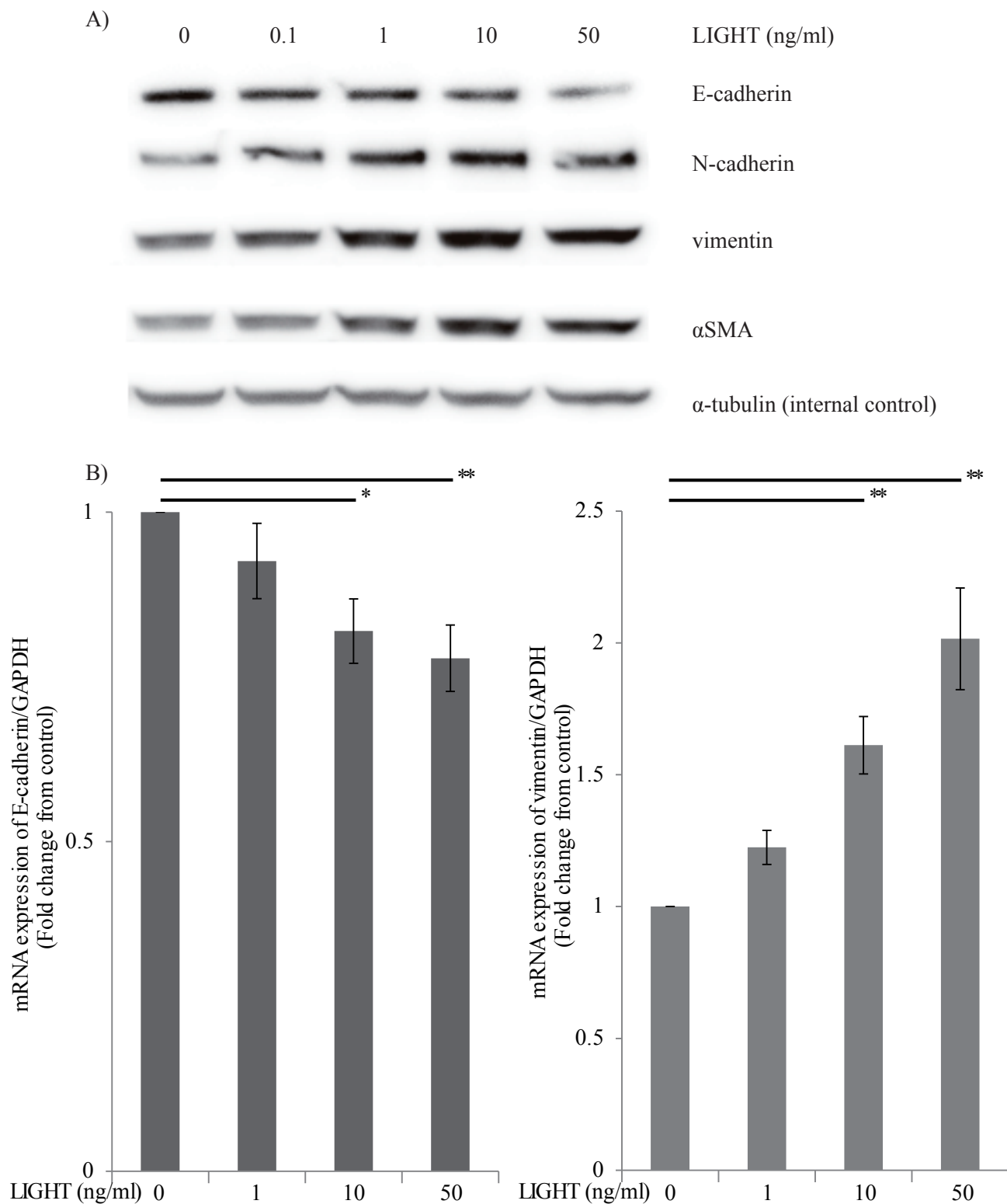


Figure 4. LIGHTによる上皮間葉転換の誘導

(A) LIGHT濃度を変えてA549細胞を刺激し上皮および間葉系細胞のマーカーを確認した。LIGHTはE-cadherin(上皮細胞マーカー)の発現を減弱し、同時にN-cadherin、vimentin、 α SMA(間葉系マーカー)発現を亢進させた。

(B) 同様の条件でE-cadherinおよびvimentin mRNA発現について検討したところ、LIGHT10ng/ml以上で濃度依存的に有意にE-cadherin mRNA発現を抑制し vimentin mRNA発現を亢進した。

n = 6 separate experiments. *: p<0.05; **: p<0.01.

A549 細胞における LIGHT による上皮間葉転換の機序

LIGHT が TGF- β 1 による上皮間葉転換を増強し、LIGHT 自身も上皮間葉転換を誘導することが示唆されたため、細胞内のシグナルについて解析を行った。

1. LIGHT による TGF- β 1 発現の検討

まず、我々は LIGHT が A549 細胞からの TGF- β 1 産生を促すことで、オートクライン機序で上皮間葉転換を生じている可能性について検討した。A549 細胞を様々な LIGHT 濃度 (0, 10, 50 ng/ml) で刺激して、24 時間後に上清を回収し TGF- β 1 の濃度を ELISA で測定した。Fig. 5A に示すようにどの濃度においても LIGHT は TGF- β 1 を誘導しなかった。Fig. 5B に示すように同条件での定量的 RT-PCR においても無刺激と比べて TGF- β 1 mRNA 発現を亢進させることはなかった。このことから、LIGHT による上皮間葉転換は TGF- β 1 産生によるものでないことが示された。

2. LIGHT による上皮間葉転換と smad-Snai1 経路

次に TGF- β 1 によって生じる上皮間葉転換の重要な細胞内 pathway である smad-Snai1 シグナル経路[45]について検討を行った。まず LIGHT が smad2 のリン酸化を生じるかについて Western blotting にて確認した。

Figure 5

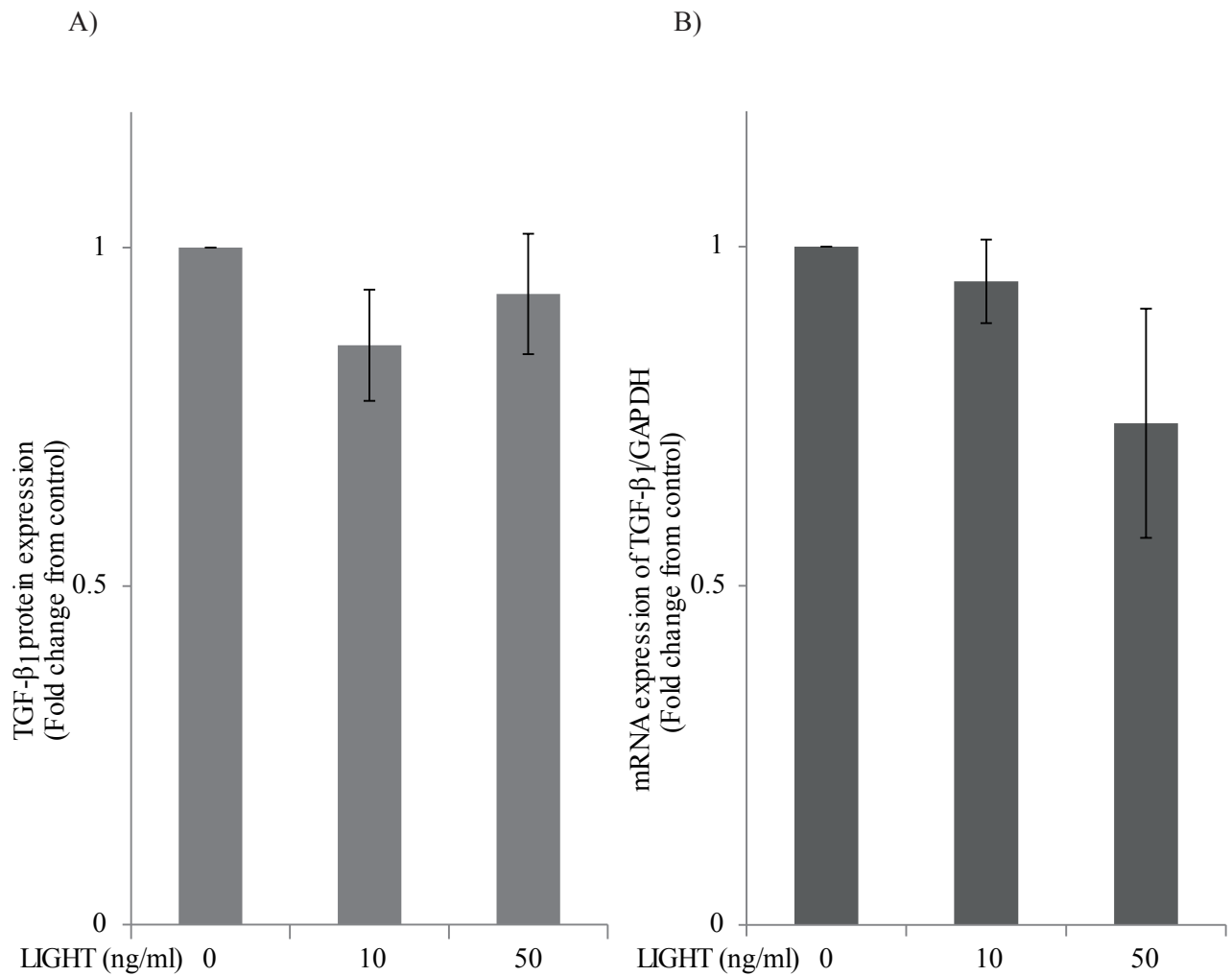


Figure 5. LIGHTによるTGF-β1産生についての検討

A549細胞をLIGHT (0, 10, 50 ng/ml)で刺激後48時間後に上清を回収しTGF-β1濃度を測定した。

(A) 上清中のTGF-β1濃度はLIGHT刺激によって変化せず産生は生じなかった

(B) LIGHT刺激後のTGF-β1 mRNA発現は変化しなかった。

また、LIGHTはA549細胞からTGF-β1を誘導しなかった

n=4 separate experiments. *: p<0.05; **: p<0.01

Fig. 6A に示すように、TGF- β 1 刺激によって生じる smad2 のリン酸化 (smad の活性化) は LIGHT 刺激によって生じなかった。

続いて smad シグナルの下流にある snai1 について定量的 RT-PCR で発現の検討を行った。Fig. 6B に示すように、*Snai1* mRNA 発現は TGF- β 1 刺激後約 2 時間でピークに達するのに対して、LIGHT は *Snai1* mRNA 発現を増強しなかった。このことから LIGHT による上皮間葉転換は TGF- β 1 の産生や smad-*Snai1* 経路によらない可能性が示唆された。

Figure 6

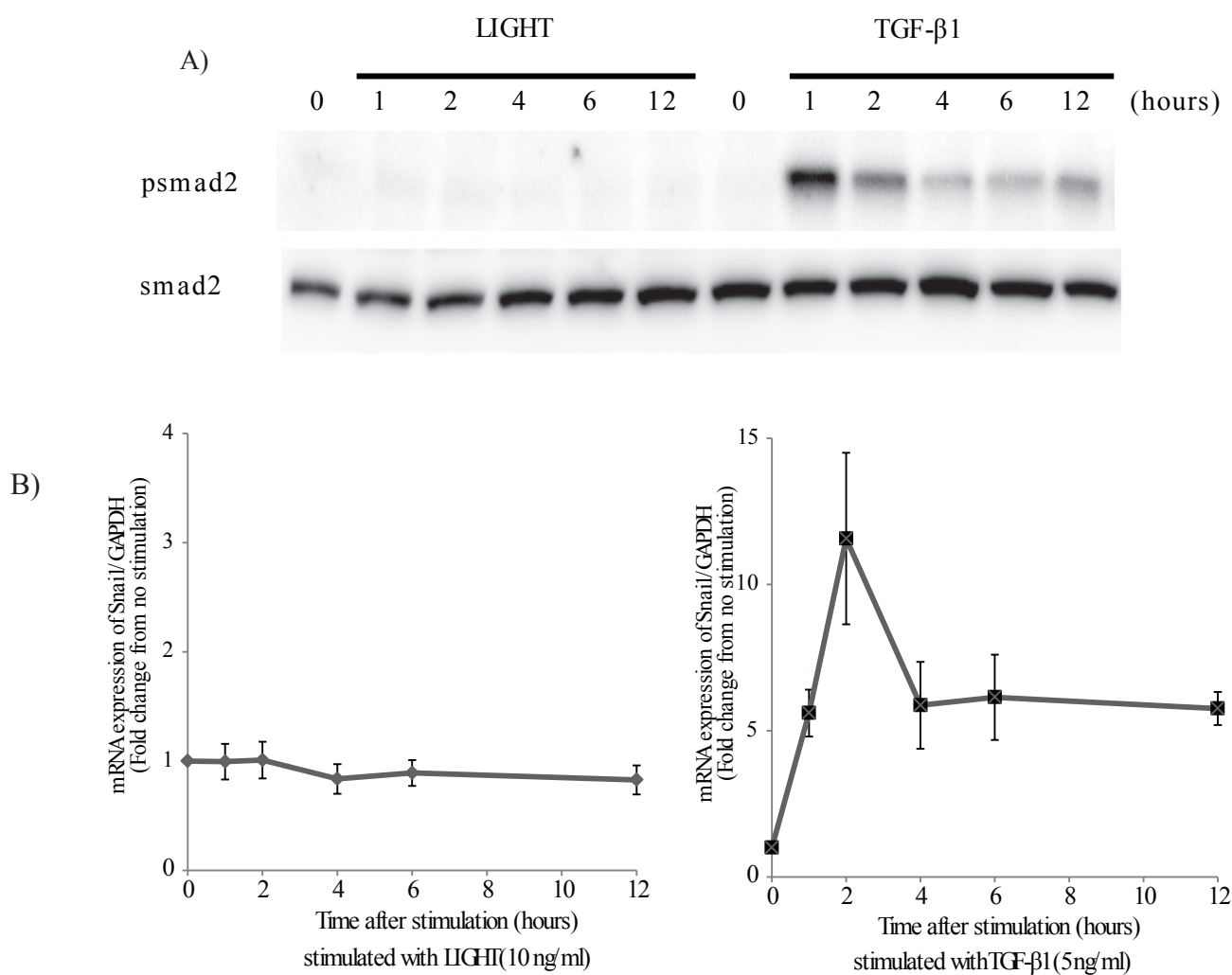


Figure 6. LIGHTによるsmad-snail pathway活性化についての検討

(A) TGF- β 1(5ng/ml)およびLIGHT (10 ng/ml)刺激によるsmad2 pathwayの活性化を検討した。TGF- β 1はsmad2リン酸化を生じたがLIGHTでは生じなかった。

(B) 同条件でE-cadherin発現を抑制する経路であるsnail pathwayの発現について検討した。TGF- β 1はsnail mRNA発現を誘導したが、LIGHTは誘導しなかった。

3. Erk1/2 シグナルと LIGHT 誘導上皮間葉転換

TGF- β 1 による上皮間葉転換のシグナル伝達として Erk1/2 のリン酸化を介した経路が知られており[46]、LIGHT による上皮間葉転換が Erk1/2 のリン酸化を介したものか検討を行った。Fig. 7A に示すように LIGHT 刺激後 1 時間で Erk1/2 のリン酸化を示した。Erk1/2 リン酸化による活性化は 2 時間か 4 時間まで続き、12 時間で減少した。Erk1/2 経路が LIGHT による上皮間葉転換に関与しているかどうかを確かめるために、Erk1/2 のリン酸化酵素阻害剤である U0126 を A549 細胞に投与した状態で LIGHT による刺激を行った。Fig. 7B に示すように、LIGHT 刺激前 1 時間に U0126 投与を行ったところ、上皮間葉転換によって生じる E-cadherin 発現の減弱を抑制した。これらの結果から LIGHT による上皮間葉転換には Erk1/2 経路が関わっていることが示唆された。

Figure 7

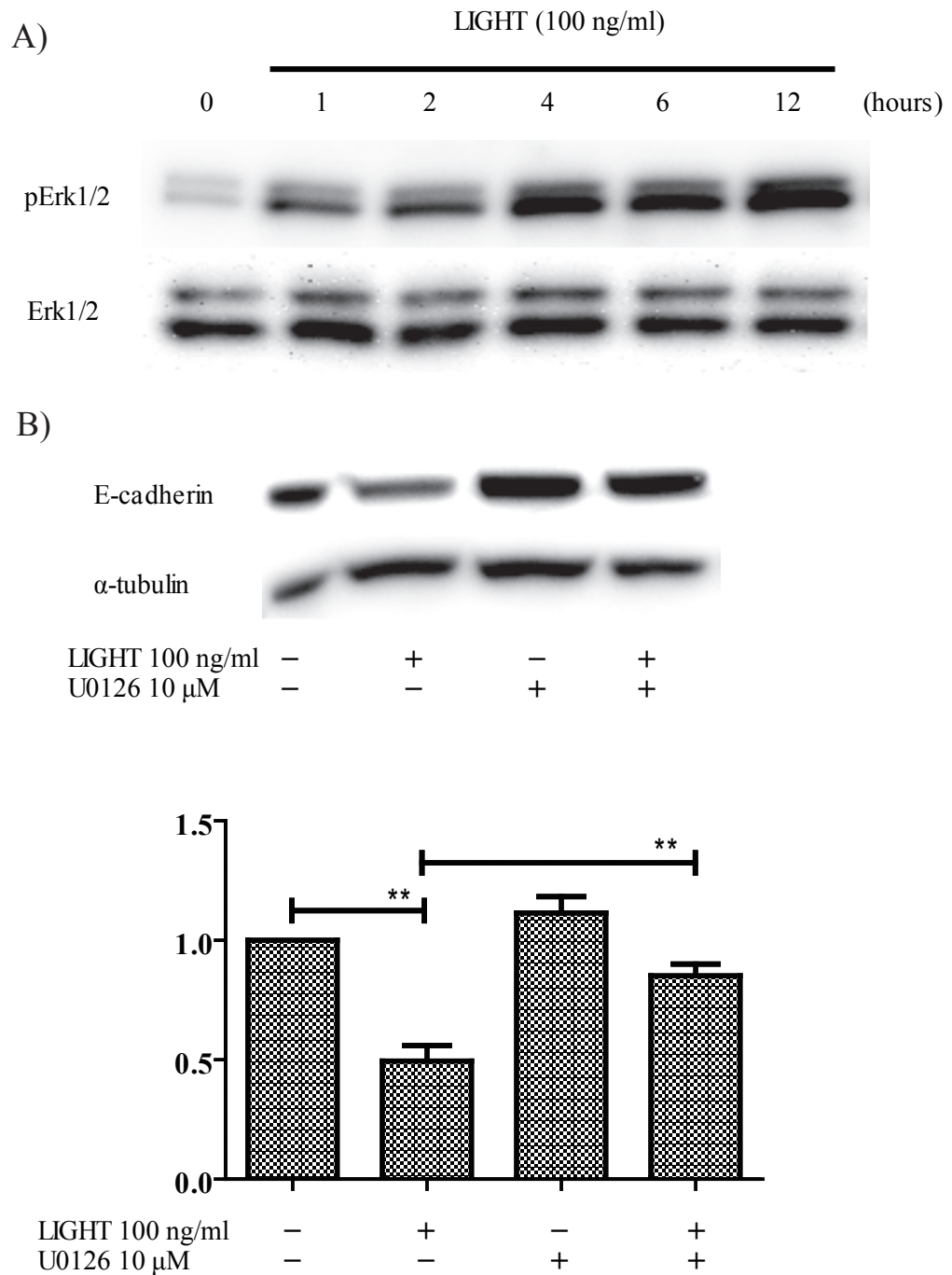


Figure 7. Erk1/2シグナルとLIGHT誘導上皮間葉転換

(A) LIGHT100ng/mlでA549細胞を刺激し刺激によるErk1/2リン酸化について検討した。0,1,2,4,6,12時間の変化をみると、刺激後1時間以降にリン酸化を生じた。リン酸化は2-4時間後まで続き12時間後には減弱した。

(B) Erk 1/2選択的リン酸化酵素阻害剤のU0126を使用し上皮間葉転換への影響を検討した。U0126投与によりA549細胞においてLIGHT刺激によるE-cadherin発現減弱を抑制した。

**: $p < 0.05$

結果 1 についての考察

上皮間葉転換は上皮細胞が何らかの刺激によって E-cadherin といった上皮のマーカー発現を失い、間葉系細胞のマーカーである N-cadherin、 α SMA、vimentin の発現を増強し、間葉系細胞としての機能を獲得することである。特に E-cadherin は上皮の性質と機能のマーカーとして重要な接着因子[47]とされている。本研究で LIGHT が TGF- β 1 による上皮間葉転換を増強し、上皮間葉転換を生じた細胞の収縮能を増強することを明らかにした。さらに、LIGHT は TGF- β 1 なしで上皮間葉転換を誘導することができ、その細胞内シグナルは TGF- β 1 による上皮間葉転換とは異なり、Erk1/2 経路を介すことを明らかにした。

近年、LIGHT は気管支喘息(BA)、関節リウマチ(RA)、炎症性腸疾患(IBD)の病態に深く関与しているとする報告がある[22, 23]。特に、慢性の気道炎症が継続している状態である重症喘息において、喀痰中の LIGHT 濃度と肺機能が負の相関を示し、気道リモデリングに関与していることが示唆されている [25]。以前の報告[24]で、LIGHT による重症喘息患者の気道の線維化とそれに伴う気道リモデリングはマクロファージからの TGF- β 分泌誘導と好酸球からの IL-13 分泌誘導によるものと考察されている。また、肺の線維化を生じる慢性炎症性肺疾患であるサルコイドーシス患者において、BALF 中の LIGHT 濃度が上昇していたとする報告[26]もある。以上から LIGHT は慢性炎症性肺疾患のみならず肺線

維症の病態にとって重要なメディエーターであることが考えられる。しかしながら、組織線維化の原因の一つと考えられている上皮間葉転換に対する LIGHT の関与について研究された文献はなく、本研究によって LIGHT のもつ TGF- β 1 による上皮間葉転換の増強作用と、LIGHT 単独での上皮間葉転換を肺上皮細胞で生じることが初めて明らかになった。TGF- β 1 は肺の線維化において重要なメディエーターであり、TGF- β シグナルが増強されることは上皮間葉転換を誘導し組織線維化に関与すると考えられている[48, 49]。さらに、いくつかの炎症性サイトカインは TGF- β 1 による上皮間葉転換を増強することが知られており[16-18]、炎症そのものが組織線維化においてきわめて重要であると考えられる。しかしながら、TGF- β 1 非存在下で上皮間葉転換を生じるという報告はほとんどなく[50]、我々は LIGHT が単独で生じる上皮間葉転換のメカニズムについて検討した。

LIGHT と同様に TNF superfamily である TNF- α が TGF- β 1 産生を誘導することから[51]、LIGHT による上皮間葉転換も細胞からの TGF- β 1 産生を誘導することによって生じる可能性を考えた。しかし、LIGHT は TGF- β 1 産生も mRNA 発現も増強しなかった。このことから LIGHT による上皮間葉転換の機序は TGF- β 1 のオートクラインによるものではないと考えられた。また、TGF- β シグナルの直下にある smad 経路と Erk 経路は TGF- β 1 による上皮間葉転換に

において主要な経路とされている [46]。このため我々は LIGHT が smad および Erk 経路の活性化を生じるかどうか検討したところ、LIGHT によって smad のリン酸化なしに Erk リン酸化を生じることが見いだされた。また Erk1/2 の選択的リン酸化酵素阻害剤である U0126 は A549 細胞での LIGHT 刺激による E-cadherin 発現減弱を抑制した。これらの結果から Erk1/2 経路が LIGHT による上皮間葉転換を生じるのに必要な経路であることが示唆された。

本研究における検討の限界として、上皮間葉転換の研究において使用した細胞株が、正常気道上皮細胞ではなく肺胞上皮癌細胞株の A549 細胞を用いた点である。そのため、肺線維化や気道リモデリングの病因として本研究の結果を直接反映するのは難しい面がある。しかし、A549 細胞は肺の上皮細胞の機能解析に広く使われており、いくつかの研究で肺の線維化の *in vitro* モデルとして A549 細胞が使われているのも事実である [52, 53]。

結果 2:LIGHT による気道上皮細胞からの CXCL8 産生

気道上皮細胞における LT β R および HVEM の発現

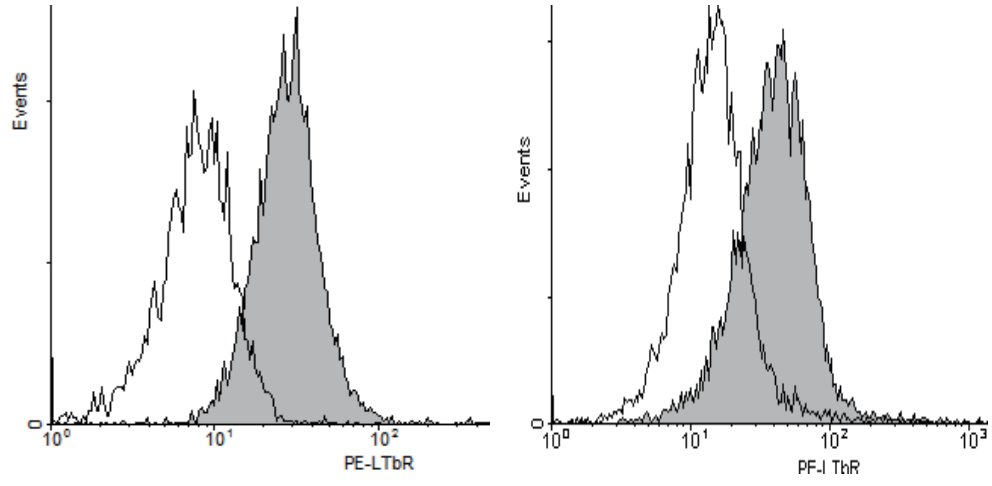
LIGHT の受容体は LT β R および HVEM が知られており[54]、我々はまずフローサイトメーターを用いて細胞表面の受容体発現を解析した。LT β R と HVEM のポジティブコントロールとして両受容体を発現している[55] [56]THP-1 細胞を用いた。Fig. 8 に示すように、BEAS-2B 細胞は LT β R を発現していたが、HVEM は発現していなかった。

サイトカインアレイを用いたサイトカイン・ケモカイン産生の検討

LIGHT 投与による気道上皮細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生を網羅的に確認するために、LIGHT 50ng/ml で BEAS-2B 細胞を刺激し、24 時間後に上清を回収し、サイトカインアレイを用いて、サイトカイン・ケモカインの産生をみた。Fig. 9 に示すように、LIGHT 刺激により IL-6、CXCL8、IL-10 等の炎症性サイトカイン・ケモカインを誘導した。

Figure 8

A)



BEAS-2B cells

THP-1 cells

(positive control)

B)

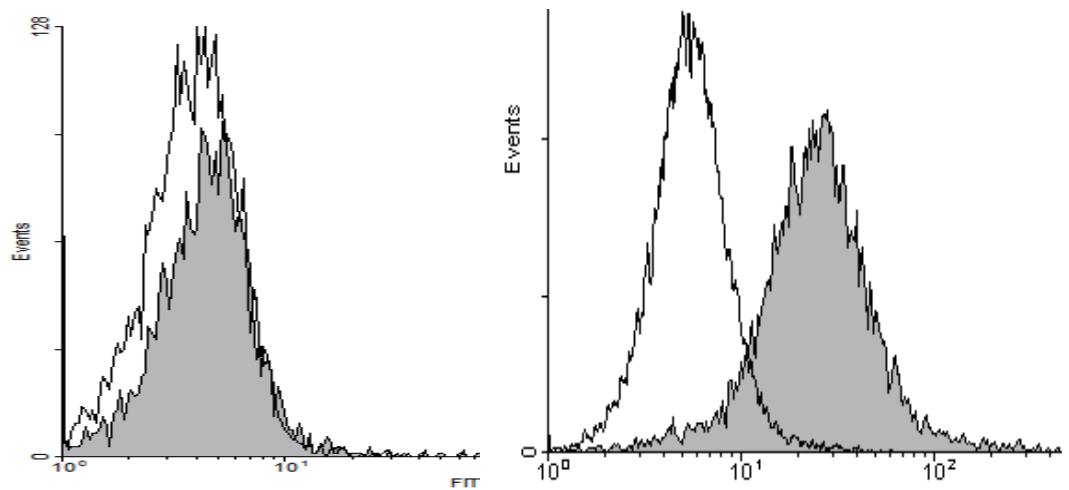


Figure 8. 気道上皮細胞におけるLTβRおよびHVEMの発現の検討

BEAS-2B細胞とTHP-1細胞にPE-LTβR抗体およびFITC-HVEM抗体で処理し、
蛍光強度をフローサイトメーターで測定した。

THP-1細胞は両抗原を発現しておりpositive controlとして用いた。

(A)PE-LTβR抗体処理による蛍光強度: BEAS-2B細胞はLTβRを発現していた。

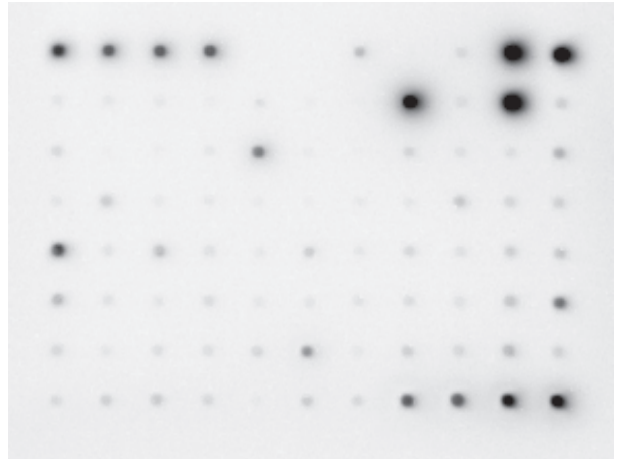
(B)FITC-HVEM抗体処理による蛍光強度:BEAS-2B細胞はHVEMを発現していなかった。

Figure9

A)



B)



C)

Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GMCSF	GRO	GRO-α
I-309	IL-1α	IL-1β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	CXCL8	IL-10
IL-12 p40p70	IL-13	IL-15	INF-γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1β
MIP-1δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1	TNF-α	TNF-β	EGF	IGF-I	Angiotensin
Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC	Ckβ8-1	Eotaxin	Eotaxin-2	Eotaxin-3
FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-9	Fit3 Ligand	Fractaline	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3α	NAP-2	NT-3
NT-4	Osteoprotegerin	PARC	PIGF	TGF-β2	TGF-β3	TIMP-1	TIMP-2	Pos	Pos	Pos

Figure9. LIGHTによる気道上皮細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生

BEAS-2B細胞をLIGHT 50 ng/mlで刺激し、24時間後に上清を回収した。

サイトカインアレイにはRaybio array5を用いた

(A) 無刺激群 (B) LIGHT刺激群

(C) アレイマッピングと増減を色で識別したもの。

赤: 無刺激より2倍以上発現が亢進したもの

青: 無刺激より0.5倍未満に発現が低下したもの

緑: 0.5-2倍未満)

LIGHT刺激によりIL-6,7,CXCL8,IL-10といった炎症性サイトカインが上昇した一方、FGFやIL-1の発現低下を認めた。

LIGHTによる気道上皮細胞からのCXCL8およびIL-6発現

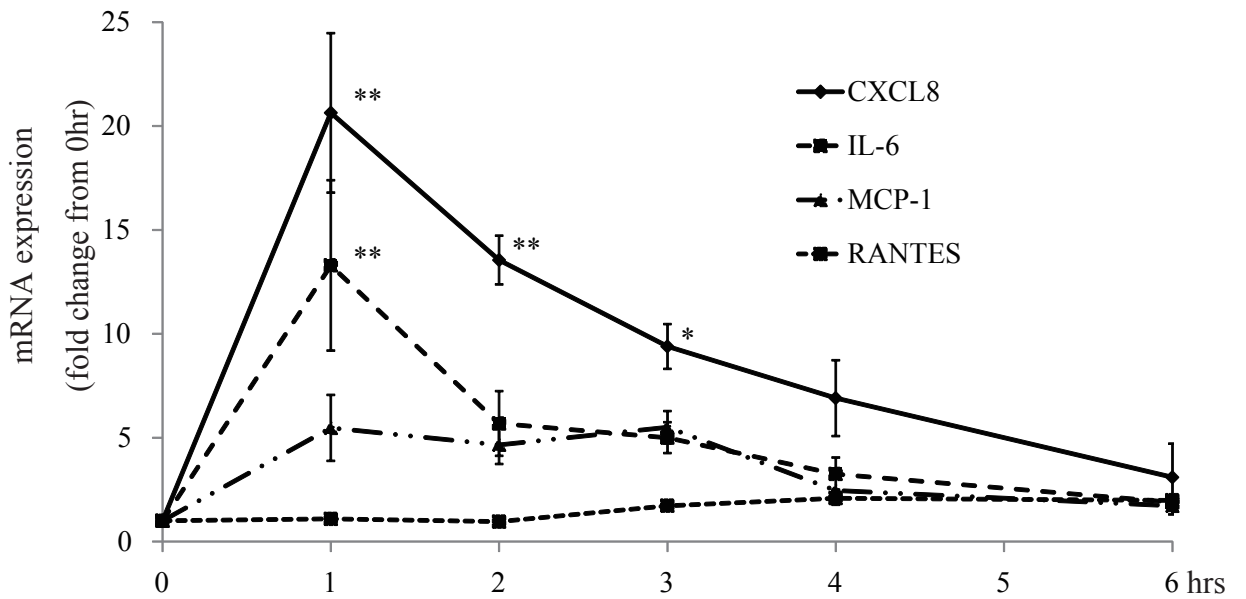
BEAS-2B細胞に及ぼすLIGHTの影響を確認するために、刺激後の種々のサイトカイン mRNAの時系列変化を評価した。Fig. 10Aに示すようにLIGHTは刺激後1時間でCXCL8およびIL-6 mRNA発現を有意に誘導した。次に濃度依存的作用を調べるために、様々な濃度のLIGHT (0, 10, 100 ng/ml)で刺激を行い1時間後にmRNA発現を解析した。LIGHTは濃度依存的にCXCL8およびIL-6 mRNA発現を有意に誘導した(Fig. 10B)。また、Fig. 11に示すように、LIGHTは刺激後24時間でBEAS-2B細胞からのCXCL8およびIL-6産生を有意に誘導した。

LIGHTによる細胞内シグナル活性化

CXCL8は気道上皮細胞においてMAPK活性化やNF- κ Bなどの誘導により産生されることが知られている[57]。このため、我々はLIGHTによるCXCL8産生もこれらのシグナルの活性化による可能性も考え、細胞をLIGHTで刺激後0, 5, 15, 20, 30, 90分後のErk1/2, JNK, p38 MAPK, I κ B α のリン酸化の時系列変化をWestern blottingで解析した。Fig. 12に示すように、LIGHTによる刺激で細胞内のErk1/2, JNK, p38 MAPK, I κ B α は15分以内にリン酸化を認め、MAPKsの活性化を認めた。またI κ B α はリン酸化されることでNF- κ Bの遊離と核内移行を誘導した。

Figure 10

A)



B)

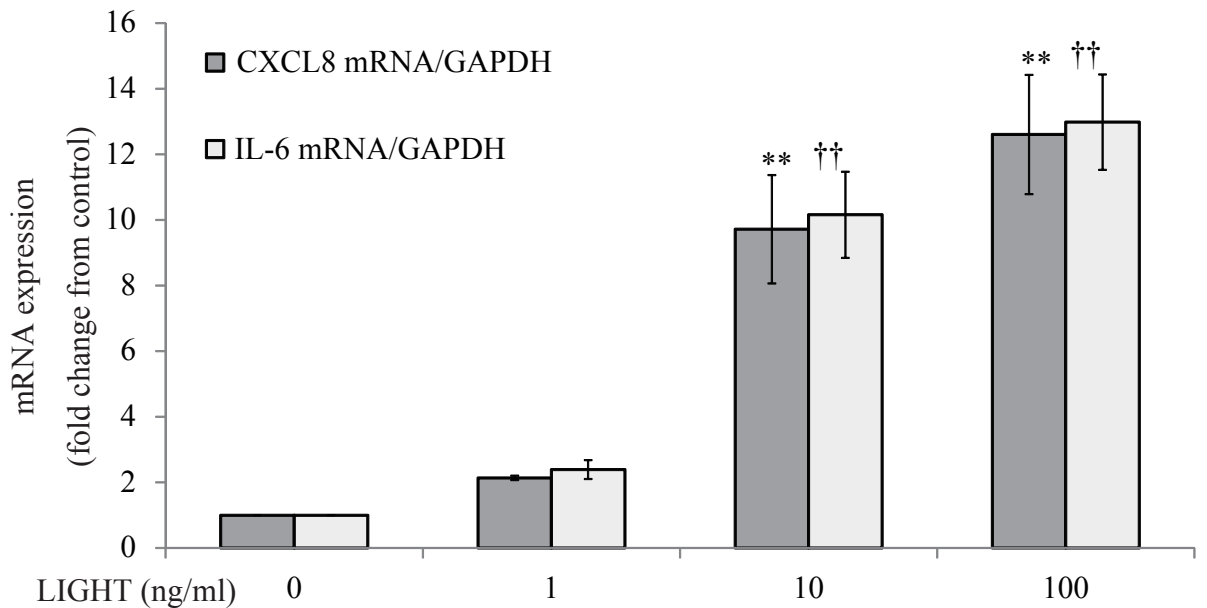


Figure10.LIGHT刺激による時系列変化と濃度依存性変化

(A)BEAS-2B細胞をLIGHT 50 ng/mlで刺激しCXCL8, IL-6, MCP-1, RANTES mRNA発現について時系列変化を検討した。LIGHTは刺激後1時間をピークにCXCL8,IL-6のmRNA発現を有意に誘導した n=4 separate experiments. *: p<0.05, **: p<0.01 vs 0 hr

(B)BEAS-2B細胞にLIGHT 0, 1, 10, 100 ng/mlで刺激し、1時間後にRNAを回収しCXCL8,IL-6 mRNA発現を検討した。LIGHTは濃度依存的に有意にCXCL8, IL-6m RNAを誘導した n=4 separate experiments. ** and ††: p<0.01 vs 0 ng/ml

Figure 11

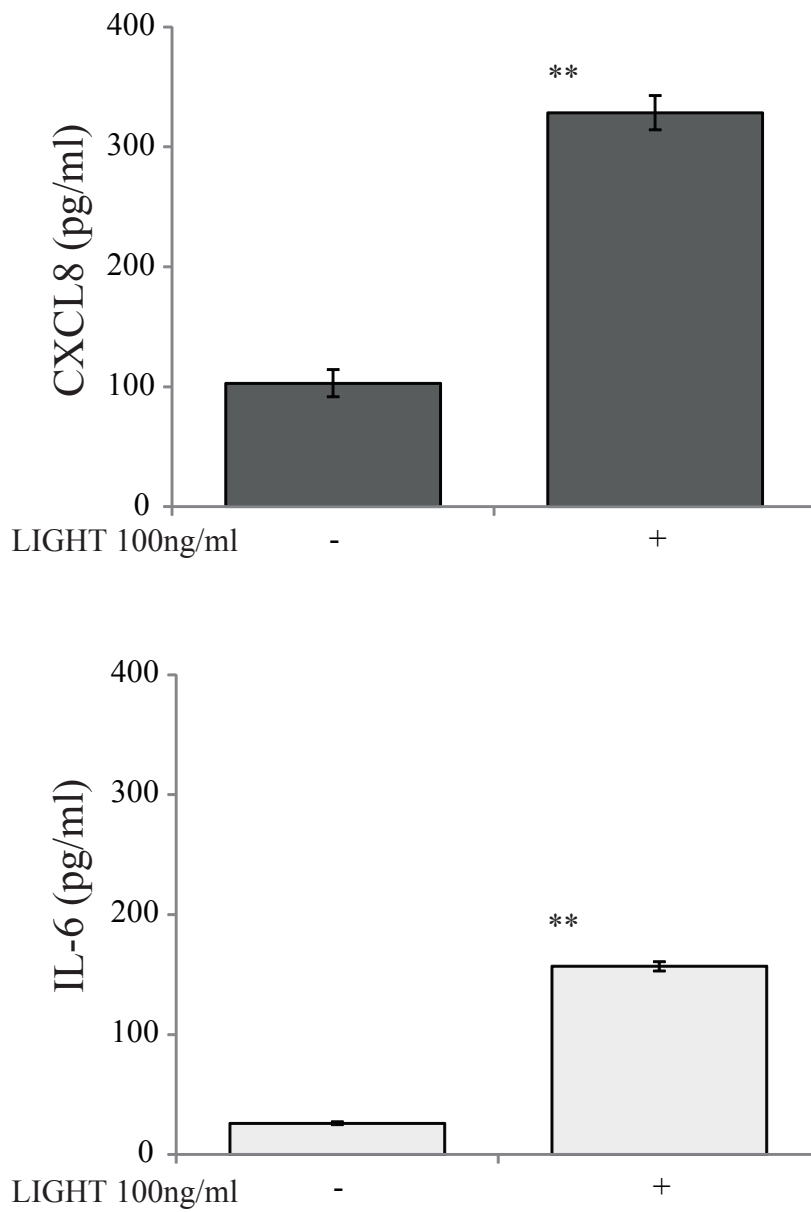


Figure 11. LIGHTによる気道上皮細胞からのCXCL8, IL-6産生

LIGHT 100 ng/mlで刺激し24時間後に上清を回収したものをELISAで測定した。LIGHTは有意に気道上皮細胞からのCXCL8およびIL-6産生を誘導した。n=6 separate experiments. **: p<0.01

Figure 12

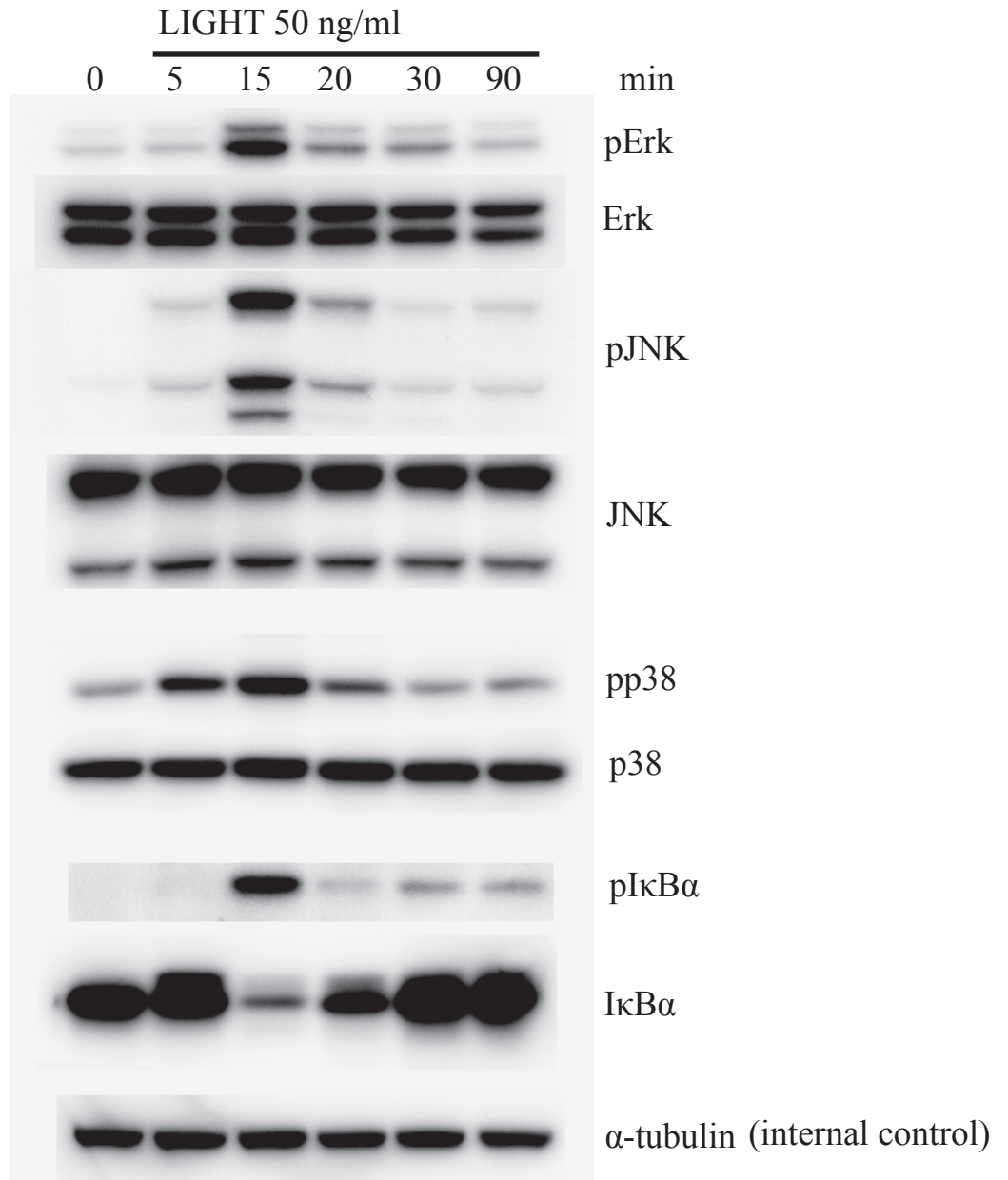


Figure 12. LIGHT刺激による細胞内シグナルの活性化

BEAS-2B細胞をLIGHT 100 ng/mlで刺激し、0,5,15,20,30,90分後に細胞溶解液を回収し、Erk, JNK, p38, IκBのリン酸化を評価した。

MAPKsは15分以内にリン酸化を認め、それぞれのシグナルの活性化を認めた。

IκBはリン酸化されることでNF-κBの遊離と核内移行を誘導した。

LIGHT による LT β R を介した CXCL8 誘導

LIGHT による気道上皮細胞からの CXCL8 産生が受容体である LT β R を介した反応であることを確認するために BEAS-2B および NHBE 細胞に LT β R の siRNA を導入し、受容体をノックダウンした。まず、三種類の siRNA (#1-#3) を使用し、導入後 72 時間での定量的 RT-PCR と Western blotting にてノックダウン効率を確認した。Fig. 13A に示すように siRNA #3 が最も強く LT β R 発現を抑制した。続いて siRNA 導入後 72 時間後の細胞を LIGHT 50ng/ml で刺激を行い CXCL8 の産生を検討した。Fig. 13B に示すように Lipofectamin 試薬のみや、negative control siRNA (NCsiRNA) 導入では CXCL8 の産生に影響を与えなかったが、siRNA 導入後により有意に CXCL8 産生を抑制し、siRNA#3 が最も抑制効果が強かった。これらの結果から LIGHT による CXCL8 誘導に LT β R が関与していることが示唆された。また、以降の実験における受容体ノックダウンには siRNA #3 を用いることとした。

Figure 13

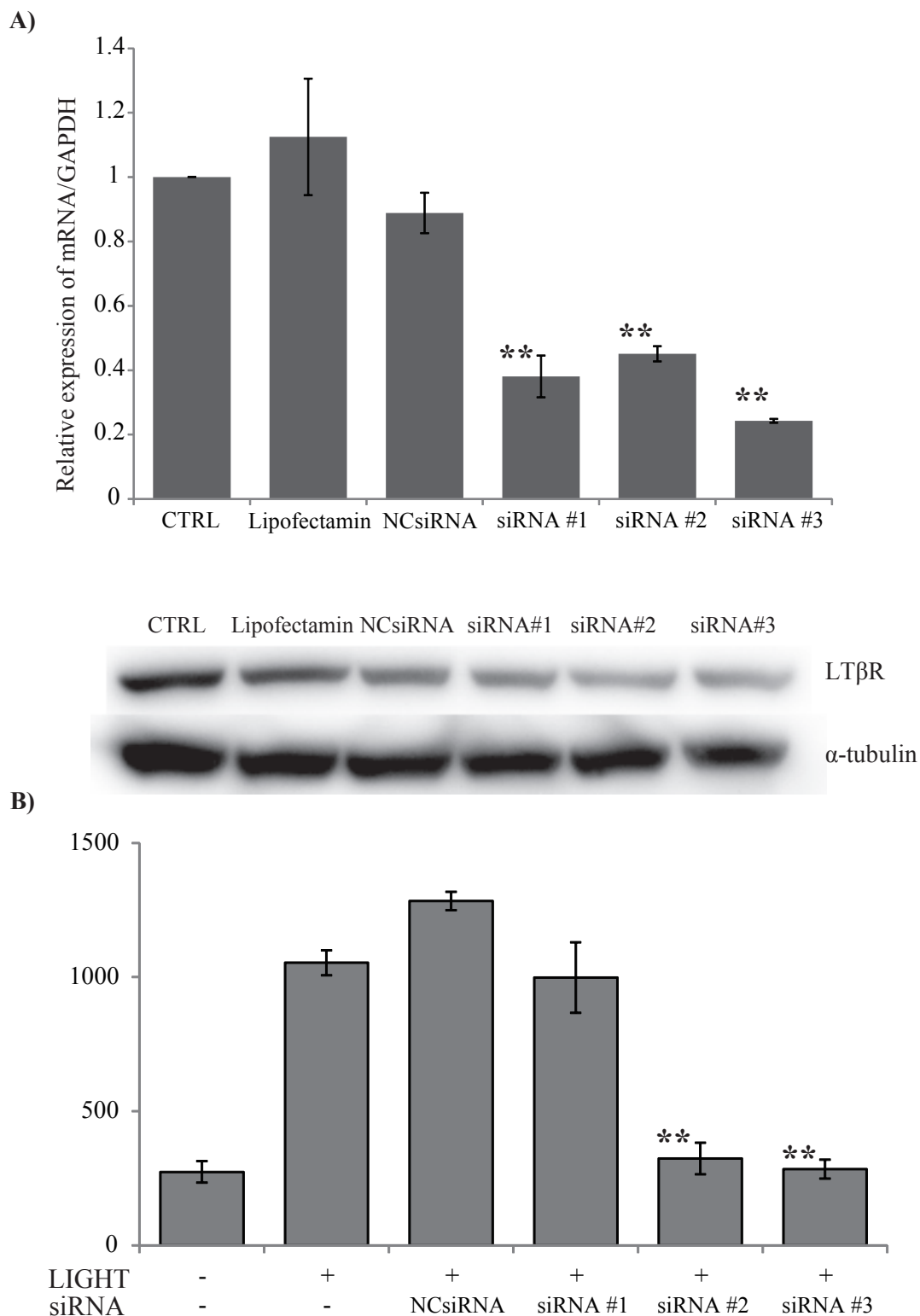


Figure13. LTβR siRNAによるCXCL8産生への影響

BEAS-2B細胞にLTβRのsiRNAをLipofectaminで導入し、受容体をノックダウンした。

(A)三種類のsiRNA (#1-#3)を使用し、導入後72時間での定量的RT-PCRとWestern blottingにてノックダウン効率を確認した。

Lipofectamin試薬のみ、negative control siRNA (NCsiRNA)ではLTβR mRNA発現に影響を与えなかったが、siRNA #1-#3導入群で有意にLTβR mRNA発現を抑制した。

(B)siRNA導入後72時間後にLIGHT 100 ng/mlで刺激を行い24時間後に上清を回収しELISAでCXCL8濃度を測定した。siRNA#2と#3で有意にCXCL8産生を抑制した。

n=4 separate experiments. **: p<0.01

LIGHT による CXCL8 産生における Erk1/2、p38 MAPK、JNK および NF- κ B の 関与

続いて、以前の研究で、気道上皮細胞からの CXCL8 産生において MAPK シグナルの活性化が示唆されており [58]、LIGHT による CXCL8 産生においても MAPK シグナルの活性化が関与しているかどうか調べた。BEAS-2B 細胞にそれぞれの選択的リン酸化酵素阻害剤である U0126(Erk1/2 リン酸化酵素阻害剤)、SB203580(p38 MAPK リン酸化阻害剤)、SP600125(JNK リン酸化阻害剤)を LIGHT 刺激 1 時間前に投与し、24 時間後の上清の CXCL8 産生を ELISA で確認した。Fig.14A に示すように U0126 投与群で有意に CXCL8 産生を抑制したものの、SP600125 および SB203580 投与群では CXCL8 産生に影響を与えなかった。以上の結果から LIGHT による CXCL8 誘導には Erk1/2 経路が関わっている可能性が示唆された。また、CXCL8 のプロモーター領域に NF- κ B 結合部位の存在が知られており [59, 60]、LIGHT による CXCL8 産生に NF- κ B シグナルを介しているかを検討するために、I κ B の選択的リン酸化阻害薬である BAY11-7082(10 μ M)を使用したところ、BAY11-7082 投与で有意に CXCL8 産生を抑制した(Fig.14B)。さらに、NHBE 細胞でも U0126 および BAY11-7082、LT β R siRNA 使用し LIGHT による CXCL8 産生に与える影響を確認したところ、BEAS-2B 細胞と同様に U0126、BAY11-7082、LT β R siRNA 群で有意に CXCL8 産生を抑制した(Fig. 14C)。

Figure 14

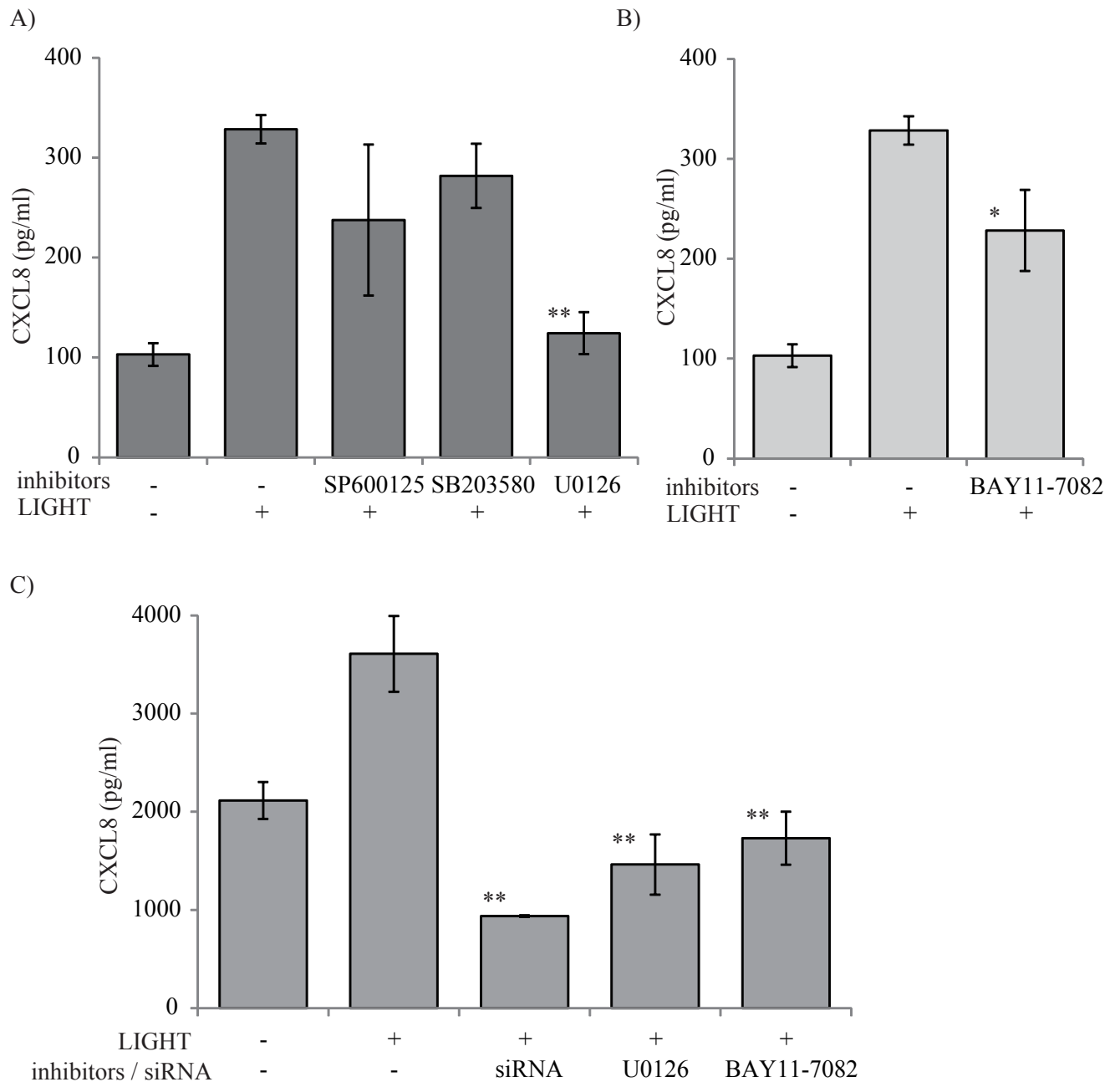


Figure 14.各種阻害剤によるCXCL8産生抑制効果

(A)BEAS-2B細胞にMAPKリン酸化阻害剤をLIGHT刺激1時間前に投与を行い、その後LIGHT 50 ng/mlで刺激を行い24時間後に上清を回収しELISAでCXCL8濃度を測定した。U0126は有意にCXCL8産生を抑制した。

(B)IκBリン酸化酵素阻害剤のBAY11-7082を(A)と同条件で投与しCXCL8産生を測定した。BAY11-7082投与により有意にCXCL8産生を抑制した。

(C)NHBE細胞においてLTβR siRNA, U0126, BAY11-7082を用いて検討したLTβRノックダウンによりNHBE細胞からのCXCL8産生を有意に抑制した。また、BEAS-2B細胞と同様に阻害剤投与でCXCL8産生を有意に抑制した。

LIGHT による CXCL8 産生における二つの経路の存在

Erk1/2 を介した NF- κ B 誘導により CXCL8 産生をきたすとする過去の報告 [61]と今までの結果から LIGHT による CXCL8 産生が Erk1/2 を介して NF- κ B を誘導する機序の可能性も考えられたため、Erk1/2 を抑制することで NF- κ B の核内移行が抑制されることが予想された。しかし、Fig. 15A に示すように U0126 投与によって I κ B α のリン酸化は抑制されず、NF- κ B の核移行も抑制されなかった。一方で、受容体である LT β R を siRNA でノックダウンすると Erk1/2 のリン酸化は抑制され、NF- κ B の核移行は抑制された(Fig. 15B)。以上の結果から、LT β R の下流に Erk および NF- κ B は存在するものの、Erk1/2 活性化と NF- κ B の誘導とは、直接的な上流・下流のシグナル伝達経路ではない可能性が示唆された。

Figure 15

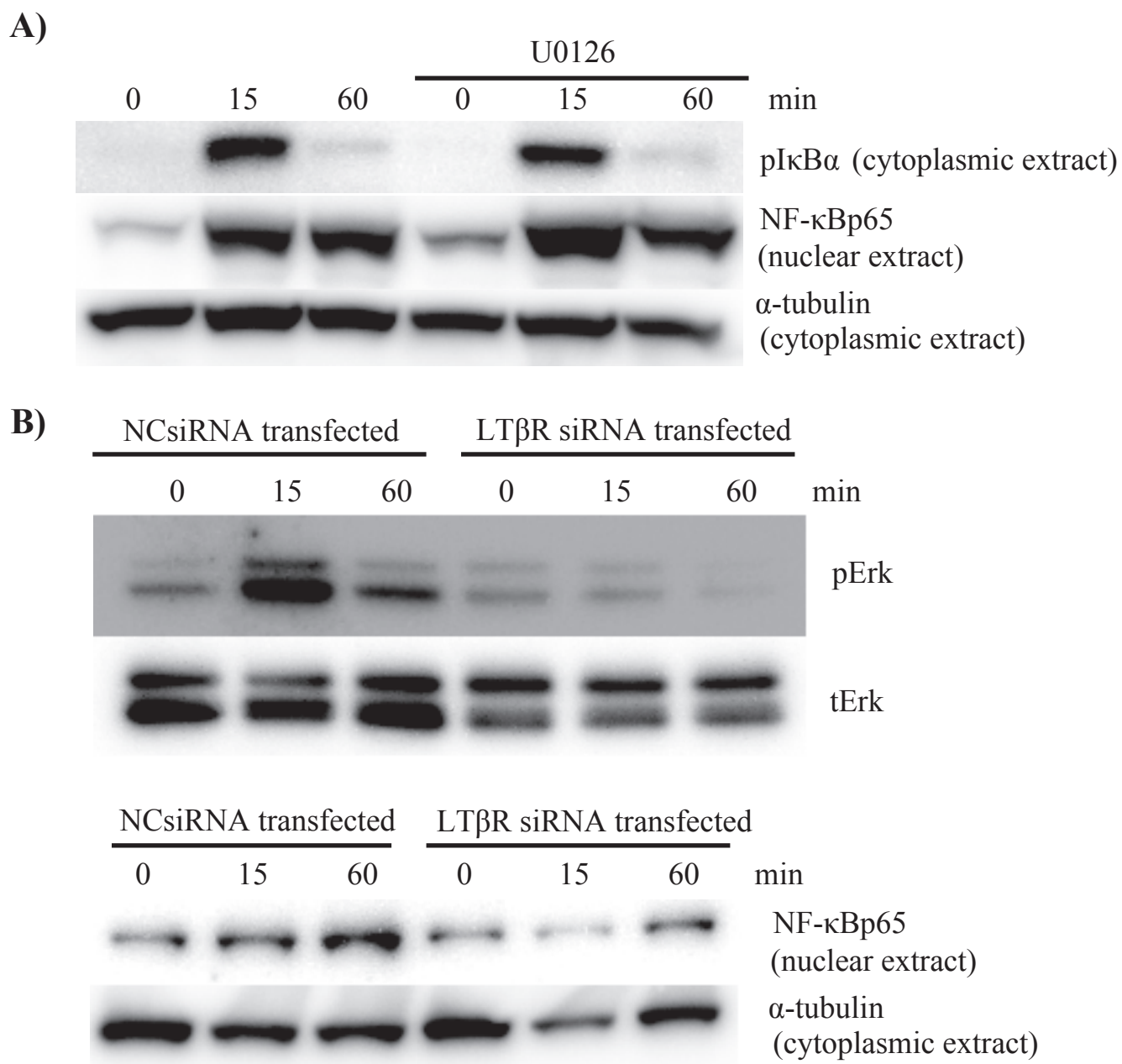


Figure 15. Erk1/2とNF-κBシグナルの検討

(A) BEAS-2B細胞にLIGHT刺激1時間前にU0126(10μM)で前処置を行いIκBαのリン酸化とNF-κBの核移行について検討を行った。Erk1/2リン酸化を阻害しても、IκBαのリン酸化は抑制されず、NF-κBの核移行も抑制されなかった。

(B) BEAS-2B細胞にnegative control siRNA (NCsiRNA)とLTβR siRNAを導入し、Erkリン酸化およびNF-κBの核移行について検討した。LTβR siRNA導入によりErkのリン酸化は抑制され、NF-κBの核移行も抑制された。これらの結果から、Erk1/2リン酸化を介す経路とLTβRからNF-κBに至る二つの経路が想定された。

結果 2 についての考察

本研究は、LIGHT が気道上皮細胞からの CXCL8 を誘導することを見いだした初めての報告である。CXCL8 はマクロファージや上皮細胞、気道平滑筋細胞、内皮細胞から産生される炎症性のサイトカインで α (CXC)ファミリーに属するケモカインの一種である。炎症反応のメディエーターとして働き、好中球をはじめとする顆粒球のケモアトラクタントとして重要で、感染巣への走化を誘導することや、血管新生作用も知られている。また、気道における好中球性炎症の機序としては、分泌された CXCL8 が好中球を集簇・活性化し、脱顆粒によって活性酸素やエラスターゼの分泌を誘導することで生じていると考えられている。実際、重症喘息患者において軽症・中等症患者と比較し喀痰の好中球数が増加していること[35]や、重症喘息患者の気道において CXCL8 発現が亢進していること[62]が知られている。また、COPD 急性増悪患者の喀痰で CXCL8 が増加していることから、好中球性の誘導によるステロイド抵抗性の炎症状態の遷延を生じて病態悪化に関与していることが報告されている[63, 64]。CXCL8 の受容体は主に CXCR1 および CXCR2 であり、これらの受容体の発現亢進により急性肺障害を生じたり[65]、COPD 急性増悪に関与したり[63]、重症喘息に関与する[66]ことから CXCR2 受容体の阻害薬が新たな治療薬として検討されているが、いまだ開発途中である[67]。以上のように CXCL8 は好中球性の炎症を生じることで、重症

喘息の慢性的な気道炎症に深く関与すると考えられている[68]。

前述のとおり LIGHT は重症喘息の新たなメディエーターとして注目されていることから、我々は、LIGHT が気道上皮細胞からの CXCL8 産生を誘導することで気道周囲への好中球集簇を促し、好中球炎症を生じることで、重症喘息に関与していると仮説を立て、*in vitro* の系として BEAS-2B 細胞および NHBE 細胞の二種類の気道上皮細胞に LIGHT を投与し CXCL8 産生を評価することと、細胞内のシグナル伝達経路を評価することで、その産生機序についての解明を試みた。

まず我々は LIGHT の気道上皮細胞への作用を解析するにあたり、フローサイトメトリーを用いた受容体発現の検討を行った。LIGHT の受容体は 3 つ知られており、それぞれ LT β R、HVEM、decoy 受容体であり、decoy 受容体以外の二つが機能を発揮する。このうち LT β R は肺、腎臓、肝臓に強く発現し、心臓と精巣に中等度発現している一方、脳、胸腺、脾臓、リンパ節での発現は弱い[69]。一方 HVEM は T 細胞、B 細胞(ナイーブ B 細胞とメモリー B 細胞)、単球など様々な細胞や組織で発現している[70, 71]。我々の検討では、BEAS-2B 細胞、NHBE 細胞は LT β R のみ発現していた。一方肺胞上皮癌由来細胞株である A549 細胞は HVEM のみを発現しており、前述の LIGHT による上皮間葉転換誘導作用に関与している可能性が示唆された。この結果から、CXCL8 産生の検討においては

LT β R に注目していくこととなった。続いて LIGHT によるサイトカイン・ケモカインの産生についてサイトカインアレイを行い、IL-6, CXCL8, IL-10 などの様々な炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を生じる一方、RANTES, TGF- β 1 などは産生しないことがわかった。このうち喘息に関与する CXCL8, IL-6, MCP-1, RANTES に関して LIGHT 刺激後の時系列変化を確認したところ、CXCL8 と IL-6 で 1 時間をピークに mRNA を誘導し、CXCL8 に関しては LIGHT 濃度依存的に mRNA を発現することを確認した。LIGHT が気道上皮細胞から CXCL8 を誘導する機序を解明するために、LT β R の siRNA を用いた受容体のノックダウンを行った。受容体のノックダウンにより有意に CXCL8 の産生が抑制されたことから、LIGHT による CXCL8 誘導は LT β R を介したものであることが確認された。次に下流のシグナルを解明するにあたり、以前より TNF- α による CXCL8 産生において MAPK が関与していること[72]や、重症喘息のステロイド抵抗性に MAPK が関与していることから[58]、同シグナルに着目した。LIGHT 刺激により細胞内の Erk1/2, p38, JNK といった MAPK は活性化を認めたが、Erk1/2 阻害で CXCL8 産生が抑制される一方、p38 と JNK に関しては阻害剤を使用しても CXCL8 産生に影響を与えなかった。これらの結果から CXCL8 産生には LT β R を介して Erk1/2 を活性化することで CXCL8 産生が生じる可能性が示唆された。また、CXCL8 発現は NF- κ B や AP-1 といった転写因子によって制御される[57]ことが知られて

おり、本研究においても LIGHT 刺激で I κ B がリン酸化され NF- κ B が誘導されたことから、Erk1/2 の下流に NF- κ B が存在し、CXCL8 を誘導している可能性も考えられた。しかし、Erk1/2 活性化を阻害しても NF- κ B の核移行を抑制しないことと、阻害剤を使った実験でより下流にあると考えられる NF- κ B を阻害するよりも上流の Erk1/2 を阻害する方がより CXCL8 の産生抑制効果が強かったことから、LIGHT による CXCL8 産生の経路は①Erk1/2 を介した経路と②LT β R から NF- κ B に至る経路の二つの経路がある可能性が示唆され、より Erk1/2 を介した経路の方が CXCL8 の産生への寄与が大きい可能性が示唆された。Erk から CXCL8 遺伝子発現に至る経緯に関しては不明な点が多いが、リン酸化された Erk2 (p42 MAPK)の二量体が核内に移行し Elk-1 をリン酸化し、SRF と共同して SRE(serum response element)に結合する可能性や核内で Erk2 が c-Fos と c-Jun の二量体をリン酸化することで安定化させ、AP-1(activator protein-1)配列に結合することで CXCL8 産生を誘導する可能性が考えられる[73]。また、NF- κ B を介した経路としては LT β R から TRAF2(TNF receptor-associated factor)を介した canonical pathway と呼ばれる I κ B α 分解を通じた NF- κ Bp65/p50 誘導による機序[74]や B 細胞で認められる[75]TRAF3 活性化を介した non-canonical pathway を通じて NF- κ B-inducing kinase (NIK)、NF- κ B2 誘導による機序が考えられる。

以上のように、LIGHT による CXCL8 産生において、受容体である LT β R の

関与は大きく、例えば、喀痰中の LIGHT 濃度の高い患者において LT β R の中和抗体(現在商業ベースでの入手はできない)や siRNA の気管内投与によって新たな喘息治療のターゲットになる可能性が考えられる。

本研究の限界として、マウスをはじめとした動物モデルを用いた *in vivo* の検討や実際の喘息患者検体を用いた検討をしていない。そのため、LT β R の siRNA を使用することによる CXCL8 誘導抑制効果を喘息への改善効果に関してそのまま反映するのは難しい面がある。しかしながら、少ない研究ではあるが、独自に LIGHT 抗体を作成しマウスに投与することでマウス喘息モデルの気道過敏性や気道リモデリングを抑制したとする報告[24]もあり、今後の検討により効果が期待できる可能性がある。

まとめ

LIGHT は、TGF- β 1 による上皮間葉転換を増強し、間葉系細胞の機能として、より強い収縮能を獲得した。さらに LIGHT は単独でも上皮間葉転換を誘導し、その細胞内経路は TGF- β シグナルを介さず Erk1/2 経路を活性化することにより生じ、組織線維化に関与している可能性が示唆された。さらに、LIGHT は気道炎症に関係するサイトカイン・ケモカイン産生を気道上皮細胞から誘導することにより、気道炎症を増強させる可能性が示唆された。特に CXCL8 の産

生においては Erk1/2 経路および NF- κ B 経路を活性化することで生じることが示された。また、LIGHT によるこれらの反応は、呼吸器疾患における肺の線維化や重症喘息の病態と深く関与している可能性が示唆された。気道上皮細胞では LIGHT の受容体として LT β R が発現しており、LT β R を阻害するような分子標的薬を開発することで、これらの病態に対する新たな治療のターゲットとなる可能性が考えられた。

謝辞

本研究の遂行をご支援、ご指導および機会を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ご指導およびご協力いただきました東京大学保健健康推進本部 山内康宏 助教、東京大学保健健康推進本部 齋藤朗 助教、帝京大学溝口病院第四内科 幸山正 教授に感謝申し上げます。

文献

1. Mehal WZ, Iredale J, Friedman SL: **Scraping fibrosis: expressway to the core of fibrosis**. In: *Nature medicine*. vol. 17: 552-553; 2011.
2. Wynn TA: **Cellular and molecular mechanisms of fibrosis**. In: *The Journal of*

- pathology*. vol. 214: 199-210; 2008.
3. 難病情報センター: 特発性間質性肺炎. In: <http://www.nanbyou.or.jp/entry/302>. 2013.
 4. Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, Starko K, Noble PW, Schwartz DA, King TE, Jr., Idiopathic Pulmonary Fibrosis Study G: **A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis**. In: *The New England journal of medicine*. vol. 350: 125-133; 2004.
 5. Nicholson AG, Fulford LG, Colby TV, du Bois RM, Hansell DM, Wells AU: **The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis**. In: *American journal of respiratory and critical care medicine*. vol. 166: 173-177; 2002.
 6. King TE, Jr., Schwarz MI, Brown K, Tooze JA, Colby TV, Waldron JA, Jr., Flint A, Thurlbeck W, Cherniack RM: **Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality**. In: *American journal of respiratory and critical care medicine*. vol. 164: 1025-1032; 2001.
 7. Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS: **Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis**. In: *The American journal of pathology*. vol. 175: 3-16; 2009.
 8. Thierry JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: **Epithelial-mesenchymal**

- transitions in development and disease.** In: *Cell*. vol. 139: 871-890; 2009.
9. Kalluri R, Weinberg RA: **The basics of epithelial-mesenchymal transition.** In: *The Journal of clinical investigation*. vol. 119: 1420-1428; 2009.
10. Forino M, Torregrossa R, Ceol M, Murer L, Della Vella M, Del Prete D, D'Angelo A, Anglani F: **TGFbeta1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture.** In: *International journal of experimental pathology*. vol. 87: 197-208; 2006.
11. Yang S, Banerjee S, de Freitas A, Sanders YY, Ding Q, Matalon S, Thannickal VJ, Abraham E, Liu G: **Participation of miR-200 in pulmonary fibrosis.** In: *The American journal of pathology*. vol. 180: 484-493; 2012.
12. Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, Shaheen F, Pechkovsky DV, Murray LA, Argentieri R, Kicic A, Stick SM, Bai TR, Knight DA: **Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1.** In: *American journal of respiratory and critical care medicine*. vol. 180: 122-133; 2009.
13. Wadsworth S, Sin D, Dorscheid D: **Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma.** In: *Journal of asthma*

- and allergy*. vol. 4: 77-86; 2011.
14. Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, Hu GH, Hong SL, Bachert C: **Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling**. In: *Allergy*. vol. 67: 1193-1202; 2012.
 15. Reynolds HY: **Lung inflammation and fibrosis: an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s**. In: *American journal of respiratory and critical care medicine*. vol. 171: 98-102; 2005.
 16. Kamitani S, Yamauchi Y, Kawasaki S, Takami K, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T: **Simultaneous stimulation with TGF-beta1 and TNF-alpha induces epithelial mesenchymal transition in bronchial epithelial cells**. In: *International archives of allergy and immunology*. vol. 155: 119-128; 2011.
 17. Yamauchi Y, Kohyama T, Takizawa H, Kamitani S, Desaki M, Takami K, Kawasaki S, Kato J, Nagase T: **Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1**. In: *Experimental lung research*. vol. 36: 12-24; 2010.
 18. Camara J, Jarai G: **Epithelial-mesenchymal transition in primary human**

- bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha.** In: *Fibrogenesis & tissue repair*. vol. 3: 2; 2010.
19. Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, Kochel KD, Cheung TC, Yu GL, Ruben S, Murphy M, Eisenberg RJ, Cohen GH, Spear PG, Ware CF: **LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator.** In: *Immunity*. vol. 8: 21-30; 1998.
20. Zhai Y, Guo R, Hsu TL, Yu GL, Ni J, Kwon BS, Jiang GW, Lu J, Tan J, Ugustus M, Carter K, Rojas L, Zhu F, Lincoln C, Endress G, Xing L, Wang S, Oh KO, Gentz R, Ruben S, Lippman ME, Hsieh SL, Yang D: **LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer.** In: *The Journal of clinical investigation*. vol. 102: 1142-1151; 1998.
21. Tamada K, Shimosaki K, Chapoval AI, Zhai Y, Su J, Chen SF, Hsieh SL, Nagata S, Ni J, Chen L: **LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response.** In: *Journal of immunology*. vol. 164: 4105-4110; 2000.
22. Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R: **LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of**

- rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor.** In: *The Journal of rheumatology*. vol. 35: 960-968; 2008.
23. Wang J, Anders RA, Wu Q, Peng D, Cho JH, Sun Y, Karaliukas R, Kang HS, Turner JR, Fu YX: **Dysregulated LIGHT expression on T cells mediates intestinal inflammation and contributes to IgA nephropathy.** In: *The Journal of clinical investigation*. vol. 113: 826-835; 2004.
24. Doherty TA, Soroosh P, Khorram N, Fukuyama S, Rosenthal P, Cho JY, Norris PS, Choi H, Scheu S, Pfeffer K, Zuraw BL, Ware CF, Broide DH, Croft M: **The tumor necrosis factor family member LIGHT is a target for asthmatic airway remodeling.** In: *Nature medicine*. vol. 17: 596-603; 2011.
25. Hastie AT, Moore WC, Meyers DA, Vestal PL, Li H, Peters SP, Bleecker ER, National Heart L, Blood Institute Severe Asthma Research P: **Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes.** In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. vol. 125: 1028-1036 e1013; 2010.
26. Luzina IG, Atamas SP, Wise R, Wigley FM, Choi J, Xiao HQ, White B: **Occurrence of an activated, profibrotic pattern of gene expression in lung CD8+ T cells from scleroderma patients.** In: *Arthritis and rheumatism*. vol.

- 48: 2262-2274; 2003.
27. Wyatt R, Waschek J, Weinberger M, Sherman B: **Effects of inhaled beclomethasone dipropionate and alternate-day prednisone on pituitary-adrenal function in children with chronic asthma.** In: *The New England journal of medicine.* vol. 299: 1387-1392; 1978.
 28. Davies G, Thomas P, Broder I, Mintz S, Silverman F, Leznoff A, Trotman C: **Steroid-dependent asthma treated with inhaled beclomethasone dipropionate. A long-term study.** In: *Annals of internal medicine.* vol. 86: 549-553; 1977.
 29. Locksley RM: **Asthma and allergic inflammation.** In: *Cell.* vol. 140: 777-783; 2010.
 30. Ward C, Pais M, Bish R, Reid D, Feltis B, Johns D, Walters EH: **Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma.** In: *Thorax.* vol. 57: 309-316; 2002.
 31. Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, Ait-Khaled N, Baena-Cagnani CE, Bleecker ER, Brightling CE, Burney P, Bush A, Busse WW, Casale TB, Chan-Yeung M, Chen R, Chowdhury B, Chung KF, Dahl R, Drazen JM, Fabbri LM, Holgate ST, Kauffmann F, Haahtela T, Khaltaev N, Kiley JP, Masjedi MR,

- Mohammad Y, O'Byrne P, Partridge MR, Rabe KF, Togias A, van Weel C, Wenzel S, Zhong N, Zuberbier T: **Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma.** In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. vol. 126: 926-938; 2010.
32. Holgate ST: **Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches?** In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. vol. 128: 495-505; 2011.
33. Al-Muhsen S, Johnson JR, Hamid Q: **Remodeling in asthma.** In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. vol. 128: 451-462; quiz 463-454; 2011.
34. Gleich GJ: **Mechanisms of eosinophil-associated inflammation.** In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. vol. 105: 651-663; 2000.
35. **The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma.** In: *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. vol. 22: 470-477; 2003.
36. Fahy JV: **Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights**

- from clinical studies.** In: *Proceedings of the American Thoracic Society.* vol. 6: 256-259; 2009.
37. Barnes PJ: **Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.** In: *Nature reviews Immunology.* vol. 8: 183-192; 2008.
38. Barnes PJ: **New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases.** In: *The Journal of allergy and clinical immunology.* vol. 119: 1055-1062; quiz 1063-1054; 2007.
39. Godaly G, Proudfoot AE, Offord RE, Svanborg C, Agace WW: **Role of epithelial interleukin-8 (IL-8) and neutrophil IL-8 receptor A in Escherichia coli-induced transuroepithelial neutrophil migration.** In: *Infection and immunity.* vol. 65: 3451-3456; 1997.
40. Nakagome K, Matsushita S, Nagata M: **Neutrophilic inflammation in severe asthma.** In: *International archives of allergy and immunology.* vol. 158 Suppl 1: 96-102; 2012.
41. Kohyama T, Wyatt TA, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Kim HJ, Rennard SI: **PGD(2) modulates fibroblast-mediated native collagen gel contraction.** In: *American journal of respiratory cell and molecular biology.* vol. 27: 375-381; 2002.

42. Kohyama T, Liu X, Wen FQ, Zhu YK, Wang H, Kim HJ, Takizawa H, Cieslinski LB, Barnette MS, Rennard SI: **PDE4 inhibitors attenuate fibroblast chemotaxis and contraction of native collagen gels.** In: *American journal of respiratory cell and molecular biology.* vol. 26: 694-701; 2002.
43. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z: **TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT).** In: *Respiratory research.* vol. 6: 56; 2005.
44. Grinnell F: **Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction.** In: *The Journal of cell biology.* vol. 124: 401-404; 1994.
45. Thiery JP, Sleeman JP: **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** In: *Nature reviews Molecular cell biology.* vol. 7: 131-142; 2006.
46. Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL: **Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro.** In: *Neoplasia.* vol. 6: 603-610; 2004.
47. Hackett TL: **Epithelial-mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma.** In: *Current opinion in allergy and clinical immunology.* vol. 12: 53-59; 2012.

48. Kalluri R, Neilson EG: **Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.** In: *The Journal of clinical investigation.* vol. 112: 1776-1784; 2003.
49. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG: **Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis.** In: *The Journal of clinical investigation.* vol. 110: 341-350; 2002.
50. Li CW, Xia W, Huo L, Lim SO, Wu Y, Hsu JL, Chao CH, Yamaguchi H, Yang NK, Ding Q, Wang Y, Lai YJ, LaBaff AM, Wu TJ, Lin BR, Yang MH, Hortobagyi GN, Hung MC: **Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1.** In: *Cancer research.* vol. 72: 1290-1300; 2012.
51. Sullivan DE, Ferris M, Pociask D, Brody AR: **Tumor necrosis factor-alpha induces transforming growth factor-beta1 expression in lung fibroblasts through the extracellular signal-regulated kinase pathway.** In: *American journal of respiratory cell and molecular biology.* vol. 32: 342-349; 2005.
52. Zhong Q, Zhou B, Ann DK, Minoo P, Liu Y, Banfalvi A, Krishnaveni MS, Dubourd M, Demaio L, Willis BC, Kim KJ, duBois RM, Crandall ED, Beers MF, Borok Z: **Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal**

- transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein.**
- In: *American journal of respiratory cell and molecular biology*. vol. 45: 498-509; 2011.
53. Liu X: **Inflammatory cytokines augments TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 cells by up-regulating TbetaR-I.** In: *Cell motility and the cytoskeleton*. vol. 65: 935-944; 2008.
54. Ware CF, Sedy JR: **TNF Superfamily Networks: bidirectional and interference pathways of the herpesvirus entry mediator (TNFSF14).** In: *Current opinion in immunology*. vol. 23: 627-631; 2011.
55. Sciortino MT, Medici MA, Marino-Merlo F, Zaccaria D, Giuffre-Cuculletto M, Venuti A, Grelli S, Mastino A: **Involvement of HVEM receptor in activation of nuclear factor kappaB by herpes simplex virus 1 glycoprotein D.** In: *Cellular microbiology*. vol. 10: 2297-2311; 2008.
56. Sandberg WJ, Halvorsen B, Yndestad A, Smith C, Otterdal K, Brosstad FR, Froland SS, Olofsson PS, Damas JK, Gullestad L, Hansson GK, Oie E, Aukrust P: **Inflammatory interaction between LIGHT and proteinase-activated receptor-2 in endothelial cells: potential role in atherogenesis.** In: *Circulation research*. vol. 104: 60-68; 2009.

57. Chang YH, Hsieh SL, Chen MC, Lin WW: **Lymphotoxin beta receptor induces interleukin 8 gene expression via NF-kappaB and AP-1 activation.** In: *Experimental cell research*. vol. 278: 166-174; 2002.
58. Robins S, Roussel L, Schachter A, Risse PA, Mogas AK, Olivenstein R, Martin JG, Hamid Q, Rousseau S: **Steroid-insensitive ERK1/2 activity drives CXCL8 synthesis and neutrophilia by airway smooth muscle.** In: *American journal of respiratory cell and molecular biology*. vol. 45: 984-990; 2011.
59. Lin CH, Cheng HW, Ma HP, Wu CH, Hong CY, Chen BC: **Thrombin induces NF-kappaB activation and IL-8/CXCL8 expression in lung epithelial cells by a Rac1-dependent PI3K/Akt pathway.** In: *The Journal of biological chemistry*. vol. 286: 10483-10494; 2011.
60. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, Matsushima K: **Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression.** In: *The Journal of biological chemistry*. vol. 269: 13289-13295; 1994.
61. Lin CH, Yu MC, Chiang CC, Bien MY, Chien MH, Chen BC: **Thrombin-induced NF-kappaB activation and IL-8/CXCL8 release is mediated by c-**

- Src-dependent Shc, Raf-1, and ERK pathways in lung epithelial cells.** In: *Cellular signalling*. vol. 25: 1166-1175; 2013.
62. Snelgrove RJ: **Targeting of a common receptor shared by CXCL8 and N-Ac-PGP as a therapeutic strategy to alleviate chronic neutrophilic lung diseases.** In: *European journal of pharmacology*. vol. 667: 1-5; 2011.
63. Kaur M, Singh D: **Neutrophil chemotaxis caused by chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages: the role of CXCL8 and the receptors CXCR1/CXCR2.** In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. vol. 347: 173-180; 2013.
64. Feng E, Wan R, Yang S, Yan Z, Wang S, He W, Zhang Y, Yin H, Chen Z, Liu R: **Expression levels of induced sputum IL-8 and IL-10 and drug intervention effects in patients with acute exacerbated COPD complicated with chronic cor pulmonale at high altitude.** In: *Experimental and therapeutic medicine*. vol. 6: 747-752; 2013.
65. Konrad FM, Reutershan J: **CXCR2 in acute lung injury.** In: *Mediators of inflammation*. vol. 2012: 740987; 2012.
66. Al-Alwan LA, Chang Y, Mogas A, Halayko AJ, Baglole CJ, Martin JG, Rousseau S, Eidelman DH, Hamid Q: **Differential roles of CXCL2 and**

- CXCL3 and their receptors in regulating normal and asthmatic airway smooth muscle cell migration.** In: *Journal of immunology*. vol. 191: 2731-2741; 2013.
67. Nair P, Gaga M, Zervas E, Alagha K, Hargreave FE, O'Byrne PM, Stryszak P, Gann L, Sadeh J, Chanez P, Study I: **Safety and efficacy of a CXCR2 antagonist in patients with severe asthma and sputum neutrophils: a randomized, placebo-controlled clinical trial.** In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. vol. 42: 1097-1103; 2012.
68. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Ludwig MS, Martin JG, Hamid Q: **Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma.** In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. vol. 116: 544-549; 2005.
69. Plant SR, Iocca HA, Wang Y, Thrash JC, O'Connor BP, Arnett HA, Fu YX, Carson MJ, Ting JP: **Lymphotoxin beta receptor (Lt betaR): dual roles in demyelination and remyelination and successful therapeutic intervention using Lt betaR-Ig protein.** In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. vol. 27: 7429-7437; 2007.

70. del Rio ML, Lucas CL, Buhler L, Rayat G, Rodriguez-Barbosa JI: **HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation.** In: *Journal of leukocyte biology.* vol. 87: 223-235; 2010.
71. Duhon T, Pasero C, Mallet F, Barbarat B, Olive D, Costello RT: **LIGHT costimulates CD40 triggering and induces immunoglobulin secretion; a novel key partner in T cell-dependent B cell terminal differentiation.** In: *European journal of immunology.* vol. 34: 3534-3541; 2004.
72. Shi JX, Su X, Xu J, Zhang WY, Shi Y: **MK2 posttranscriptionally regulates TNF-alpha-induced expression of ICAM-1 and IL-8 via tristetraprolin in human pulmonary microvascular endothelial cells.** In: *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* vol. 302: L793-799; 2012.
73. Treisman R: **Regulation of transcription by MAP kinase cascades.** In: *Current opinion in cell biology.* vol. 8: 205-215; 1996.
74. Beinke S, Ley SC: **Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology.** In: *The Biochemical journal.* vol. 382: 393-409; 2004.
75. Sun SC: **Non-canonical NF-kappaB signaling pathway.** In: *Cell research.* vol. 21: 71-85; 2011.