

博士論文

病原微生物分子に対する気道上皮細胞の
Pattern Recognition Receptors の役割

鈴木智史

病原微生物分子に対する気道上皮細胞の
Pattern Recognition Receptors の役割

大学院博士課程 医学系研究科 内科学専攻 呼吸器内科学

指導教員 長瀬隆英 教授

鈴木智史

目次

要旨	3
序文(背景と目的)	4
材料と方法	14
結果	19
考察	36
結論	43
謝辞	44
引用文献	45

要旨

常に外界と接している気道にとって、的確に病原微生物の排除を行う自然免疫の働きは重要である。その中で **Pattern Recognition Receptors(PRRs)** は様々な病原微生物分子を認識する役割を持っている。今回、気道上皮細胞において、細菌の鞭毛の構成成分である **flagellin** が **Toll-like receptor5(TLR5)** を介して炎症性サイトカイン産生を促すこと、およびその応答が別の **PRRs** の **ligand** でありペプチドグリカンの構成成分である **muramyl dipeptide(MDP)** の併存より修飾をうけることを細胞レベルで確認した。この結果から、慢性呼吸器疾患患者における下気道感染症に、各種 **PRRs** の相互作用が関与する可能性が示唆された。

序文 (背景と目的)

世界では発展途上国を中心として急性の下気道感染症の発症は年代を問わず数多く見られ、現在も多数の死者を数えている。一方、我が国でも高齢者を中心に死亡率は高く、2011年以降は日本人の死因の第3位を占めている[1]。また我が国を含む先進国では、慢性閉塞性肺疾患(COPD)およびその急性増悪による死亡者の割合増加も問題となっている。加えて抗癌剤などによる免疫低下状態での日和見感染も今後さらに増すと考えられる。これらの患者では、一般的な市中肺炎の起因为菌に加えて、緑膿菌などの関与も大きくなる。また、重篤な肺炎には、宿主側に誘導される強い炎症が関与していることも知られている。そのため、抗菌薬の開発・発達が著しい現在においても、気道感染のメカニズム解明は新たな予防法や治療法の手がかりを探るのに重要と考えられる。

気道は外部環境と直接広範に接しており、絶えず微生物との接触にも曝されている。そのため各種の防御機構(物理的および免疫学的)が備わっており、病原微生物の排除に努めている。その防御機構の第一は、気道上皮細胞による物理的バリアおよび線毛の働きである。線毛は細気管支領域までの気道上皮に見られ、吸入した粒子や微生物を粘液とともに中枢側へと輸送することで、それらの下気道への侵入を防いでいる。また気道粘液中に含まれる antimicrobial

peptides やリゾチームなども関与する[2]。これらの機能低下・破綻により病原微生物の排除が不十分な場合には、自然免疫や獲得免疫が働くことになるのだが、その際重要となるのが微生物などの認識である。特に自然免疫においてその中心的役割を果たすのが、**Pattern Recognition Receptors(PRRs)**である。

PRRs は細菌やウイルスといった微生物の構成成分や核酸など (pathogen-associated molecular patterns ; PAMPs)を認識して、Interleukin(IL)-8、IL-6、IL-1 β などのサイトカインやケモカイン、IFN などの産生を促すことで、周囲の細胞を活性化し、好中球遊走を促進し、炎症反応を惹起する。また微生物以外にも、尿酸や ATP など組織損傷の結果生じる物質(damage-associated molecular patterns ; DAMPs)を認識するものもあり[3, 4]、組織の恒常性維持や修復にも寄与している。またアスベスト繊維やシリカの認識にも関与しており、塵肺症の病因の一つと考えられている [5, 6]。他にも肺線維症[7]や ALI/ARDS[8]、人工呼吸器関連肺障害[9]の発症との関連を示唆する報告が散見される。

PRRs には Toll-like receptors(TLRs)、NOD-like receptors(NLRs)や RIG- I -like receptors(RLRs)、cytoplasmic DNA sensors などがあり、様々な ligand に対応している(表 1)。

表 1 主な Pattern Recognition Receptors とその ligands

Family	PRRs	Localization	Ligand	Origin of the ligand
TLR	TLR1	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	Bacteria
	TLR2	Plasma membrane	Lipoprotein	Bacteria, virus
	TLR3	Endolysosome	dsRNA	Virus
	TLR4	Plasma membrane	LPS	Bacteria, virus
	TLR5	Plasma membrane	Flagellin	Bacteria
	TLR6	Plasma membrane	Diacyl lipoprotein	Bacteria, virus
	TLR7,8	Endolysosome	ssRNA	Bacteria, virus, self
	TLR9	Endolysosome	CpG-DNA	Bacteria, virus, self
	TLR10	Endolysosome	Unknown	Unknown
	TLR11	Plasma membrane	Profilin-like molecule	Protozoa
	NLR	NOD1	Cytoplasm	Diaminopimelic acid (DAP)
NOD2		Cytoplasm	Muramyl dipeptide (MDP)	Bacteria
NLRP3		Cytoplasm	ATP, uric acid, ROS, MDP, pore-forming toxins, silica	Bacteria, self,
NLRC4		Cytoplasm	Bacterial secretion systems, Flagellin	Bacteria
RLR	RIG-I	Cytoplasm	dsRNA	virus

NOD : nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein NLRP : nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing proteins NLRC : nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD containing proteins RIG- I : retinoicacid-inducible gene- I ds-DNA : double strand DNA ss-DNA : single strand DNA ROS : reactive oxygen species 文献[10]より改変

中でも TLRs は最も研究・解析が進んでいる PRRs である。TLRs は細胞膜上あるいは endolysosome 膜上に発現している膜貫通タンパク質であり、ligand の認識を行う N-terminal leucine-rich repeats(LRRs) domain、および細胞質側への signal 伝達に関与する Toll/IL-1R homology(TIR) domain から構成されている[11](図 1)。ヒトでは 10 種類が同定されており、それぞれ異なる微生物などの molecular pattern を認識している[10] (表 1)。細菌感染において代表的なものとしては、TLR2 によるグラム陽性菌の細胞壁中のリポテイコ酸やリポタンパクや、TLR4 によるグラム陰性菌の細胞壁成分である lipopolysaccharide(LPS)の認識がよく知られている。一方、TLR5 は細菌の鞭毛を構成するタンパクである、flagellin の認識をつかさどっている。

flagellin が TLR5 によって認識されると、TIR domain を介してアダプタータンパクである MyD88 が活性化され、IRAK、TRAF6 を経て TAK1 が活性化される。その後、①I κ B kinase(IKK)複合体の活性化から NF- κ B 活性化が起きる経路と、②Mitogen Activated Protein Kinase(MAPK)のリン酸化により AP-1 などの転写因子の活性化が起きる経路の 2 つをたどり、結果として炎症性サイトカインである IL-8 や CCL20 等の産生が促進される(図 2)[12-14]。

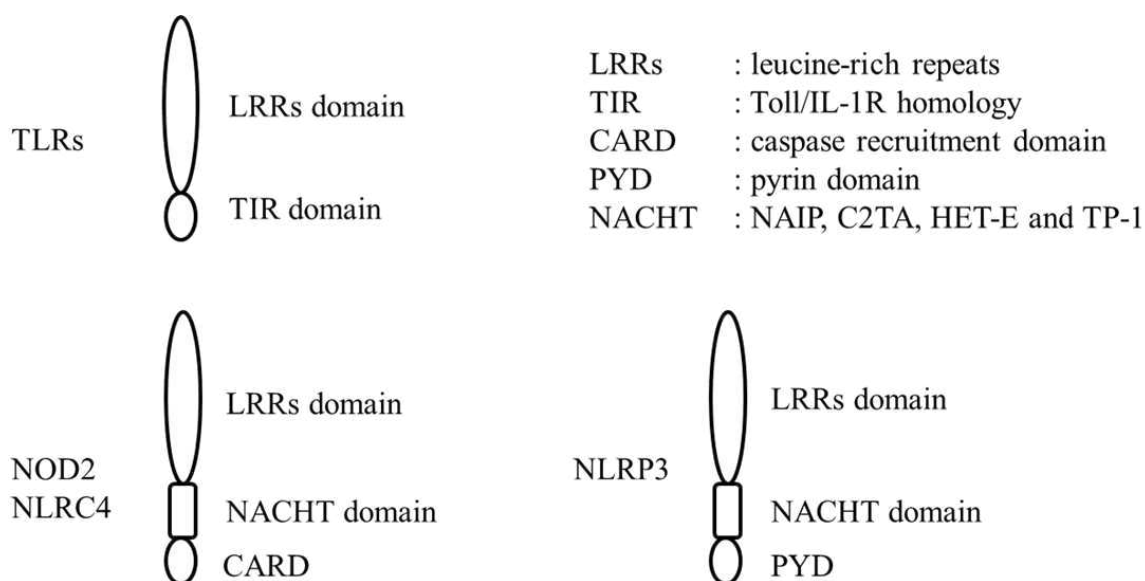


図 1 代表的な Pattern Recognition Receptors の構造 : TLRs は ligand と結合する LRRs domain、および細胞質内にありシグナル伝達のためのアダプタータンパクと作用する TIR domain からなる。一方 NLRs では、C 末端の LRRs domain は同様だが、N 末端は CARD や PYD などの domain からなり、その中間に NACHT domain を持っている。CARD や PYD などが下流のシグナル伝達の働きを担う。文献[10]より改変。

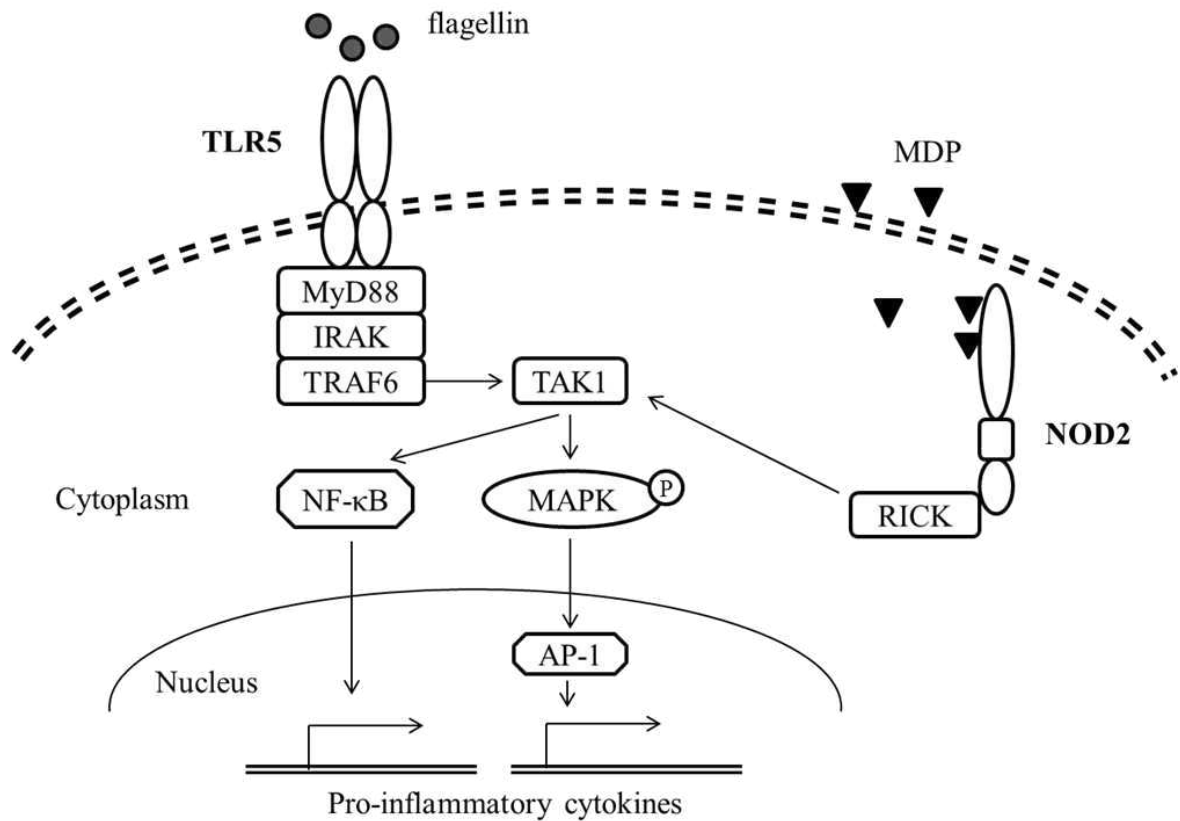


図2 flagellin/TLR5 および MDP/NOD2 のシグナル伝達の模式図 : 細胞膜上にある TLR5 に flagellin 分子が認識されると、細胞質内ではアダプタータンパクである MyD88(myeloid differentiation factor 88)を介して、IRAK(interleukin-1 receptor-associated kinase)、TRAF6(TNF receptor associated factor)、TAK1 とシグナルが伝達される。TAK1(Transforming growth factor β -activated kinase 1)が活性化されると、転写因子である NF- κ B が活性化される経路、および MAPK がリン酸化されて AP-1 などの転写因子が活性化される経路の2つから IL-8 などの炎症性サイトカインの産生が誘導される。一方、NOD2 は細胞質内にあり、MDP が結合すると RICK(Receptor-interacting serine/ threonine kinase)をアダプタータンパクとして、TAK1 を活性化し、TLR5 同様に NF- κ B 活性化および MAPK リン酸化を促す。文献[15, 16]より改変。

これら flagellin/TLR5 のシグナル伝達の知見の多くはマクロファージや樹状細胞で得られたもので、上皮細胞では腸管上皮においてサルモネラ菌や大腸菌の flagellin を用いたものがほとんどである。気道上皮細胞においては緑膿菌やレジオネラ菌の flagellin を用いた報告が散見されているのみである[17-21]。一方で気道上皮細胞では、気道粘膜における粘液産生促進への flagellin/TLR5 の関与も報告されている[18, 19]。

特に flagellin を有する緑膿菌は COPD や、びまん性汎細菌支炎、嚢胞性線維症といった慢性気道炎症疾患との関わりも深く、また易感染状態での下気道感染症の原因菌としても重要な菌であり、これらの病因に flagellin が何らかの関与をしていることが推測される。

もう一つの代表的な PRRs である NLRs はその殆どが細胞質内に存在するタンパク質であり、C 末端に TLRs と同様 LRR domain を、N 末端には caspase recruitment domain(CARD)あるいは pyrin domain(PYD)あるいは baculovirus inhibitor repeats (BIRs) domain を持ち、その中間に NACHT domain を有している[22](図 1)。NLRs は現在ヒトでは 20 種類あまりが同定され、inflammasome の活性化を行うものと、inflammasome の活性化に直接は関与しないものとに分けら

れる。Inflammasome を活性化する NLRs には NLRP1、NLRP3、NLRC4 などがあり、ligand の認識により、apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) や Caspase-1 などからなる inflammasome と呼ばれるタンパク複合体が形成され、Caspase-1 の活性化を経て、pro IL-1 β や pro IL-18 から活性型の IL-1 β および IL-18 への産生誘導が行われる[23]。一例として、flagellin 分子を ligand とする NLRC4 の細胞質内でのシグナル伝達の模式図を図 3 に示す。

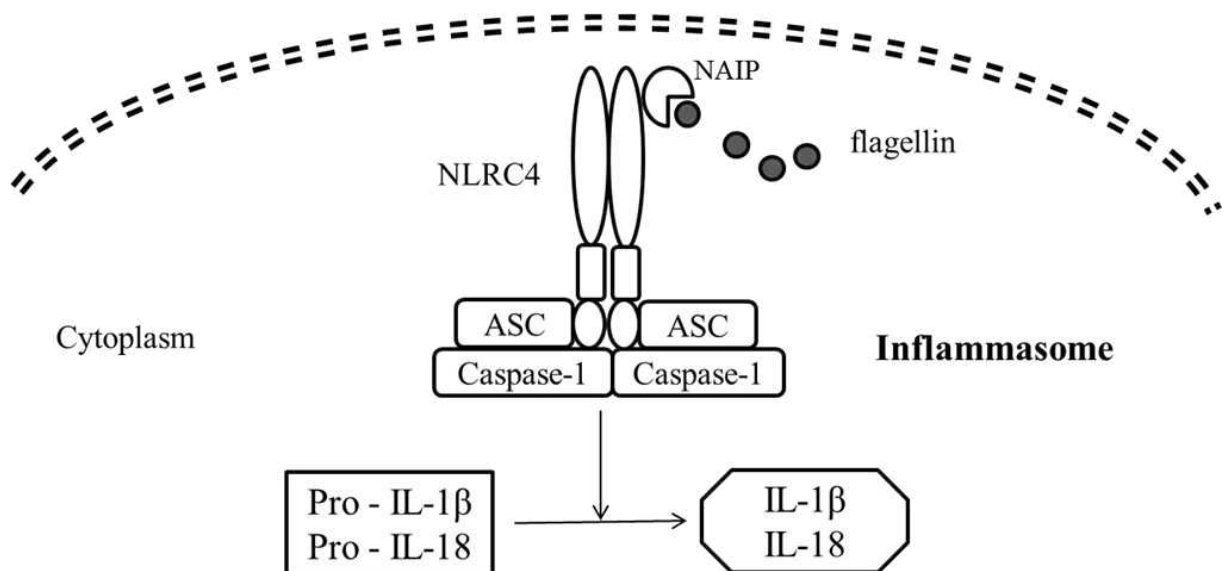


図 3 NLRC4 のシグナル伝達の模式図 : NLRC4 は細胞質内の flagellin 分子を NAIP(neuronal apoptosis inhibitory protein)を介して認識する。flagellin を認識すると、NLRC4 は ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD)や pro-Caspase-1 などとともに inflammasome と呼ばれるタンパク複合体を形成する。すると pro-Caspase-1 が活性型の Caspase-1 となり、pro-IL-1 β や pro-IL-18 を活性型の IL-1 β や IL-18 に変化させる。文献[24]より改変

inflammasome を活性化しない NLRs には NOD1 や NOD2 があり、アダプタータンパクの RICK(Receptor-interacting serine/ threonine kinase)活性化から、MAPK のリン酸化や NF- κ B などの転写因子活性化を促し、各種炎症性サイトカインの産生を誘導する(図 2)[25] [26]。

NOD1 は主にグラム陰性菌の細胞壁の構成成分のひとつである d-glutamyl-meso-diaminopimelic acid(DAP)を ligand として、*P. aeruginosa*[27], *C. pneumoniae*[28], *H. influenzae*, *L. pneumophila*[29]などの認識に関わっていることが知られている。一方、NOD2 は白血球だけでなく気道上皮細胞にも発現しており [30] [31]、グラム陰性菌・陽性菌を問わず広く細胞壁のペプチドグリカン中に存在している muramyl dipeptide (MDP)を認識し、*M. tuberculosis* [32, 33], *S. pneumoniae*[30], *C. pneumoniae*[34]などへの免疫反応に関与している。

MDP は NOD2 の活性化以外にも、NLRP3 や NLRP1 といった他の NLRs にも作用して IL-1 β の産生を促したり [35, 36]、NO や活性酸素の産生にも関与したりすることが報告されているが [37]、いずれも MDP 単独での作用は微細であるとされている。

一方で、MDP の併存は LPS やペプチドグリカンといった TLRs の刺激によるサイトカイン(IL-1 β 、IL-6、IL-8)産生を増強させることが報告されている

[38-41]。この相乗効果は NOD2 依存性に生じることは示されているが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。マクロファージ系細胞や樹状細胞、腸管上皮細胞では複数の研究がある一方で、気道上皮細胞では MDP と LPS の同時刺激により IL-8 産生が増強されることが報告されているのみであり[42]、MDP と flagellin の刺激によってサイトカイン産生が変化するかは知られていない。

そこで今回私は、気道上皮細胞から flagellin 刺激により産生されるサイトカインを測定し、それが MDP の併存によりどのように変化するかを検証することで、COPD などの慢性呼吸器疾患を念頭に、菌定着のある気道に病原微生物が侵入した場合の PRRs の役割について考察することとした。

材料と方法

細胞培養

ATCC(American Type Culture Collection)より購入した BEAS-2B 細胞を使用した。BEAS-2B 細胞は、剖検により得られた正常気管支上皮細胞に由来し、SV40/アデノウイルス 12 のハイブリッドの感染により不死化された細胞株である。同細胞は、10%の FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F12 (DMEM/F-12)を用いて、37°C、CO₂ 濃度 5%下で培養を行った。

試薬

flagellin(Salmonella typhimurium 由来)、MDP、TLR5 中和抗体(IgA)、およびコントロールの IgA はそれぞれ InvivoGen 社より購入した。また MAPK の阻害薬である、SB203580(p38 阻害薬)および PD98059(ERK 阻害薬)は Cell Signaling 社より購入したものをを用いた。

Western Blotting 法に用いる 1 次抗体には、phospho-ERK 抗体(E-4)、ERK 抗体(C-16)、p38 抗体(H-147)、phospho-JNK 抗体(G-7)、JNK 抗体(D-2)を Santa Cruz 社より、phospho-p38 抗体(#9211)を Cell Signaling 社より、NOD2 抗体(#31488)を abcam 社よりそれぞれ購入した。2 次抗体は DAKO 社のヤギ由来抗マウスある

いは抗ウサギ免疫グロブリンポリクローナル抗体を用いた。化学発光を起こさせる HRP 基質は Millipore 社から購入した(WBLUF0100)。

細胞に対する flagellin 刺激および MDP 前処置、MAPK 阻害薬の前投与

12-well あるいは 6-well (Western Blotting 法を行う場合) plate で培養した BEAS-2B 細胞が 80-90% confluent に発育したところで、非血清培地に混合した flagellin を 100ng/mL の濃度で投与した。MDP による前処置を行う際には、flagellin 刺激の 16 時間前に MDP を 10 μ g/mL の濃度で加えた。また MAPK の阻害薬を使用する場合には flagellin 刺激の 1 時間前に前投与を行うこととし、濃度は SB203580(p38 阻害薬)で 10 μ M、PD98059(ERK 阻害薬)で 100 μ M とした。

ELISA 法による Interleukin-8 (IL-8)、IL-6、IL-1 β の定量

BEAS-2B 細胞に対する flagellin 刺激の 4 時間後に培養液を回収した。この培養液を human IL-8 ELISA kit (Thermo scientific)を用いてプロトコルに従い、IL-8 の定量を行った。同様に IL-6、IL-1 β についても human ELISA kit(Thermo scientific)を用いて定量した。なお定量においては、BIO-RAD 社の Microplate Reader(iMARK™)で 450nm の吸光度測定を行った。

Dual Luciferase Assay による NF- κ B の転写活性の測定

BEAS-2B 細胞を 12-well plate に 1well あたり 5×10^5 個ずつ撒き、24 時間培養を行った。その後、NF- κ B レポーターベクター 500ng/well およびウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクター(pRL-TK vector) 50ng/well(ともに Promega)を、transfection 試薬である FuGENE6(Promega)を用いて遺伝子導入した。導入から 48 時間後に細胞培養液を除去、flagellin 刺激を行い、その 6 時間後に細胞溶解液を回収した。回収した溶解液に対して、ウミシイタケと比較した相対的な NF- κ B の発光酵素活性 (relative luciferase units ; RLU) を計測した。測定は Dual-Luciferase® Reporter Assay System(Promega)のプロトコルに沿い、Gene Light-200(Microtec)で行った。

Western Blotting 法によるリン酸化 MAP kinase の検出

BEAS-2B 細胞に対する flagellin 刺激の 0,15,30,60 分後に、培養液の除去・PBS での洗浄を行い、200 μ L の RIPA buffer で細胞溶解液を得た。そしてこの溶解液を 10% ポリアクリルアミドゲルを使用し、SDS アクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)を行った。その後、Western Blotting 法でセルロースメンブレンへ転写後、MAP kinase のリン酸化を確認した。

1 次抗体には、phospho-ERK 抗体(1:2000)、ERK 抗体(1:1000)、phospho-p38 抗

体(1:500)、p38 抗体(1:1000)、phospho-JNK 抗体(1:1000)、JNK 抗体(1:1000)、NOD2 抗体(1:500)をそれぞれ括弧内の希釈で、2 次抗体は各々1 次抗体によってヤギ由来の抗マウスあるいは抗ウサギの免疫グロブリンポリクローナル抗体(HRP 標識)を 10000 倍希釈で使用した。その後、HRP 基質を加えることで生じた化学発光を、BIO-RAD 社の画像撮影システム(ChemiDoc™ XRS+)で検出した。なおバンドの intensity は同社の Image Lab™ software を使用して定量化を行い、<リン酸化 MAPK/全 MAPK> の比率も算出・図示した。

MDP 前処置による細胞障害性の評価

細胞の障害により培養液中に放出される LDH を測定することで評価を行った (LDH assay)。12-well plate で発育させた BEAS-2B 細胞を用い、一旦培養液を除去した後に、MDP を含む培養液あるいはコントロールの培養液を加えて、16 時間後に培養液を回収し、それぞれサンプル群、コントロール群とした。一方、無処置の細胞をすべて溶解した液も作成して内在 LDH 群とした。そして各群の液を、Roche 社の Cytotoxicity detection kit plus(LDH)を用いてプロトコルに従い処理を行い、490nm の吸光度を測定することで LDH 量を測定した。サンプル群の cell viability は以下の数式で算出した。

$$\text{Cell viability}(\%) = \left(1 - \frac{\text{サンプル群の吸光度} - \text{コントロール群の吸光度}}{\text{内在 LDH 群の吸光度} - \text{コントロール群の吸光度}}\right) \times 100 (\%)$$

統計解析

ELISA 法、Dual Luciferase Assay はいずれも 1 条件につき 3 標本にて再現性を確認した。平均値および標準偏差を算出し、グループ間の平均値の差の検定については、二群間の検定には student's t 検定を、三群間以上には One-way ANOVA を行い、有意水準 5%未満を有意とした。統計処理には JMP®(SAS 社、version 10.0.0)を用いた。

結果

flagellin 刺激による気道上皮細胞(BEAS-2B)からの炎症性サイトカインの産生

まず初めに BEAS-2B 細胞の flagellin に対する応答を検証した。80-90% confluent に発育した同細胞に対して、flagellin(*S. typhimurium* 由来)を 100ng/mL の濃度で刺激し、4 時間後に回収した細胞培養液を用いて、IL-8、IL-6、IL-1 β の産生を ELISA 法で測定した(図 4)。その結果、IL-8 の産生は明らかに認められたものの、IL-6 および IL-1 β については殆ど産生が確認されなかった。そこで以下では、flagellin による IL-8 産生増加について詳しく検証することとした。

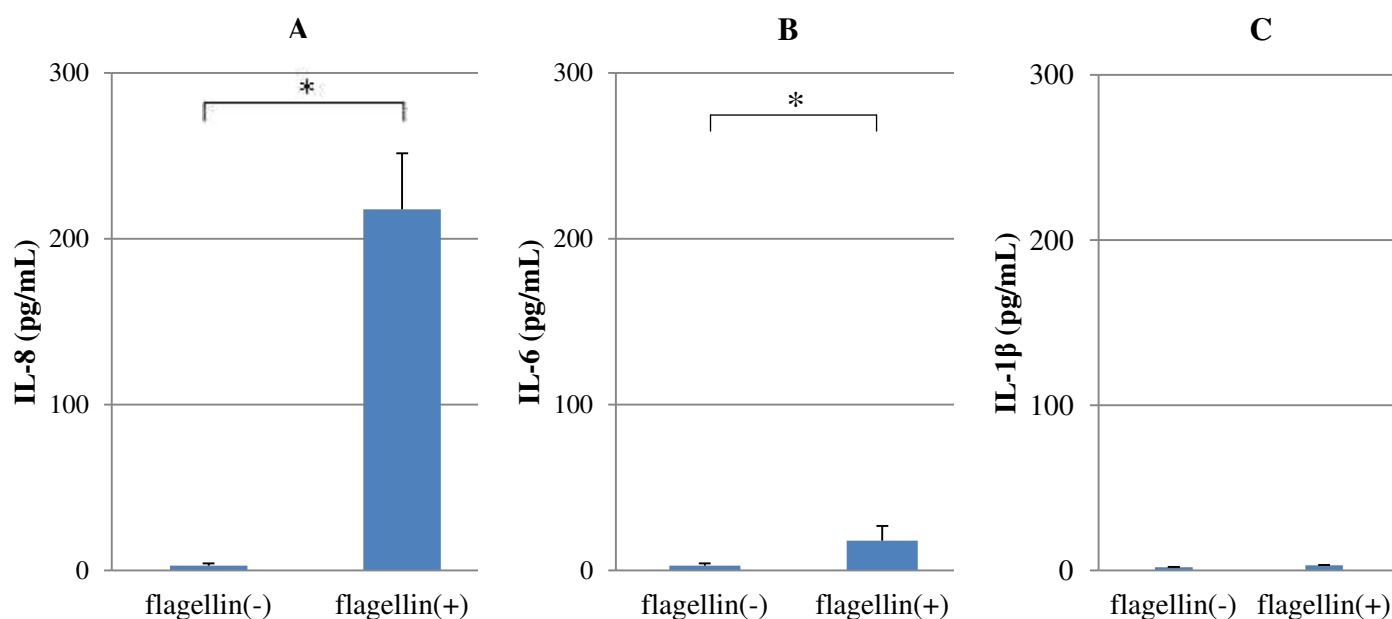


図 4 flagellin 刺激に対する気道上皮細胞のサイトカイン産生 : 12-well plate で 80-90% confluent に発育させた BEAS-2B 細胞を用いた。培養液を除去後、flagellin を 100ng/mL の濃度で含む培養液とそのコントロールを 1mL/well ずつ加え刺激を行い、4 時間後に培養液を回収し、ELISA 法で IL-8 (A)、IL-6 (B)、IL-1 β (C) の測定を行った。*は 2 群間で有意差があったことを示す(p<0.05)。N=3。

まず、flagellin 刺激後の培養液中の IL-8 濃度上昇が、気道上皮細胞に内在する IL-8 放出によるものではないことを示すために、flagellein 刺激前後の細胞質内の IL-8 量を測定し、培養液中に放出された IL-8 量との比較を行った(図 5)。細胞質内の IL-8 は flagellin 刺激の前後によらず、刺激後に細胞外に放出される量に比べて非常に微量であり、flagellin 刺激後の培養液中の IL-8 濃度上昇は、細胞質内の IL-8 放出によるものではなく、新たに産生されたものによることが示された。そのため、以後の実験でも同細胞における IL-8 産生の評価に、培養液を用いた ELISA 法による定量は妥当であると考えられた。

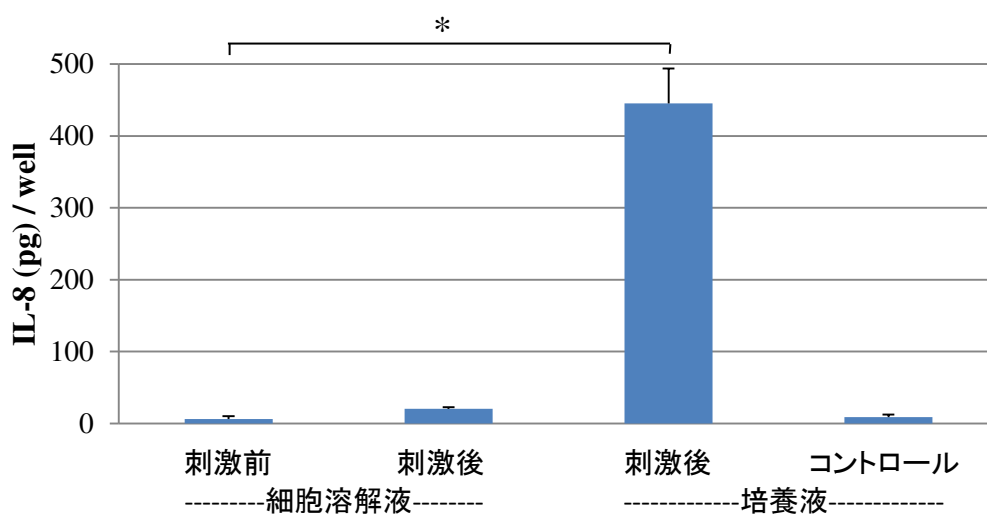


図 5 flagellin 刺激前後の気道上皮細胞内の IL-8 量、および培養液中への IL-8 放出量 : 12-well plate で発育させた BEAS-2B 細胞に対して 100ng/mL の濃度の flagellin を含む培養液およびコントロールの培養液を加えた。刺激から 4 時間後の培養液、および刺激前後の細胞から RIPA buffer を用い作成した細胞溶解液中の IL-8 をそれぞれ ELISA 法で測定し、1-well あたりの量として図示した。* は 2 群間で有意差があったことを示す(p<0.05)。N=3。

flagellin 刺激による BEAS-2B 細胞からの IL-8 産生

BEAS-2B 細胞に対する刺激物質としての flagellin の至適濃度を確認するために、0~300ng/mL の範囲で段階的に濃度を設定し、各々刺激後の IL-8 産生量を測定した(図 6)。その結果、IL-8 産生量は flagellin 濃度依存的に増加するものの、30ng/mL 以上の濃度ではほぼプラトーになることが示された。そのため以降の実験では、刺激濃度を 100ng/mL に設定することとした。

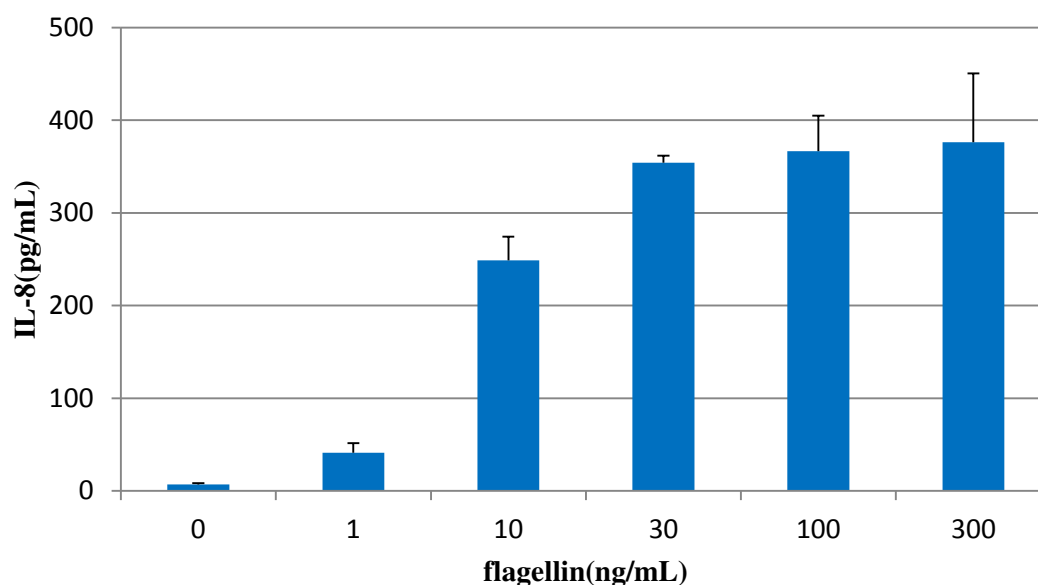


図 6 刺激に用いる flagellin の濃度と気道上皮細胞からの IL-8 産生量 : 12-well plate で 80-90% confluent に発育させた BEAS-2B 細胞に対して、それぞれ 0、1、10、30、100、300ng/mL の濃度で flagellin を含む培養液を加えた。その 4 時間後に培養液をサンプルとして回収し、ELISA 法で IL-8 の定量を行った。N=3。

次に flagellin 刺激後の IL-8 産生量の経時的変化を確認するため、flagellin 刺激から 0、2、4、8、16、24 時間後に培養液中の IL-8 を定量した(図 7)。その結果、flagellin 刺激後の IL-8 産生量は 4 時間後以降でほぼプラトーに達しており、以降の実験では刺激 4 時間後の培養液で IL-8 を測定することとした。

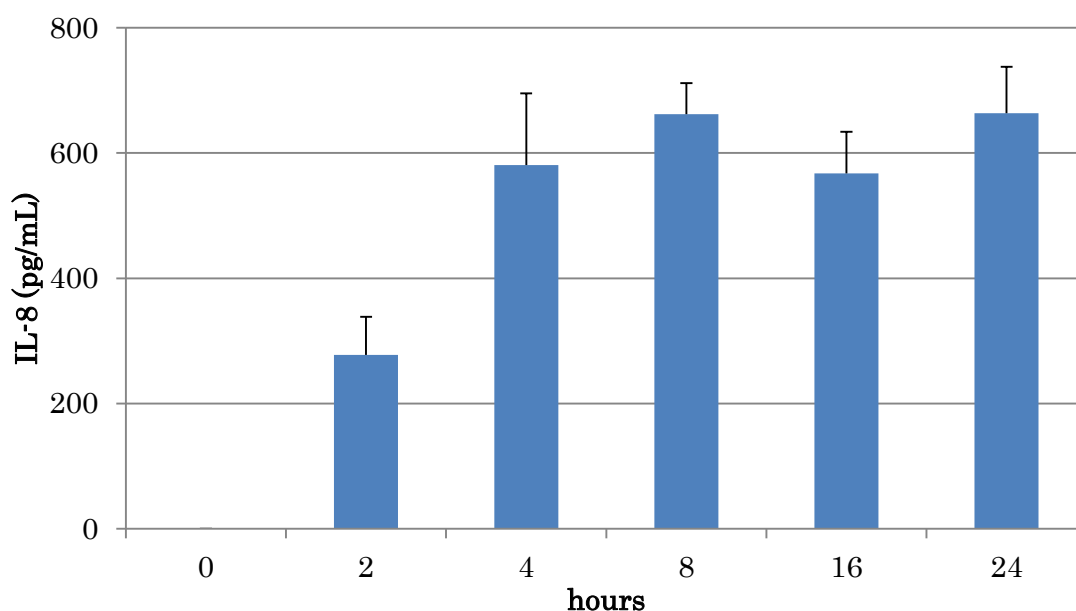


図 7 flagellin 刺激後の気道上皮細胞からの IL-8 産生の経時的変化 : 12-well plate で 80-90% confluent に発育させた BEAS-2B 細胞に対して、100ng/mL の濃度で flagellin を含む培養液を加えた。その 0、2、4、8、16、24 時間後に培養液を回収し、ELISA 法で IL-8 の定量を行った。N=3。

flagellin 刺激から IL-8 産生にいたるシグナル伝達

続いて、flagellin 刺激による IL-8 産生促進が他の細胞でも確認されているように TLR5 を介していることを確認するために、TLR5 に対する中和抗体を用いて、IL-8 産生量に変化するかを検証した。細胞培養液中に各種濃度の TLR5 中和抗体およびコントロールの IgA 抗体を加え、その 1 時間後に flagellin(100ng/mL)で刺激した(図 8)。その結果、TLR5 中和抗体の濃度依存性に IL-8 産生は低下し、300ng/mL では flagellin 未刺激時とほぼ同じ水準まで抑制され、BEAS-2B 細胞でも、flagellin 刺激による IL-8 産生は細胞膜上の TLR5 を介していると考えられた。

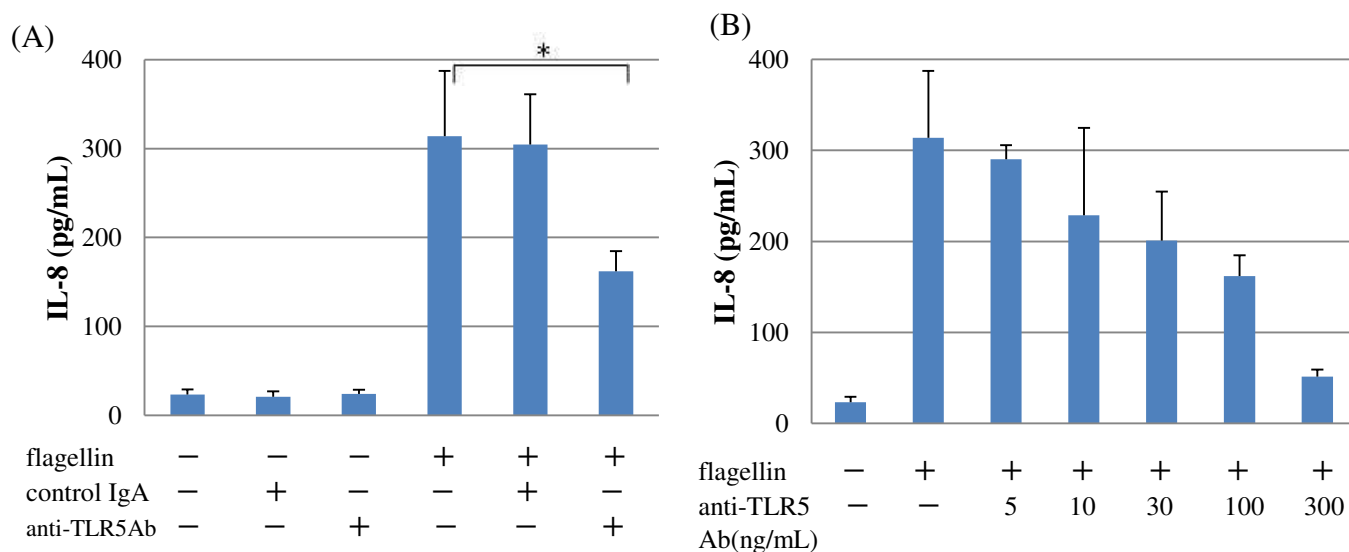


図 8 flagellin 刺激による気道上皮細胞からの IL-8 産生への TLR5 中和抗体の影響 : 12-well plate で 80-90% confluent に発育させた BEAS-2B 細胞に対して、100ng/mL の濃度の TLR5 中和抗体或いはコントロールの IgA 抗体で前処置し、1 時間後に flagellin(100ng/mL)を含む培養液を加えた。その 4 時間後に培養液を回収し、ELISA 法で IL-8 の定量を行った(A)。次に各種濃度の TLR5 中和抗体で前処置を行い、同様に flagellin 刺激後の培養液中の IL-8 を定量した(B)。*は 2 群間で有意差があったことを示す(p<0.05)。N=3。

次に flagellin の TLR5 への結合から、どのシグナル経路が活性化されて IL-8 産生に至るかを検証した。図 2 に示したようにマクロファージなど他の細胞では flagellin の TLR5 への結合により細胞質側ではアダプタータンパクである MyD88 や IRAK、TRAF6 を経て TAK1 が活性化された後、①I κ B kinase(IKK)複合体の活性化から NF- κ B 活性化が起きる経路と、②MAPK のリン酸化により AP-1 などの転写因子の活性化が起きる経路を介して IL-8 は産生される[12-14]。

まず①の経路について、flagellin 刺激後の NF- κ B 活性化の有無を dual luciferase assay で確認することとした。すなわち、NF- κ B のレポーターとなるホタルのルシフェラーゼ遺伝子と、コントロールとなるウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子を BEAS-2B 細胞にトランスフェクションし、flagellin 刺激前後でルシフェラーゼ基質添加時の発光を測定し、RLU(relative luciferase units) を算出した。刺激後では刺激前に比較し有意に NF- κ B の活性化が見られ(図 9)、flagellin 刺激による IL-8 産生には NF- κ B 活性化の経路が関与していることが示された。

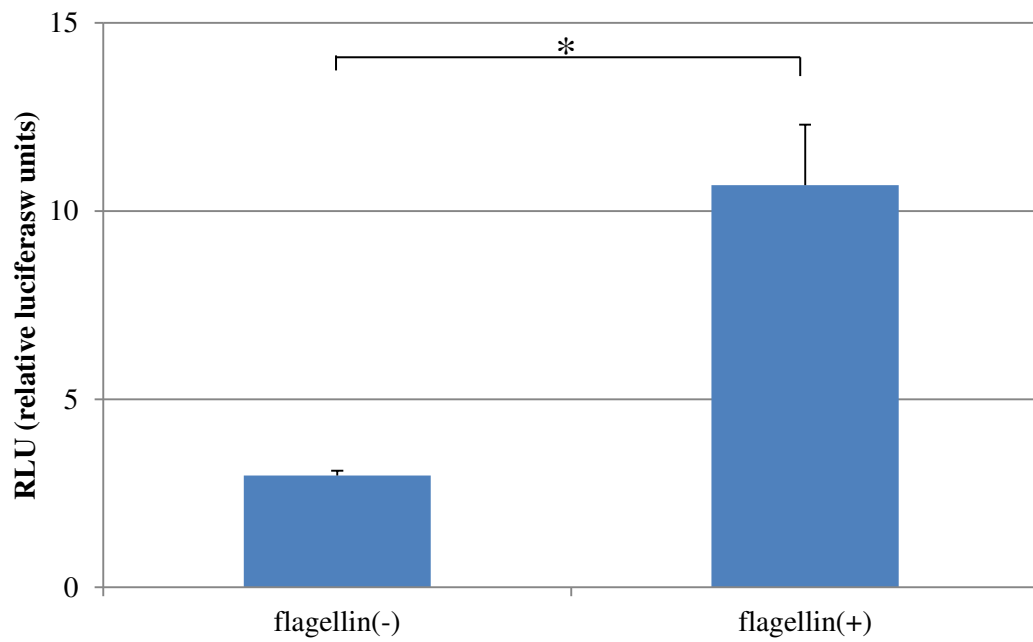


図9 気道上皮細胞における flagellin 刺激による NF- κ B 活性の変化 : あらかじめ NF- κ B レポーターと pRL-TK の遺伝子導入を行った BEAS-2B 細胞に対して、flagellin(100ng/mL)を含む培養液で刺激を行った。4 時間後に細胞を溶解した溶液を用いて、Dual luciferase assay により NF- κ B 活性を測定し、RLU(relative luciferase units)で表示した。*は 2 群間で有意差があったことを示す(p<0.05)。N=3。

②の経路については、まず flagellin 刺激後の細胞溶解液を用いて、SDS-PAGE および Western Blotting 法で各種 MAPK のリン酸化の有無を検証した。その結果、ERK および p38 に関しては MAPK のリン酸化が確認された(図 10)。一方、JNK については今回の実験手法でリン酸化を検出することはできなかった。

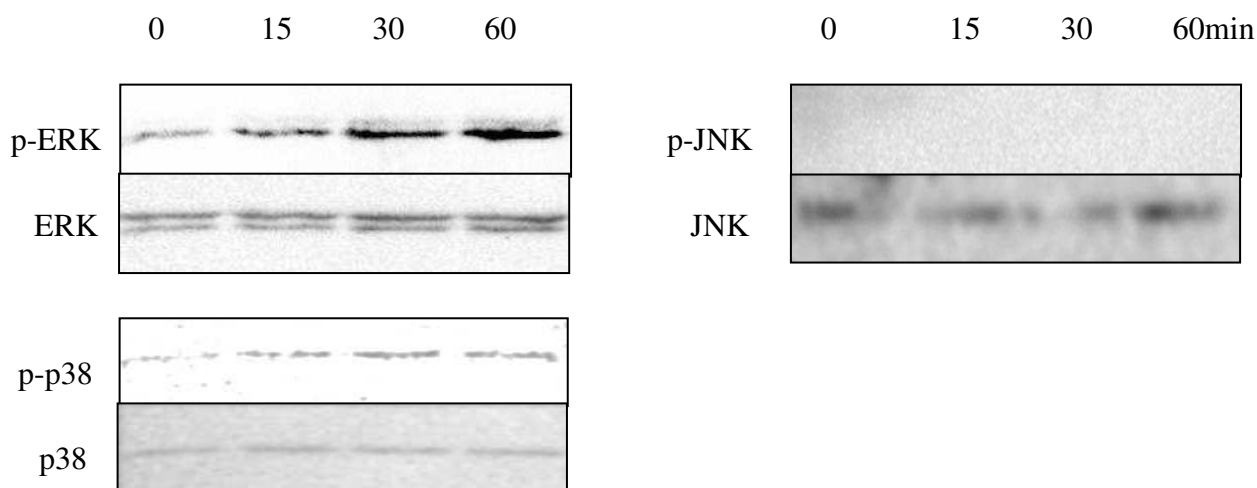


図 10 気道上皮細胞における flagellin 刺激に伴う MAPK のリン酸化 : 80-90% confluent に発育した BEAS-2B 細胞に対して flagellin(100ng/mL)を含む培養液で刺激を行い、0、15、30、60 分後にそれぞれ LIPA buffer で細胞溶解液を作成した。細胞溶解液を用いて SDS-PAGE、Western Blotting 法を行い、各種 MAPK のリン酸化を確認した。一次抗体として phospho-ERK、p38、JNK 抗体、およびコントロールとして total の ERK、p38、JNK 抗体も用いた。写真は図 17 と同一のもの(MDP 前処置なしの部分)を示した。

次に flagellin 刺激を行う 1 時間前に、ERK の阻害薬(PD98059)や p38 の阻害薬 (SB203580)で処理した場合の IL-8 産生量の変化を検証したところ、これら MAPK の経路のブロックにより IL-8 の産生が抑制されることが確認された(図 11)。

以上から BEAS-2B 細胞でも flagellin は TLR5 に結合したのち、NF- κ B 活性化 および MAPK のリン酸化の双方の経路を介して炎症性サイトカインである IL-8 の産生を促すことが示された。

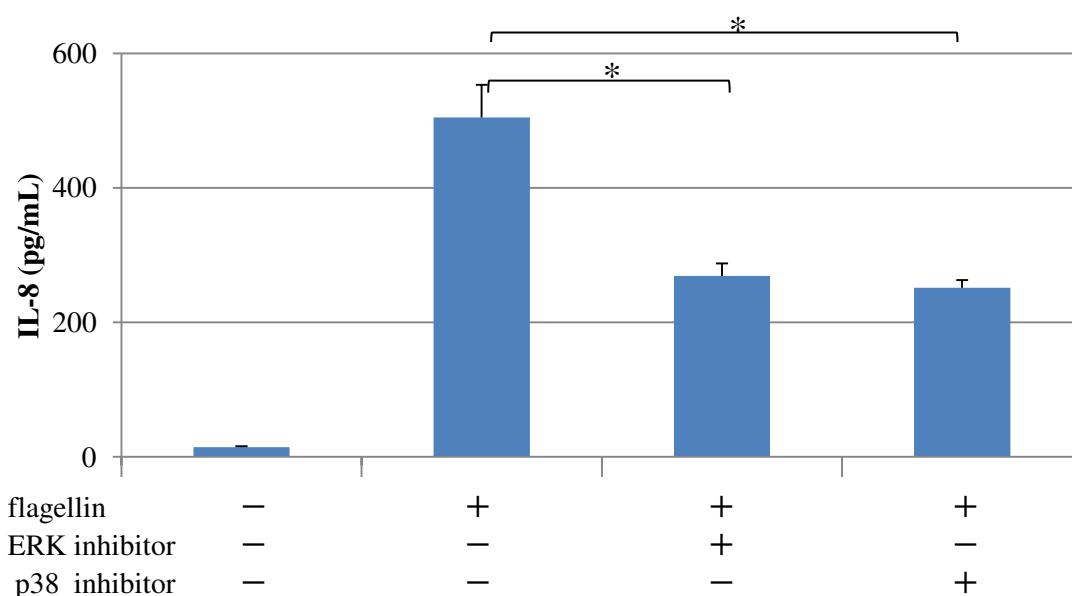


図 11 MAPK 阻害薬による flagellin 刺激後の気道上皮細胞からの IL-8 産生への影響 : 12-well plate で 80-90% confluent に発育させた BEAS-2B 細胞に対して、ERK 阻害薬(PD98059)および p38 阻害薬(SB203580)をそれぞれ 100 μ M、10 μ M の濃度で前処置し、1 時間後に flagellin(100ng/mL)を含む培養液を加えた。flagellin 刺激から 4 時間後に培養液を回収し、ELISA 法で IL-8 の定量を行った。*は 2 群間で有意差があったことを示す(p<0.05)。N=3。

flagellin 刺激による IL-8 産生に及ぼす、MDP 同時刺激および前刺激の影響

まず MDP(10 μ g/mL)と flagellin(100ng/mL)による同時刺激後の IL-8 産生量を、flagellin 単独時および MDP 単独時と比較した(図 12)。MDP(10 μ g/mL)単独の刺激では無刺激の場合と同様に IL-8 産生は殆どなく、また flagellin との同時刺激時も flagellin 単独時と明らかな差は認められなかった。

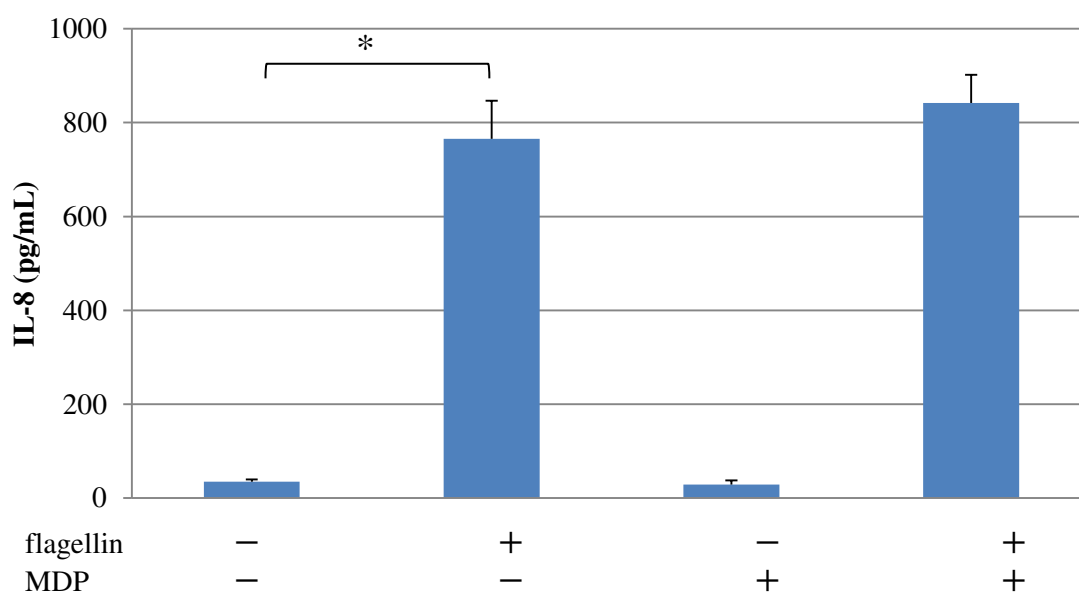


図 12 flagellin および muramyl dipeptide (MDP)との同時刺激による気道上皮細胞からの IL-8 産生 : 12-well plate で 80-90% confluent に発育させた BEAS-2B 細胞に対して、コントロールとなる培養液、flagellin(100ng/mL)や MDP (10 μ g/mL)を含む培養液を加えた。刺激から 4 時間後に培養液をサンプルとして回収し ELISA 法で IL-8 産生量を定量した。*は 2 群間で有意差があったことを示す ($p < 0.05$)。N=3。

一方で、100ng/mL の flagellin 刺激下では図 6 で示されたように、BEAS-2B 細胞から産生される IL-8 の最大量に既に達している可能性も考えられた。そのため、低濃度(1、10ng/mL)の flagellin 刺激下でも MDP との同時刺激を行い IL-8 産生量の評価を行った(図 13)。その結果、1ng/mL、10ng/mL の flagellin 刺激下においても MDP 同時刺激の有無で IL-8 産生量に有意差は示されなかった。従って 100ng/mL の場合のみならず、低濃度の flagellin でも MDP との同時刺激による IL-8 産生量の増強は起こらないと考えた。

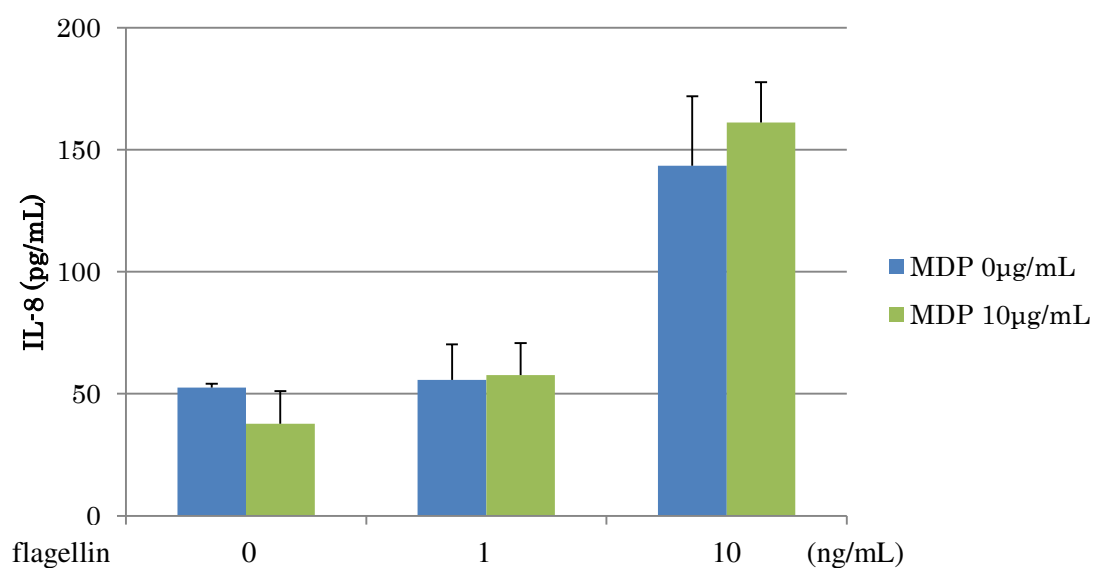


図 13 低濃度の flagellin および MDP との同時刺激による気道上皮細胞からの IL-8 産生 : 12-well plate で発育させた BEAS-2B 細胞に対して 0、1、10ng/mL の濃度の flagellin、および 0、10 μ g/mL の濃度の MDP を含む培養液を加えた。刺激から 4 時間後の培養液を回収し ELISA 法で IL-8 産生量を定量した。N=3。

次に flagellin 刺激を行う前に、あらかじめ MDP を加えていた場合の IL-8 産生への影響を検証することとした。つまり、まず MDP(10 μ g/mL)を含む培養液で細胞を前処置(overnight ; 16 時間)した後、flagellin を含む培養液への交換を行った。サンプルの回収は従来通り 4 時間後に行い、ELISA 法で測定した。その結果は図 14 に示すように、MDP 前処置を行った場合には、flagellin 刺激後の IL-8 産生量が未処置の場合と比べ有意に抑制されていた。

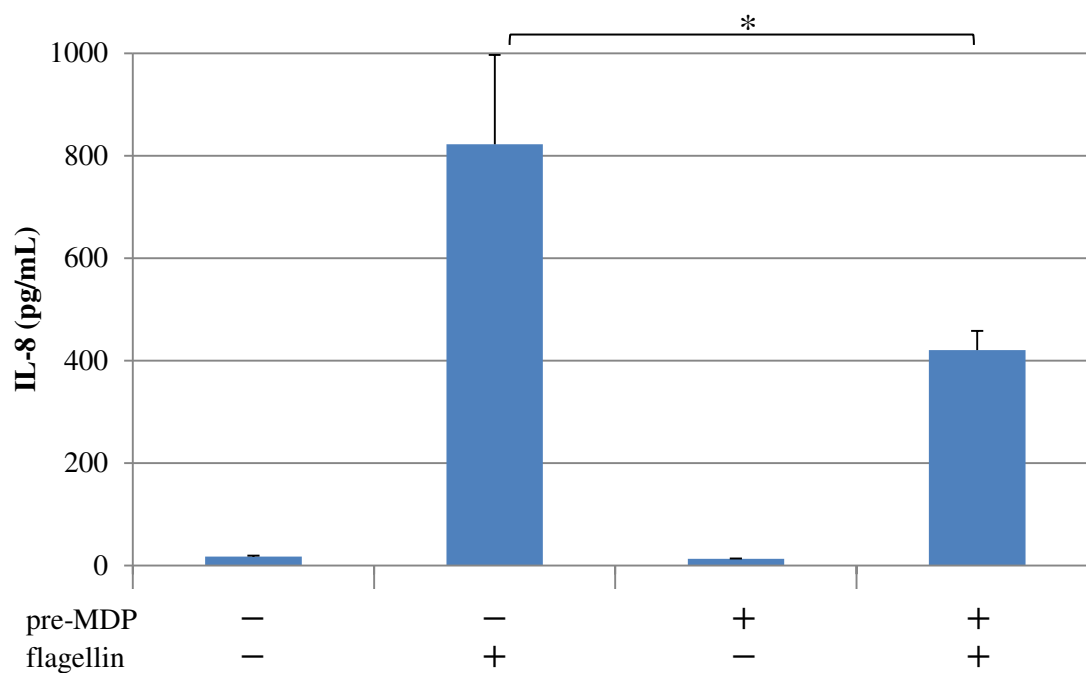


図 14 MDP 前処置を行った場合の、flagellin 刺激による気道上皮細胞からの IL-8 産生に対する影響 : BEAS-2B 細胞に対してまず MDP (10 μ g/mL)を加え、その 16 時間後に flagellin(100ng/mL)を含む培養液へ交換した。flagellin 刺激から 4 時間後に培養液をサンプルとして回収し ELISA 法で IL-8 産生量を定量した。* は 2 群間で有意差があったことを示す(p<0.05)。N=3。

続いて MDP 前処置を行う時間と、flagellin 刺激後の IL-8 産生量への影響を検証するために、前処置の時間を 8、16、24 時間と変えて同様の実験を行った(図 15)。その結果、前処置が 8 時間の場合では flagellin 刺激後の IL-8 産生量への影響は確認されなかったが、16 時間と 24 時間の群では同等の IL-8 産生抑制が認められた。このことから以後の実験では、IL-8 抑制効果を検証するにあたり MDP 前処置の時間を 16 時間に設定することが妥当と考えた。

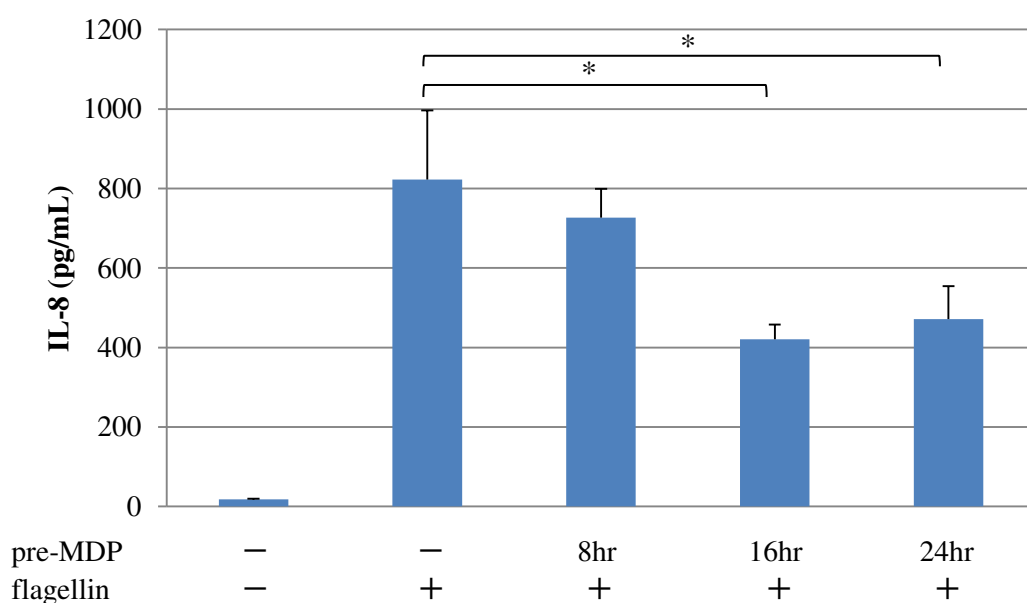


図 15 MDP 前処置時間と flagellin 刺激後の IL-8 産生量 : 12well plate で発育させた BEAS-2B 細胞に対して MDP (10 μ g/mL)を加え、その 8、16、24 時間後に flagellin(100ng/mL)を含む培養液へと交換した。MDP 前処置をせず flagellin を加えたものも含め flagellin 刺激から 4 時間後に培養液を回収し ELISA 法で IL-8 産生量を定量した。*は 2 群間で有意差があったことを示す(p<0.05)。N=3。

一方で、MDP 前処置による IL-8 産生低下が、MDP による細胞障害性に起因する可能性も考えられたため、その評価を LDH assay を用いて行った。16 時間の MDP 前処置を行った細胞の培養液中の LDH 活性を、無処置の細胞の培養液および MDP 前処置を行わず全ての細胞を溶解した液と共に測定し、材料と方法で前述した方法で cell viability を算出した(図 16)。その結果、投与から 16 時間の時点での cell viability は MDP 10 μ g/mL の場合、50 μ g/mL と高濃度の場合ともに、コントロールとの間に有意差は認めなかった。そのため 10 μ g/mL の MDP 前処置では明らかな細胞障害性はないと考えた。

以上のことから気道上皮細胞(BEAS-2B)においては、MDP 前処置が flagellin による IL-8 産生に抑制的に働く可能性が示唆された。

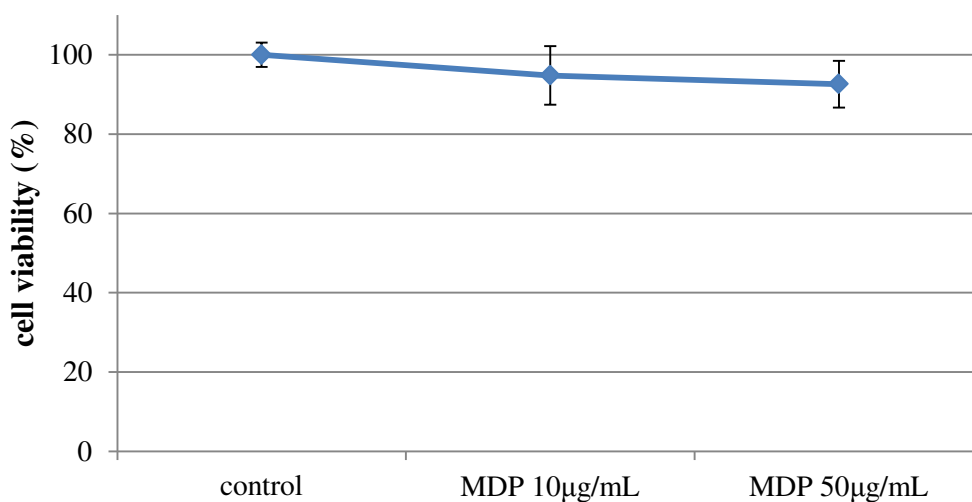


図 16 MDP 前処置による細胞障害性の有無の評価 : 12-well plate で発育させた BEAS-2B 細胞に対して、10 および 50 μ g/mL の濃度の MDP を含む培養液あるいはコントロールの培養液を加え、16 時間後に培養液を回収した。培養液中の LDH 活性を測定し、サンプル群の cell viability を算出し図示した。N=3。

MDP 前処置の flagellin-TLR5 シグナル伝達への影響

flagellin 刺激が細胞膜上の TLR5 を介した後、NF- κ B 活性化および MAPK リン酸化という 2 つの経路を経て IL-8 産生を促すことは前述した。このいずれ(あるいは両方)の経路が MDP 前処置後の IL-8 産生低下に関与しているかを検証することとした。

MDP 前処置や flagellin 刺激を行った後に、LIPA buffer を用いて細胞溶解液を採取し、SDS-PAGE および Western Blotting 法により各種 MAPK(ERK、p38、JNK) のリン酸化の状態を確認した。ERK および p38 は、flagellin 単独刺激時にはリン酸化の亢進が認められた(図 17)。一方で MDP 前処置を行った場合には、flagellin 刺激後のリン酸化亢進は示されなかった。なお JNK は、MDP 前処置の有無に関わらず今回の実験方法ではリン酸化が確認できなかった。

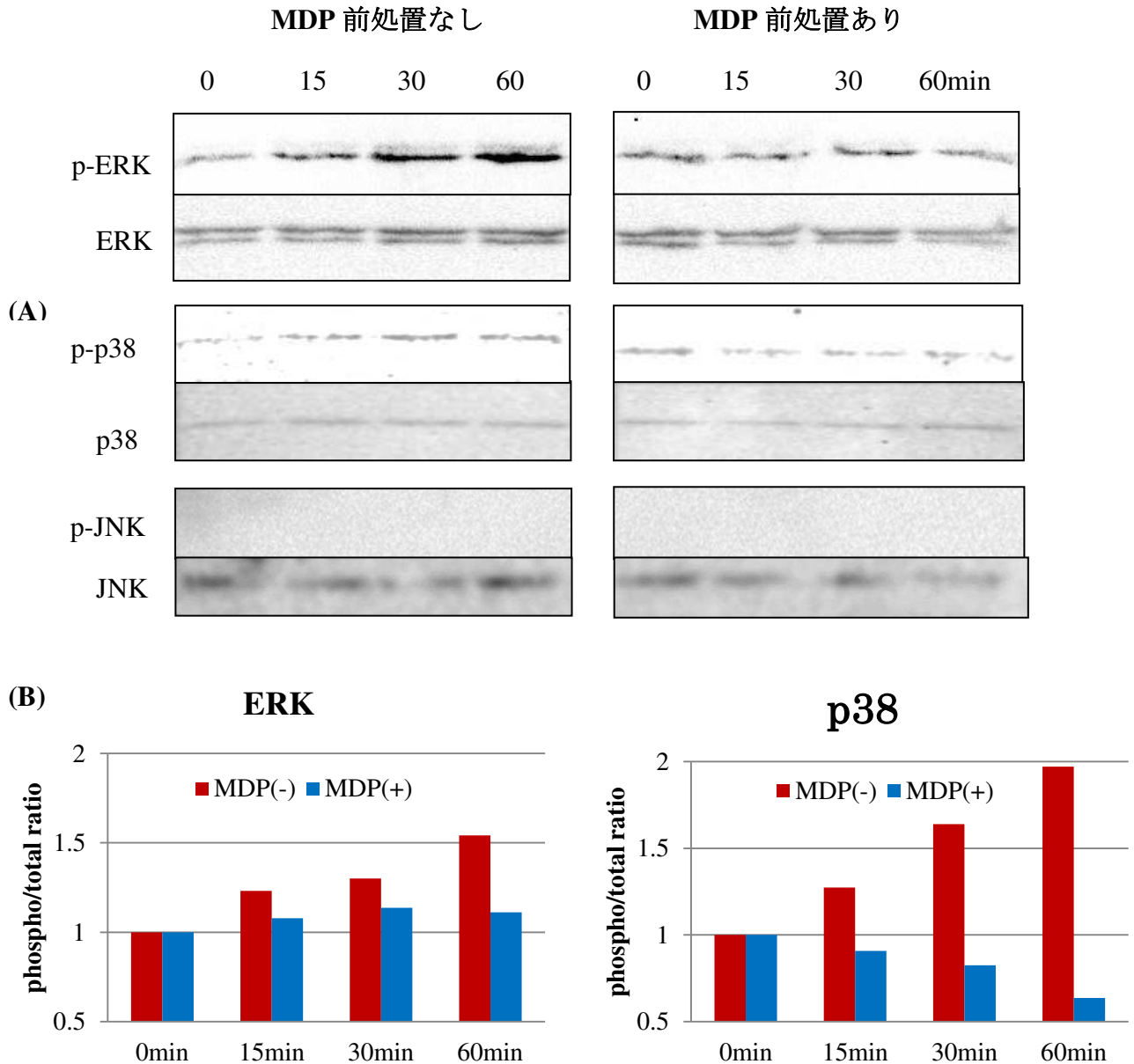


図 17 気道上皮細胞における flagellin 刺激に伴う MAPK のリン酸化 : 80-90% confluent に発育した BEAS-2B 細胞に対して flagellin(100ng/mL)を含む培養液で刺激を行い、0、15、30、60 分後にそれぞれ LIPA buffer で細胞溶解液を作成した。flagellin 刺激の 16 時間前に MDP (10 μ g/mL)を加えた場合も同様の手順で行った。細胞溶解液を用いて SDS-PAGE、Western Blotting 法を行い、各種 MAPK のリン酸化を確認した(A)。一次抗体として phospho-ERK、p38、JNK 抗体、およびコントロールとして total の ERK、p38、JNK 抗体も用いた。また phospho-ERK/p38 のバンドの intensity を、それぞれ total の ERK/p-38 のバンドの intensity で標準化した上で、刺激 0 分後を「1」として各時点のバンドの intensity をグラフ化した (B)。

次に MDP 前処置を行った場合の、flagellin 刺激後の NF- κ B 活性化を Dual luciferase assay で測定した(図 18)。下図のように、MDP 前処置の後に flagellin 刺激を行った際の NF- κ B 活性化は、前処置を行わず flagellin 単独刺激の場合と比べて違いを認めないものであった。

以上の 2 つの実験結果から、MDP 前処置による IL-8 産生抑制には、NF- κ B 活性化の経路はあまり関与しておらず、むしろ MAPK のリン酸化が抑制されることが大きく関与している可能性が示された。

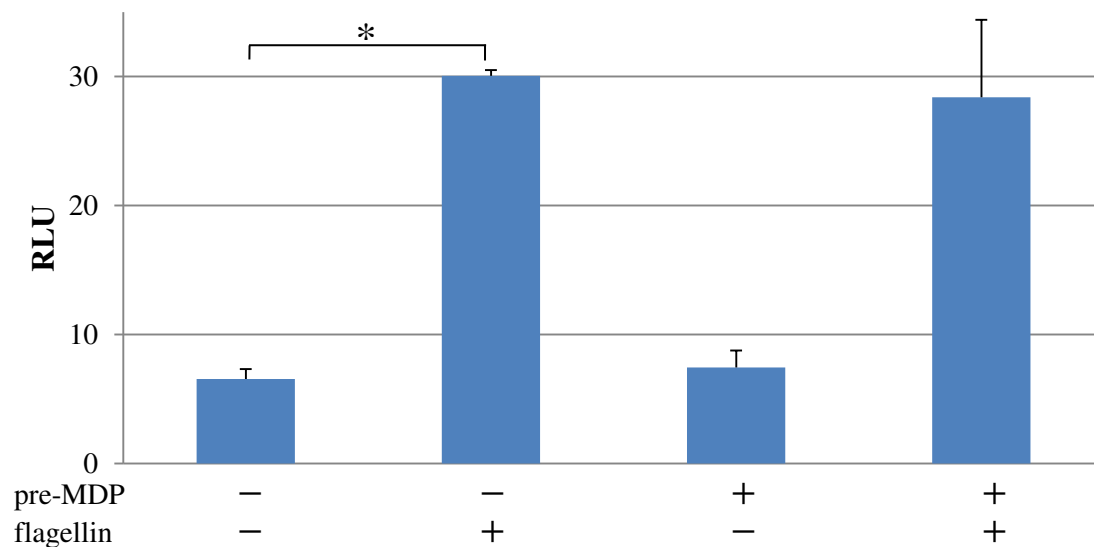


図 18 flagellin 刺激時の NF- κ B 活性化に MDP 前処置が与える影響 : あらかじめ NF- κ B レポーターと pRL-TK の遺伝子導入を行った BEAS-2B 細胞に対して、flagellin(100ng/mL)刺激の 16 時間前から MDP 前処置(10 μ g/mL)を行った。flagellin 刺激から 4 時間後に採取した細胞溶解液をサンプルとして、Dual luciferase assay により NF- κ B 活性化を測定し、RLU (relative luciferase units)を算出・表示した。*は 2 群間で有意差があったことを示す(p<0.05)。N=3。

考察

本実験ではヒト気道上皮由来の細胞株(BEAS-2B)を用いて、細菌の鞭毛の構成成分である flagellin に対する細胞の応答を、炎症性サイトカインである IL-8 の産生を中心として見てきた。この反応には、細胞膜上の TLR5 による flagellin 認識、および細胞内における転写因子である NF- κ B 活性化や MAPK のリン酸化がそれぞれ関与していることが確認された。またこの IL-8 産生に至る応答が、様々な細菌のペプチドグリカン構成成分で別の PRRs のファミリーである NOD2 の ligand である muramyl dipeptide (MDP)による前処置で抑制されることを明らかにした。

まず flagellin 刺激による IL-8 産生については、BEAS-2B 細胞では *P.aeruginosa* 由来の flagellin での報告がされていたが[43]、単球系の細胞や腸管上皮細胞など他の細胞で証明されているのと同様の経路をとることが今回確認できた[12-14]。IL-8 は好中球の活性化・遊走を促進する代表的な炎症性サイトカインであり、直接外界と接する気道上皮細胞にとって、一部の病原微生物が有する flagellin を認識し炎症を惹起することは、病原微生物の速やかな排除にも寄与しうると考えられた。

一方で今回の実験では炎症性サイトカインである、IL-6 や IL-1 β の産生はほとんど認められなかった。IL-6 は B 細胞の分化を促進することで液性免疫を活性化するほか、急性期タンパクの産生促進や気道におけるムチン産生にも関与するサイトカインであり[44, 45]、BEAS-2B 細胞でも LPS や大気汚染物質への曝露で産生されることが知られている[46, 47]。またヒト肺胞上皮細胞株では Legionella 菌の flagellin による産生が報告されているが[48]、BEAS-2B 細胞から flagellin で産生促進を示した研究は現在のところ確認できなかった。

IL-1 β は好中球やリンパ球の増殖、血管内皮細胞への接着促進をはじめとして多岐にわたる効果を有し、初期免疫応答において中心的な役割を持つサイトカインであり、前述のように NLRs ファミリーによる ligand の認識や inflammasome 活性化を経て、マクロファージなど単球系の細胞から分泌される[49, 50]。今回用いた BEAS-2B 細胞では、LPS や silica などによる刺激で産生が確認されているものの[6, 51]、産生量は単球系の細胞からのそれと比べて極少量である。本実験でも flagellin 刺激による産生量は非常に少なく、生体内での産生元として気道上皮細胞の関与は少ないものと考えられた。

次に NOD2 の ligand である MDP が、TLR のシグナル伝達に与える影響について述べる。これまでの報告ではマクロファージ系細胞や腸管上皮細胞を中心

とし用いて MDP と TLR の ligand との同時刺激による炎症性サイトカインの産生増強が示されていたが[38-41]、flagellin が関与する研究は腸管上皮細胞で MDP 同時刺激による IL-8 産生増強を示した一篇のみであり[41]、気道上皮では報告されていなかった。そこで今回の一連の実験では、気道上皮細胞(BEAS-2B)を用いて flagellin および MDP による刺激時の IL-8 産生を検証した。その結果としては、flagellin 濃度によらず MDP との同時刺激では産生増強は示されなかったが、一方で MDP の前処置により flagellin 刺激後の IL-8 産生が逆に抑制されることが見いだされた。またこの過程では flagellin/TLR5 のシグナル伝達のうち、特に MAPK のリン酸化が阻害されている可能性が示唆された。

MDP 前処置による TLR 刺激への応答抑制効果は、過去に Hedl らがヒト由来のマクロファージを用いて TLR4 刺激後の TNF- α や IL-8、IL-1 β の産生抑制を報告している[52, 53]。今回の一連の実験結果は、その抑制効果を気道上皮細胞を用いて、また flagellin を刺激物質として用いて初めて示すことができたという点で意義があると考えられる。なお Hedl らの設定した前処置の MDP 濃度は 100 μ g/mL と今回用いた 10 μ g/mL の 10 倍量であった。しかし、実際の腸管内での MDP 濃度はおよそ 100 μ g/mL とされており[54]、気道上皮細胞を使う今回の実験ではそれより十分低い濃度とするのが妥当と考え 10 μ g/mL に設定した。

MDP 前処置によって IL-8 産生抑制が起こるメカニズムは現時点では明らかでないが、可能性としては、MDP による細胞膜上の TLR 発現低下誘導、細胞質内での TLR シグナル伝達阻害が考えられる。上述のヒトマクロファージを用いた研究では、TLR 発現への影響はなく、TLR シグナルの比較的上流に位置する IRAK(IL-1 receptor-associated kinase)の活性低下や、IRAK の阻害物質である IRAK-M の発現増加を示している[53]。また rapamycin により MDP 前処置の効果が消失することから、細胞増殖やリンパ球の分化・活性化に重要な mTOR(mammalian target of rapamycin)経路の関与も示唆されている[52]。

今回の実験では MDP 前処置後の MAPK リン酸化と NF- κ B 活性化の程度に乖離が見られており、flagellin/TLR シグナルのかなり下流部分にも何らかの影響があった可能性も推測される。また一方で、MDP が NLRP3 など IL-1 β や IL-18 の産生促進を行うタイプの NLRs にも働くことで、シグナル伝達に影響を与えた可能性もある[35, 36]。

今回の一連の実験にはいくつかの問題点が挙げられる。まず第 1 には、今回用いたのは flagellin 分子であり、生菌を扱った感染実験ではないという点である。実際の菌体にはペプチドグリカンや LPS といった他の TLR の ligand も含まれており、また菌の細胞内侵入により細胞質内の NLRs なども刺激され、多種の PRRs

シグナルが同時に伝達されることが想定される。今回は flagellin/TLR5 の応答を MDP との相互作用を中心に検証するため、菌体を用いずに実験系を簡素化した
が、より生体内に近い状況を検証するには今後菌体を用いた感染実験が必要で
あろう。

第 2 の問題点は今回用いたのは市販の *Salmonella typhimurium* 由来の flagellin
分子であり、*P.aeruginosa* や *Legionella pneumoniae* といった実際に気道感染を起
こす菌種のものではないという点である。当初は *P.aeruginosa* から flagellin 分子
の単離・精製を過去の報告[55]に基づいて試みたが、LPS 除去が不完全など純度
の問題点がクリアできず、また市販されている flagellin は *S. typhimurium* や *E.coli*
など腸内細菌由来のもののみで、やむなく同様の実験に頻用されている前者を
購入・使用した。flagellin 分子の違いによって免疫応答の強弱が異なるとする報
告もあり[43]、シグナル伝達経路は同様であっても本来は *P.aeruginosa* などから
単離精製したものを使用するのが望ましかった。

第 3 は動物実験を行っていない点である。生体内の気道には気道上皮細胞だ
けでなく、気道のバリア機能の一翼を担う粘液産生細胞や、樹状細胞やマクロ
ファージといった免疫細胞も存在している。特に後者から産生されるサイトカ
インが、生体内での免疫応答を大きく修飾している可能性が高いと考えられる。

第4の問題点には、flagellinがTLR5だけでなく、NLRsファミリーのNLRC4にも認識された可能性が挙げられる。細胞質内のNLRC4はTLR5のシグナル伝達とは独立して、前述のようにinflammasome活性化を介したIL-1 β やIL-18の産生促進を行うことが知られている[49, 50]。しかし今回のBEAS-2Bを用いた実験では最終産物であるIL-1 β の産生は極少量のみであり、同細胞ではNLRC4の関与は殆どなかったものと推測された。その原因としては、気道上皮細胞におけるNLRC4の発現が十分でないことが想定され(図示していないがWestern Blotting法やPCR法で確認できず)、実際に気道組織におけるNLRC4の発現が殆ど見られないことを示した研究もある[56]。生体内においてNLRC4の機能の場はマクロファージなどに限られているのかもしれない[50, 57]。

今回の実験では気道上皮細胞単独でも、細菌の鞭毛の構成成分であるflagellinを細胞膜上のTLR5で認識を行い、NF- κ Bの活性化およびMAPKのリン酸化の2つの経路を経てIL-8の産生を促進すること、および細菌の構成成分であるMDPの前処置によりこの免疫応答が抑制されることが確認できた。

これらの知見はCOPDや嚢胞性線維症(CF)、びまん性汎細気管支炎(DPB)など慢性的に細菌が定着しうる慢性呼吸器疾患患者において、flagellin分子をもつ緑膿菌などの細菌の侵入時の免疫応答を考える一助となる可能性がある。

通常 IL-8 の産生は、好中球の活性化・遊走を促進し炎症を惹起することで病原微生物の排除に働くが、過剰な産生はむしろ組織の損傷を招いてしまい長期的な予後を悪化させることもある。実際、健常人と比較して気管支肺胞洗浄液や喀痰中の IL-8 量は COPD[58, 59]、CF[60, 61]、DPB[62]の患者で上昇しており、重症度や呼吸機能低下との相関も示されている[59, 63, 64]。また、ベースラインの IL-8 量が多いほど COPD 急性増悪が頻回に生じるとする報告もある[65]。加えて COPD や CF の急性増悪時には、気道内の IL-8 量がさらに増加し[58, 66, 67]、その増加幅が大きいほど急性増悪からの回復が遅いことも示されている[66]。

このように上記慢性呼吸器疾患では、気道内の IL-8 をコントロールすることが重要と考えられており、実際これらの疾患に有効である少量マクロライド療法では気道内の IL-8 産生抑制が観察されている[68]。こういった観点から本実験の結果を見てみると、明らかな細胞障害性を持たず、前処置による IL-8 産生抑制効果を示した MDP は、緑膿菌など flagellin を有する細菌の侵入時に気道組織に対して保護的に働く可能性が示唆される。本実験はあくまで flagellin との関係に焦点を当てたものであり、今後さらに他の PRRs ligand と MDP との関係を含めて動物実験などでの検証が必要であるが、慢性の呼吸器疾患の病勢コントロールに病原微生物由来分子の MDP が寄与する可能性が考えられた。

結論

ヒト気道上皮由来細胞(BEAS-2B)において、細菌の鞭毛の構成成分である flagellin は TLR5 に認識され、NF- κ B 活性化および MAPK のリン酸化を経て IL-8 産生が促進されること、及び様々な細菌のペプチドグリカンに含まれる MDP で前処置を行うとこの応答が抑制されることが示された。

これらの知見は、緑膿菌などが有する flagellin が病原性を有すること、および COPD など慢性的に細菌が定着しうる呼吸器疾患患者において MDP の存在が気道組織に対して保護的に働く可能性を示すものと考えられた。

謝辞

本研究および本論文の作成に当たりましては、指導教員であります東京大学大学院医学系研究科内科学専攻呼吸器内科教授 長瀬隆英先生には様々なご指導、ご支援を賜りましたことに感謝の意を表します。

また研究の場を快くご提供いただきました、帝京大学医学部内科(感染症) 教授 太田康男先生には研究内容から論文作成にいたるまでの全般におきまして多大なるご指導をいただきました。この場をお借りして、心より感謝申し上げます。加えて日々の研究におきまして、実験方法など手技の基本から事細かにアドバイスを頂きました、帝京大学医学部内科(感染症) 助教 吉野友祐先生、同助教 古賀一郎先生、同講師 北沢貴利先生にも深く感謝申し上げます。

その他、様々な形で本研究および大学院での 4 年間を支えて下さった方々にも感謝の意を表して謝辞と致します。

引用文献

1. 厚生労働省, *人口動態統計の年間推計*. 2013.
2. Mizgerd J P, Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med*, **358**(7): p. 716-27. 2008.
3. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Pétrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux V F, Ryffel B, and Couillin I, Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **179**(10): p. 903-13. 2009.
4. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux V F, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, and Couillin I, Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **182**(6): p. 774-83. 2010.
5. Palomaki J, Valimaki E, Sund J, Vippola M, Clausen P A, Jensen K A, Savolainen K, Matikainen S, and Alenius H, Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. *ACS Nano*, **5**(9): p. 6861-70. 2011.
6. Peeters P M, Perkins T N, Wouters E F, Mossman B T, and Reynaert N L, Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*, **10**: p. 3. 2013.
7. Xu J F, Washko G R, Nakahira K, Hatabu H, Patel A S, Fernandez I E, Nishino M, Okajima Y, Yamashiro T, Ross J C, Estepar R S, Diaz A A, Li H P, Qu J M, Himes B E, Come C E, D'Aco K, Martinez F J, Han M K, Lynch D A, Crapo J D, Morse D, Ryter S W, Silverman E K, Rosas I O, Choi A M, and Hunninghake G M, Statins and pulmonary fibrosis: the potential role of NLRP3 inflammasome activation. *Am J Respir Crit Care Med*, **185**(5): p. 547-56. 2012.
8. Tolle L B and Standiford T J, Danger-associated molecular patterns (DAMPs) in acute lung injury. *J Pathol*, **229**(2): p. 145-56. 2013.
9. Kuipers M T, Aslami H, Janczy J R, van der Sluijs K F, Vlaar A P, Wolthuis E K, Choi G, Roelofs J J, Flavell R A, Sutterwala F S, Bresser P, Leemans J C, van der Poll T, Schultz M J, and Wieland C W, Ventilator-induced lung injury is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Anesthesiology*, **116**(5): p. 1104-15. 2012.
10. Takeuchi O and Akira S, Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*,

- 140(6):** p. 805-20. 2010.
11. Gay N J and Gangloff M, Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*, **76**: p. 141-65. 2007.
 12. Hayashi F, Smith K D, Ozinsky A, Hawn T R, Yi E C, Goodlett D R, Eng J K, Akira S, Underhill D M, and Aderem A, The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, **410(6832)**: p. 1099-103. 2001.
 13. Tallant T, Deb A, Kar N, Lupica J, de Veer M J, and DiDonato J A, Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol*, **4**: p. 33. 2004.
 14. Yu Y, Zeng H, Lyons S, Carlson A, Merlin D, Neish A S, and Gewirtz A T, TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285(2)**: p. G282-90. 2003.
 15. Balamayooran T, Balamayooran G, and Jeyaseelan S, Review: Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. *Innate Immun*, **16(3)**: p. 201-10. 2010.
 16. Strober W and Watanabe T, NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease. *Mucosal Immunol*, **4(5)**: p. 484-95. 2011.
 17. Raoust E, Balloy V, Garcia-Verdugo I, Touqui L, Ramphal R, and Chignard M, *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS One*, **4(10)**: p. e7259. 2009.
 18. Ben Mohamed F, Garcia-Verdugo I, Medina M, Balloy V, Chignard M, Ramphal R, and Touqui L, A crucial role of Flagellin in the induction of airway mucus production by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, **7(7)**: p. e39888. 2012.
 19. Yu H, Zhou X, Wen S, and Xiao Q, Flagellin/TLR5 responses induce mucus hypersecretion by activating EGFR via an epithelial cell signaling cascades. *Exp Cell Res*, **318(6)**: p. 723-31. 2012.
 20. Hawn T R, Berrington W R, Smith I A, Uematsu S, Akira S, Aderem A, Smith K D, and Skerrett S J, Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*. *J Immunol*, **179(10)**: p. 6981-7. 2007.
 21. Miao E A, Andersen-Nissen E, Warren S E, and Aderem A, TLR5 and Ipaf: dual

- sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol*, **29**(3): p. 275-88. 2007.
22. Inohara, Chamaillard, McDonald C, and Nunez G, NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*, **74**: p. 355-83. 2005.
 23. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, and Nunez G, The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*, **10**(3): p. 241-7. 2009.
 24. Franchi L, Munoz-Planillo R, and Nunez G, Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*, **13**(4): p. 325-32. 2012.
 25. Moreira L O and Zamboni D S, NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Front Immunol*, **3**: p. 328. 2012.
 26. Correa R G, Milutinovic S, and Reed J C, Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Biosci Rep*, **32**(6): p. 597-608. 2012.
 27. Travassos L H, Carneiro L A, Girardin S E, Boneca I G, Lemos R, Bozza M T, Domingues R C, Coyle A J, Bertin J, Philpott D J, and Plotkowski M C, Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, **280**(44): p. 36714-8. 2005.
 28. Opitz B, Forster S, Hocke A C, Maass M, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttorp N, and Krull M, Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydia pneumoniae*. *Circ Res*, **96**(3): p. 319-26. 2005.
 29. Shin S, Case C L, Archer K A, Nogueira C V, Kobayashi K S, Flavell R A, Roy C R, and Zamboni D S, Type IV secretion-dependent activation of host MAP kinases induces an increased proinflammatory cytokine response to *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog*, **4**(11): p. e1000220. 2008.
 30. Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke A C, Rosseau S, Hammerschmidt S, Schumann R R, Suttorp N, and Hippenstiel S, Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, **279**(35): p. 36426-32. 2004.
 31. Qiu H N, Wong C K, Chu I M, Hu S, and Lam C W, Muramyl dipeptide mediated activation of human bronchial epithelial cells interacting with basophils: a novel mechanism of airway inflammation. *Clin Exp Immunol*, **172**(1): p. 81-94. 2013.
 32. Ferwerda G, Girardin S E, Kullberg B J, Le Bourhis L, de Jong D J, Langenberg

- D M, van Crevel R, Adema G J, Ottenhoff T H, Van der Meer J W, and Netea M G, NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*, **1**(3): p. 279-85. 2005.
33. Juarez E, Carranza C, Hernandez-Sanchez F, Leon-Contreras J C, Hernandez-Pando R, Escobedo D, Torres M, and Sada E, NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Eur J Immunol*, **42**(4): p. 880-9. 2012.
 34. Shimada K, Chen S, Dempsey P W, Sorrentino R, Alsabeh R, Slepkin A V, Peterson E, Doherty T M, Underhill D, Crother T R, and Arditi M, The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydomonas pneumoniae* lung infection. *PLoS Pathog*, **5**(4): p. e1000379. 2009.
 35. Pan Q, Mathison J, Fearn C, Kravchenko V V, Da Silva Correia J, Hoffman H M, Kobayashi K S, Bertin J, Grant E P, Coyle A J, Sutterwala F S, Ogura Y, Flavell R A, and Ulevitch R J, MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. *J Leukoc Biol*, **82**(1): p. 177-83. 2007.
 36. Hsu L C, Ali S R, McGillivray S, Tseng P H, Mariathasan S, Humke E W, Eckmann L, Powell J J, Nizet V, Dixit V M, and Karin M, A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(22): p. 7803-8. 2008.
 37. Kinsner A, Boveri M, Hareng L, Brown G C, Coecke S, Hartung T, and Bal-Price A, Highly purified lipoteichoic acid induced pro-inflammatory signalling in primary culture of rat microglia through Toll-like receptor 2: selective potentiation of nitric oxide production by muramyl dipeptide. *J Neurochem*, **99**(2): p. 596-607. 2006.
 38. Wolfert M A, Murray T F, Boons G J, and Moore J N, The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J Biol Chem*, **277**(42): p. 39179-86. 2002.
 39. Kim H J, Yang J S, Woo S S, Kim S K, Yun C H, Kim K K, and Han S H, Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol*, **81**(4): p. 983-9. 2007.
 40. Natsuka M, Uehara A, Yang S, Echigo S, and Takada H, A polymer-type water-soluble peptidoglycan exhibited both Toll-like receptor 2- and NOD2-agonistic activities, resulting in synergistic activation of human

- monocytic cells. *Innate Immun*, **14**(5): p. 298-308. 2008.
41. Huang F C, Regulation of Salmonella flagellin-induced interleukin-8 in intestinal epithelial cells by muramyl dipeptide. *Cell Immunol*, **278**(1-2): p. 1-9. 2012.
 42. Farkas L, Stoelcker B, Jentsch N, Heitzer S, Pfeifer M, and Schulz C, Muramyl dipeptide modulates CXCL-8 release of BEAS-2B cells via NOD2. *Scand J Immunol*, **68**(3): p. 315-22. 2008.
 43. Shanks K K, Guang W, Kim K C, and Lillehoj E P, Interleukin-8 production by human airway epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates expressing type a or type b flagellins. *Clin Vaccine Immunol*, **17**(8): p. 1196-202. 2010.
 44. Chen Y, Thai P, Zhao Y H, Ho Y S, DeSouza M M, and Wu R, Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem*, **278**(19): p. 17036-43. 2003.
 45. Thacker E L, Lung inflammatory responses. *Vet Res*, **37**(3): p. 469-86. 2006.
 46. Schulz C, Farkas L, Wolf K, Kratzel K, Eissner G, and Pfeifer M, Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). *Scand J Immunol*, **56**(3): p. 294-302. 2002.
 47. Honda A, Murayama R, Tsuji K, Matsuda Y, Koike E, Okamoto Y, Shirasawa N, and Takano H, Streamer discharge reduces pollen-induced inflammatory responses and injury in human airway epithelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, **238**(2): p. 187-92. 2013.
 48. Lorenz J, Zahlten J, Pollok I, Lippmann J, Scharf S, N'Guessan P D, Opitz B, Flieger A, Suttorp N, Hippenstiel S, and Schmeck B, Legionella pneumophila-induced IkappaBzeta-dependent expression of interleukin-6 in lung epithelium. *Eur Respir J*, **37**(3): p. 648-57. 2011.
 49. Cai S, Batra S, Wakamatsu N, Pacher P, and Jeyaseelan S, NLRC4 inflammasome-mediated production of IL-1beta modulates mucosal immunity in the lung against gram-negative bacterial infection. *J Immunol*, **188**(11): p. 5623-35. 2012.
 50. Cohen T S and Prince A S, Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest*, **123**(4): p. 1630-7. 2013.
 51. Fuentes-Mattei E, Rivera E, Gioda A, Sanchez-Rivera D, Roman-Velazquez F R, and Jimenez-Velez B D, Use of human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) to

- study immunological markers resulting from exposure to PM(2.5) organic extract from Puerto Rico. *Toxicol Appl Pharmacol*, **243**(3): p. 381-9. 2010.
52. Hedl M and Abraham C, Secretory mediators regulate Nod2-induced tolerance in human macrophages. *Gastroenterology*, **140**(1): p. 231-41. 2011.
 53. Hedl M, Li J, Cho J H, and Abraham C, Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(49): p. 19440-5. 2007.
 54. Vavricka S R, Musch M W, Chang J E, Nakagawa Y, Phanvijhitsiri K, Waypa T S, Merlin D, Schneewind O, and Chang E B, hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology*, **127**(5): p. 1401-9. 2004.
 55. Bardoel B W, van der Ent S, Pel M J, Tommassen J, Pieterse C M, van Kessel K P, and van Strijp J A, Pseudomonas evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog*, **7**(8): p. e1002206. 2011.
 56. Yin Y, Yan Y, Jiang X, Mai J, Chen N C, Wang H, and Yang X F, Inflammasomes are differentially expressed in cardiovascular and other tissues. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **22**(2): p. 311-22. 2009.
 57. Abdelaziz D H, Amr K, and Amer A O, Nlrc4/Ipaf/CLAN/CARD12: more than a flagellin sensor. *Int J Biochem Cell Biol*, **42**(6): p. 789-91. 2010.
 58. Kim V, Rogers T J, and Criner G J, New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, **5**(4): p. 478-85. 2008.
 59. Stockley R A, Progression of chronic obstructive pulmonary disease: impact of inflammation, comorbidities and therapeutic intervention. *Curr Med Res Opin*, **25**(5): p. 1235-45. 2009.
 60. Dhooghe B, Noel S, Huaux F, and Leal T, Lung inflammation in cystic fibrosis: Pathogenesis and novel therapies. *Clin Biochem*. 2013.
 61. van de Weert-van Leeuwen P B, Arets H G, van der Ent C K, and Beekman J M, Infection, inflammation and exercise in cystic fibrosis. *Respir Res*, **14**: p. 32. 2013.
 62. Sakito O, Kadota J, Kohno S, Abe K, Shirai R, and Hara K, Interleukin 1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin 8 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis: a potential mechanism of macrolide therapy. *Respiration*, **63**(1): p. 42-8. 1996.
 63. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer P C, Buhl R, Schmitt-Grohe S, Zielen S, and Schubert R, Sputum biomarker profiles in

- cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine*, **50**(2): p. 152-7. 2010.
64. Mayer-Hamblett N, Aitken M L, Accurso F J, Kronmal R A, Konstan M W, Burns J L, Sagel S D, and Ramsey B W, Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **175**(8): p. 822-8. 2007.
 65. Bhowmik A, Seemungal T A, Sapsford R J, and Wedzicha J A, Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*, **55**(2): p. 114-20. 2000.
 66. Perera W R, Hurst J R, Wilkinson T M, Sapsford R J, Mullerova H, Donaldson G C, and Wedzicha J A, Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J*, **29**(3): p. 527-34. 2007.
 67. Sloane A J, Lindner R A, Prasad S S, Sebastian L T, Pedersen S K, Robinson M, Bye P T, Nielson D W, and Harry J L, Proteomic analysis of sputum from adults and children with cystic fibrosis and from control subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, **172**(11): p. 1416-26. 2005.
 68. Cameron E J, McSharry C, Chaudhuri R, Farrow S, and Thomson N C, Long-term macrolide treatment of chronic inflammatory airway diseases: risks, benefits and future developments. *Clin Exp Allergy*, **42**(9): p. 1302-12. 2012.