

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

慢性呼吸器疾患における
IL-17F 及び Nrf2 の機能解析

2019

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

中嶋真之

目次

第 1 章 気道平滑筋における IL-17F の機能解析	2
序論：気管支喘息と IL-17F の概要	3
1-1 IL-17F による気道平滑筋細胞からの IL-6 の産生	5
1-2 IL-17F による気道平滑筋細胞からの IL-8 の産生	10
第 2 章 肺非結核性抗酸菌症における Nrf2 の役割	16
第 3 章 総括	28
図	29
参考文献	50
謝辞	57
出典	58
参考論文	59

第1章 気道平滑筋における IL-17F の機能解析

略語

本論文においては以下の略語を使用した。

BET	bromodomains and extra-terminal domain
Brd4	bromodomain-containing protein4
CDK9	cyclin dependent kinase9
DSIF	5,6-dicholoro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity-inducing factor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ILC	innate lymphoid cell
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NELF	negative elongation factor
NF κ B	nuclear factor-kappa B
P-TEFb	positive transcription elongation factor b
TAK1	transforming growth factor β -activated kinase1
PolII	RNA polymerase II

序章

気管支喘息は、気道狭窄と気道過敏性の亢進、リモデリングによって特徴づけられる慢性炎症性疾患である。一般的に気管支喘息は、好酸球性の気道炎症を主体とする type2 型とそれ以外の non-type2 型に分類される[1]。Type2 型の気道炎症には、ILC2 や好酸球、肥満細胞や Th2 細胞などが関与する。Type2 型の気管支喘息は、通常吸入ステロイドをはじめとした既存の治療薬への反応が良好であり、IL-4、IL-5、IL-13、IgE などを対象とした生物学的製剤の使用も可能なため、重症例においても複数の治療選択肢が残されている。一方、Non-type2 型の気管支喘息は主に好中球主体の気道炎症を特徴とし、ILC3 や Th1 細胞、Th17 細胞などが関与する。また気道の好中球浸潤と喘息の重症度は相関することが報告されている[2, 3]。さらに吸入ステロイドが奏功しない重症喘息に好中球性炎症の関与が示唆されている[4, 5]。重症喘息患者は全喘息患者の約 10% を占めることから今後の喘息の治療・管理における最重要課題の一つとなっているが、好中球性炎症の病態は完全には明らかにされていない。これらのことから non-type2 型気管支喘息に対する有効な治療法は確立されておらず、新たな薬物療法の開発が期待されている。

2001 年に川口がクローニングした IL-17F は IL-17 ファミリーに属するサイトカインであり、IL-6 や IL-8、GRO α などの産生を強力に誘導することで、好中球性炎症の発現に関与している[6-8]。IL-17F をマウスの気道に過剰発現させると、気道の好中球性炎症が誘導される[9]。また、IL-17F は喘息や COPD 患者の気道で増加し、重症度とも相関することが知られている[10-12]。IL-17F の遺伝子多型の一つでアミノ酸変異を伴う一塩基多型 (7188T/C) は有意に喘息患者に多く、かつ気管支喘息患者の肺機能の低下とも関連している[13]。これらの知見から IL-17F は喘息の発症や病態に関与する重要な因子の一つであると考えられる。

気道平滑筋は直接的に気道閉塞をきたすため、気管支喘息における気管平滑筋の役割は、これまで主に機械的な収縮能に着目されてきた。しかし、近年の研究から気道平滑筋細胞自身が IL-6 を含む炎症性サイトカインを産生する、す

なわちエフェクター細胞として気道炎症の病態に積極的に関与する事が報告されてきた[14, 15]。気道平滑筋細胞は IL-17F の受容体である IL-17RA と IL-17RC を発現していることから、IL-17F によるサイトカイン分泌においても何らかの機能を有していることが推察されるが、その詳細は不明である[16]。IL-17F の気道平滑筋細胞における役割を明らかにすることは、喘息、特に重症喘息の病態を解明し新たな創薬治療のターゲットになる可能性があると考えられる。

1-1 IL-17F による気道平滑筋細胞からの IL-6 の誘導

1. 背景

前述のように IL-6 は喘息の病因に関与する重要な因子である[17]。喘息患者の血清や気管支肺胞洗浄液では IL-6 の発現が亢進しており、喘息の重症度とも相関することが知られている[18, 19]。また IL-6 は気管支喘息の特徴の一つである粘液産生の亢進とも関連している[20]。従って気道平滑筋細胞における IL-6 発現のメカニズムを明らかにすることは重要である。

2. 方法

細胞培養

正常ヒト気道平滑筋細胞 (Walkersville) を使用し、添付文書に従い専用の培地で培養した。実験には第 4 世代までの細胞を利用した。

IL-6 の mRNA 発現解析

10-100 ng/ml の IL-17F (R&D Systems) でサブコンフルエントになったヒト気道平滑筋細胞を刺激し、4、12、24、48 時間後に回収した。RNA 抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いた。1 µg の total RNA から ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて cDNA を作製し、real-time PCR を施行した。

プライマー配列は以下の通り。

IL-6 forward ; 5'-AAAGAGGCACTGGCAGAAAA-3'

IL-6 reverse ; 5'-CACCAGGCAAGTCTCCTCAT -3'

G3PDH forward ; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'

G3PDH reverse ; 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

遺伝子発現は G3PDH 遺伝子をコントロールとして $\Delta\Delta C_t$ 法で算出した。結果は mean \pm SEM (n=6) で表記した。

IL6 のタンパク発現解析

10-100 ng/ml の IL-17F でサブコンフルエントになったヒト気道平滑筋細胞を刺激し、4、12、24、48 時間後に回収した。同様に 100 ng/ml の IL-17A (R&D Systems) でヒト気道平滑筋細胞を刺激し、24 時間後に回収した。培養上清中の IL-6 濃度は IL-6 Elisa kit (R&D Systems) で測定した。結果は mean \pm SEM (n=6) で表記した。

ウェスタンブロッティングによる TAK1 と NF κ B の検出

ヒト気道平滑筋細胞を TAK1 または p65 の siRNAs で 1 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で刺激した。総細胞抽出液を調製し、7.5-15%の Tris-glycine ゲル (DRC) で電気泳動した後、polyvinylidene difluoride メンブレン (Bio-Rad) へ転写した。使用した抗体は以下の通り。anti-TAK1 Ab, anti-phospho-TAK1 Ab, anti-phospho-p65 Ab (Cell Signaling Technology)、anti-p65 (RelA) Ab (Santa Cruz Biotechnology)。

TAK1 阻害による IL-6 発現の抑制効果

ヒト気道平滑筋細胞を TAK1 阻害剤 5Z-7-Oxozeaenol (Sigma-Aldrich) または control vehicle (0.1%の DMSO) で 3 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で刺激した。24 時間後に培養上清を回収し、IL-6 のタンパク発現量を解析した。同様に、ヒト気道平滑筋細胞に TAK1 siRNAs (Santa Cruz Biotechnology) もしくは control siRNAs (Ambion) を移入した。トランスフェクションには HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) を用いた。100 ng/ml の IL-17F で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-6 のタンパク発現量を解析した。結果は mean \pm SEM (n=6) で表記した。

NF κ B 阻害による IL-6 発現の抑制効果

ヒト気道平滑筋細胞を NF κ B 阻害剤 BAY 11-7082 (Calbiochem) または control vehicle (0.1%の DMSO) で 1 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で刺激した。24 時間後に培養上清を回収し、IL-6 のタンパク発現量を解析した。同様に、

前述の方法でヒト気道平滑筋細胞に p65 siRNAs (Santa Cruz Biotechnology) を移入した。100 ng/ml の IL-17F で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-6 のタンパク発現量を解析した。結果は mean±SEM (n=6) で表記した。

統計解析

統計解析は分散分析 (ANOVA) で判定し、結果を mean±SEM で表記した。P 値が 0.05 未満を有意差ありと判断した。

3. 結果

IL-17F による IL-6 の遺伝子とタンパク発現

ヒト気道平滑筋細胞を 10-100 ng/ml の IL-17F で刺激すると IL-6 の遺伝子発現が誘導された (Fig. 1A)。IL-17F は刺激後 24 時間をピークに、濃度依存的に IL-6 のタンパク発現を誘導した (Fig. 1B)。IL-17A も IL-17F と同様に、IL-6 のタンパク発現を誘導した (Fig. 1C)。

IL-17F による TAK1 の活性化

IL-17F による刺激後 10-20 分をピークに TAK1 のリン酸化が確認された。反応は 120 分で消失した (Fig. 2)。

TAK1 阻害による IL-6 発現の抑制効果

TAK1 阻害剤 5Z-7-Oxozeaenol は IL-17F による IL-6 のタンパク発現を濃度依存的に抑制した (Fig. 3A)。次に TAK1 の機能をより詳細に確認するために siRNAs を用いた阻害実験を行った。TAK1 siRNAs によりヒト気道平滑筋細胞における TAK1 の発現は抑制された (Fig. 3B)。また IL-17F による IL-6 の発現も減少した (Fig. 3C)。

IL-17F による NF κ B (p65) の活性化

IL-17F による刺激後 10-60 分で NF κ B のサブユニットである p65 のリン酸化が確認された。反応は 120 分で消失した (Fig. 4A)。次に TAK1 と NF κ B の関係を検証するため、ヒト気道平滑筋細胞を TAK1 siRNAs で前処理した後に NF κ B のリン酸化を確認した。TAK1 siRNAs は IL-17F による p65 のリン酸化を抑制した (Fig. 4B)。

NF κ B 阻害による IL-6 発現の抑制効果

NF κ B 阻害剤 BAY 11-7082 は IL-17F による IL-6 のタンパク発現を濃度依存的に抑制した (Fig. 5A)。次に、NF κ B の関与をより詳細に確認するために siRNAs を用いた阻害実験を行った。NF κ B siRNAs によりヒト気道平滑筋細胞における NF κ B の発現は抑制され (Fig. 5B)、IL-17F による IL-6 の発現も減少した (Fig. 5C)。

4. 考察

本研究により IL-17F が TAK1-NF κ B 経路を介して、気道平滑筋細胞から IL-6 の発現を誘導することが明らかとなった。また TAK1 阻害剤が IL-17F による NF κ B のリン酸化を抑制したことから、TAK1 は NF κ B の上流に位置することが確認された。

IL-17F の産生細胞は気道上皮細胞や好塩基球、肥満細胞、CD8⁺T 細胞などが知られているが、主な産生細胞は Th17 細胞である[6, 21-23]。今回我々は、IL-17F が気道平滑筋細胞から IL-6 の発現を誘導することを明らかにした。IL-6 は直接好中球性炎症を悪化させるだけでなく、ROR γ t を誘導することで Th17 細胞の分化においても重要な因子である[24]。気道炎症における IL-6 の産生細胞は明らかにされていないが、今回の結果から IL-17F に反応して気道平滑筋細胞から誘導される IL-6 が関与していることが証明された。これらの結果から、Th17 細胞と気道平滑筋細胞のクロストーク、つまり、IL-17F により誘導された IL-6 が Th17 細胞への分化を促進することでポジティブフィードバックループを形成

し、さらなる Th17 細胞の反応を増加させる可能性が推察された。この IL-17F/IL-6 経路の重要性を確認するために、*in vivo* での新たな検証が望まれる。

TAK1 は MAP3K ファミリーに属し、自然免疫や獲得免疫を制御することで気道炎症の病態に関与する事が知られている。気道上皮細胞では、RS ウイルスや緑膿菌感染、ディーゼル排気ガスなどにより TAK1 の活性化が誘導される[25, 26]。興味深いことに TAK1 は喘息のステロイド反応性にも関与している[27]。病原性細菌の存在下で TAK1 を阻害すると MAPK ホスファターゼの制御を介して、ステロイド反応性が改善することが報告されている。これまで気道平滑筋細胞における TAK1 の役割は明らかでなかったが本研究により、IL-17F が TAK1 をリン酸化することが確認された。これは、TAK1 が IL-17F を介した気道炎症の制御に関する潜在的な治療標的である可能性を示唆している。一方、TAK1 や NF κ B の機能を阻害しても、IL-17F による IL-6 の発現が完全には阻害されなかった。この結果は、未知のシグナル伝達経路の可能性を示唆している。IL-17F による IL-6 の発現メカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。

5. 結論

本研究により、IL-17F が気道平滑筋細胞から IL-6 の発現を誘導することが明らかになった。またその発現には、TAK1-NF κ B 経路が関与していた。IL-17F/IL-6 経路が気管支喘息において、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

1-2 IL-17F による気道平滑筋細胞からの IL-8 の誘導

1. 背景

次に IL-17F と IL-8 の関係について検証した。前述のように IL-8 は好中球の強い誘導、活性化能を有す。喘息患者や COPD 患者では気道分泌物中の IL-8 濃度が上昇していることが知られており、気道平滑筋細胞から分泌される IL-8 が、気道の好中球性炎症に関与している可能性が示唆される[28-33]。しかし、気道平滑筋細胞における IL-17F と IL-8 の関係については明らかでない。

IL-17F のシグナル伝達経路は、ERK1/2 が上流の主要なシグナル伝達経路であることが知られている。一方で下流のシグナル伝達経路は明らかでない[7, 34]。近年、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による転写の一時停止が、遺伝子発現調節における重要なチェックポイントである事が認識されている[35]。Pol II による転写開始後、20～60 塩基下流で promoter-proximal pausing と呼ばれる転写の一時停止が起こる。これには、NELF や DSIF といった負の調節因子のほか、複数の正の調節因子が関与している[36]。P-TEFb は、NELF と DSIF により停止した転写伸長を再開させる、重要な役割を担っている。

P-TEFb は cyclinT1 と CDK9 により構成されるヘテロダイマーであり、Brd4 により制御されている[37]。また、P-TEFb の活性化は CDK9 により調製されている[38]。しかし、IL-17F と P-TEFb の関与やステロイドの影響については、明らかでない。

2. 方法

細胞培養

正常ヒト気道平滑筋細胞 (Walkersville) を使用し、添付文書に従い専用の培地で培養した。実験には第 4 世代までの細胞を利用した。

IL-8 の mRNA 発現解析

10 ng/ml または 100 ng/ml の IL-17F でサブコンフルエントになったヒト気道平滑筋細胞を刺激し、前述の方法で real-time PCR を施行した。プライマー配列は以下の通り。

IL-8 forward ; 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG -3'

IL-8 reverse ; 5'-AAATTTGGGGTGGAAAGGTT -3'

G3PDH forward ; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'

G3PDH reverse ; 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

結果は mean±SEM (n=6) で表記した。

IL-8 のタンパク発現解析

10-100 ng/ml の IL-17F でヒト気道平滑筋細胞を刺激し、4、12、24、48 時間後に回収した。培養上清中の IL-8 濃度は IL-8 Elisa kit (R&D Systems) で測定した。結果は mean±SEM (n=6) で表記した。

ブデソニドによる IL-8 発現の抑制効果

ヒト気道平滑筋細胞をステロイドの 1 つであるブデソニド (Calbiochem) または control vehicle (0.1% の DMSO) で 1 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で刺激した。24 時間後に培養上清を回収し、IL-8 のタンパク発現量を解析した。結果は mean±SEM (n=6) で表記した。

ウェスタンブロッティングによる CDK9 と NFκB の検出

ヒト気道平滑筋細胞を 100 ng/ml の IL-17F で刺激した後、前述の方法でウェスタンブロッティングを行った。使用した抗体は以下の通り。

anti-CDK9 Ab, anti-phospho-CDK9 Ab, anti-phospho-p65 Ab (Cell Signaling Technology)。Anti-p65 Ab, anti- β -actin Ab (Santa Cruz Biotechnology)。

CDK9、cyclinT1 阻害による IL-8 発現の抑制効果

ヒト気道平滑筋細胞を CDK9 阻害剤 CDK9 inhibitor II (Calbiochem) または control vehicle (0.1%の DMSO) で 1 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で刺激した。24 時間後に培養上清を回収し、IL-8 のタンパク発現量を解析した。同様に、前述の方法でヒト気道平滑筋細胞に CDK9 siRNAs、cyclinT1 siRNAs (Santa Cruz Biotechnology)もしくは control siRNAs を移入し、100 ng/ml の IL-17F で刺激した。24 時間後に培養上清を回収し、IL-6 のタンパク発現量を解析した。結果は mean \pm SEM (n=6) で表記した。

Brd4 による CDK9 の活性化、IL-8 発現の抑制効果

前述の方法で Brd4 の siRNAs (Santa Cruz Biotechnology) もしくは control siRNAs を移入した後、100 ng/ml の IL-17F で 24 時間刺激した。Brd4 が CDK9 の発現と IL-8 のタンパク発現に与える影響を検証した。

NF κ B 阻害による IL-8 発現の抑制効果

ヒト気道平滑筋細胞を NF κ B 阻害剤 BAY 11-7082 (Calbiochem) または control vehicle (0.1%の DMSO) で 1 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で刺激した。24 時間後に培養上清を回収し、IL-8 のタンパク発現量を解析した。同様に、前述の方法でヒト気道平滑筋細胞に p65 siRNAs (Santa Cruz Biotechnology) を移入し、100 ng/ml の IL-17F で刺激後 24 時間後に培養上清を回収し、IL-6 のタンパク発現量を解析した。結果は mean \pm SEM (n=6) で表記した。

統計解析

統計解析は分散分析 (ANOVA) で判定し、結果を mean \pm SEM で表記した。P 値が 0.05 未満を有意差ありと判断した。

3. 結果

IL-17F による IL-8 の遺伝子とタンパク発現

ヒト気道平滑筋細胞を 100 ng/ml の IL-17F で刺激すると IL-8 の遺伝子発現が誘導された (Fig. 6a)。IL-17F は刺激後 24 時間をピークに、濃度依存的に IL-8 のタンパク発現を誘導した (Fig. 6b)。ブデソニドでヒト気道平滑筋を前処理すると IL-17F による IL-8 の発現は抑制された (Fig. 7)。

IL-17F による CDK9 の活性化

IL-17F による刺激後 10-30 分で CDK9 のリン酸化が確認された。反応は 60 分で消失した (Fig. 8a)。

CDK9 と cyclinT1 阻害による IL-8 発現の抑制効果

CDK9 阻害剤 CDK9 inhibitor II は IL-17F による IL-8 のタンパク発現を抑制した (Fig. 8b)。次に P-TEFb の機能をより詳細に確認するために siRNAs を用いた阻害実験を行った。CDK9 siRNAs および cyclinT1 siRNAs により IL-17F による IL-8 の発現は抑制された (Fig. 8c)。

Brd4 による CDK9 の活性化、IL-8 発現の抑制効果

次に Brd4 が IL-17F による CDK9 の活性化に与える影響について検証した。Brd4 siRNAs は IL-17F による CDK9 のリン酸化を抑制した (Fig. 8d)。また、Brd4 siRNAs は IL-17F による IL-8 の発現を抑制した (Fig. 8c)。

NFκB 阻害による IL-8 発現の抑制効果

次に NFκB が IL-17F による IL-8 発現に与える影響について検証した。NFκB 阻害剤 BAY 11-7082 は IL-17F による IL-8 のタンパク発現に影響を与えなかった (Fig. 9a)。同様に p65 siRNAs も IL-17F による IL-8 のタンパク発現を抑制しなかった (Fig. 9b)。

ブデソニドによる CDK9 と NF κ B の抑制効果

ヒト気道平滑筋細胞をブデソニドで前処理すると IL-17F による CDK9 のリン酸化が抑制された (Fig. 10a)。一方でブデソニドは IL-17F による NF κ B p65 のリン酸化を抑制しなかった (Fig. 10b)。

4. 考察

本研究により、IL-17F が Brd4-P-TEFb 経路を介して、気道平滑筋細胞から IL-8 の発現を誘導する事が示された。Brd4 の siRNAs が CDK9 のリン酸化を抑制したことから、Brd4 は P-TEFb の上流に位置することが確認された。さらに、コルチコステロイドは CDK9 の活性化を抑制することで、IL-17F による IL-8 を抑制した。以上の結果から Brd4-P-TEFb 経路は気道平滑筋細胞における IL-17F による IL-8 発現に重要と考えられる。遺伝子の転写は複数の転写伸長因子により厳密に制御されている[35]。P-TEFb は IL-8 などの炎症に関与する遺伝子の発現調節において、重要と考えられている[39]。CDK 阻害剤である 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole や cyclinT1 の siRNAs はデングウイルスによる IL-8 発現を抑制することが知られている[40]。気道上皮細胞では、P-TEFb は TNF- α による IL-8 産生にも関与している[39,41]。一方で CDK9 を阻害してもウイルス感染における IFN- β 発現は抑制されない[42]。このことから P-TEFb は全てのサイトカインでなく、炎症性サイトカインの産生に関与する因子であることが推察される。

本研究で、Brd4 を阻害すると CDK9 のリン酸化のみならず IL-8 の発現抑制も確認された。Brd4 は気道炎症に関与することが知られている。気道上皮細胞では、RS ウイルスやディーゼル排気ガスにより Brd4 の活性化が誘導され、炎症が悪化する[26,43]。Brd4 は IL-1 β による IL-8 産生にも関与している[44]。また、Brd4 は気道平滑筋細胞の増殖やサイトカイン産生とも関連がある[45,46]。さらに Brd4 は BET ファミリーに属しているが、BET は Th17 細胞の分化を制御している[47,48]。以上のことから Brd4 は Th17 細胞応答における重要なターゲットであると考えられる。

興味深い事に、IL-17F は NF κ B をリン酸化させたが、NF κ B を阻害しても IL-17F による IL-8 の発現は抑制されなかった。一般的に、NF κ B は IL-8 の遺伝子発現に関与すると考えられているが、その役割は細胞や刺激の種類により異なる可能性がある[49, 50]。

これまで IL-17F のシグナル伝達経路におけるコルチコステロイドの影響は明らかでなかったが、本研究でブデソニドが CDK9 を抑制する事で IL-17F による IL-8 の発現を抑制することを明らかにした。気道上皮細胞では、コルチコステロイド受容体が P-TEFb の IL-8 プロモーター領域への結合と競合することが報告されている[39]。このことからコルチコステロイドによる IL-8 などの炎症性サイトカインの抑制には P-TEFb が重要である可能性が示唆された。

5. 結論

本研究により、IL-17F が気道平滑筋細胞から IL-8 の発現を誘導することが明らかになった。またその発現には、Brd4-P-TEFb 経路が関与していた。またコルチコステロイドは P-TEFb の活性化を抑制することで、IL-17F による IL-8 の発現を抑制した。IL-17F/IL-8 経路が気管支喘息などの炎症性疾患において、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

第2章 肺非結核性抗酸菌症における Nrf2 の役割

略語

本論文においては以下の略語を使用した。

ARE	antioxidant responsive element
BAL	bronchoalveolar lavage
CFU	colony forming unit
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
HO-1	heme oxygenase-1
IFN- γ	interferon-gamma
IL	interleukin
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
LPS	lipopolysaccharide
MAC	Mycobacterium avium complex
Maf	musculoaponeurotic fibrosarcoma
MHC	major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
NRAMP1	natural resistance-associated macrophage protein 1
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NTM	nontuberculous mycobacteria
Th1	type 1 helper T
Th17	type 17 helper T
TNF- α	tumor necrosis factor- α

1. 背景

肺非結核性抗酸菌症（肺 NTM 症）とは、結核菌以外の抗酸菌により引き起こされる慢性呼吸器感染症である。肺 NTM 症の原因菌で約 80 – 90 % を占めるのが *Mycobacterium avium complex* (MAC) である。この肺 MAC 症の罹患率は近年増加傾向にあるが、発症・増悪メカニズムは十分に解明されておらず、また有効な治療法も確立されていない。[51, 52]。しかし、疫学研究から高齢のやせ型女性が MAC に感染しやすいことが判明しており、何らかの宿主因子が関与していることが推察されている[53, 54]。実際に、嚢胞性線維症や原発性線毛機能不全症などのいくつかの遺伝的な要素は肺 NTM 症の発症に関与することが知られている[55, 56]。またエクソーム解析の結果から、肺 NTM 症は免疫や繊毛機能、結合組織の異常など複数の因子が関与する多因子疾患であることが推察されている[57]。

マウスを用いた研究でも、*T-bet* 遺伝子 (Th1 細胞のマスターレギュレーター) 欠損マウスに MAC を感染させると、IFN- γ の誘導が抑制され MAC の疾患感受性が亢進される。また代償的に Th17 誘導サイトカインの産生が亢進し、好中球性炎症が促進される[58]。同様に *ROR- γ t* (Th17 細胞のマスターレギュレーター) を過剰発現させた場合には、肺の炎症が促進されるが感染制御には寄与しないことが報告されている[59]。また正常ヒト気道上皮細胞に MAC を感染させて遺伝子の変化を網羅解析すると、繊毛機能に関わる遺伝子の発現低下と IL-32 などの炎症に関わる遺伝子の発現亢進が認められる[60]。以上の知見からも、MAC の感染制御には繊毛機能や Th1 を主体とした宿主免疫が重要であることが示唆される。一方で MAC 症患者の多くは免疫学的に明らかな異常をもたず、その他の原因の合併が推察されている[53, 54]。

Nrf2 は細胞の恒常性を維持するマスターレギュレーターである。非酸化ストレス環境下では、Nrf2 は Keap1 と複合体を形成しユビキチン化を受けることで、プロテアソームにより速やかに分解される。感染や代謝ストレスなどの酸化ストレスにおかれると、Nrf2 は Keap1 から離れ核内へと移行する[61]。その後 Nrf2 は小 Maf 因子とヘテロ二量体を形成し、ARE 配列と結合することで HO-1 などの抗酸化ストレス因子を分泌し、細胞を保護する[62]。また Nrf2 は感染制御に

重要な Th1 免疫の制御にも関連している[63]。実際に Nrf2 欠損マウスに LPS を投与すると、炎症や組織障害が悪化する[64]。また、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、肺炎球菌などの細菌を Nrf2 欠損マウスに投与すると、野生型マウスと比較して感染が増悪することが報告されている[65-68]。従って、Nrf2 は感染制御に重要な役割を果たしていることが推測される。

MAC と同じ抗酸菌である、結核菌と Nrf2 との関係については、Nrf2 により誘導される代表的な抗酸化ストレス因子である HO-1 を欠損したマウスは、結核に感受性を示すことが報告されている[69]。一方で、最近の知見では、肺胞マクロファージにおける Nrf2 の誘導が結核感染初期における菌の制御を妨げている可能性も報告されており、結核感染における Nrf2 の役割は十分に解明されていない[70]。また、MAC 感染における Nrf2 の役割も未だ明らかにされていない。

Nrf2 は加齢により発現が低下する事が知られており、COPD や間質性肺炎、多発性硬化症など老化が関連する疾患の潜在的な治療標的として注目されている[71]。肺 MAC 症患者の多くは高齢者であることから、肺 MAC 症の進展に Nrf2 が関与している可能性も考えられる。以上から、肺 MAC 症の発症・進展における Nrf2 の役割を明らかにするため、Nrf2 欠損マウスを用いた MAC 感染の研究を行うこととした。

2. 方法

MAC

肺 MAC 症患者由来の MAC 菌株 (*M.avium.subsp.hominissuis*) を 7H9 液体培地で 14 日間培養した。菌量を調整した後、使用するまで -80℃ で保存した。臓器内の生菌数は還元培養法により測定した。各臓器をガラスホモジナイザーで磨砕し、0.02% tween20 入りの滅菌蒸留水で 10 倍希釈した。混濁液を 10 倍ずつ段階希釈した後、7H10 固形培地に播種し臓器当たりの生菌数 (CFU) を測定した。

マウスと感染法

Nrf2 欠損マウスは共同研究者より供与された[22, 23]。同マウスを BALB/c マウスで 9 世代にわたり戻し交配し、BALB/c Nrf2 欠損マウスを作製した。野生型の BALB/c マウスは Charles River から購入した。8~12 週齢の雌マウスに 50 μ L の PBS に溶解した 1×10^7 CFU の MAC を経鼻感染させた。対照群には同量の PBS を投与した。研究は筑波大学の動物実験倫理規定を遵守して行った。

病理組織

マウスから肺を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後パラフィンに包埋した。切片作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色で病理像を評価した。抗酸菌を評価するため Ziehl-Neelsen 染色を行った。また、酸化ストレスの程度を評価するために 8-OHdg 染色を行った（詳細は後述する）。

気管支肺胞洗浄 (BAL)

マウスに気管カニューレを挿入し、1ml の生理食塩水を 6 回注入、回収することで気管支肺胞洗浄を行った。細胞数を血球計算板で測定し、サイトスピンでスライドガラスに接着させた後、ディフクイック染色で細胞分画を評価した。また、キニヨン染色を行い MAC に感染した肺胞マクロファージの割合を評価した。同様に気管支肺胞洗浄液を遠心分離後、グルタル酸アルデヒドで固定し肺胞マクロファージを透過電子顕微鏡で観察した。

RT-PCR

RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を、マウス肺組織、あるいはマウス肺胞マクロファージより抽出した。その後、High Capacity cDNA reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を作製した。qRT-PCR に関しては、Table1 のプライマーを利用し、Quant 800 (Thermo Fisher Scientific) を用いて CT 値を測定した。各遺伝子の発現は、GAPDH を内部標準として用いて、 $\Delta\Delta$ CT 法により計算した。

Th1 サイトカインの発現解析

感染2ヶ月のマウスから肺組織を摘出し、75 U/mlのコラゲナーゼ (type 1;Sigma) を用いて 37°Cで 90 分間処理した。分離された細胞を 20 μ m のナイロンメッシュで分離後、25 ng/ml PMA (Sigma) , 1 μ g/ml ionomycin (Sigma) , 組み換え型マウス IL-2 (Peprotech)、および 10 μ g/ml brefeldin A (Epicentre) 溶液で 37°C、4 時間処理した。細胞を抗 CD4 抗体、抗 TCR β 抗体で表面染色し、固定後に Intraprep permeabilization reagent (Beckman Coulter) を用いて膜処理を行った。その後、抗 IFN- γ 抗体 (Biolegend) で染色し、CD4 陽性 T 細胞における IFN γ の発現を解析した。

酸化ストレスマーカーの測定

市販のキット (OxiSelect TBARS Assay Kit, Cell Biolabs. Inc) を用いて、脂質過酸化の一般的な副産物であるマロンジアルデヒド (MDA) の測定を行った。測定法はキットのプロトコルに従った。即ち、未感染・感染マウスの肺を 0.05 % ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT) 含有の PBS でホモジナイズした後、4°C、10000 \times g で 10 分間遠心した。上清を回収した後に同量の SDS 溶解液と TBA 溶液を加えて 95°Cで 1 時間インキュベートした。ヘモグロビンによる干渉を防ぐため、ブタノール抽出を行い 532 nm の吸光度計で測定した。

また、肺組織標本を用いて DNA 酸化損傷マーカーである 8-OHdg の測定を行った。パラフィン包埋した肺切片を 4 μ m に薄切し、キシレンで脱パラフィンを行った。その後 100 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いて電子レンジで 15 分間熱処理を行い、抗原を賦活化した。切片を抗 8H-OHdg 抗体を用いて 4°Cで一晩反応させ、DAB 溶液を用いて抗原抗体反応を可視化した。各画像の 8-OHdG 陽性細胞の比率を手動でカウントした。

肺胞マクロファージの単離

前述の方法で感染 2 ヶ月後のマウスに気管支肺胞洗浄を行い、96well プレートに 1×10^5 cell ずつの細胞を播種した。播種 1 時間後に PBS で洗浄し非接着細胞を除去して、残った細胞をマクロファージと判断した。前述の方法で RNA を抽出し、RT-PCR を行った。

RNA-seq 解析

未感染・感染 2 ヶ月後のマウスから肺組織を摘出し、TRIZOL を用いて Total RNA を抽出した。その後、RNA-seq により遺伝子発現の網羅解析を行った (n=3)。RNA-seq はつくば i-Laboratory LLP (Tsukuba, Japan) に委託し、NextSeq500 (Illumina) を用いて行った。すなわち、RNA-seq 解析結果から FASTQ ファイルを得た後に、個々のマウス肺組織における遺伝子の発現量を算出した。その上で、感染後の野生型マウス肺組織と感染後の Nrf2 欠損マウス肺組織で遺伝子発現量の比較解析を行い、False Discovery Rate (FDR) 0.01 以下かつ fold change 2.0 以上を有意に発現変動している遺伝子と認識した。得られた発現変動遺伝子リストを使用して、Enrichment Analysis (エンリッチメント解析) を実施した (GO 解析とパスウェイ解析)。GO 解析 は、Top gene suite を用いて実施し (<http://toppgene.cchmc.org>)、パスウェイ解析 は、IPA software (Intenuity Systems) を用いて実施した。

ヒートマップは morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) を用いて作製した。

統計解析

データは平均値±標準誤差 (SEM) で記載した。統計解析は分散分析 (ANOVA) の後に、Tukey の多重比較テストを行った。生存率は Kaplan-Meier 法で解析し、log-rank test で検定を行った。統計解析ソフトは GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) を使用した。p<0.05 を有意差ありと判断した。

3. 結果

Nrf2 は MAC 感染の疾患感受性に関与する。

Nrf2 と MAC 感染の影響を明らかにするため、感染後のマウスの生存を調べた。Nrf2 欠損マウスに MAC を感染させると感染 4 ヶ月目からマウスの死亡が認められたが、野生型のマウスでは感染 8 ヶ月目でも大部分が生存していた (Fig. 11)。MAC 感染 2・4・8 ヶ月後の肺組織を Ziehl-Neelsen 染色で確認すると、いずれのタイミングにおいても Nrf2 欠損マウスは野生型よりも抗酸菌数が増加していた (Fig. 12A)。同様に感染 2 ヶ月後の主要臓器 (肺・肝臓・脾臓) の CFU は Nrf2 欠損マウスで有意に増加していた (Fig. 12B)。

Nrf2 欠損マウスでは感染 4 か月以降、肺の炎症細胞浸潤が増加し、肉芽腫の形成不全をきたす。

次に、MAC 感染後の肺病理像を HE 染色で評価した。野生型のマウス肺組織では、感染 2 ヶ月目から小型の肉芽腫形成を伴う炎症細胞浸潤を認めた (Fig. 13A)。また、感染 2 ヶ月後の Nrf2 欠損マウス肺組織では、野生型のマウス肺組織と同程度の炎症細胞浸潤が観察された。一方で、感染 4 ヶ月後、8 か月後の Nrf2 欠損マウス肺組織では、野生型のマウス肺組織と比較して、肺の炎症細胞浸潤が強く、肉芽腫の形成不全が認められた。

MAC 感染 2 ヶ月後の気管支肺胞洗浄では、感染により総細胞数、特に好中球の増加を認めたが、マウスの系統による差は認めなかった (Fig. 13B)。

Nrf2 は肺 MAC 感染において、Th1 サイトカインの発現に関与しない。

Nrf2 欠損マウスで感染感受性が亢進している原因を調べるため、感染 2 ヶ月後のマウス肺組織から Total RNA を抽出し、real-time PCR で Th1 サイトカインの評価を行った。感染 2 カ月後の肺組織において、未感染コントロールの肺組織と比較して、*IFN- γ* mRNA、*TNF- α* mRNA、*IL-12p40* mRNA の発現の亢進を認めたが、マウスの系統による差は認めなかった (Fig. 14A)。また、感染 2 カ月後の肺組織において、フローサイトメトリーで IFN- γ を発現する CD4 陽性リンパ球を計測した。Real-time PCR の結果を反映して、感染 2 カ月後の Nrf2 欠損マウ

ス肺組織における、IFN- γ を発現する CD4 陽性リンパ球の割合は、感染 2 カ月後の野生型のマウス肺組織における割合と統計学的な有意差を認めなかった (Fig. 14B)。

Nrf2 は肺 MAC 感染において、酸化ストレスの発現に関与しない

次に感染による酸化ストレス反応を評価した。MAC 感染 2 ヶ月後の肺組織標本を用いて DNA 酸化ストレスマーカーである 8-OHdg を計測した。感染により 8-OHdg 陽性細胞は増加したが、マウスの系統による差は認めなかった (Fig. 15A)。標本中の 8-OHdg 陽性細胞の割合を計測すると、いずれの系統のマウスも MAC 感染により 80%以上の細胞が 8-OHdg 陽性となっており持続的な感染の影響で酸化ストレス反応が飽和している可能性が考えられた (Fig. 15B)。また感染 2 ヶ月後のマウスから肺組織を摘出し、脂質過酸化の副産物であるマロンジアルデヒドを測定したが、野生型マウス肺と Nrf2 欠損マウス肺の比較では有意差を認めなかった (Fig. 15C)。

Nrf2 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して MAC 感染後に酸化ストレス、鉄代謝に関わる遺伝子 (*Nrf2*, *HO-1*, *NRAMP1*) の発現が減弱している

これまでの結果で、Nrf2 欠損マウスでは MAC の菌感受性が亢進し肉芽腫の形成不全を認めた。しかし MAC の殺菌や Nrf2 による感染制御に重要とされる Th1 サイトカインと酸化ストレスレベルについては、マウスの系統間で有意差を認めなかった。MAC 感染における Nrf2 の役割をより詳細に検討するため、未感染および、感染 2 ヶ月後のマウス肺組織より RNA を抽出し、RNA-seq により発現遺伝子の網羅解析を行った。

感染 2 カ月後の野生型マウスの肺組織と感染 2 カ月後の Nrf2 欠損マウスの肺組織の mRNA の発現量を比較解析した。FDR 0.01 以下、fold change 2.0 以上を統計学的に有意と判断すると合計で 79 個の変動遺伝子が抽出された (感染野生型マウス肺と比べて発現が亢進していた遺伝子 36 個、発現が減弱していた遺伝子 43 個)。この得られた 79 個の発現変動遺伝子の機能、パスウェイに、何が多くのを明らかにするために、Enrichment Analysis (エンリッチメント解析) を施

行した。

まず、GO 解析を施行した。MAC 感染 2 ヶ月後に野生型マウス肺と比較して Nrf2 欠損マウス肺で有意に発現が亢進していた、遺伝子 36 個を用いて有意にエンリッチされたトップ 15 の GO term を抽出した。その後、カテゴリー別に分類したものを Table 2 に示した。同様に、MAC 感染 2 ヶ月後に野生型マウス肺と比較して Nrf2 欠損マウス肺で有意に発現が低下していた、遺伝子 43 個を用いて有意にエンリッチされたトップ 15 の GO term を抽出し、カテゴリー別に分類した (Table 2)。MAC 感染 2 ヶ月後の Nrf2 欠損マウスの肺では、野生型マウスの肺と比較して、酸化ストレスや鉄代謝に関わる遺伝子の発現が低下していた。一方 Nrf2 欠損マウスの肺では、筋肉に關与する遺伝子やイオンの輸送に關する遺伝子の発現が亢進していた。

次に、この 79 個の遺伝子を用いてパスウェイ解析も施行した。この 79 個の遺伝子群は有意に、酸化ストレスや鉄代謝、マクロファージの殺菌に関わるパスウェイにエンリッチされた (Table 3)。

各々の条件下でのマウス肺における、遺伝子発現の変化を可視化するため、この 79 個の遺伝子を用いてヒートマップを作製した (Fig. 16)。先述した鉄代謝や酸化ストレスに関わるカテゴリーリストを構成していた遺伝子である *SLC11a1* (*NRAMP1*)、*Hmox1* (*HO-1*)、*Nfe2l2* (*Nrf2*) が MAC 感染により誘導されるが、Nrf2 欠損マウス肺では野生型マウス肺と比べてこれらの遺伝子発現が低値であることが確認された。

肺胞マクロファージは Nrf2 を活性化し、NRAMP1 を発現誘導することで MAC の感染制御に寄与する

RNA-seq の結果の妥当性を検証するために、MAC 感染 2 ヶ月後のマウスから肺胞マクロファージを抽出し real-time PCR で mRNA の発現を解析した。RNA-seq の結果と同様に、MAC 感染により NRAMP1 の遺伝子発現が誘導されたが、Nrf2 欠損マウスでは発現が低値であった (Fig. 17A)。一方、HO-1 の遺伝子発現は Nrf2 欠損マウスと比較して野生型で亢進していたが、感染による変化は認めなかった。Nrf2 の遺伝子発現は野生型マウスでは感染により亢進し、Nrf2 欠損

マウスでは検出されなかった。また MAC に感染した肺胞マクロファージの割合を調べると、Nrf2 欠損マウスでは野生型と比較して肺胞マクロファージ内に多数の MAC 菌を認めた (Fig. 17B)。肺胞マクロファージを電子顕微鏡で観察すると、野生型マウスの肺胞マクロファージではファゴリソソームが融合し、MAC 菌を殺菌される経過が観察されたが、Nrf2 欠損マウスでは認められなかった (Fig. 17C)。以上の結果から、MAC の疾患感受性の制御には肺胞マクロファージにおける NRAMP1 の発現が重要であり、Nrf2 が NRAMP1 の誘導に寄与している可能性が推察された。

4. 考察

本研究により、Nrf2-NRAMP1 経路が MAC 感染の制御に寄与していることが明らかとなった。Nrf2 欠損マウスは野生型と比較して、MAC 感染後早期に死亡した。また Nrf2 欠損マウスでは主要臓器内の菌量が増加し、肉芽腫の形成不全を認めた。一方、感染肺の Th1 サイトカイン産生や酸化ストレスの程度に関しては、野生型マウス肺と Nrf2 欠損マウス肺で有意な差を認めなかった。感染肺組織における発現変動遺伝子の網羅解析の結果から、Nrf2 欠損マウス肺では、野生型マウス肺と比較して、NRAMP1 の発現が低下していることが分かった。さらに、Nrf2 欠損マウスの肺胞マクロファージは野生型マウスの肺胞マクロファージと比較して、MAC 感染後の NRAMP1 の発現が低下していた。Nrf2 欠損マウスの肺胞マクロファージでは、MAC 感染後のファゴリソソームの融合が認められなかった。以上のことから、MAC の感染制御には肺胞マクロファージ内における Nrf2 の活性化および、NRAMP1 の誘導が重要であると考えられた。

Nrf2 が感染症の制御に重要であることは以前から報告されている[72]。しかし、その明確な機序は明らかでなく、これまでの報告の多くが Nrf2 の機能低下が酸化ストレスや炎症の悪化を招き、組織障害や壊死を誘導することで感染を増悪させると考察されている。例えば、Nrf2 欠損マウスに LPS を投与すると、TNF- α を主体とした過剰な炎症と活性酸素が誘導され、野生型マウスと比較して、早期に死亡する[64]。Nrf2 欠損マウスに肺炎球菌を感染させると好中球性炎

症が悪化した結果、野生型マウスと比べて、早期に死亡する[68]。また、結核に感染したマクロファージに Nrf2 活性剤である NAC を投与すると、酸化ストレスと細胞死を抑制することで、結核菌の増殖が抑えられることが報告されている[73]。以上から、Nrf2 が炎症や酸化ストレスを制御することで、感染症の制御を行っていることが理解できる。しかしながら、今回の MAC 感染の研究において、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数や感染肺組織の炎症性サイトカインの遺伝子発現量、酸化ストレスレベルを検証したが、マウスの系統間で有意な差を認めなかった。そこで感染肺組織の遺伝子発現を網羅的に解析し、Nrf2 による新たな感染制御機構としての Nrf2-NRAMP1 経路に注目することが可能になった。

Nrf2 は、酸化ストレス下におかれると HO-1 などの、様々な抗酸化ストレス因子を誘導する。一方で、Nrf2 が活性化されると、マウスマクロファージ内において、二価遷移金属の輸送体である ferroportin-1 および NRAMP1 が誘導されることが示されている[74]。

NRAMP1 は細胞内 Fe^{2+} の輸送に関わることから、NRAMP1 による鉄代謝と細菌感染に関する研究報告がある。例えば、NRAMP1 はファゴソームに鉄を取り込みフェントン効果で細菌を殺すという報告がある[75-77]。一方、反対に NRAMP1 が鉄をファゴソーム外に出して細菌に栄養を与えないようにし、感染制御を行っているという報告もあり、その詳細は明らかでない[78-82]。二価遷移金属の輸送体としての役割以外にも NRAMP1 の機能は多彩であり、炎症性サイトカインや MHC class 2 の産生に関わったり、NRAMP1 自身が酸化ストレスの誘導にも寄与しているとする報告もある[83-85]。さらに、MAC 感染において、NRAMP1 がマクロファージ内のファゴリソソームの融合・成熟化を促進した結果、MAC 感染を制御することも報告されている[86]。ヒトにおいては、NRAMP1 遺伝子の発現に関わる遺伝子多型がサルモネラ、結核菌感染の発症と関連があることが推察されている[87, 88]。また、NRAMP1 遺伝子は肺 MAC 症の疾患感受性遺伝子としても報告されている[89, 90]。

本研究で Nrf2 欠損マウスは野生型マウスと比較して、MAC 感染後の NRAMP1 の誘導が低値であった。さらに、Nrf2 による NRAMP1 の発現誘導には肺胞マクロファージが関与していた。マクロファージは MAC を含む細胞内寄生菌の制御

の要である。また Nrf2 の主な発現細胞は、マクロファージである[71,91]。上述のように、MAC 感染の制御に NRAMP1 が防御的に働くことは既報から明らかである。Nrf2 の欠損、その結果生じる NRAMP1 の発現低下が Nrf2 欠損マウスにおける MAC 感染感受性の亢進の最大の理由と考えられる。

Nrf2 の発現と機能は加齢によっても低下することが報告されている[71, 92]。肺 MAC 症患者は高齢者が多く、加齢による Nrf2 の発現低下が NRAMP1 の発現を低下させることで MAC の疾患感受性に寄与している可能性も推察される。MAC 感染における Nrf2-NRAMP1 経路の重要性と加齢に伴う変化を確認するために、今後新たな検証が望まれる。

5. 結論

本研究により、Nrf2 が MAC の感染感受性に寄与することが明らかとなった。また Nrf2 による MAC の感染制御には、肺胞マクロファージにおける NRAMP1 の誘導が重要と考えられる。

第3章 総括

第1章では代表的な慢性気道炎性疾患である気管支喘息に関して、IL-17F と気道平滑筋に焦点をあてて、*in vitro* の観点から研究を行った。重症喘息に好中球性炎症が関与することが知られているが、その詳細は明らかでなかった。また、IL-17F は重症喘息に関与することが知られているが、その機能は不明であった。本研究により、気道平滑筋細胞における IL-17F の新たな機能として、TAK1-NF κ B 経路を介して IL-6 の発現を誘導すること、Brd4-P-TEFb 経路を介して IL-8 の発現を誘導することを明らかにした (Fig. 18)。

IL-17A および IL-17F をターゲットとした抗体製剤は複数の臨床試験が進行中である。代表的な皮膚の好中球性疾患である乾癬に関しては、抗 IL-17 抗体の有効性が証明され国内でも広く使用されている。一方で気管支喘息に関しては、その効果は限定的であった。この結果は、難治性喘息における診断、治療の難解さを反映したものと考えられる。今後は、好中球性の気道炎症が優位な患者群を選別するなどして、IL-17 阻害の効果が高い集団を選別し検討する必要がある。IL-17F の役割をより詳細に検討するため、*in vivo* でのアプローチを検討していきたい。

第2章では代表的な慢性感染症の一つである肺 MAC 症に関して、抗酸化ストレス因子 Nrf2 に焦点をあてて研究を行った。その結果、Nrf2 は MAC の感染制御に寄与していること、また Nrf2 による MAC の殺菌には肺胞マクロファージにおける NRAMP1 の発現誘導が重要であることを明らかにした (Fig. 19)。環境常在菌である MAC に対して、なぜ肺 MAC 症を発症する人とそうでない人がいるのか、その詳細は明らかでない。本研究から MAC の感染増悪のメカニズムとして、NRAMP1 の発現・機能低下に関わる遺伝子多型に加えて、加齢による Nrf2 の発現低下が加わることで感染を増悪させるという新たな仮説が考えられ、今後の研究発展が期待される。

第1章 1-1 図

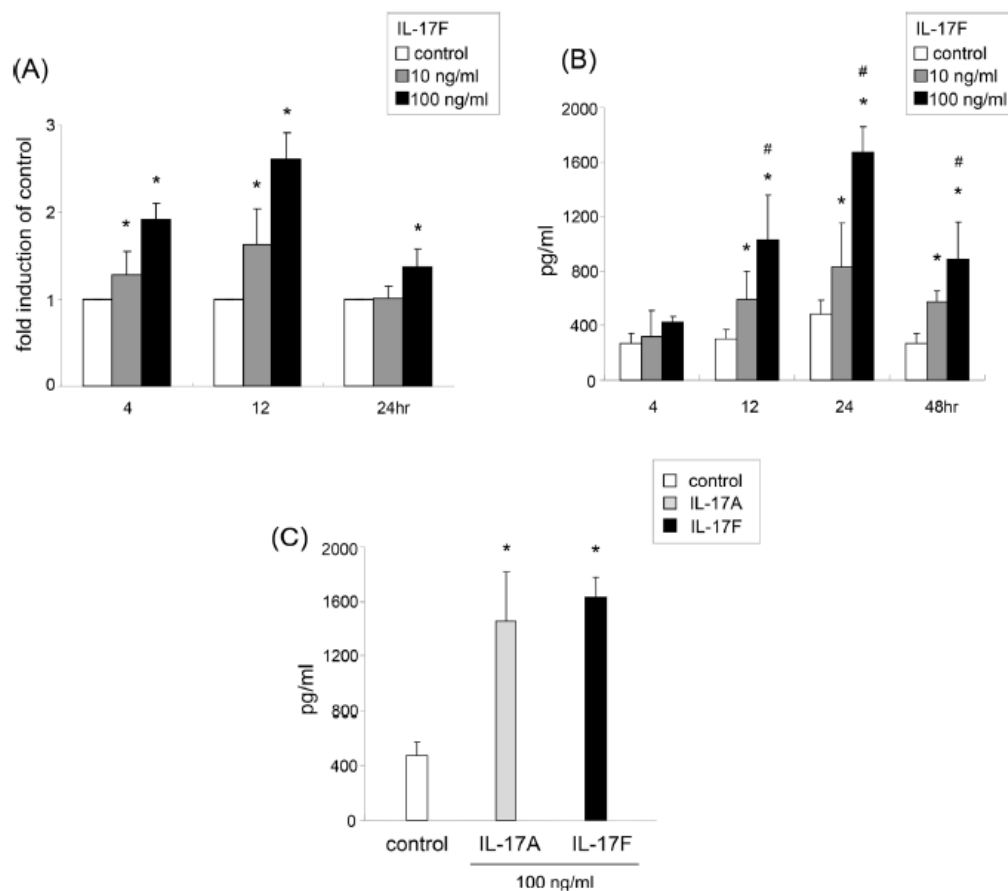


Fig1. IL-17FによるIL-6の発現

(A) IL-17FによるIL6の遺伝子発現。10-100 ng/mlのIL-17Fでヒト気道平滑筋細胞を刺激し、遺伝子の発現量をreal-time PCRで測定した (n=6)。* $p < 0.05$ vs medium control。 (B) IL-17FによるIL-6のタンパク発現 (n=6)。* $p < 0.05$ vs medium control。 # $p < 0.05$ vs 10 ng/ml of IL-17F stimulated cells。 (C) IL-17AによるIL-6のタンパク発現。100 ng/mlのIL-17AもしくはIL-17Fでヒト気道平滑筋細胞を刺激し、24時間後にIL-6のタンパク濃度を測定した (n=6)。* $p < 0.05$ vs medium control。

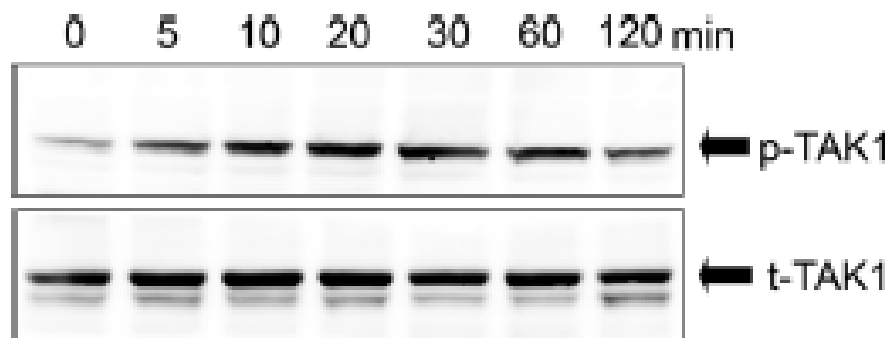


Fig2. IL-17F による TAK1 の活性化

100 ng/ml の IL-17F でヒト気道平滑筋細胞を刺激し、記載の時間で回収した。TAK1 のリン酸化をウエスタンブロッティングで検証した (n=3)。

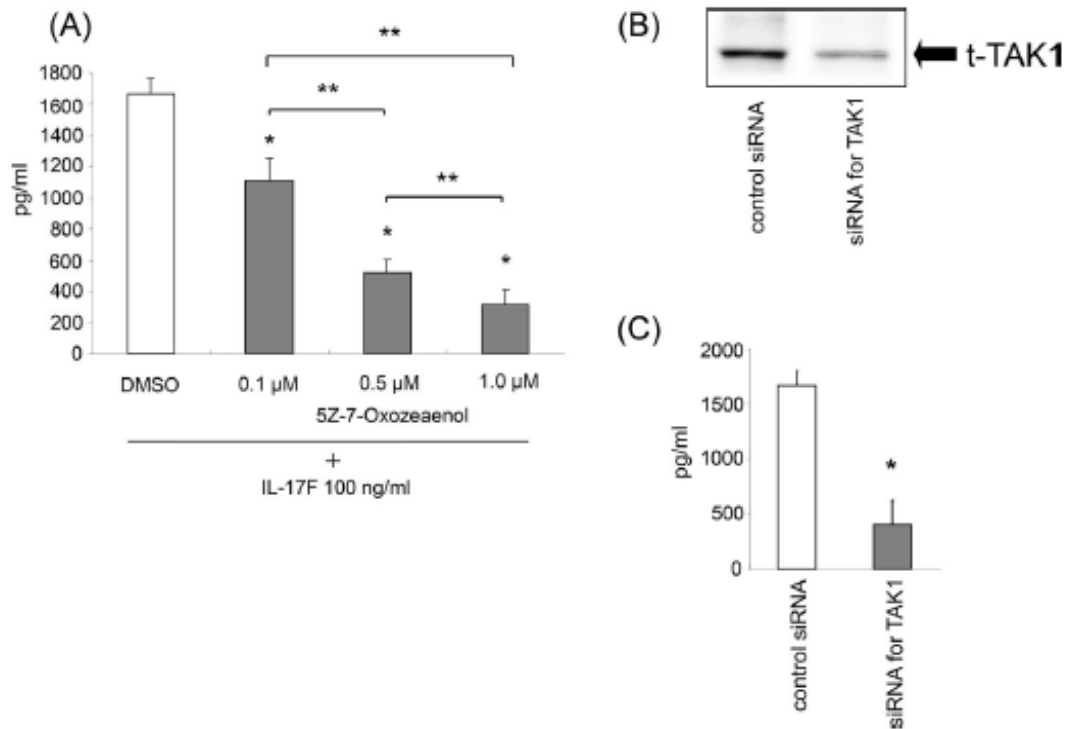


Fig3. TAK1 による IL-6 発現への影響

(A) ヒト気道平滑筋細胞を TAK1 阻害剤 5Z-7-Oxozeaenol で 3 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で 24 時間刺激した。培養上清中の IL-6 のタンパク発現量を解析した (n=6)。*p<0.05 vs IL-17F stimulated cells in the absence of the inhibitor. **p<0.05 vs the presence of individual inhibitor。 (B) ヒト気道平滑筋細胞に TAK1 siRNAs もしくは control siRNAs を移入し、100 ng/ml の IL-17F で 24 時間刺激した。siRNAs の抑制効果をウェスタンブロッティングで確認した。 (C) 同様に TAK1 siRNAs が IL-17F による IL-6 のタンパク発現に与える影響を検証した(n=6)。*p<0.05 vs IL-17F stimulated cells transfected with a control siRNA。

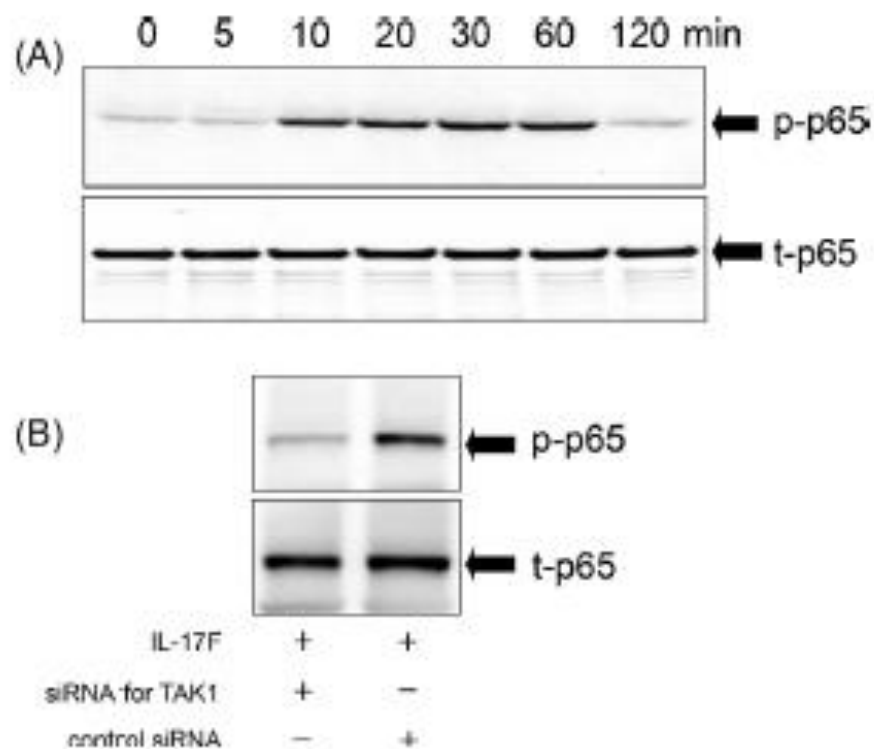


Fig4. IL-17F による NF κ B の活性化

(A) 100 ng/ml の IL-17F でヒト気道平滑筋細胞を刺激し、記載の時間で回収した。P65 のリン酸化をウエスタンブロッティングで検証した (n=3)。 (B) TAK1 の siRNAs が IL-17F による p65 のリン酸化に与える影響を検証した。ヒト気道平滑筋細胞に TAK1 siRNAs もしくは control siRNAs を移入し、100 ng/ml の IL-17F で 30 分刺激した後、ウエスタンブロッティングを行った (n=3)。

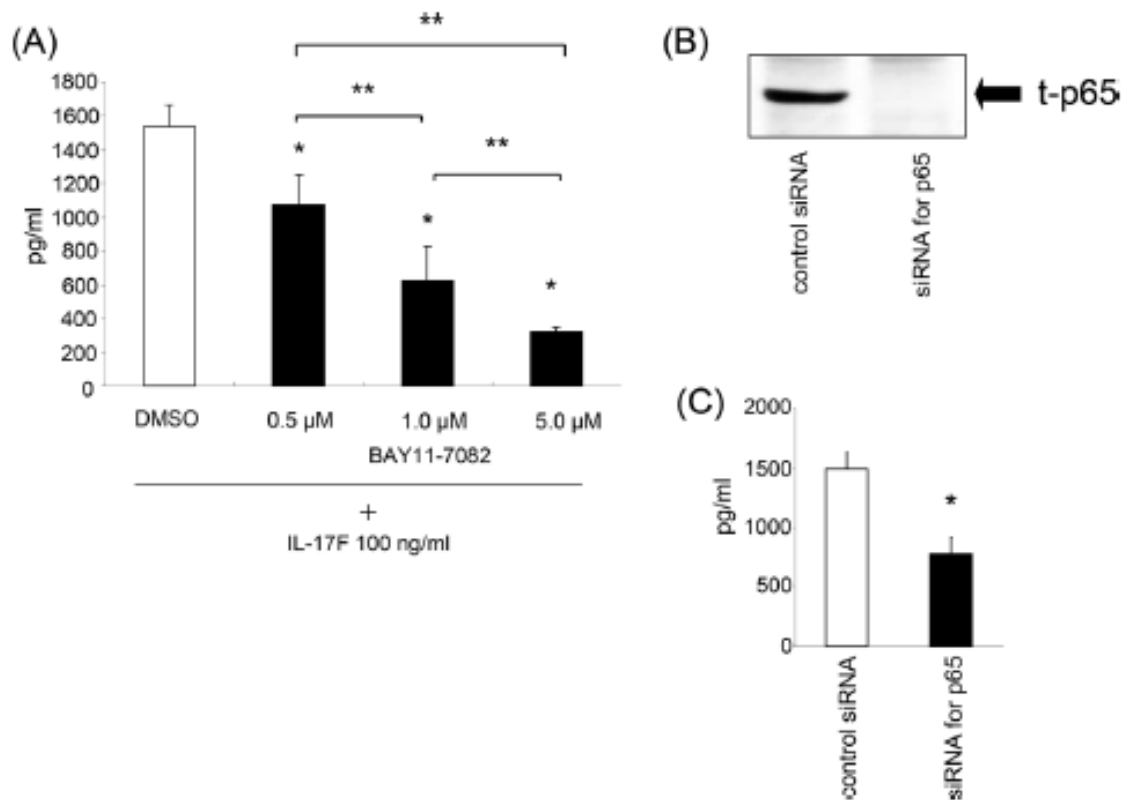


Fig5. NFκB 阻害による IL-6 発現への影響

(A) ヒト気道平滑筋細胞を NFκB 阻害剤 BAY1170-82 で 1 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で 24 時間刺激した。培養上清中の IL-6 のタンパク発現量を解析した (n=6)。*p<0.05 vs IL-17F stimulated cells in the absence of the inhibitor. **p<0.05 vs the presence of individual inhibitor. (B) ヒト気道平滑筋細胞に NFκB siRNAs もしくは control siRNAs を移入し、100ng/ml の IL-17F で 24 時間刺激した。siRNAs の抑制効果をウェスタンブロッティングで確認した。 (C) 同様に NFκB siRNAs が IL-17F による IL-6 のタンパク発現に与える影響を検証した(n=6)。*p<0.05 vs IL-17F stimulated cells transfected with a control siRNA。

第1章 1-2 図

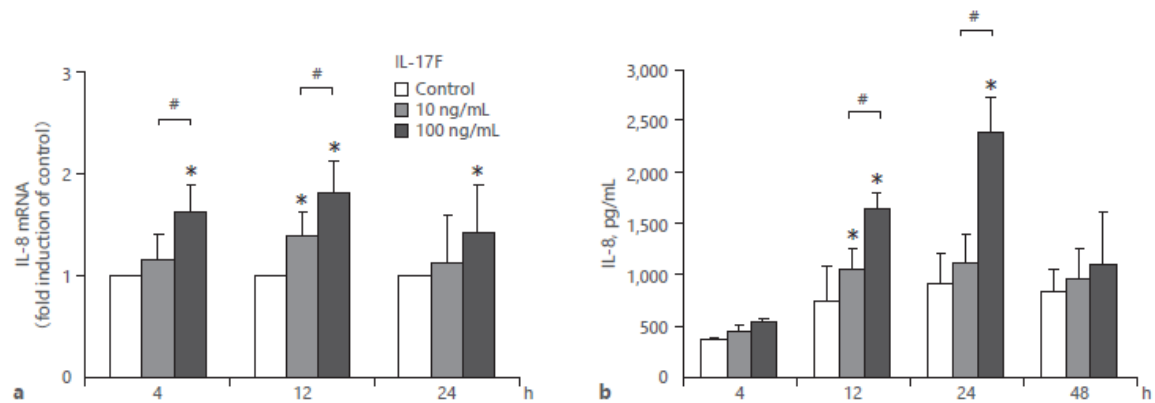


Fig6. IL-17FによるIL-8の発現

(a) IL-17FによるIL8の遺伝子発現。100 ng/mlのIL-17Fでヒト気道平滑筋細胞を刺激し、遺伝子の発現量をreal-time PCRで測定した (n=6)。*p<0.05 vs medium control。#p<0.05 vs 10 ng/ml of IL-17F stimulated cells。(b) IL-17FによるIL-8のタンパク発現 (n=6)。*p<0.05 vs medium control。#p<0.05 vs 10 ng/ml of IL-17F stimulated cells。

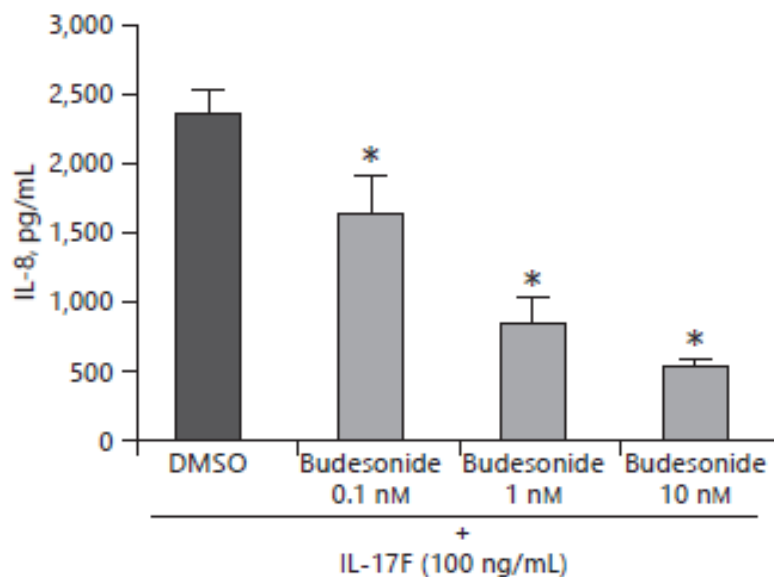


Fig7. IL-8発現に関するブデソニドの影響

ヒト気道平滑筋細胞をブデソニドまたはcontrol vehicle (0.1%のDMSO)で1時間前処理し、その後100 ng/mlのIL-17Fで刺激した。24時間後に培養上清を回収し、IL-8のタンパク発現量を解析した (n=6)。

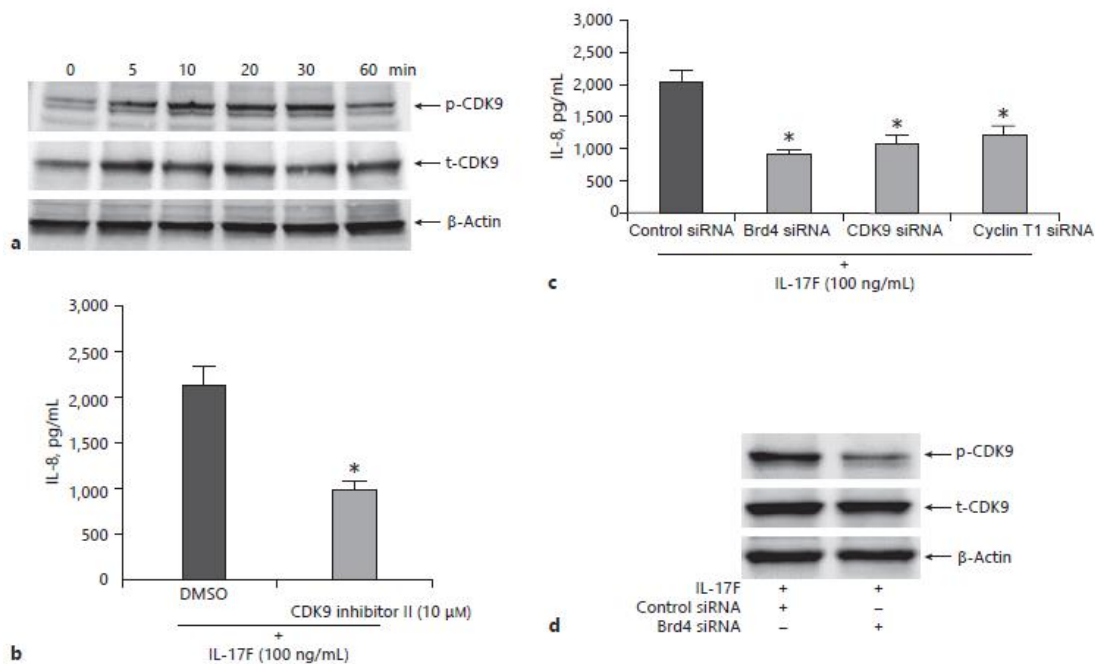


Fig8. IL-17F による CDK9 の活性化

(a) 100 ng/ml の IL-17F でヒト気道平滑筋細胞を刺激し、記載の時間で回収した。CDK9 のリン酸化をウエスタンブロッティングで検証した (n=3)。 (b) ヒト気道平滑筋細胞を CDK9 阻害剤 CDK9 inhibitor II で 1 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で 24 時間刺激した。培養上清中の IL-8 のタンパク発現量を解析した (n=6)。* $p < 0.05$ vs IL-17F stimulated cells in the absence of the inhibitor。 (c) ヒト気道平滑筋細胞へ Brd4 siRNAs、CDK9 siRNAs、cyclinT1 siRNAs を移入して IL-8 発現に与える影響を検証した (n=6)。* $p < 0.05$ vs IL-17F stimulated cells transfected with a control siRNAs。 (d) Brd4 の siRNA が IL-17F による CDK9 のリン酸化に与える影響を検証した。ヒト気道平滑筋細胞に Brd4 siRNAs もしくは control siRNAs を移入し、100ng/ml の IL-17F で 30 分刺激した後、ウエスタンブロッティングを行った (n=3)。

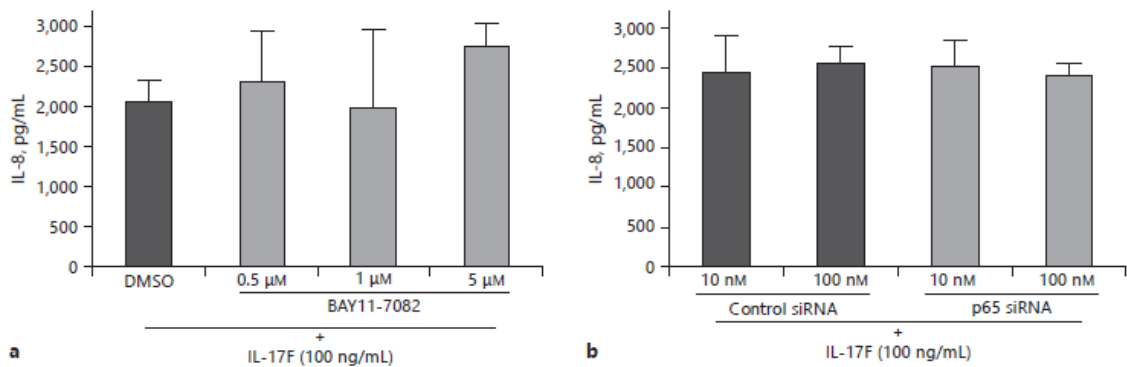


Fig9. NFκB 阻害による IL-8 発現への影響。(a) ヒト気道平滑筋細胞を NFκB 阻害剤 BAY 1170-82 で 1 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で 24 時間刺激した。培養上清中の IL-8 のタンパク発現量を解析した (n=6)。(b) ヒト気道平滑筋細胞に NFκB siRNAs もしくは control siRNAs を移入し、100 ng/ml の IL-17F で 24 時間刺激した。培養上清中の IL-8 のタンパク発現量を解析した (n=6)。

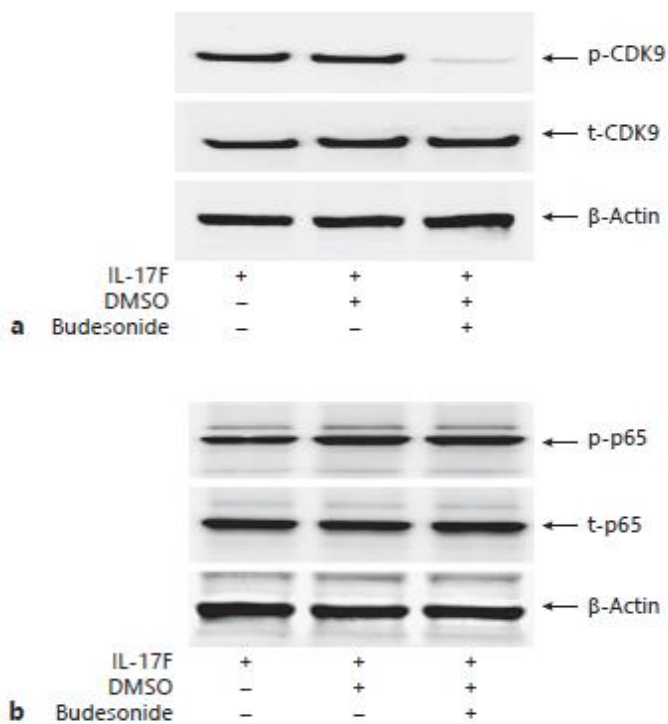


Fig10. ブデソニドによる CDK9 と NFκB p65 への影響。ヒト気道平滑筋細胞をブデソニドまたは control vehicle (0.1%の DMSO) で 1 時間前処理し、その後 100 ng/ml の IL-17F で 30 分間刺激した。(a) CDK9 のリン酸化、および (b) NFκB p65 のリン酸化をウエスタンブロッティングで検証した (n=3)。

第2章 図

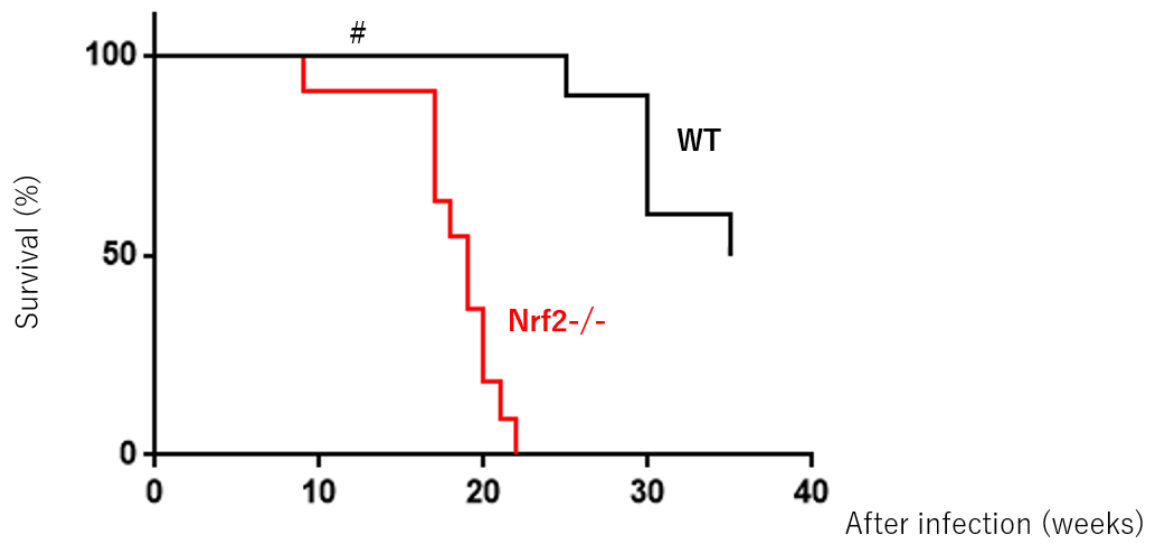


Fig11. Nrf2 欠損マウスは MAC 感染後早期に死亡する。
野生型および Nrf2 欠損マウスに 1×10^7 CFU の MAC 菌を経鼻感染させマウスの生存を観察した (n=10)。

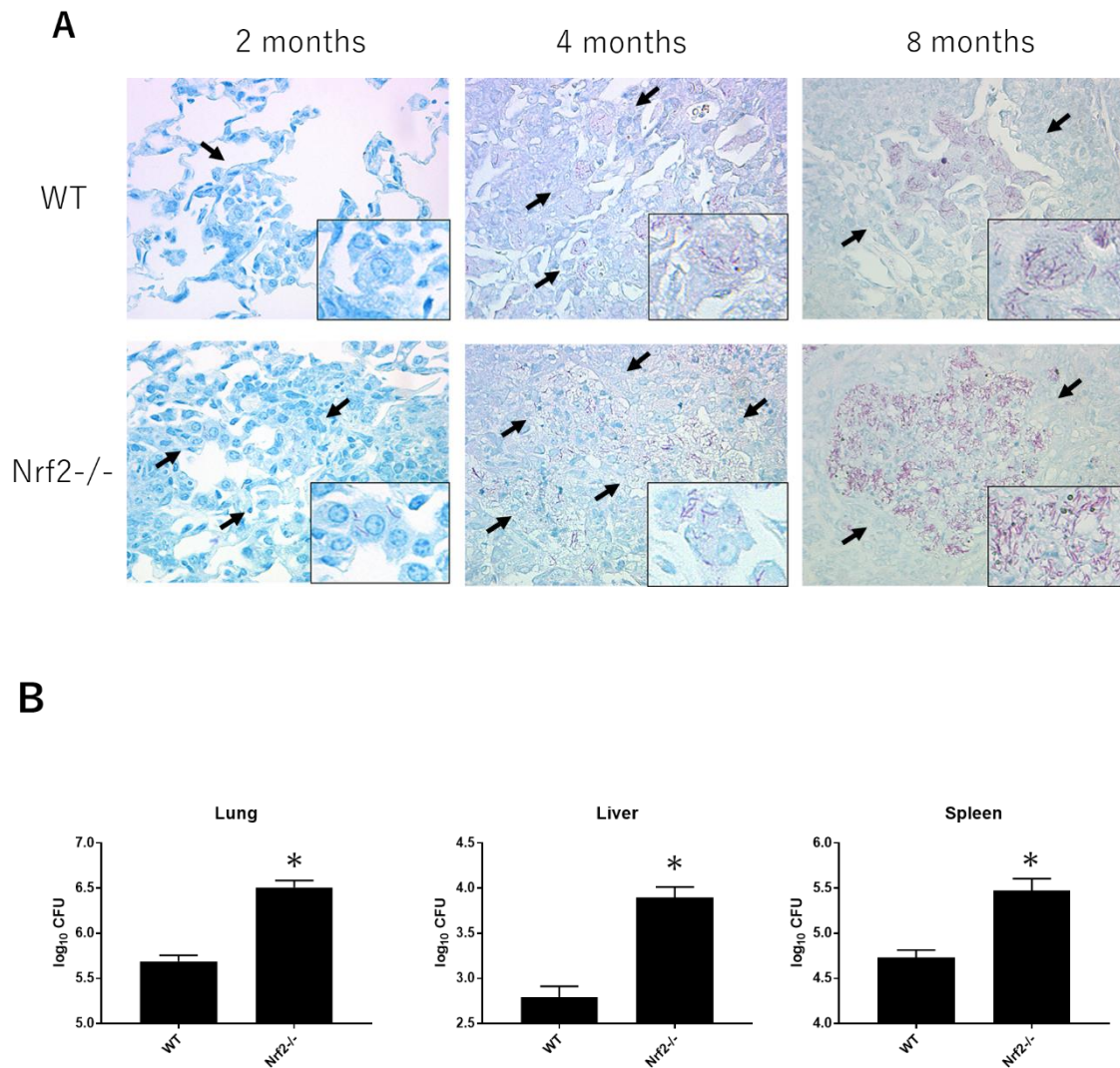


Fig12. Nrf2欠損マウスはMAC感染後の臓器内菌量が増加している。

(A) MAC感染後のマウスの肺病理組織をZiehl-Neelsenで染色 (×400)。Nrf2欠損マウスでは、マクロファージ内に多数のMAC菌を認める (黒矢印)。

(B) MAC感染2ヶ月後のマウスの主要臓器内菌量をCFUで測定した (n=7)。

*Significant difference between *Nrf2*^{-/-} mice and wild-type mice after MAC infection (p<0.05)

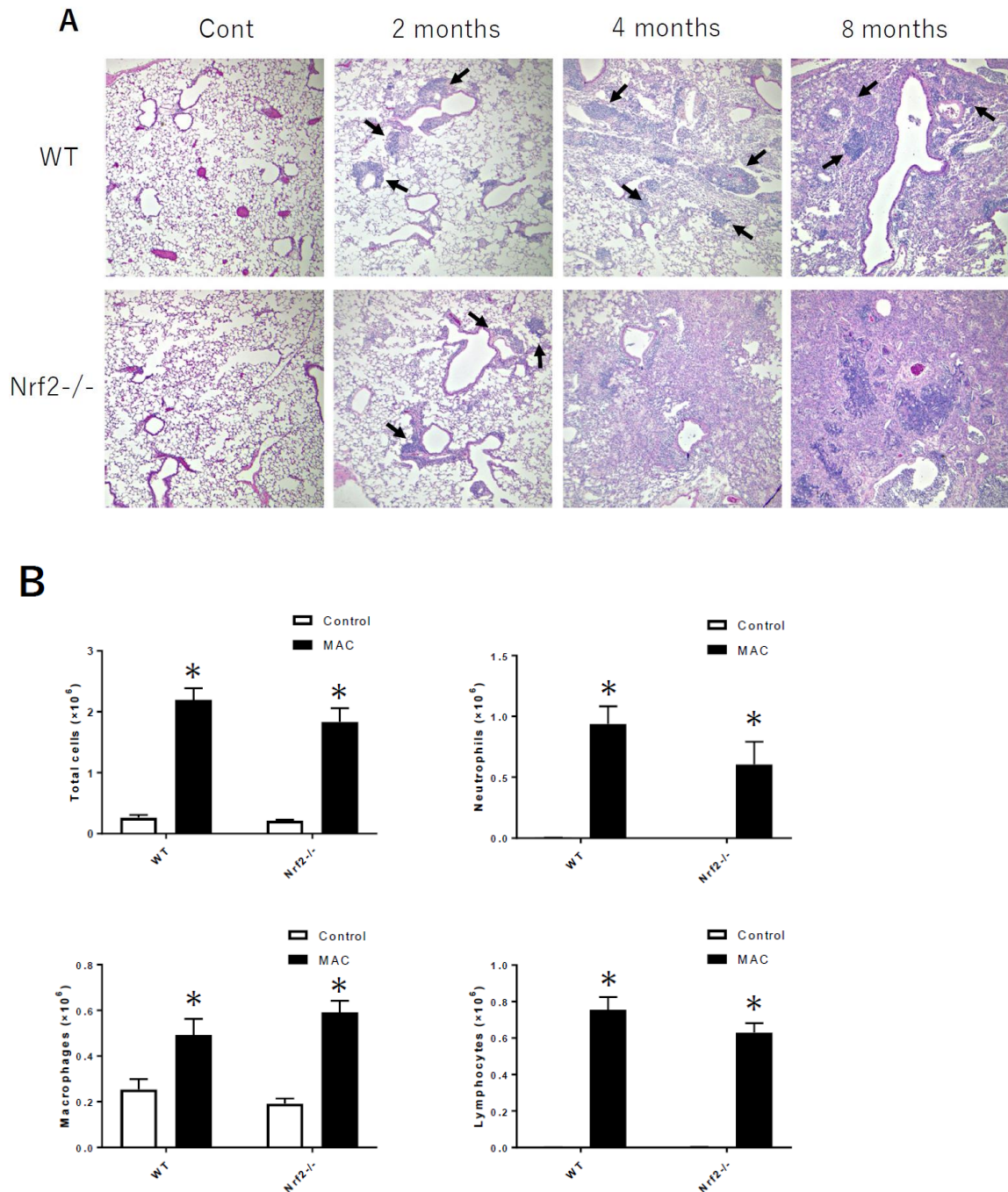


Fig13. Nrf2 欠損マウスでは、MAC 感染後の肺の炎症細胞浸潤が増加している。
 (A) MAC 感染 2、4、8 ヶ月後のマウスの肺病理組織を HE 染色で評価した ($\times 200$)。野生型マウスでは炎症細胞が集簇し、肉芽腫様の変化が認められる (黒矢印)。(B) 未感染、MAC 感染 2 ヶ月後のマウスから気管支肺胞洗浄液を回収し、ディフクイック染色で細胞分画を評価した (n=5)。*Significant difference between infected mice and uninfected mice (p<0.05).

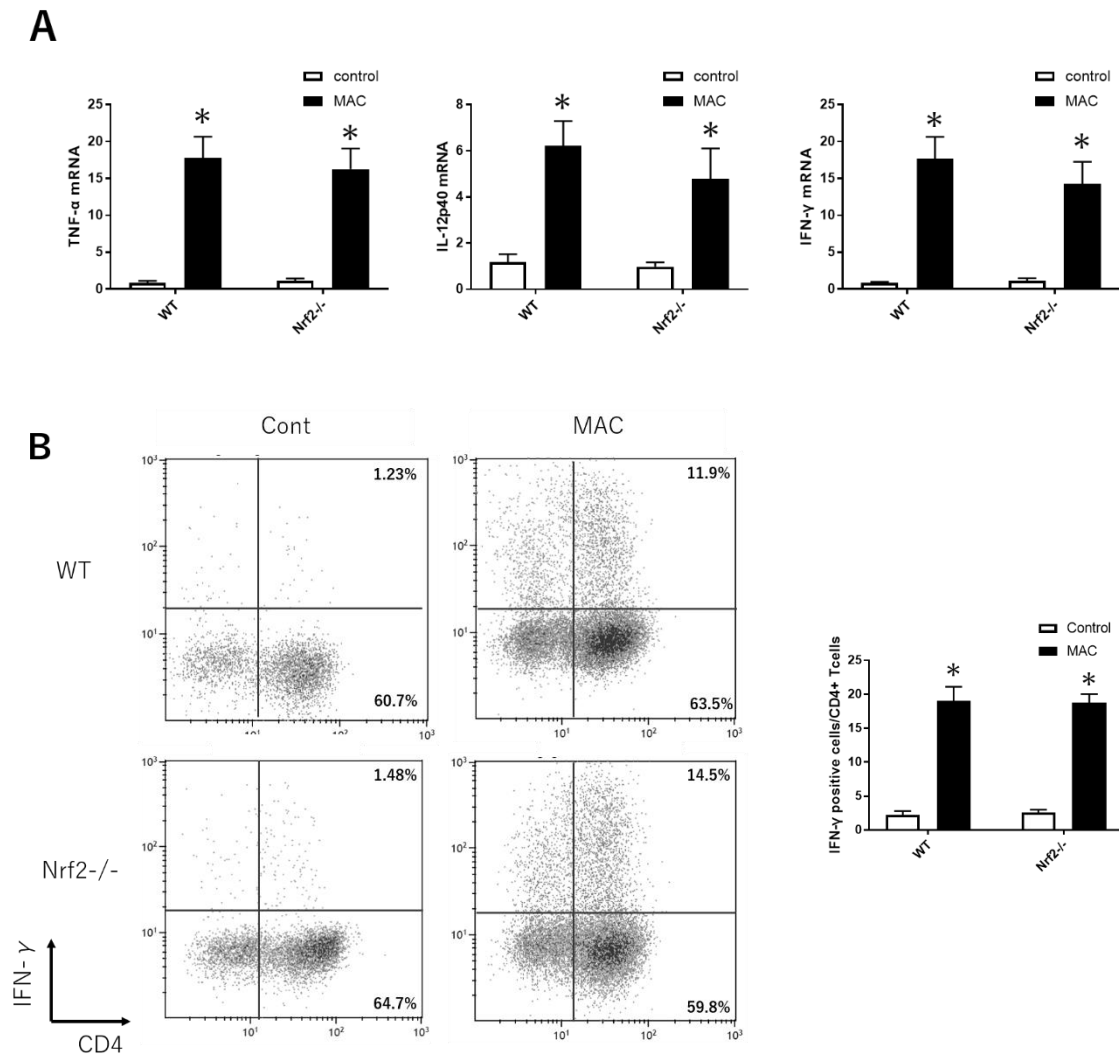


Fig14. Nrf2 は肺 MAC 感染において Th1 サイトカインの発現に関与しない。

(A) 未感染、MAC 感染 2 ヶ月後のマウスから肺組織を摘出し、*TNF-α*、*IL-12*、*IFN-γ* の mRNA 発現を評価した (n=4)。(B) 同様に MAC 感染 2 ヶ月後のマウス肺組織を用いて、CD4 陽性 T 細胞における IFN-γ の発現を解析した (n=4)。*Significant difference between infected mice and uninfected mice (p<0.05).

Data are expressed as the mean ± SEM.

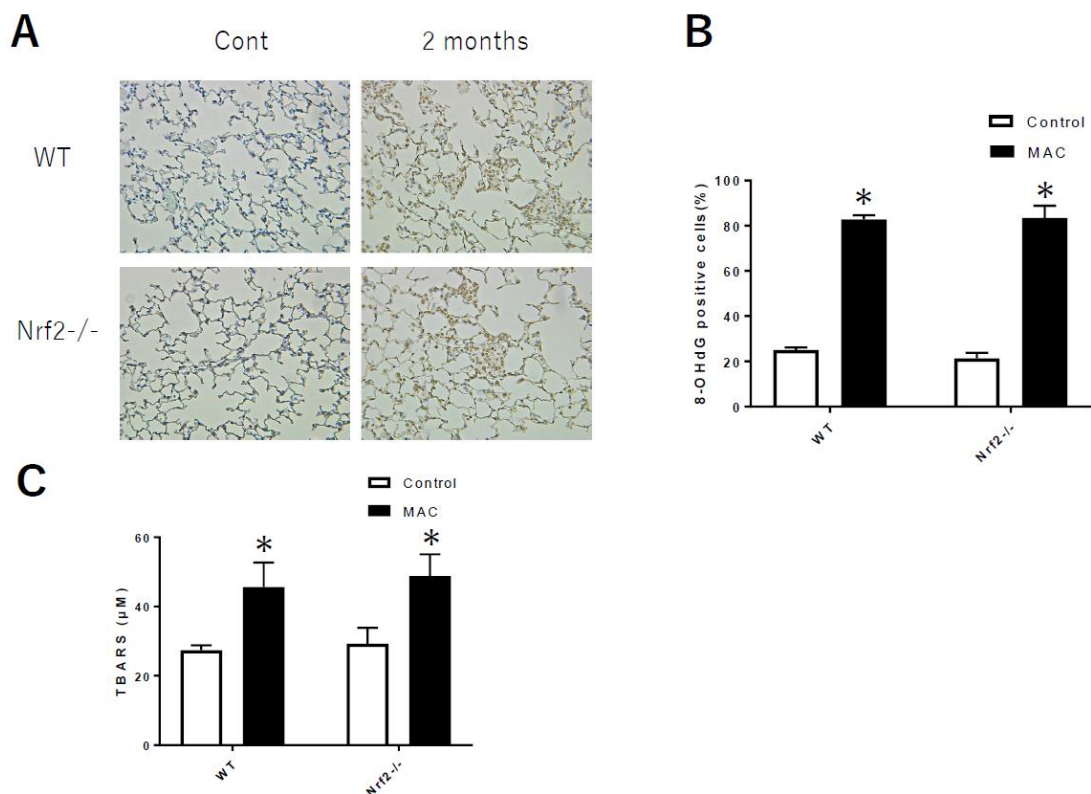


Fig15. Nrf2 は肺 MAC 感染において酸化ストレスの発現に関与しない。

(A) 未感染、MAC 感染 2 ヶ月後のマウスの肺病理組織を 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) で染色した。(B) 各画像の 8-OHdG 陽性細胞の比率をカウントした (n=4)。

(C) 未感染、MAC 感染 2 ヶ月後のマウス肺組織を摘出し、脂質過酸化物であるマロンジアルデヒドの計測を行った (n=5)。

*Significant difference between infected mice and uninfected mice (p<0.05).

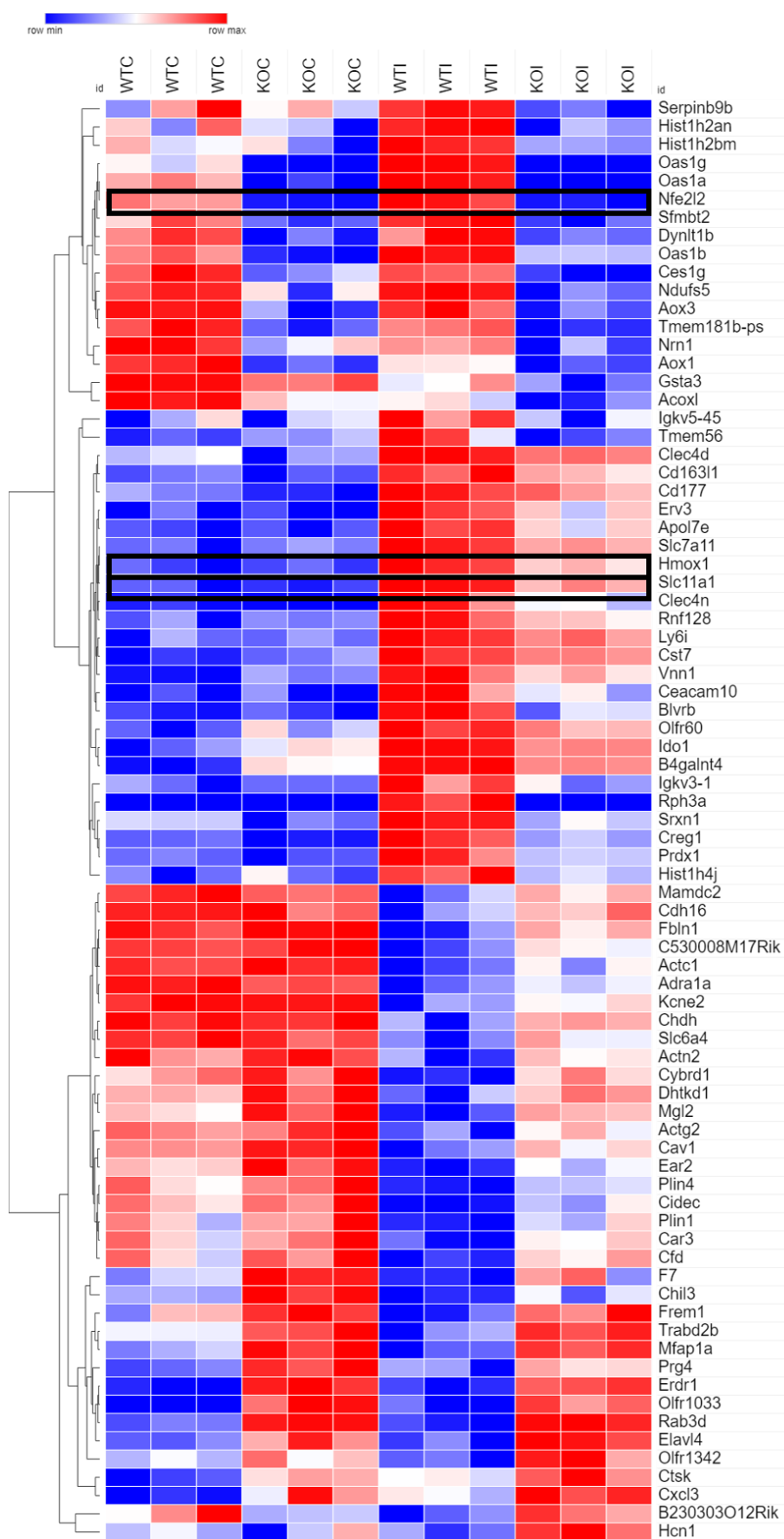


Fig16.

MAC 感染 2 ヶ月後の野生型マウスと Nrf2 欠損マウスの肺組織で mRNA の発現量を比較解析した。FDR 0.01 以下、fold change 2.0 以上を統計学的に有意と判断すると 79 個の遺伝子が抽出された。この 79 個の遺伝子でヒートマップを作成した。Nrf2 欠損マウス肺では、野生型マウス肺と比較して MAC 感染による *Nrf2* (*Nfe2l2*)、*Hmox1*、*Nramp1* (*Slc11a1*) の発現誘導が低下していた。

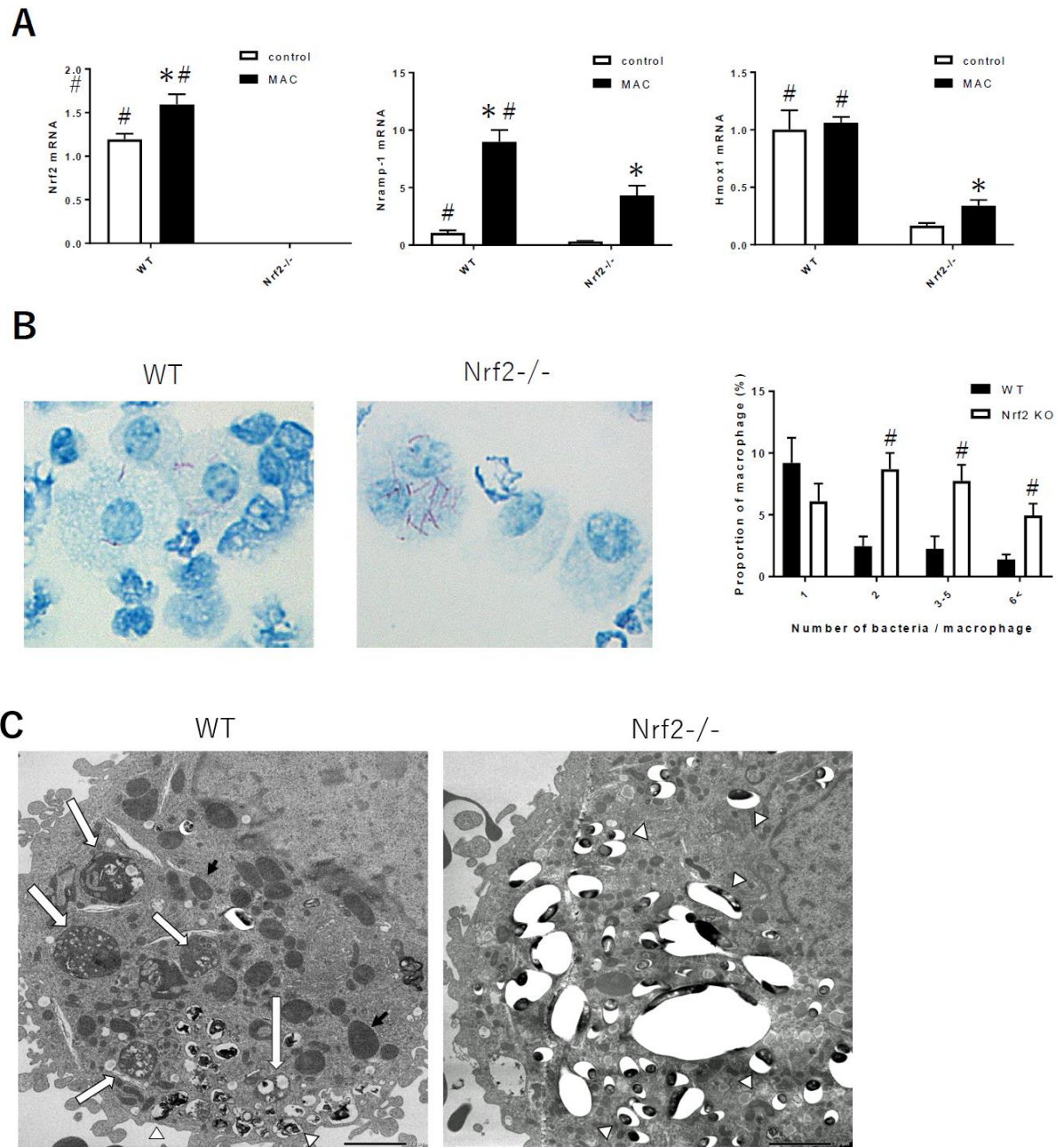


Fig17. 肺胞マクロファージはNrf2を活性化し、NRAMP1を誘導することでMACの感染制御に寄与する。

(A) 未感染、MAC感染2ヶ月後のマウスから気管支肺胞洗浄液を採取し、96wellプレートに 1×10^5 cell ずつ細胞を播種した。播種1時間後にPBSで洗浄し、非接着細胞をマクロファージと判断した。RT-PCRを行い、*Nrf2*、*Nramp1*、*Hmox1*のmRNA発現を評価した (n=4)。(B) 同様に気管支肺胞洗浄液をキニヨ

ン染色し、MACに感染した肺胞マクロファージの割合と肺胞マクロファージ内の菌数を評価した (n=4)。(C) MAC感染2ヶ月後のマウスから気管支肺胞洗浄液を採取し、遠心分離後透過電子顕微鏡で観察した。Nrf2欠損マウスの肺胞マクロファージでは、ファゴリソソームの形成不全が認められた。ファゴリソソーム(白矢印)、リソソーム(黒矢印)、ファゴソーム(白三角)。*Significant difference between infected mice and uninfected mice ($p<0.05$). #Significant difference between *Nrf2*^{-/-} mice and wild-type mice after MAC infection ($p<0.05$).

第3章 図

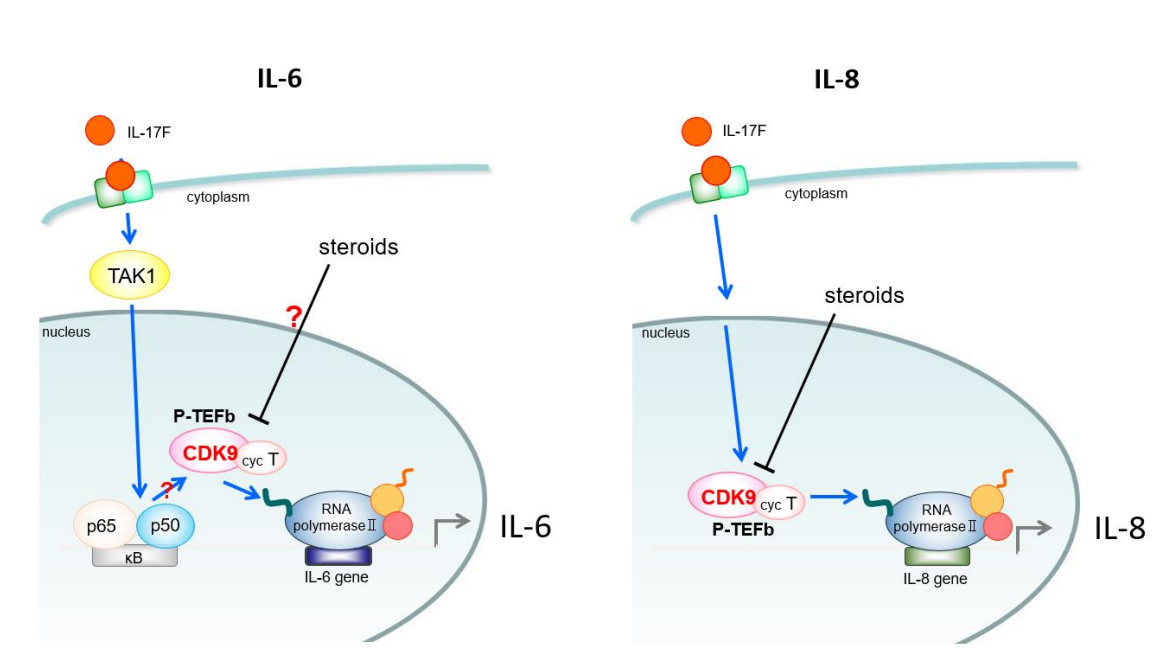


Fig18. 第1章シエーマ

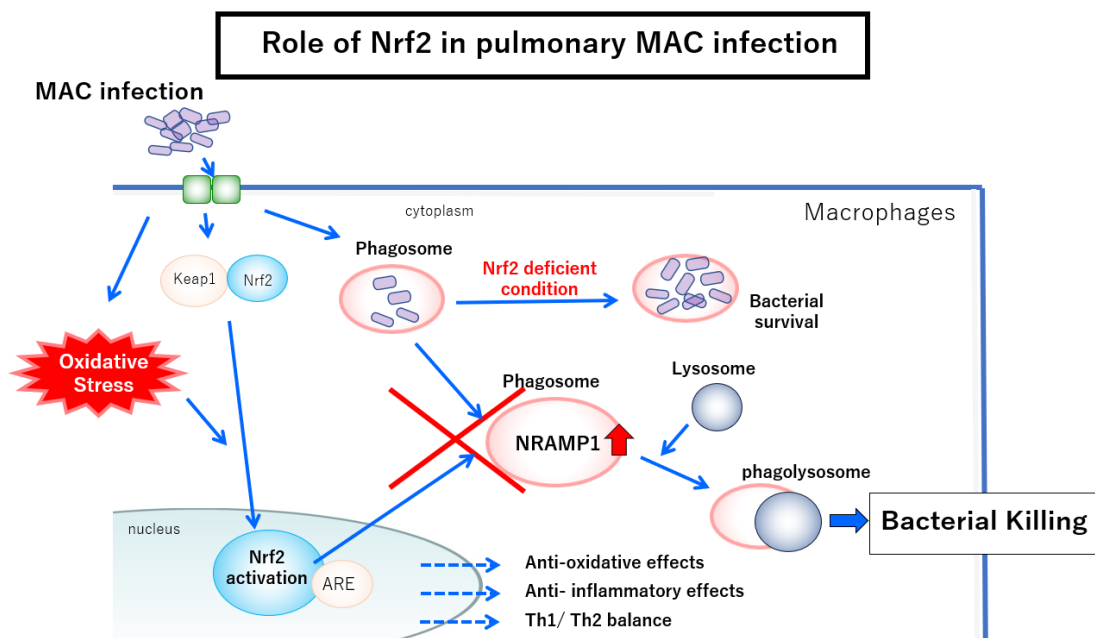


Fig19. 第2章シエーマ

Table 1

Primers used for RT-PCR		
Primer	Target	Sequence
GAPDH		5'-CCGCATCTTCTTGTGCAGTG-3' (forward)
		5'-CGTTGATGGCAACAATCTCC-3' (reverse)
IFN- γ		5'-CACGGCACAGTCATTGAAAG-3' (forward)
		5'-TCTGGCTCTGCAGGATTTTC-3' (reverse)
IL-12p40		5'-TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG-3' (forward)
		5'-ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT-3' (reverse)
TNF- α		5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' (forward)
		5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3' (reverse)
HO-1		5'-AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA-3' (forward)
		5'-GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA-3' (reverse)
Nrf2		5'-CTTCCATTTACGGAGACCC-3' (forward)
		5'-GAGCACTGTGCCCTTGAGC-3' (reverse)
NRAMP-1		5'-GCAGGCCCAGTTATGGCTC-3' (forward)
		5'-CAGGCTGAATGTACCCTGGTC-3' (reverse)

Table 2

The top 15 significantly enriched GO terms for upregulated or downregulated genes in the lungs of Nrf2 deficient mice as compared with those of WT mice, at 2 months after MΔC infection.			
downregulated GO terms in Nrf2 ^{-/-} mice compared with WT mice			
category	ID	Go term	gene name
Response to oxidative stress	GO:0016491	oxidoreductase activity	BLVRB,SRXN1,HMOX1,IDO1,CREG1,NDUFS5,ACOXL,PRDX1,AOX1
	GO:0055114	oxidation-reduction process	BLVRB,SRXN1,HMOX1,IDO1,CREG1,NDUFS5,ACOXL,PRDX1,AOX1
	GO:0006952	defense response	OAS1,HMOX1,CLEC6A,SLC11A1,IDO1,CLEC4D,NFE2L2,VNN1,CD163L1,PRDX1,AOX1
	GO:0006979	response to oxidative stress	SRXN1,HMOX1,SLC7A11,NFE2L2,VNN1,PRDX1
	GO:0043619	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to oxidative stress	HMOX1,NFE2L2
	GO:0033015	tetrapyrrole catabolic process	BLVRB,HMOX1
	GO:0006787	porphyrin-containing compound catabolic process	BLVRB,HMOX1
	GO:0042167	heme catabolic process	BLVRB,HMOX1
Heme metabolism	GO:0020037	heme binding	HMOX1,IDO1,PRDX1
	GO:0046906	tetrapyrrole binding	HMOX1,IDO1,PRDX1
	GO:0051139	metal ion-proton antiporter activity	SLC11A1
	GO:0046149	pigment catabolic process	BLVRB,HMOX1
Membrane transport	GO:0009055	electron transfer activity	IDO1,ACOXL,AOX1
	GO:0046983	protein dimerization activity	HIST1H2AG,HIST1H2BM,HMOX1,SLC11A1,NRN1,HIST1H4J,NFE2L2,PRDX1
protein	GO:0032993	protein-DNA complex	HIST1H2AG,HIST1H2BM,HIST1H4J,NFE2L2
upregulated GO terms in Nrf2 ^{-/-} mice compared with WT mice			
category	ID	Go term	gene name
	GO:0006936	muscle contraction	ACTC1,ACTG2,KCNE2,ADRA1A,ACTN2,CAV1
	GO:0070252	actin-mediated cell contraction	ACTC1,KCNE2,ACTN2,CAV1
	GO:0060048	cardiac muscle contraction	ACTC1,KCNE2,ADRA1A,CAV1
	GO:0003012	muscle system process	ACTC1,ACTG2,KCNE2,ADRA1A,ACTN2,CAV1
Muscle	GO:0030048	actin filament-based movement	ACTC1,KCNE2,ACTN2,CAV1
	GO:0098900	regulation of action potential	ADRA1A,CAV1,HCN1
	GO:0001508	action potential	KCNE2,ADRA1A,CAV1,HCN1
	GO:1901380	negative regulation of potassium ion transmembrane transport	KCNE2,ACTN2,CAV1
Ion transport	GO:1901979	regulation of inward rectifier potassium channel activity	KCNE2,CAV1
	GO:2001257	regulation of cation channel activity	KCNE2,ACTN2,CAV1,HCN1
	GO:0043267	negative regulation of potassium ion transport	KCNE2,ACTN2,CAV1
	GO:2001259	positive regulation of cation channel activity	KCNE2,ACTN2,HCN1
Cellular component	GO:1901016	regulation of potassium ion transmembrane transporter activity	KCNE2,ACTN2,CAV1
	GO:0005811	lipid droplet	PLIN4,CAV1,PLIN1,CIDECD
	GO:0090131	mesenchyme migration	ACTC1,ACTG2
15 significantly enriched GO terms for upregulated or downregulated genes in the infected lungs of Nrf2 deficient mice as compared with those of WT mice were classified into related functional cate			

Table 3

Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	p-value	gene name
Nrf2-mediated Oxidative Stress Response	5.35	4.5E-06	GSTA3,ACTC1,AOX1,PRDX1,HMOX1,ACTG2,NFE2L2
Heme Degradation	4.22	6.0E-05	BLVNB,HMOX1
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	2.84	1.4E-03	ACTC1,ACTN2,ACTG2
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	2.81	1.5E-03	CAV1,ACTC1,ACTG2
Ery Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes	2.46	3.5E-03	ACTC1,HMOX1,ACTG2
VEGF Signaling	2.23	5.9E-03	ACTC1,ACTN2,ACTG2
Integrin Signaling	2.2	6.3E-03	CAV1,ACTC1,ACTN2,ACTG2
Choline Degradation I	2.19	6.5E-03	CHDH,
Virus Entry via Endocytic Pathways	2.16	6.9E-03	CAV1,ACTC1,ACTG2
Paxillin Signaling	2.13	7.4E-03	ACTC1,ACTN2,ACTG2
Mechanisms of Viral Exit from Host Cells	2.11	7.8E-03	ACTC1,ACTG2
Iron homeostasis signaling pathway	2.01	9.8E-03	CYBRD1,SLC11A1,HMOX1
Phagosome Maturation	1.92	1.2E-02	DYNLT1,CTSK,PRDX1
Epithelial Adherens Junction Signaling	1.88	1.3E-02	ACTC1,ACTN2,ACTG2
Nicotine Degradation III	1.85	1.4E-02	AOX1,Aox3

The top 15 significantly enriched canonical pathways in the lungs of Nrf2 deficient mice as compared with those of WT mice, at 2 months after MAC infection.

参考文献

1. Brusselle, G. and K. Bracke, *Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Ann Am Thorac Soc, 2014. **11 Suppl 5**: p. S322-8.
2. Wenzel, S.E., et al., *Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(3 Pt 1):p. 737-43.
3. Woodruff, P.G., et al., *Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(5): p. 753-8.
4. Gold, D.R. and A.L. Fuhlbrigge, *Inhaled corticosteroids for young children with wheezing*. N Engl J Med, 2006. **354**(19): p. 2058-60.
5. Hastie, A.T., et al., *Biomarker surrogates do not accurately predict sputum eosinophil and neutrophil percentages in asthmatic subjects*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(1): p. 72-80.
6. Kawaguchi, M., et al., *Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4430-5.
7. Kawaguchi, M., L.F. Onuchic, and S.K. Huang, *Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, but not p38 and c-Jun N-terminal kinase, is involved in signaling of a novel cytokine, ML-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15229-32.
8. Kawaguchi, M., et al., *Induction of C-X-C chemokines, growth-related oncogene alpha expression, and epithelial cell-derived neutrophil-activating protein-78 by ML-1 (interleukin-17F) involves activation of Raf1-mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(3): p. 1213-20.
9. Oda, N., et al., *Interleukin-17F induces pulmonary neutrophilia and amplifies antigen-induced allergic response*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(1): p. 12-8.
10. Kawaguchi, M., et al., *IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(4): p.795-801.
11. Al-Ramli, W., et al., *T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(5): p. 1185-7.
12. Chang, Y., et al., *CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Res, 2011. **12**: p. 43.
13. Kawaguchi, M., et al., *IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with*

- protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(4): p. 795-801.
14. Elias, J.A., et al., *Cytokine- and virus-stimulated airway smooth muscle cells produce IL-11 and other IL-6-type cytokines.* Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 1): p. L648-55.
 15. Perry, M.M., et al., *Airway smooth muscle hyperproliferation is regulated by microRNA-221 in severe asthma.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(1): p. 7-17.
 16. Chang, Y., et al., *TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(4): p. 1046-53.e1-2.
 17. Rincon, M. and C.G. Irvin, *Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases.* Int J Biol Sci, 2012. **8**(9): p. 1281-90.
 18. Dixon, A.E., et al., *Lower airway disease in asthmatics with and without rhinitis.* Lung, 2008. **186**(6): p. 361-8.
 19. Dixon, A.E., et al., *Effect of obesity on clinical presentation and response to treatment in asthma.* J Asthma, 2006. **43**(7): p. 553-8.
 20. Neveu, W.A., et al., *IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens.* J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1732-8.
 21. O'Brien, R.L., C.L. Roark, and W.K. Born, *IL-17-producing gammadelta T cells.* Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 662-6.
 22. Ciric, B., et al., *IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells.* J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5296-305.
 23. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.* Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
 24. Ghoreschi, K., et al., *Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling.* Nature, 2010. **467**(7318): p. 967-71.
 25. Dey, N., et al., *TAK1 regulates NF-KappaB and AP-1 activation in airway epithelial cells following RSV infection.* Virology, 2011. **418**(2): p. 93-101.
 26. Yun, Y.P., et al., *Induction of nuclear factor-kappaB activation through TAK1 and NIK by diesel exhaust particles in L2 cell lines.* Toxicol Lett, 2005. **155**(2): p. 337-42.
 27. Goleva, E., et al., *The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(10): p. 1193-201.
 28. Ordonez, CL., et al., *Increased Neutrophil Numbers and IL-8 Levels in Airway*

- Secretions in Acute Severe Asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(4):1185-90.
29. Stanescu, D., et al., *Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils*. Thorax, 1996. **51**(3):267-71.
 30. Saetta, M., et al., *Inflammatory Cells in the Bronchial Glands of Smokers with Chronic Bronchitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(5):1633-9.
 31. Hennessy, S., et al., *IL-17A acts via p38 MAPK to increase stability of TNF-alpha-induced IL-8 mRNA in human ASM*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(6): p. L1283-90.
 32. Pera, T., et al., *Role for TAK1 in cigarette smoke-induced proinflammatory signaling and IL-8 release by human airway smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **303**(3): p. L272-8.
 33. Watson, M.L., et al., *Interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein 1 production by cultured human airway smooth muscle cells*. Cytokine, 1998. **10**(5): p. 346-52.
 34. Ota, K., et al., *Potential involvement of IL-17F in asthma*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 602846.
 35. Shao, W. and J. Zeitlinger, *Paused RNA polymerase II inhibits new transcriptional initiation*. Nat Genet, 2017. **49**(7): p. 1045-1051.
 36. Yamaguchi, Y., et al., *NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DISF to repress RNA polymerase 2 elongation*. Cell, 1999. **97**(1):41-51.
 37. Jang, M.K., et al., *The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription*. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 523-34.
 38. Zhou, M., et al., *Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(14): p. 5077-86.
 39. Luecke, H.F. and K.R. Yamamoto, *The glucocorticoid receptor blocks P-TEFb recruitment by NFkappaB to effect promoter-specific transcriptional repression*. Genes Dev, 2005. **19**(9): p. 1116-27.
 40. Li, L.L., et al., *Positive transcription elongation factor b (P-TEFb) contributes to dengue virus-stimulated induction of interleukin-8 (IL-8)*. Cell Microbiol, 2010. **12**(11): p. 1589-603.
 41. Barboric, M., et al., *NF-kB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation*

- by RNA polymerase 2. *Mol Cell*, 2001. **8**(2):327-37.
42. Tian, B., et al., *CDK9-dependent transcriptional elongation in the innate interferon-stimulated gene response to respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells*. *J Virol*, 2013. **87**(12): p. 7075-92.
 43. Tian, B., et al., *BRD4 Couples NF-kappaB/RelA with Airway Inflammation and the IRF-RIG-I Amplification Loop in Respiratory Syncytial Virus Infection*. *J Virol*, 2017. **91**(6).
 44. Khan, Y.M., et al., *Brd4 is essential for IL-1beta-induced inflammation in human airway epithelial cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e95051.
 45. Perry, M.M., et al., *BET bromodomains regulate transforming growth factor-beta-induced proliferation and cytokine release in asthmatic airway smooth muscle*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(14): p. 9111-21.
 46. Clifford, R.L., et al., *CXCL8 histone H3 acetylation is dysfunctional in airway smooth muscle in asthma: regulation by BET*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015. **308**(9): p. L962-72.
 47. Cheung, K., et al., *BET N-terminal bromodomain inhibition selectively blocks Th17 cell differentiation and ameliorates colitis in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(11): p. 2952-2957.
 48. Mele, D.A., et al., *BET bromodomain inhibition suppresses TH17-mediated pathology*. *J Exp Med*, 2013. **210**(11): p. 2181-90.
 49. Kim, J., et al., *Role of NF-kappa B in cytokine production induced from human airway epithelial cells by rhinovirus infection*. *J Immunol*, 2000. **165**(6): p. 3384-92.
 50. Cormet-Boyaka, E., et al., *An NF-kappaB-independent and Erk1/2-dependent mechanism controls CXCL8/IL-8 responses of airway epithelial cells to cadmium*. *Toxicol Sci*, 2012. **125**(2): p. 418-29.
 51. Mirsaeidi, M., et al., *Hospital costs in the US for pulmonary mycobacterial diseases*. *Int J Mycobacteriol*, 2015. **4**(3): p. 217-221.
 52. Marras, T.K., et al., *Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario, 1997-2003*. *Thorax*, 2007. **62**(8): p. 661-6.
 53. Reich, J.M. and R.E. Johnson, *Mycobacterium avium complex pulmonary disease. Incidence, presentation, and response to therapy in a community setting*. *Am Rev Respir Dis*, 1991. **143**(6): p. 1381-5.
 54. Prince, D.S., et al., *Infection with Mycobacterium avium complex in patients without predisposing conditions*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(13): p. 863-8.
 55. Knowles, M.R., M. Zariwala, and M. Leigh, *Primary Ciliary Dyskinesia*. *Clin*

- Chest Med, 2016. **37**(3): p. 449-61.
56. Martiniano, S.L., J.A. Nick, and C.L. Daley, *Nontuberculous Mycobacterial Infections in Cystic Fibrosis*. Clin Chest Med, 2016. **37**(1): p. 83-96.
 57. Szymanski, E.P., et al., *Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infection. A Multisystem, Multigenic Disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **192**(5): p. 618-28.
 58. Matsuyama, M., et al., *Role of Th1/Th17 balance regulated by T-bet in a mouse model of Mycobacterium avium complex disease*. J Immunol, 2014. **192**(4): p. 1707-17.
 59. Matsuyama, M., et al., *Overexpression of RORgammat Enhances Pulmonary Inflammation after Infection with Mycobacterium Avium*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0147064.
 60. Matsuyama, M., et al., *Transcriptional Response of Respiratory Epithelium to Nontuberculous Mycobacteria*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018. **58**(2): p. 241-252.
 61. Zhao, H., et al., *The role of nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf-2) in the protection against lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017. **312**(2): p. L155-L162.
 62. Zhou, Y., et al., *The Bach Family of Transcription Factors: A Comprehensive Review*. Clin Rev Allergy Immunol, 2016. **50**(3): p. 345-56.
 63. Williams, M.A., et al., *Disruption of the transcription factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4545-59.
 64. Thimmulappa, R.K., et al., *Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(4): p. 883-9.
 65. Chang, A.L., et al., *Redox regulation of mitophagy in the lung during murine Staphylococcus aureus sepsis*. Free Radic Biol Med, 2015. **78**: p. 179-89.
 66. Athale, J., et al., *Nrf2 promotes alveolar mitochondrial biogenesis and resolution of lung injury in Staphylococcus aureus pneumonia in mice*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(8): p. 1584-94.
 67. Reddy, N.M., et al., *Innate immunity against bacterial infection following hyperoxia exposure is impaired in NRF2-deficient mice*. J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4601-8.
 68. Gomez, J.C., et al., *Nrf2 Modulates Host Defense during Streptococcus pneumoniae Pneumonia in Mice*. J Immunol, 2016. **197**(7): p. 2864-79.

69. Chinta, K.C., et al., *Microanatomic Distribution of Myeloid Heme Oxygenase-1 Protects against Free Radical-Mediated Immunopathology in Human Tuberculosis*. Cell Rep, 2018. **25**(7): p. 1938-1952 e5.
70. Rothchild, A.C., et al., *Alveolar macrophages generate a noncanonical NRF2-driven transcriptional response to Mycobacterium tuberculosis in vivo*. Sci Immunol, 2019. **4**(37).
71. Sykietis, G.P. and D. Bohmann, *Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease*. Sci Signal, 2010. **3**(112): p. re3.
72. Deramautd, T.B., C. Dill, and M. Bonay, *Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases*. Med Mal Infect, 2013. **43**(3): p. 100-7.
73. Amaral, E.P., et al., *N-acetyl-cysteine exhibits potent anti-mycobacterial activity in addition to its known anti-oxidative functions*. BMC Microbiol, 2016. **16**(1): p. 251.
74. Harada, N., et al., *Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages*. Arch Biochem Biophys, 2011. **508**(1): p. 101-9.
75. Zwillling, B.S., et al., *Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth*. Infect Immun, 1999. **67**(3): p. 1386-92.
76. Kuhn, D.E., et al., *Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(1): p. 113-9.
77. Goswami, T., et al., *Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H⁺/bivalent cation antiporter*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 3): p. 511-9.
78. Gomes, M.S. and R. Appelberg, *Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against Mycobacterium avium*. Immunology, 1998. **95**(2): p. 165-8.
79. Barton, C.H., et al., *Nramp1: a link between intracellular iron transport and innate resistance to intracellular pathogens*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 757-62.
80. Atkinson, P.G. and C.H. Barton, *High level expression of Nramp1G169 in RAW264.7 cell transfectants: analysis of intracellular iron transport*. Immunology, 1999. **96**(4): p. 656-62.
81. Jabado, N., et al., *Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane*. J Exp Med,

2000. **192**(9): p. 1237-48.
82. Soe-Lin, S., et al., *Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(14): p. 5960-5.
 83. Blackwell, J.M., et al., *SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance*. Cell Microbiol, 2001. **3**(12): p. 773-84.
 84. Valdez, Y., et al., *Nramp1 drives an accelerated inflammatory response during Salmonella-induced colitis in mice*. Cell Microbiol, 2009. **11**(2): p. 351-62.
 85. Denis, M., et al., *Pleiotropic effects of the Bcg gene: III. Respiratory burst in Bcg-congenic macrophages*. Clin Exp Immunol, 1988. **73**(3): p. 370-5.
 86. Frehel, C., et al., *Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages*. Cell Microbiol, 2002. **4**(8): p. 541-56.
 87. Blackwell, J.M., et al., *Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story*. Immunol Lett, 2003. **85**(2): p. 197-203.
 88. Vidal, S., et al., *The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene*. J Exp Med, 1995. **182**(3): p. 655-66.
 89. Koh, W.J., et al., *NRAMP1 gene polymorphism and susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung diseases*. Chest, 2005. **128**(1): p. 94-101.
 90. Tanaka, G., et al., *Pulmonary Mycobacterium avium complex infection: association with NRAMP1 polymorphisms*. Eur Respir J, 2007. **30**(1): p. 90-6.
 91. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(2): p. 313-22.
 92. Surolia, R., et al., *Attenuated heme oxygenase-1 responses predispose the elderly to pulmonary nontuberculous mycobacterial infections*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **311**(5): p. L928-L940.

謝辞

本研究にあたり終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました筑波大学大学院呼吸病態医学分野檜澤伸之教授に深い謝意を表します。

適切な御指導と御示唆をいただきました筑波大学大学院呼吸器内科川口未央先生と松山政史先生に深く感謝いたします。

研究その他多方面にわたり御指導いただきました筑波大学附属病院土浦地域臨床教育ステーション石井幸雄教授、水戸地域医療教育センター佐藤浩昭教授に深く感謝いたします。

日々の研究において様々な御協力、御教示をいただきました、坂本透准教授，森島祐子准教授，松野洋輔講師，際本拓未講師，小川良子講師，増子裕典講師，中澤健介講師，塩澤利博講師，藤田純一医学士，太田恭子医学士，角田義弥医学士，櫻井啓文医学士，金澤潤医学士，吉田和史医学士，北沢晴奈医学士，矢崎海医学士に深謝いたします。

そして、日々の研究、診療を続けていく上で、常に心の支えとなり、暖かく励まし続けてくれた家族に感謝したいと思います。

出典

本学位論文では

Immun Inflamm Dis. 2017;5:124-131. (doi; 10.1002/iid3.149)

Int Arch Allergy Immunol. 2018;176:83-90. (doi; 10.1159/000488154)

に記載された論文の内容を Karger Publishers および Wiley & Sons, Inc の許可を得て再利用している。