マウスにおける Lipopolysaccharide 反復曝露誘発気道炎症に対する Src の関与

西本裕樹,^a 安田啓信,^a 益子圭太,^a 臼井良斗,^a
上田敬太郎,^a 木村元気,^a Kazuhiro Ito,^b 木澤靖夫^{*,a}

**The Involvement of Src in Airway Inflammation Induced by
Repeated Exposure to Lipopolysaccharide in Mice**

Yuki Nishimoto,^a Hironobu Yasuda,^a Keita Masuko,^a Yoshito Usui,^a
Keitaro Ueda,^a Genki Kimura,^a Kazuhiro Ito,^b and Yasuo Kizawa^{*,a}

^aLaboratory of Physiology and Anatomy, School of Pharmacy, Nihon University; 7-7-1 Narashinodai,
Funabashi, Chiba 274-8555, Japan; and ^bAirway Disease Section, National Heart and Lung
Institute, Imperial College London; Dovehouse Street, London SW3 6LY, U.K.

(Received April 1, 2019; Accepted June 3, 2019; Advance publication released online June 13, 2019)

Corticosteroid insensitive airway inflammation is one of major barrier to effective managements of chronic airway diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and severe asthma. The role of nonreceptor tyrosine kinase Src is important in airway inflammation in mice models of atopic asthma and COPD. Thus, in this study, we determined the effects of Src inhibitor, dasatinib, on airway inflammation induced by repeated intranasal exposure to lipopolysaccharide (LPS). Male mice (A/J strain, 5 weeks old) were intranasally exposed to LPS twice daily for 3 d, and dasatinib was intranasally treated 2 h prior to each LPS exposure. A day after the last stimulation, lungs and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected. Dasatinib attenuated the accumulation of inflammatory cells in lungs, and the increase in the numbers of inflammatory cells and the accumulation of cytokines/chemokines in BALF in a dose dependent manner. Therefore, this study suggested that targeting the Src can provide a new therapeutic approach for corticosteroid insensitive pulmonary diseases.

Key words—Src; corticosteroid resistance; lipopolysaccharide

緒 言

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) や気管支喘息は持続的な末梢気道炎症を基礎とする慢性呼吸器疾患であり、炎症に伴い気道過敏性の亢進や、杯細胞の過形成、粘液の過剰産生及び気道平滑筋の肥厚による気道狭窄が誘発される。^{1,2)} また、COPD や気管支喘息患者では、*Haemophilus influenzae* や *Streptococcus pneumoniae* などによる細菌感染、あるいは rhinovirus, H1N1 influenza A virus による感染といった様々な呼吸器感染症による気道炎症が、COPD や気管支喘息の急性増悪を誘発することも問題となる。³⁻⁵⁾ したがって、これらの疾患の治療を考えるうえで炎

症の制御は重要と考えられる。

しかし、COPD 患者ではコルチコステロイドに対する感受性が低下することが知られており、COPD 患者の炎症の制御は困難である。^{6,7)} 一方、気管支喘息においても、重症喘息患者ではステロイド抗炎症薬による炎症の制御が困難になる場合が知られている。^{6,7)} また、*in vivo*, *in vitro* の研究で、アレルギー性気道炎症モデルマウスへの respiratory syncytial virus 感染、ヒト末梢血由来単核球への *Chlamydia pneumoniae* 感染、ヒト気道上皮由来細胞株 A549 への rhinovirus 感染によってコルチコステロイド感受性の低下が観察されることが報告されている。⁸⁻¹⁰⁾ さらに、われわれは以前の研究において、マウスに lipopolysaccharide (LPS) を 3 日間経鼻曝露させることで、PI3K を介した histone deacetylase (HDAC) 2 発現量の低下によってコルチコステロイド感受性が低下することを報告した。¹¹⁾ また、二本鎖 RNA である poly(I:C) の 3 日間曝露に

^a日本大学薬学部機能形態学研究室, ^bAirway Disease Section, National Heart and Lung Institute, Imperial College London

*e-mail: kizawa.yasuo@nihon-u.ac.jp

よってコルチコステロイド非感受性の気道炎症が誘導されることも報告した。¹²⁾ このことから、COPDや気管支喘息の急性増悪の原因となる呼吸器感染症もまた、コルチコステロイド感受性を低下させる要因の1つとなると考えられる。したがって、種々の呼吸器疾患において、ステロイド抗炎症薬とは異なる機序で炎症を制御する、あるいはコルチコステロイド感受性を改善する新規治療薬の開発が望まれる。

Srcは、がん原遺伝子として発見されたSRC遺伝子によりコードされるnonreceptor tyrosine kinaseであり、T cell receptor (TCR)やB cell receptor (BCR)、Toll like receptor (TLR)、成長因子の受容体、細胞接着分子などを介した細胞内シグナルの活性化に関与する。¹³⁻¹⁷⁾ これらの機序に関連することから、Srcは、細胞接着、浸潤、細胞生存、分化、増殖、アポトーシスの誘導などの様々な細胞機能に重要であると考えられている。¹⁶⁾ また、近年、マウスにおけるタバコ主流煙曝露誘発気道炎症モデルやovalbumin (OVA) 惹起アレルギー性気道炎症モデルにおいて、Srcが気道炎症の誘発に関与することが報告されている。^{18,19)} したがって、SrcはCOPDや気管支喘息を始めとする種々の呼吸器疾患において、炎症を制御するための新たな標的分子であると考えられる。そこで本研究では、Src阻害作用を持つdasatinibを用い、マウスにLPSを3日間経鼻曝露させて誘発したステロイド治療抵抗性気道炎症におけるSrcの関与について検討した。

実験方法

1. 実験動物 本研究における*in vivo*実験はすべて、三共ラボサービス(株)(東京)より購入した雄性A/J系マウス(5週齢; 22-27 g)を使用した。購入したマウスは、固形飼料及び水を自由に摂取させ、温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間の明暗周期の飼育室において、1週間馴化させたのち実験に供した。なお、すべての動物実験は、日本大学動物実験運営内規及び日本大学薬学部動物実験指針を遵守して行った。

2. 病態モデル 急性気道炎症に対するSrc阻害薬の効果を調べるため、3% isoflurane (アボット、東京) 麻酔下でLPS (0.1 mg/mL , $40 \mu\text{L/animal}$; lipopolysaccharide from *E. Coli* Serotype

055:B5; Sigma Aldrich Co., St. Louis) を1日2回、3日間、マウスに経鼻曝露させた。また、LPS投与2時間前に3% isoflurane 麻酔下でdasatinib (4 , 40 及び $400 \mu\text{g/mL}$ in 10% dimethyl sulfoxide, $35 \mu\text{L/animal}$; Cayman Chemical, Ann Arbor) を1日2回、マウスに経鼻投与した。Dasatinibは、臨床においてBCR/Abl阻害薬として用いられるが、高いSrc阻害作用を示すことを特徴とする。²⁰⁾ なお、dasatinib ($40 \mu\text{g/mL}$) の投与量は、ラットにdasatinibを経口投与した場合の肺への分布を参考に、マウスにLPS (20 mg/kg) を腹腔内投与し2時間後に誘発される肺でのtumor necrosis factor- α (TNF- α) 発現を抑制する経口投与用量と同程度の最大局所曝露が期待される用量として設定した。^{21,22)}

3. 気管支肺胞洗浄液及び肺の採取 最後の薬物投与から1日後に、Toらの方法に準じて気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)を採取した。²³⁾ Pentobarbital (ソムノペンチル; 大日本住友製薬、大阪) 過麻酔によりマウスを安楽死させ、気管を切開して静脈カテーテルを挿管・固定した。静脈カテーテルを通じて生理食塩液(100 mL/kg) による洗浄操作を3回行い、この洗浄液をBALFとして採取した。

4. BALF細胞分画及び上清の測定 採取したBALFは $500 \times g$, 4°C にて遠心し、細胞分画と上清をそれぞれ採取した。上清はサイトカイン測定用に分取し、 -80°C で保存した。細胞分画は0.2%及び1.6%のNaClを順に添加して溶血させた後、血球計数盤(ワンセルカウンター; バイオメディカルサイエンス、東京)を用いて細胞数を計数した。さらに、細胞懸濁液 $100 \mu\text{L}$ を分取して、propidium iodide (Sigma Aldrich Co., St. Louis)、及び好中球標識抗体として抗マウスLy-6B.2抗体(monoclonal antibody to neutrophils-FITC, clone 7/4; Acris Antibodies GmbH, Herford)、又は組織マクロファージ標識抗体として抗マウスMOMA-2抗体(monoclonal antibody to macrophages/monocytes-FITC, clone MOMA-2; Acris Antibodies GmbH, Herford)をそれぞれ $2 \mu\text{L}$ ずつ添加して室温で30分間インキュベートした。その後、リン酸緩衝液を添加して1 mLに調製し、flow cytometer (ALTRA II System; ベックマン・コールター、東京)を用

いて BALF 中の細胞組成を測定し、BALF 中の好中球数を算出した。また、BALF 上清中の chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) 量及び TNF- α 量はそれぞれ、Mouse CXCL1/KC Quantikine ELISA Kit 及び Mouse TNF- α Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis) を用いて測定した。

5. 肺の採取及び固定 組織染色に用いるため、薬物の最終投与から 1 日後に肺を採取した。Pentobarbital 過麻酔によりマウスを安楽死させ、気管を切開して静脈カテーテルを挿管・固定し、肺を採取した。肺をリン酸緩衝液で洗浄した後、静脈カテーテルを通じて 10% phosphate buffered formalin (1 mL/lung) を注入し、20 cm H₂O 圧を加えた状態で 10% phosphate buffered formalin に 4 時間浸漬した。その後、静脈カテーテルを除去して 10% phosphate buffered formalin に 68 時間浸漬し、肺を固定した。固定後、肺は流水中にて一晩洗浄した上で 70% ethanol を用いて 8 時間以上の脱水処理を行った。さらに完全に脱水するため肺を 100% ethanol に浸漬した。脱水後に肺に xylene (富士フィルム和光純薬、大阪) 及び paraffin (桜ファインテックジャパン、東京) を浸透させて paraffin 包埋した。包埋した肺は、ミクロトームを用いて厚さ 4 μ m の切片に加工し、室温にて保存した。

6. Hematoxylin and eosin 染色 4 μ m の肺切片に、xylene による脱 paraffin 処理及び ethanol による親水化を施し流水洗浄した上で、Mayer's hematoxylin solution (富士フィルム和光純薬) を用いて染色した。染色後、流水及び精製水を用いて洗浄し、さらに eosin Y ethanol solution (富士フィルム和光純薬) を用いて染色した。その後、ethanol による脱水、及び xylene に浸漬による透徹を施し、Multi Mount 480 (松浪硝子工業、大阪) を用いて封入した。染色した肺切片は、光学顕微鏡を用いて観察した。

7. 統計解析 実験結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego) を用いて ANOVA 検定後、Dunnett の多重比較検定を実施した。また、2 群間の検定は unpaired *t*-test with Welch's correction 又は Mann-Whitney test を用いて行い、 $p < 0.05$ の場合に統計学的有意な差があると判断した。

結 果

1. LPS 曝露によって誘発した肺組織中の病態形成に対する Src 阻害薬の効果 LPS を曝露させた際のマウスの肺における病態変化と Src の関連を検討するため、マウスに 3 日間、dasatinib (40 μ g/mL) 投与及び LPS 経鼻曝露をそれぞれ 1 日 2 回行い、採取した肺の切片を hematoxylin and eosin (H&E) 染色し、光学顕微鏡で観察した。

マウスに LPS を 3 日間曝露させると、control 群と比較して肺胞内及び肺胞壁中に炎症性細胞と考えられる細胞の増加が観察された [Figs. 1 (A) and (B)]. これに対して dasatinib を投与したマウスでは、control 群のマウスに比較すると肺胞中に存在する細胞数が増加していたものの、LPS 曝露のみを行ったマウスに比し細胞数が著明に減少した [Figs. 1 (A) and (C)]. すなわち、dasatinib は LPS によって誘発された肺における炎症の病態形成を抑制する可能性が示された。

2. LPS 曝露によって誘発した BALF 中の炎症性細胞数の増加に対する Src 阻害薬の効果 マウスに LPS 曝露、及び dasatinib (4, 40, 及び 400 μ g/mL) 投与をそれぞれ 1 日 2 回実施して、BALF 中の総細胞数、好中球数、及びマクロファージ数を測定した。3 日間 LPS 曝露によって BALF 中の総細胞数、好中球数、マクロファージ数が、control 群に対していずれも有意に増加した (Fig. 2)。これに対して、4 μ g/mL の dasatinib は、これら炎症性細胞数の増加を抑制しなかったが、40 μ g/mL の dasatinib は、組織学的変化とよく一致し、炎症性細胞数の増加を有意に抑制した (Fig. 2)。また、400 μ g/mL の dasatinib を投与した群では、40 μ g/mL 投与群と同程度の炎症性細胞数が観察された。すなわち、dasatinib は、40 μ g/mL で最大反応を示し、炎症性細胞数の増加を抑制することが示唆された。

3. LPS 曝露によって誘発した BALF 中のサイトカイン/ケモカイン量の増加に対する Src 阻害薬の効果 好中球等の炎症性細胞浸潤及び炎症の病態形成に関与するサイトカイン・ケモカインとして、BALF 中の CXCL1 量及び TNF- α 量を測定した。BALF 中の CXCL1 量は LPS 曝露によって有意に増加し、dasatinib は、4 μ g/mL では統計学的に有

Fig. 1. Dasatinib, a Src Inhibitor, Attenuated Histopathological Changes of Neutrophilia Induced by LPS

Mice were intranasally administrated with LPS twice daily for 3 d and intranasally treated with dasatinib (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 h prior to the each LPS exposure. Lung sections stained with H&E staining were prepared from control (A), LPS (B), and LPS + dasatinib (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C) groups, respectively. Magnification, $\times 200$.

Fig. 2. Dasatinib, a Src Inhibitor, Attenuated LPS-induced Neutrophilia

Mice were intranasally administrated with LPS twice daily for 3 d and intranasally treated with dasatinib (4, 40, and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 h prior to the each LPS exposure. The numbers of (A) alveolar total cells, (B) neutrophils and (C) macrophages in BALF were measured by hemocytometer and flow cytometer, respectively. Data represent mean $\pm$ S.E.M. ($n = 4$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as compared with the control group, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$).

Fig. 3. Dasatinib, a Src Inhibitor, Attenuated the Accumulation of Inflammatory Cytokine in BALF Induced by LPS

Mice were intranasally administrated with LPS twice daily for 3 d and intranasally treated with dasatinib (4, 40, and 400 $\mu\text{g/mL}$) 2 h prior to the each LPS exposure. The accumulation of CXCL1 (A) and TNF- α (B) in BALF were measured by ELISA kit, respectively. Data represent mean $\pm$ S.E.M. ($n = 4$, *** $p < 0.001$, as compared with the control group, ### $p < 0.001$).

意ではないものの薬物非投与群に比し約 72.3%まで抑制し、40 及び 400 $\mu\text{g/mL}$ では有意に抑制した [Fig. 3 (A)]. BALF 中の TNF- α 量についても、LPS 曝露によって有意に増加し、4, 40 及び 400 $\mu\text{g/mL}$ の dasatinib は、統計学的に有意ではないものの、薬物非投与群に比しそれぞれ約 64.5, 63.1 及び 57.3%まで抑制した [Fig. 3 (B)]. すなわち、dasatinib は、BALF 中のサイトカイン量に対しては 4–40 $\mu\text{g/mL}$ で最大反応を示し、これらを抑制することが示唆された。

考 察

COPD や気管支喘息は持続的な末梢気道炎症を基礎とするため、炎症の制御はこれらの疾患の治療に重要である。しかし、COPD や重症喘息の患者では、コルチコステロイド感受性の低下が観察され、炎症の制御の妨げとなることがある。また、種々の呼吸器感染症もコルチコステロイド感受性を低下させる要因であり、COPD や気管支喘息に感染症を併発し急性増悪した場合も、炎症の制御は困難であると考えられる。そこで本研究では、ステロイド抗炎症薬によって炎症が抑制されない気道炎症モデルとして、マウスに 3 日間 LPS 曝露させることで気道炎症を誘発した。われわれは以前、雄性 A/J 系マウスにおいて、タバコ主流煙及び poly(I:C) 曝露又は LPS 曝露によって肺の HDAC2 量が減少し、コルチコステロイド感受性が低下することを報告している。^{11,23)} ステロイド抗炎症薬が炎症を抑制する機序の 1 つとして、glucocorticoid receptor (GR) が HDAC2 などと複合体を形成し、プロモー

ター領域上の glucocorticoid responsive element に結合することで炎症関連遺伝子の発現を抑制することが知られている。^{24,25)} また、HDAC2 は GR のリン酸化レベルやアセチル化レベルを調節することで GR の活性を調節する機能を持つ。^{24,26)} HDAC2 量の低下は、COPD や重症喘息においてコルチコステロイド感受性を低下させる重要な機序の 1 つと考えられることから、本研究で用いた気道炎症モデルは、これらの疾患の少なくとも一面を反映する有用な実験系であると考えられる。加えてわれわれは、poly(I:C) によるコルチコステロイド感受性の低下が、BALB/c 系、C57BL/6 系においても観察されることも報告した。¹²⁾ そこで、A/J 系マウスで観察された結果は同様に他の系統でも観察されと考え、本報告においても A/J 系マウスを使用した。

本研究において、LPS によって誘発した肺胞内及び BALF 中の炎症性細胞数の増加が、dasatinib によって用量依存的かつ有意に抑制された。また、BALF 中の炎症性サイトカイン・ケモカイン量についても、CXCL1 量が有意に抑制され、TNF- α 量にも dasatinib による抑制傾向が観察された。Dasatinib による抗炎症作用は 40 $\mu\text{g/mL}$ の経鼻投与によってほぼ最大反応に近い抑制効果が観察されたと考えられた。TLR4 は inhibitor of kappa B kinase (IKK) 及び interferon regulatory factor を介して炎症を誘導するが、Src 依存的に epidermal growth factor receptor (EGFR) 及び platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) を介して nuclear factor- κB (NF- κB) を活性化することでも炎症を誘導することが報告されている。^{15,27)} また、

タバコ主流煙曝露誘発気道炎症やアレルギー性気道炎症では、PKC, TCR, IgE 及び dual oxidase 1 により活性化された Src が, EGFR, p38 mitogen activated protein kinase (MAPK), 及び extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化を介して気道炎症を誘導する.^{18,19,28)} したがって, Src の活性化は, 種々の気道炎症に共通する炎症誘導の機序であると考えられる. 本研究においても dasatinib は, Src 依存的な p38 MAPK 及び NF- κ B の活性化を介したサイトカイン・ケモカイン発現を抑制することで, 肺での炎症性細胞の増加を抑制した可能性が考えられた. また, dasatinib の効果が限定的であったことから, Src 非依存的な炎症誘導経路の影響が考えられるものの, Src は気道炎症を制御するための新たな標的として有用であると考えられた. 様々な呼吸器疾患における気道炎症が Src と関連する可能性があるため, 今後, 他の気道炎症モデルに対する Src 阻害薬の効果についても検討していく必要がある.

p38 MAPK は, 細菌感染や Th2 サイトカイン刺激によるコルチコステロイド感受性の低下にも関与することが報告されている.^{6,29)} また, タバコ主流煙曝露誘発気道炎症においても, Src 及び p38 MAPK 活性の両方を阻害する新規化合物により気道炎症及びコルチコステロイド感受性の低下が改善されることが報告されている.³⁰⁾ したがって, Src を介した p38 MAPK の活性化は, 本研究で用いた病態モデルを始めとする様々な気道炎症において炎症のみならずコルチコステロイド感受性の低下にも関与する可能性が考えられる. Src とコルチコステロイド感受性の関連についても今後の検討を重ねていく必要はあるが, 今回の実験結果より, COPD や重症喘息といったステロイド抗炎症薬による治療が困難な呼吸器疾患に対して Src は重要な治療標的になる可能性が示された.

本研究において, Src 阻害作用を持つ dasatinib によって LPS により誘発された肺における炎症性細胞数の増加が抑制されたことから, ステロイド抗炎症薬で抑制されない気道炎症の誘発に, Src が少なくとも一部関与することが示唆された. Src が活性化するシグナルには炎症及びコルチコステロイド感受性の低下に関連するシグナルが含まれることから, Src を治療のターゲットとすることは, 多くの

呼吸器疾患の治療に貢献する新たな治療戦略の 1 つとなることが期待される.

謝辞 本研究の一部は, 文部科学省 私立大学研究ブランディング事業「スポーツ日大によるアンチ・ドーピング教育研究拠点確立とポストオリンピックへの展開」の助成を受けて行った.

利益相反 開示すべき利益相反はない.

REFERENCES

- 1) Rogers D. F., *Respir. Care*, **52**, 1134–1149 (2007).
- 2) Chung K. F., *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **2**, 347–354; discussion 371–372 (2005).
- 3) Sethi S., Wrona C., Eschberger K., Lobbins P., Cai X., Murphy T. F., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **177**, 491–497 (2008).
- 4) Bauer C. M. T., Zavitz C. C. J., Botelho F. M., Lambert K. N., Brown E. G., Mossman K. L., Taylor J. D., Stämpfli M. R., *PLoS One*, **5**, e13251 (2010).
- 5) Hewitt R., Farne H., Ritchie A., Luke E., Johnston S. L., Mallia P., *Ther. Adv. Respir. Dis.*, **10**, 158–174 (2016).
- 6) Barnes P. J., Adcock I. M., *Lancet*, **373**, 1905–1917 (2009).
- 7) Barnes P. J., *Br. J. Pharmacol.*, **163**, 29–43 (2011).
- 8) Papi A., Contoli M., Adcock I. M., Bellettato C., Padovani A., Casolari P., Stanciu L. A., Barnes P. J., Johnston S. L., Ito K., Caramori G., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **132**, 1075–1085.e6 (2013).
- 9) Cho Y. S., Kim T. B., Lee T. H., Moon K. A., Lee J., Kim Y. K., Lee K. Y., Moon H. B., *Clin. Exp. Allergy*, **35**, 1625–1631 (2005).
- 10) Nguyen T. H., Maltby S., Simpson J. L., Eysers F., Baines K. J., Gibson P. G., Foster P. S., Yang M., *J. Immunol.*, **196**, 3547–3558 (2016).
- 11) Ueda K., Nishimoto Y., Kimura G., Masuko T., Barnes P. J., Ito K., Kizawa Y., *Biochem. Biophys. Rep.*, **7**, 367–373 (2016).
- 12) Kimura G., Ueda K., Eto S., Watanabe Y., Masuko T., Kusama T., Barnes P. J., Ito K., Kizawa Y., *Chest*, **144**, 99–105 (2013).

- 13) Senis Y. A., Mazharian A., Mori J., *Blood*, **124**, 2013–2024 (2014).
- 14) Wu Y., Span L. M., Nygren P., Zhu H., Moore D. T., Cheng H., Roder H., DeGrado W. F., Bennett J. S., *J. Biol. Chem.*, **290**, 15825–15834 (2015).
- 15) Cho R. L., Yang C. C., Lee I. T., Lin C. C., Chi P. L., Hsiao L. D., Yang C. M., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **310**, L639–L657 (2016).
- 16) Kumar A., Jaggi A. S., Singh N., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **29**, 115–130 (2015).
- 17) Toubiana J., Rossi A. L., Belaidouni N., Grimaldi D., Pene F., Chafey P., Comba B., Camoin L., Bismuth G., Claessens Y. E., Mira J. P., Chiche J. D., *Innate. Immun.*, **21**, 685–697 (2015).
- 18) El-Hashim A. Z., Khajah M. A., Renno W. M., Babyson R. S., Uddin M., Benter I. F., Ezeamuzie C., Akhtar S., *Sci. Rep.*, **7**, 9919 (2017).
- 19) Geraghty P., Hardigan A., Foronjy R. F., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **50**, 559–570 (2014).
- 20) O'Hare T., Walters D. K., Stoffregen E. P., Jia T., Manley P. W., Mestan J., Cowan-Jacob S. W., Lee F. Y., Heinrich M. C., Deininger M. W., Druker B. J., *Cancer Res.*, **65**, 4500–4505 (2005).
- 21) Fraser C. K., Lousberg E. L., Kumar R., Hughes T. P., Diener K. R., Hayball J. D., *Exp. Hematol.*, **37**, 1435–1444 (2009).
- 22) He K., Lago M. W., Iyer R. A., Shyu W. C., Humphreys W. G., Christopher L. J., *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 2564–2570 (2008).
- 23) To Y., Ito K., Kizawa Y., Failla M., Ito M., Kusama T., Elliott W. M., Hogg J. C., Adcock I. M., Barnes P. J., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **182**, 897–904 (2010).
- 24) Barnes P. J., Adcock I. M., Ito K., *Eur. Respir. J.*, **25**, 552–563 (2005).
- 25) Barnes P. J., *Br. J. Pharmacol.*, **148**, 245–254 (2006).
- 26) Ito K., Yamamura S., Essilfie-Quaye S., Cosio B., Ito M., Barnes P. J., Adcock I. M., *J. Exp. Med.*, **203**, 7–13 (2006).
- 27) Li J., Wang X., Zhang F., Yin H., *Pharmacol. Ther.*, **138**, 441–451 (2013).
- 28) Habibovic A., Hristova M., Heppner D. E., Danyal K., Ather J. L., Janssen-Heininger Y. M. W., Irvin C. G., Poynter M. E., Lundblad L. K., Dixon A. E., Geiszt M., van der Vliet A., *JCI Insight*, **1**, e88811 (2016).
- 29) Khalaf R. M., Lea S. R., Metcalfe H. J., Singh D., *Respir. Res.*, **18**, 61 (2017).
- 30) Charron C. E., Russell P., Ito K., Lea S., Kizawa Y., Brindley C., Singh D., *Eur. Respir. J.*, **50**, 1700188 (2017).