

ATP 誘導性気道上皮バリア形成促進に関与する
プリン作動性受容体の同定
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系呼吸器内科学専攻

津谷 恒太

修了年 2019 年

指導教員 権 寧博

I. 研究の目的

気管支喘息(以下, 喘息)とは「気道の慢性炎症を本態とし, 臨床症状として変動性を持った気道狭窄(喘鳴・呼吸困難)や咳嗽で特徴付けられる疾患」と定義されている¹. 気道炎症には好中球, 好酸球, 好塩基球, リンパ球, 肥満細胞などの炎症細胞の活性化に加え, 気道上皮細胞, 線維芽細胞, 気道平滑筋細胞などの気道を構成する細胞および様々な液性免疫因子が関与している. 気道炎症や気道過敏性の亢進による可逆性の気流制限を呈する. しかし, 炎症が持続することで, 気道障害および構造変化(リモデリング)を惹起し, 非可逆性の気流制限となり, 難治化する².

喘息の発症因子には, 遺伝的要因, アトピー性要因, 気道過敏性, 出生時低体重や肥満などに加え, 環境要因(ハウスダストダニアレルゲン(House dust mite; HDM), ウイルス感染, 喫煙, 大気汚染, 食物など)がある. これらの相互作用によって喘息病態が形成される³. ダニアレルゲンやウイルス感染などの環境要因は, 気道上皮の障害を誘導し, 外来吸入抗原の侵入を容易にし, アレルギー性気道炎症を惹起しているといわれている⁴. 特に喘息病態を誘導する代表的な環境要因である HDM は, 内在するプロテアーゼより上皮バリアが破壊されるとともに, 上皮細胞表面に発現する自然免疫受容体の代表である Toll-like receptor⁴ を介してアレルギー性炎症を誘導する⁵.

また, 喘息患者の気道上皮バリア機能は, 健常者と比較して脆弱であり⁶, さらに病態悪化の要因となっている. 気道上皮バリアの増強および減弱を抑制することが喘息の新たな治療となる可能性がある.

気道上皮バリアは, 外界からの病原体および抗原侵入を阻止する生体防御機構である. 気道上皮細胞間の隙間を埋めるように存在している細胞間接着構造であり, この構造には, 隣接する細胞間の細胞膜を密着させる密着結合 Tight junction (TJ), 細胞形態を維持する接着結合 Adherens junction (AJ), 細胞同士をつなぎ合わせるデスモソーム

Desmosome などが存在する⁷。TJにはクラウディン(Claudin; CLDN)やオクルディン Occludin , 裏打ちタンパクである Zonula Occludens (ZO)-1, ZO-2, ZO-3 などが関与しており⁸、AJにはカドヘリン Cadherin などが関与している。この TJ や AJ の破綻が、上皮バリア機能を低下させる分子病態の1つである。HDMは、そのプロテアーゼ活性により気道上皮細胞間の TJ を破壊し、また気道上皮プロテアーゼインヒビター活性を抑制することが報告されている^{9 10 11}。様々な環境因子によって TJ や AJ が破綻し、喘息患者のバリア機能脆弱化につながっていると考えられる。そこで本研究では、喘息病態に関与する環境因子と気道上皮バリア機能に着目した。

アデノシン三リン酸(adenosine triphosphate; ATP)は、生体機能を維持するために不可欠なエネルギー供給に関与するヌクレオチドであるが、興味深いことに、細胞外に放出された状態では細胞表面のプリン作動性受容体を介して異なる作用を有する¹²。プリン作動性受容体は、ヌクレオチドゲートで制御されたイオンチャネル型である P2X 受容体と、G 蛋白質結合型である P2Y 受容体がある¹³。ATPの一部は加水分解によって Adenosine まで分解される¹⁴。Adenosine はその受容体である A1 受容体に結合し、主に抗炎症作用を示す。

細胞障害により細胞外に放出される尿酸・核酸や細胞外 ATP などの物質群や、それらのシグナルによって放出される蛋白はアラミンと総称され、喘息病態形成に関与する内因性の環境要因であると報告されている¹⁵⁻¹⁸。ATP は免疫応答の発端である樹状細胞を分化成熟・誘導させることによって 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) 分化を誘導している¹⁹。また Ca²⁺流入によって好酸球の活性化や CD11b の発現、IL-8 産生などに関与している^{20 21}。さらにアレルギー吸入後のヒト喘息患者の気管支肺胞洗浄液(BAL)中の ATP が増加する。卵白アルブミン(OVA)抗原を用いたマウス喘息モデルを用いても BAL 中の ATP が増加し、ATP の免疫賦活作用により OVA によるアレルギー性気道炎症が誘導された。さらに

ATP 阻害薬はマウスのアレルギー性気道炎症や気道過敏性亢進を抑制した¹⁶。OVA によるマウス喘息モデルでは、P2Y2 受容体の活性化を介してアレルギー性気道炎症を進展させることが報告されており²²、ATP によるプリン作動性受容体を介した刺激は、喘息病態を増悪させる。

一方で ATP は受容体を介してイオンチャネルの透過性調整や線毛運動の促進、粘液分泌の促進を行い、吸入された抗原や感染性物質、有害物質から宿主を保護する重要な因子としても作用している²³。気道上皮はその粘液層の水分含有量が適切であれば線毛運動は適切に働き、肺を保護することが可能である。ATP は受容体を介して気道上皮表面の水分含有量を調整する重要な管腔のオートクリン、パラクリンシグナルであるとの報告もある²⁴。さらに細胞外 ATP によるプリン作動性受容体刺激は、細胞内シグナル伝達経路(ERK1/2 およびマトリックスメタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9)など)の活性化により気道上皮障害後の修復に重要な役割をはたしている²⁵。このように ATP は気道上皮に対して様々な作用を有しているが、気道上皮バリア機能を調整するプリン作動性受容体を詳細に解析した報告はない。

本研究の目的は、アラーミンの一部である ATP が上皮バリア機能に対してどのような作用を示すのかを検証し、さらにどの P2 受容体を介するのかを同定することである。これにより喘息病態に重要な気道上皮バリアを介した新たな治療標的を特定する基盤となる成果をあげる。そのために気道上皮細胞株を用いて、ATP による気道上皮バリア機能測定および受容体同定を行った。

III. 対象と方法

1) 細胞培養

ヒト気道上皮細胞株 16HBE14o- (16HBE)を使用した。16HBE は 37°C・5%CO₂条件下で培養した。培養液には Minimum Essential Medium; MEM を用い, 10% Fetal Bovine Serum (SAFC Biosciences, Lenexa, KS)・Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Nacalai Tesque, Inc, Kyoto, Japan)を添加して使用した。

2) 経上皮電気抵抗 Transepithelial Electrical Resistance の測定

気道上皮のバリア機能評価のため, TER を測定した。TER 測定には Millicell-ERS (Millipore Co, Bedford, MA) を用いた。上皮細胞のバリア機能と電気抵抗を示す TER には相関関係が認められ, 細胞層における TJ 形成に依存して TER は高値を示すとされている²⁶。TER 値 (Ohms × cm²) は, (TER sample – TER blank) × 表面積で算出した。

3) 傍細胞透過率 Apparent permeability coefficient (P_{app})の測定

16HBE の傍細胞透過率を評価するために Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran の拡散の程度により, Transwell 上の単層細胞のデキストラン透過性を測定した。FITC 溶液は 10mg/mL となるように D-PBS(-)で溶解して使用した。測定の際には Transwell apical chamber 内の medium を 20 μL 取り除き FITC を 20 μL 加え, 37°C 下のインキュベーターで 1 時間安置後にフルオロメーターを用いて蛍光測定した。蛍光度は, PTI 蛍光光度計 (excitation ; 492 nm, emission ; 520 nm) で測定した。デキストラン透過性 (P_{app})は, 以下の通りに算出した。

$$P_{app} \text{ (cm/s)} = dQ/dt(1/AC_0)$$

dQ/dt ; 透過率 ($\mu\text{g/s}$), C_0 ; Transwell 上層に加えた FITC 初期濃度($\mu\text{g/ml}$),

A ; Transwell の表面積(cm^2)

4) ATP 刺激によるバリア機能の測定

ATP を用いて 16HBE の気道上皮バリア機能における影響を検討した。ATP を、MEM を用いて $125 \mu\text{M}$ ・ $250 \mu\text{M}$ ・ $500 \mu\text{M}$ の濃度に希釈し、Transwell 上で単層培養した 16HBE へ刺激した。刺激は単層培養 24 時間後に行い、刺激当日を第 0 日として TER およびデキストラン透過性を測定した。培養液のみである非刺激群をコントロール(CTR)とし、ATP 刺激群($125 \mu\text{M}$ ・ $250 \mu\text{M}$ ・ $500 \mu\text{M}$)で比較検討した。また、測定にあたり生細胞数差がバリア機能へ影響がないことを確認するため、第 0 日および第 3 日の CTR 群・ATP 刺激群の生細胞数を比較検討した。測定にはトリパンブルーを使用した。

5) Real-time PCR

ATP 刺激による上皮バリア関連分子の遺伝子発現を変化するのかを Real-time PCR を用いて検討した。ATP 刺激第 3 日で細胞を回収し、Ambion Fast SYBR Green Cells-to-CT kit(life technologies, Carlsbad,CA)を用いて、製品プロトコールに従い Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction)解析を行った。StepOne™システムを用いて Fast SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) の製品プロトコールに従い、96 wellplate 上で反応を行った。反応は 95°C ・20 秒の反応の後、 95°C ・3 秒、 60°C ・30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行い、Ct 値は初期閾値の設定を行い決定した。各サンプルの RNA 量は比較定量法($\Delta\Delta\text{CT}$ 法)により評価した。

6) Reverse Transcription PCR

16HBE 上に発現している P2 受容体遺伝子群を確認するため、Reverse Transcription PCR を行った。採取した細胞より PrimeScript™ RT Master Mix (#RR036A, TAKARA BIO)を用いて cDNA を合成した。調整した cDNA, GeneAmp 10x PCR Buffer, dNTP Mix, Amplitaq Gold DNA polymerase を使用した。また 1.8% agarose gel を用いて電気泳動を行った。DNA 検出にはエチジウムブロマイドを用いて紫外線照射器を使用してゲルを観察した。P2X 受容体は 94°C・2 分の反応の後、94°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・30 秒を 1 サイクルとし、35cycle 行った。P2Y 受容体は 94°C・2 分の反応の後、94°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・30 秒を 1 サイクルとし、62°C・40cycle 行った。

7) P2 受容体選択的アゴニストによるバリア機能の測定

バリア機能へ影響を与える P2 受容体を特定するため、P2 受容体選択的アゴニストを用いてバリア機能を測定した。選択的アゴニストとして α β -MeATP, 2-MeSATP, ADP, UDP, UTP, 2-MeSADP を使用した。それぞれの試薬に対して、非刺激群である CTR 群および刺激群(125 μ M・250 μ M・500 μ M)で比較検討した。16HBE を 24 穴 Transwell 上において 1×10^5 cells/well で単層培養し、培養液は 24 時間後に試薬を含有したものと交換した。試薬は Transwell の apical および basal chamber 双方に加え、第 3 日に TER およびデキストラン透過性を測定した。

8) P2 受容体選択的アンタゴニストによるバリア機能の測定

選択的アゴニストによりバリア機能へ影響を与える可能性のある P2 受容体に対して、選択的アンタゴニストを用いて TER 測定を行った。選択的アンタゴニストとして

MRS2179・AZD1283・Clopidogrel・MRS2211を使用した。比較は非刺激群である CTR 群, ATP 単独刺激群(500 μ M), MRS2179・AZD1283・Clopidogrel・MRS2211 単独投与群 (10 μ M・50 μ M・100 μ M), および ATP+各アゴニスト投与群で検討した。16HBE を 24 穴 Transwell 上において 1×10^5 cells/well で単層培養し培養液は 24 時間後に交換した。選択的アンタゴニストを含有した培養液で 15 分間前処置後に, ATP を添加した。ATP 試薬は Transwell の apical および basal chamber 双方に加え, 第 1 日に TER を測定した。

IV. 結果

1) ATP による気道上皮バリア機能の増強

TER は第 1 日, 第 2 日, 第 3 日で, CTR 群と比較して濃度依存性に有意に上昇した。また第 3 日でのデキストラン透過性は CTR 群と比較して ATP 刺激群は濃度依存生に有意に低下した。生細胞数差に関しては, 第 0 日, 第 3 日において CTR 群と ATP 刺激群では有意差は認められなかった。また, ATP 刺激によるバリア機能関連分子群の遺伝子発現への影響を検討するため Real-time PCR (Polymerase Chain Reaction)解析を行った。CTR 群と比較して, ATP 刺激第 3 日で E-Cadherin, Occludin, Zo-1, Zo-2, JAM-A, JAM-C, CLDN1,3,4,6,9 で有意に発現量が増加していた。

2) 気道上皮における P2X および P2Y 受容体発現の確認。

16HBE において, P2X 受容体では P2X4 の発現が認められ, P2Y 受容体では P2Y1,2,4,6,11,12,13,14 の発現が確認された。

3) ATP 受容体に対する選択的アゴニストによるバリア機能増強

第3日において CTR 群と比較すると、 $\alpha\beta$ -MeATP 刺激群ではいずれの濃度群でも TER, デキストラン透過性ともに有意差はみられなかった。2-MeATP 刺激群ではいずれの濃度群でも TER, デキストラン透過性ともに有意差を認めた。ADP 刺激群では CTR 群と比較して TER は $500\ \mu\text{M}$ 濃度群で有意差が認められなかったが、濃度依存的に TER は変化しており、デキストラン透過性は全ての群で有意差を認めた。UTP 刺激群では $250\ \mu\text{M}$ 濃度群で有意差を認めたが、 $125\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$ では認めず、デキストラン透過性も傾向は同じであった。UDP 刺激群では CTR 群と比較して全ての濃度群で有意差を認めなかった。2-MeSADP 刺激群では CTR 群と比較して $125\ \mu\text{M}$ 濃度群では有意差を認めなかったものの、 $250\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$ では TER, デキストラン透過性ともに有意差を認めた。これらの結果から、関与する受容体は P2Y_{1,12,13} である可能性が示唆された。

4) ATP 受容体に対する選択的アンタゴニストによるバリア機能の抑制

ATP 単独群と比較して、P2Y₁ 受容体阻害剤である MRS2179 投与群では $10\ \mu\text{M}$ 濃度群でのみ有意差が認められたが、他の濃度群では有意差は認められなかった。P2Y₁₂ 受容体阻害剤である AZD1283, Clopidogrel は全ての濃度群で TER は有意に低下した。P2Y₁₃ 受容体阻害剤である MRS2211 も全ての濃度群で TER は有意に低下した。これらの結果から、ATP 受容体に対する選択的アンタゴニストとして P2Y_{12,13} の関与が明らかとなった。

V. 考察

本研究では ATP がプリン作動性受容体である P2Y_{12,13} を介して気道上皮バリア機能形成を促進することを証明した。

今回、気道上皮細胞のバリア機能を評価するために経上皮電気抵抗 **Transepithelial Electrical Resistance** を測定し評価した。TER の測定ではイオン透過性により数値に影響が生じてしまう可能性がある^{27,28}ため、傍細胞透過率(デキストラン透過性)を併用して評価した。気道上皮細胞に ATP 刺激を加えると濃度依存的に上皮バリア機能形成が促進されることが示唆された。また、ATP は細胞増殖に関与する報告もある¹²ことから、ATP 刺激によるバリア機能形成の促進が細胞増殖による影響でないことを確認するため、CTR 群と ATP 刺激群で生細胞数の比較を行った。その結果、生細胞数差は認められず、バリア機能形成の促進には細胞増殖の関与は否定された。上皮細胞間には細胞間接着構造が存在しているが、特に上皮バリア機能という面では主に TJ が関与している。TJ には主に 2 つの役割があり、まずフェンスのように作用することで偏極した細胞の頂端および側底の境界を画定する。そして膜タンパク質が 2 つの膜の区画間で自由に拡散するのを防止する。この機能は頂端および側底領域が、それらの異なる脂質およびタンパク質組成を維持するために必要とされている。TLR3 のリガンドである double stranded RNA は 16HBE のバリア機能を減弱させ、CLDN ファリミーを中心とした TJ 分子の発現量を減弱させるが、AJ である E-Cadherin の発現量は減弱させなかったとの報告がある²⁹。本研究の Real-time PCR の結果から、16HBE に ATP 刺激を行うと E-Cadherin, Occludin, ZO-2, JAM-A, JAM-C, CLDN1,3,4,6,9 での発現量が増加することが明らかとなった。このように特定の細胞間接着装置のみが活性化されているのではなく、TJ および AJ を含めた複数の接着装置が関与していることが証明された。ATP は TJ および AJ を含めた気道上皮バリア機能や細胞骨格自体の維持調整など生体維持に重要な役割を果たしている可能性が

あり、本研究の結果から、持続する ATP 刺激は、その上皮バリア機能形成を全体として促進している可能性が示唆された。

また、これまでの報告では、気道上皮細胞におけるプリン作動性受容体の発現は P2X(1, 4, 6, 7), P2Y(1, 2, 4, 6, 14)であった¹³。本研究で使用した 16HBE には P2Y 受容体が優位に発現していることが明らかとなった。P2Y 受容体の内因性リガンドとしての ATP は、P2Y6 および P2Y14 を除く全ての P2 受容体に結合する³⁰。その結合性は P2Y 受容体のシグナル伝達の複雑性を示している。低濃度の ATP では、P2Y11 受容体の唯一のアゴニストであるが、高濃度の ATP では P2Y1 および P2Y13 受容体の部分的なアゴニストとして、またヒトの P2Y4 および P2Y12 受容体のアンタゴニストとして作用するなど受容体特異的リガンドとしては言い難い^{30 31 32}。ATP 以外の他のヌクレオチドである ADP, UTP, UDP などは P2Y 受容体に対してより特異的に結合する³³。ADP は P2Y1,12,13 受容体を、UTP は P2Y2,4 受容体を、UDP は P2Y6 受容体をそれぞれ活性化させる。そのため本研究ではプリン作動性受容体の上皮バリア形成促進の機序への関与を検討するために ATP 以外のリガンド刺激を行った。P2Y 受容体のアゴニストとして作用する ADP では有意にバリア機能形成が促進したため、これに特異的結合をする P2Y1,12,13 受容体がバリア機能形成の促進に影響していることを特定した。

次にこれらの受容体が ATP による気道上皮バリア形成の促進に関与することを、選択的アンタゴニストを用いて確認を行った。MRS2179 は P2Y1 受容体を³⁴、AZD1283 および Clopidogrel は P2Y12 受容体を³⁵、MRS2211 は P2Y13 受容体を³⁶それぞれ阻害する。AZD1283, Clopidogrel, MRS2211 で ATP によるバリア機能形成の抑制効果を示した。このことから P2Y12,13 受容体が気道上皮バリア機能形成に関与することが確認できた。これまでは P2Y12 受容体は血小板での報告が多くされてきているが、最近になり内皮細胞や血管平滑筋細胞などで P2Y12 受容体の発現が明らかとなってきた³⁷。また P2Y12 は

アスピリン喘息の病態に関与するとの報告がある³⁸が、気道上皮バリア形成に関与する報告はこれまでにはない。P2Y13についても同様に気道上皮に関する報告がない。

P2Y12,13 受容体は G タンパク質共役型受容体(GPCR)の中でも G_i タンパク質と共役している受容体である。G_i の活性化によりアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性化が抑制され、細胞内の cAMP 濃度が減少する。しかし上皮バリア機能形成における細胞接着関連分子へのシグナル経路は未だ解明されておらず、今後、P2 受容体の下流にある気道上皮バリア形成促進のシグナル経路の詳細な解析が新たな治療標的となる可能性がある。細胞接着関連分子への関与に関して、気道上皮ではないが最近の報告では、イヌ腎尿細管上皮細胞(MDCK 細胞)においては細胞接着関連分子の調節に AMP 活性化タンパク質キナーゼ(AMPK)が関与しているとの報告がある³⁹。AMPK は触媒性 α-サブユニットからなる偏在性のセリン/スレオニンキナーゼであり、AMPK 活性化は上皮 TJ 集合の初期段階を促進すると言われている。AMPK は AJ タンパク質であるアフアディンをリン酸化し、TJ タンパク質である ZO-1 との相互作用を調整し、それにより細胞膜への ZO-1 分布を促進する。気道上皮において同様の調節経路が存在するのかは解明されていないため、今後の検討課題と考えられる。

OVA を用いたマウス喘息モデルの報告では、P2Y12 アンタゴニストはアレルギー性気道炎症を抑制する。また、Idzko らの報告でも、同様の動物モデルで、細胞外 ATP が喘息病態を増悪させている¹⁶。しかし本研究では、ATP は気道上皮バリア機能を増強しており、上皮バリアが脆弱な喘息病態を改善することが期待される結果となった。ATP は Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) を介して気道上皮障害の修復を促進する作用がある^{40 41}。気道上皮バリア増強にも EGFR を介する⁴²ことから、本研究における ATP によるバリア機能形成の促進は、矛盾しない結果と考えられた。また、膜型酵素 CD39/CD73 は ATP を分解し、Adenosine を産生することにより抗炎症作用を誘導する

13. 喘息病態を抑制的に制御するといわれる制御性 T 細胞は CD39/CD73 を発現しており⁴³, ATP による喘息病態抑制の可能性も推測される. 上皮バリア機能の増強については, 腸管上皮バリアを増強するとの報告はある⁴⁴が, 気道上皮細胞におけるバリア機能形成の促進あるいは増強といった報告はなく, 本研究がその最初の報告と考えられる. また気道上皮バリア機能を *in vivo* で評価する実験系自体が困難であり, P2 受容体へ作用後のシグナル経路を確認する方法も確立されていないため, *in vivo* における気道上皮バリア機能形成促進に関する報告もこれまでされていない. 気道上皮バリア機能形成促進のメカニズムが判明することで, P2Y_{12,13} 受容体への選択的刺激薬として今後は臨床応用できる可能性がある. 本研究では ATP 刺激を気道上皮細胞の管腔側(apical)および基底膜側(basal)の双方から刺激を行っているが, 我々の研究室の予備実験では気道上皮細胞の管腔側(apical)ではなく基底膜側(basal)での ATP 刺激によりバリア機能形成が促進することが示唆された. そのため管腔側に作用する吸入剤ではなく, 基底膜側のみ作用させる内服薬などの全身投与が可能となれば臨床応用も可能になるのではないかと考えられる. ATP およびその分解産物である Adenosine を含めたプリン作動性受容体経路と気道上皮バリア機能形成の関係について, 今後検討する必要がある.

本研究により, ATP が気道上皮におけるバリア機能形成を促進することを明らかにした. さらに気道上皮バリア機能形成の促進には P2Y_{12,13} 受容体を介して機能することを証明した.

XI. 引用文献

1. 喘息予防・管理ガイドライン 2015: 社団法人日本アレルギー学会喘息ガイドライン専門部会監修. 東京: 協和企画; 2015
2. Haldar P, Pavord ID. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;119:1043-52; quiz 53-4.
3. Ford ES. The epidemiology of obesity and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005;115:897-909; quiz 10.
4. 橋本 修. 気管支喘息 ; 気道炎症の病態の解明とその制御. *アレルギー* 2017;66:168-72.
5. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, Lambrecht BN. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 2009;15:410-6.
6. Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007;120:1233-44; quiz 45-6.
7. Georas SN, Rezaee F. Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2014;134:509-20.
8. Sawada N. Tight junction-related human diseases. *Pathology international* 2013;63:1-12.
9. Shakib F, Ghaemmaghami AM, Sewell HF. The molecular basis of allergenicity. *Trends in immunology* 2008;29:633-42.
10. Shakib F, Schulz O, Sewell H. A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity. *Immunology today* 1998;19:313-6.
11. Chapman MD, Wunschmann S, Pomes A. Proteases as Th2 adjuvants. *Current allergy and asthma reports* 2007;7:363-7.
12. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *The New England journal of medicine* 2012;367:2322-33.
13. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 2014;509:310-7.
14. Faas MM, Saez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Mol Aspects Med* 2017;55:9-19.

15. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:1-5.
16. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007;13:913-9.
17. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425:516-21.
18. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews Immunology* 2008;8:279-89.
19. Yao Y, Levings MK, Steiner TS. ATP conditions intestinal epithelial cells to an inflammatory state that promotes components of DC maturation. *European journal of immunology* 2012;42:3310-21.
20. Dichmann S, Idzko M, Zimpfer U, et al. Adenosine triphosphate-induced oxygen radical production and CD11b up-regulation: Ca(++) mobilization and actin reorganization in human eosinophils. *Blood* 2000;95:973-8.
21. Kukulski F, Ben Yebdri F, Lecka J, et al. Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. *Cytokine* 2009;46:166-70.
22. Muller T, Robaye B, Vieira RP, et al. The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* 2010;65:1545-53.
23. Okada SF, Nicholas RA, Kreda SM, Lazarowski ER, Boucher RC. Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J Biol Chem* 2006;281:22992-3002.
24. Button B, Okada SF, Frederick CB, Thelin WR, Boucher RC. Mechanosensitive ATP release maintains proper mucus hydration of airways. *Science signaling* 2013;6:ra46.
25. Wesley UV, Bove PF, Hristova M, McCarthy S, van der Vliet A. Airway epithelial cell migration and wound repair by ATP-mediated activation of dual oxidase 1. *J Biol Chem* 2007;282:3213-20.
26. Grumbach Y, Quynh NV, Chiron R, Urbach V. LXA4 stimulates ZO-1 expression and transepithelial electrical resistance in human airway epithelial (16HBE14o-) cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2009;296:L101-8.
27. Powell DW. Barrier function of epithelia. *The American journal of physiology* 1981;241:G275-88.

28. Lazarowski ER, Tarran R, Grubb BR, van Heusden CA, Okada S, Boucher RC. Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279:36855-64.
29. Gon Y, Maruoka S, Kishi H, et al. DsRNA disrupts airway epithelial barrier integrity through down-regulation of claudin members. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 2016;65 Suppl:S56-8.
30. Jacobson KA, Balasubramanian R, Deflorian F, Gao ZG. G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: ligand design and receptor interactions. *Purinergic signalling* 2012;8:419-36.
31. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006;58:281-341.
32. von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & therapeutics* 2006;110:415-32.
33. von Kugelgen I, Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* 2016;104:50-61.
34. Baurand A, Raboisson P, Freund M, et al. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *European journal of pharmacology* 2001;412:213-21.
35. Zhang K, Zhang J, Gao ZG, et al. Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* 2014;509:115-8.
36. Sakamoto S, Miyaji T, Hiasa M, et al. Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Scientific reports* 2014;4:6689.
37. Ben Addi A, Cammarata D, Conley PB, Boeynaems JM, Robaye B. Role of the P2Y12 receptor in the modulation of murine dendritic cell function by ADP. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2010;185:5900-6.
38. Laidlaw TM, Cahill KN, Cardet JC, et al. A trial of type 12 purinergic (P2Y12) receptor inhibition with prasugrel identifies a potentially distinct endotype of patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2018.
39. Rowart P, Wu J, Caplan MJ, Jouret F. Implications of AMPK in the Formation of Epithelial Tight Junctions. *Int J Mol Sci* 2018;19.

40. Sarojini H, Billeter AT, Eichenberger S, et al. Rapid tissue regeneration induced by intracellular ATP delivery-A preliminary mechanistic study. *PLoS One* 2017;12:e0174899.
41. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2010;298:L715-31.
42. Sekiyama A, Gon Y, Terakado M, et al. Glucocorticoids enhance airway epithelial barrier integrity. *International immunopharmacology* 2012;12:350-7.
43. Ehrentraut H, Clambey ET, McNamee EN, et al. CD73+ regulatory T cells contribute to adenosine-mediated resolution of acute lung injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013;27:2207-19.
44. Yang Y, Qiu Y, Wang W, et al. Adenosine A2B receptor modulates intestinal barrier function under hypoxic and ischemia/reperfusion conditions. *International journal of clinical and experimental pathology* 2014;7:2006-18.