

바퀴항원 천식모델에서 기도내 바퀴항원과 CpG 병용 투여가 바퀴항원에 의한 알레르기 염증에 미치는 효과

연세대학교 의과대학 내과학교실, 알레르기연구소

손정호 · 김주영 · 이재현 · 이용원 · 홍천수 · 박종원

Intranasal Administration of Unmethylated CpG with Cockroach Antigen Prevents the Development of Cockroach-Induced Allergic Inflammation

Jung-Ho Sohn, Joo-Young Kim, Jae Hyun Lee, Yong-Won Lee, Chein-Soo Hong and Jung-Won Park

Department of Internal Medicine and Institute of Allergy, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Unmethylated CpG can induce Th1 and regulatory T cell immune responses and may modulate ovalbumin-induced mouse allergic asthma. However, the effects of CpG in a cockroach allergen asthma model have not yet been elucidated.

Objective: To evaluate whether unmethylated CpG can prevent the development of indoor allergen-induced allergic asthma.

Methods: Effects of CpG were evaluated using a cockroach allergen-induced mouse model. CpG and *Blattella germanica* (CR) allergen were co-administered intranasally, and methacholine airway hyperresponsiveness (MCh-AHR), inflammatory cells and cytokine profiles in BAL fluid and lung histology were evaluated.

Result: Co-administration of CpG with CR allergen can prevent the development of MCh-AHR and allergic inflammation in a CR-induced asthma mouse model. Eosinophils, lymphocytes, macrophages and neutrophils in BAL fluid were decreased by the co-administration of unmethylated CpG in an OVA-induced asthma model. The expression of IL-5, IL-13 and IFN- γ in BAL fluid was attenuated by the CpG. Peribronchial, perivascular inflammation, and goblet cell hyperplasia in respiratory epithelium were also markedly attenuated by the CpG.

Conclusion: These findings suggest that unmethylated CpG may have role in the immune modulation of allergic asthma induced by indoor allergens. (Korean J Asthma Allergy Clin Immunol 2009;29:194-199)

Key words: Cockroach, CpG, Asthma

서 론

천식을 포함한 알레르기 질환은 최근 들어 급증하고 있으며,¹⁾ 아직까지 그 이유에 대해서 명확하게 알려져 있지 않다. 여러 역학조사를 보면 농촌지역,²⁾ 형제가 많은 가정에서 천식 및 알레르기 질환의 유병률이 낮으며,³⁾ 많은 연구자가 감염성 질환에 노출이 적을수록 알레르기에 이환될 위험이 증가한다는 위생가설을 제시하고 있으며, 이는 바이러스, 박테리아 감염에 의한 내인성 면역기전(innate immunity)의 활성화

또는 regulatory T cell 활성화가 알레르기질환의 발생을 억제할 가능에 중점을 두고 있다.

Unmethylated cytosine-guanine dinucleotide DNA (CpG)는 척추동물에서는 드물고, 박테리아나 바이러스에 주로 관찰되는 nucleotide로 척추동물에서 강한 면역반응을 유발하고, B 세포를 직접적으로 증식 활성화 시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ CpG의 수용체인 Toll like receptor 9 (TLR 9)은 dendritic cell 이나 B세포에 항시 발현되어 있으며, CpG와 결합할 경우에는 TLR 9이 세포핵으로 이동해서 NF-kB 발현이 증가하며, dendritic cell 또는 NK cell에서 IL-10, 제1형 interferon (IFN), IFN inducible protein 10과 여러 cytokine을 발현시키는 것으로 알려져 있으며,⁵⁾ 다양한 세포에 영향을 미칠 수 있다.

여러 연구자들이 Unmethylated CpG를 이용해서 여러 알레르기 마우스 모델에서 그 치료효과를 보았다. Schistosoma egg 항원 또는 ovalbumin⁶⁾으로 감작된 마우스에서 항원과 같이 CpG를 예방적으로 투여한 경우에는 항원에 의한 호산구성

본 연구비는 연세대의 장기해외연수교수 연구비 지원(6-2004-1002)으로 이루어졌음.

책임저자 : 박종원, 서울시 서대문구 신촌동 성산로 250
연세대학교 의과대학 내과학교실, 우: 120-752
Tel: 02) 2228-1961, Fax: 02) 2227-7730
E-mail: parkjw@yuhs.ac

투고일: 2009년 6월 16일, 심사일: 2009년 7월 3일
게재확정일: 2009년 7월 25일

기도 염증, 기도과민반응, 특히 IgE 생성을 현저하게 억제하였다.^{7,8)} 또한 마우스를 OVA/alum으로 감작시킬 때에만 CpG를 피하주사할 경우에도 OVA 흡입 유발에 의한 알레르기 염증반응, 기도과민반응, 그리고 폐섬유화, 기도개형을 막을 수 있는 것으로 알려져 있다.⁹⁾

지금까지의 동물실험은 대부분 OVA를 이용하여 시행되었다. OVA는 감작 시 adjuvant가 필요하다. 그러나 실제 천식을 유발하는 집먼지진드기, 바퀴, 아스페르길루스 알레르겐 등은 protease 활성도가 높으며,¹⁰⁾ 다양한 범위의 endotoxin이 포함되어 있어서 OVA과는 다른 기전으로 알레르기 기도면역반응이 유발될 수 있다.¹¹⁾ 바퀴, 집먼지진드기 알레르겐은 다른 adjuvant없이 단독 투여만으로도 천식 모델이 유발되며,¹²⁾ 다른 알레르겐에 대한 감작을 용이하게 한다.⁶⁾

이에 본 연구는 실생활에서 흔히 노출되는 바퀴 알레르겐에 의한 천식모델에서 CpG를 바퀴항원과 병행 투여할 경우 치료효과가 있는지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 마우스 및 실험 계획

6~8주령의 여성 BALB/c 마우스(오리엔트, 대전)를 이용하였다. 모든 마우스는 American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care-approved facilities 기준에 따라 specific pathogen free 상태로 사육하였다. 본 실험은 연세대학교 실험동물 윤리위원회의 승인을 받아 이루어 졌다. 각군은 5마리로 실험을 진행하였다. Isoflurane으로 마취한 마우스에 PBS 50 μ L로 희석한 바퀴항원 300 μ g과 대조 CpG 3 μ g 투여 또는 바퀴항원과 phosphorothioate unmethylated CpG (no. 1826S) 3 μ g을 비강을 통해서 1주일에 2번씩, 5주간 투여하였다. 본 실험에서 사용한 Unmethylated CpG는 phosphorothioate backbone을 가졌으면, 염기서열은 5'-TCCATGACGTTCTCTGAC-GTT-3'였고, 대조 CpG는 5'-TCCATGAGCTTCTCTGA GTCT- 3'였다(Genotech, 대전, 한국).

2. 바퀴 항원

연세대학교 의과대학 환경의생물학교실에서 사육한 *Blattella germanica* 에서 항원을 추출하였다. 30 gam의 독일바퀴를 액체질소와 함께 분쇄하였고, 이를 200 mL의 1 : 1 ethyl ether/ethyl acetate로 탈지방화 하였다. 이후 4°C에서 phosphate-buffered saline (PBS), 6 mM/L 2-mercaptoethanol, 1 mg/mL 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourea 용액으로 바퀴 알레르겐을 24시간 동안 추출하였다. 추출액은 원심분리한 후(9,300 g, 30 분) 0.22 nm filter로 걸렀다. QCL-1000 chromogenic LAL kit로 측정된 추출액내의 endotoxin 치는 8,510 EU/mg (Cambrex, East

Rutherford, NJ, USA)이었다. 바퀴 추출액은 endotoxin 제거 column (Thermo, Rockford, IL, USA)을 이용하여 endotoxin 농도를 0.0254 EU/mg으로 낮췄다. 최종적으로 만들어진 바퀴 추출액은 동결건조하여 사용하였다.

3. Methacholine (MCh) 기도과민반응 측정

마지막 바퀴항원을 비강내로 투여한지 48시간 후에 MCh 기도과민반응을 측정하였다. Phentobarbital (70 mg/kg)으로 마취한 마우스의 기관지를 절개한 후 18 gauge 관을 삽입하여 *flexiVent 5.1*[®] (SCIREQ, Montreal, PQ, Canada)로 기도 저항과 탄성을 측정하였다. 저항 및 탄성 측정 시 10 mL/kg의 용적으로 분당 160회 기계호흡을 시켰고, 이때 positive end expiratory pressure를 3 cmH₂O로 맞췄다. 마우스는 생리식염수 및 MCh 흡입(3.1, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 mg/mL)은 10초간 Flexivent 시스템의 분무기로 흡입하였으며, 이때 기계호흡은 분당 60회, 흡입 용적은 30 mL/kg으로 맞췄다. 각각 농도의 MCh 흡입 후 2분에 기도저항 및 폐탄성을 측정하였다.

4. 기관지세척액 분석

기관지세척액은 삼관된 기관지에 1 mL의 Hank's balanced salt solution (HBSS)을 투여하여 얻었다. BALF의 총 숫자는 hemocytometer를 이용하여 측정하였다. BALF는 1.5 *ng*로 3분간 원심분리한 후 얻은 세포를 cytocentrifugation (cytospin3, Thermo, MA, USA)하였고, 이를 Diff Quick stain 하였다. 총 200개의 염증세포를 세어서 각각의 염증세포의 백분율을 얻었고, 이를 총 세포수와 곱해서 각각의 염증세포 수를 구하였다.

또한 기관지세척액을 원심분리해서 얻은 상층액을 이용해서 IL-5, IL-13, 그리고 IFN- γ 치는 ELISA 법(R&D Systems, Minneapolis, MN)으로 측정하였다.

5. 폐병변 관찰

기관지세척액 채취 후 마우스 폐를 적출하였다. 적출된 폐에 10% formalin 1 mL를 투여한 후 48시간 formaline으로 고정된 후 이를 paraffin block으로 만들었다. 이후 3 μ m 두께로 절편을 만들어 H&E 염색, 기도상피세포의 goblet cell hyperplasia 평가를 위해서 Periodic Acid-Schiff (PAS) 염색을 실시하였다.

6. 통계방법

각 군 간의 평균값 차이는 SPSS 12프로그램(SPSS Co. Chicago, IL)을 이용하여 one-way ANOVA를 이용하여 분석하였다. P value가 0.05 이하인 경우에 통계학적 의미를 두었다.

결 과

1. 바퀴 천식모델에서 Unmethylated CpG 투여가 MCh 비특이적 기도과민반응에 미치는 영향

CR 항원을 5주간 2회씩 투여할 경우 CR을 투여하지 않은 대조군에 비해 MCh 비특이적 기도과민반응이 유도되었으며, CR항원과 함께 unmethylated CpG를 병용투여할 경우에 MCh 기도과민반응이 억제되었다. MCh 투여 농도가 25와 50 mg/mL를 흡입시킨 후 측정된 마우스의 기도저항은 대조 CpG 투여군에 비해 유의하게 호전되었다(Fig. 1).

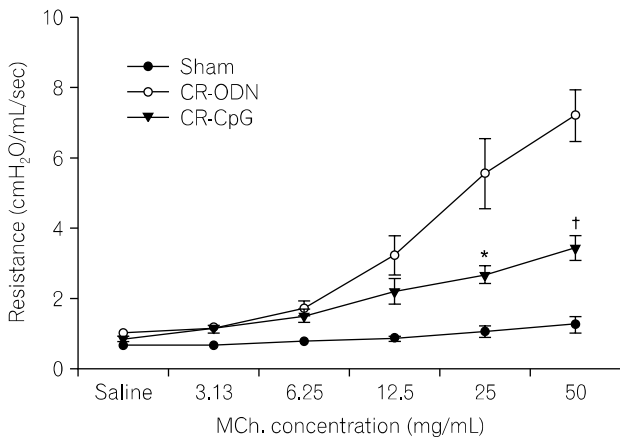


Fig. 1. Concomitant administration of unmethylated CpG with CR attenuated AHR by inhalation of MCh. Intranasal administration of CR extract induced nonspecific AHR. * $P < 0.05$ between unmethylated CpG and control ODN groups; † $P < 0.01$ between unmethylated CpG and control ODN groups.

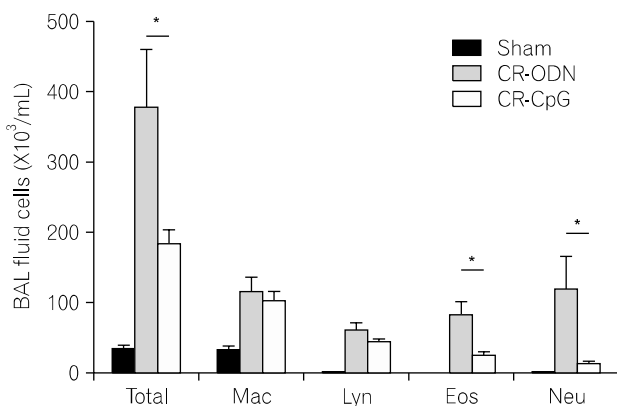


Fig. 2. Concomitant administration of unmethylated CpG with CR attenuated total inflammatory cells, eosinophils and neutrophilic inflammation induced by intranasal administration of CR compared to control ODN administration. * $P < 0.05$.

2. Unmethylated CpG투여가 기관지세척액내의 염증세포 분포 및 IL-5, IL-13, IFN- γ 치에 미치는 영향

CR를 투여할 경우 호산구, 호중구, 그리고 림프구 염증반응이 기관지세척액에서 뚜렷하였다. CR 천식 모델에서 Unmethylated CpG 투여군과 대조 CpG 투여군에서 BAL fluid내 염증세포 숫자를 비교하였다. Unmethylated CpG와 CR을 병용 투여한 군에서 대조 CpG 투여군에 비해 총 염증세포(378.0 ± 82.0 vs. $184.0 \pm 19.4 \times 10^3/\text{mL}$, $P = 0.050$), 호산구(82.9 ± 18.3 vs. $24.9 \pm 4.9 \times 10^3/\text{mL}$, $P = 0.011$), 호중구(118.6 ± 45.7 vs. $12.8 \pm 2.7 \times 10^3/\text{mL}$, $P = 0.049$)가 적었으며(Fig. 2), 기관지세척액에서의 IL-5 (17.8 ± 2.2 vs. 5.0 ± 3.5 pg/mL, $P = 0.032$), IL-13 (77.6 ± 11.5 vs. 39.1 ± 5.5 pg/mL, $P = 0.010$), 그리고 IFN- γ (582.0 ± 19.7 vs. 272.2 ± 74.8 pg/mL, $P = 0.006$)의 발현도 억제되었다(Fig. 3).

3. Unmethylated CpG 투여가 폐병변에 미치는 영향

CR과 대조 CpG 투여군에서 peribronchial 및 perivascular inflammation, 그리고 기도상피세포에서의 goblet cell hyperplasia가 유의하게 유도되었다. CR과 unmethylated CpG를 병용 투여한 군에서 대조군에 비해 유의하게 peribronchial 및 perivascular inflammation이 억제되었으며(Fig. 4A~C), 또한 기도 상피세포에서의 goblet cell hyperplasia도 의미있게 억제되었다(Fig. 4D~F).

고 찰

본 연구에서 바퀴 알레르겐과 CpG를 병용 투여할 경우 바퀴에 의한 알레르기 염증반응 및 기도과민반응, 그리고 폐의 염증성 병변 및 기도상피세포의 goblet hyperplasia가 현저하게 억제될 수 있음 증명하였고, 이는 바퀴에 감작된 천식환자에서 면역치료를 실시할 때 unmethylated CpG를 병용 투여할 경우 면역조절 기능을 향상시킬 가능성을 보여 주고 있다. 본 연구에서 사용한 unmethylated CpG는 박테리아, 바이러스에서 주로 발견되어 이는 기본적으로 위생가설을 전제로 하고 있다. 과거의 위생가설은 Th1과 Th2 면역반응이 상호 억제할 수 있으며, 환경위생이 개선됨에 따라 감염성 질환이 감소하여 Th2 면역반응이 상대적으로 강해져 유발되는 것으로 설명하고 있지만 이러한 소견은 여러 사실과 일치하지 않는다. 예를 들면 천식 및 알레르기 질환이 증가되는 지역에서도 Th1 면역반응이 중요한 역할을 하는 1형 당뇨, 염증성 장질환, 다발성 경화증 역시 증가하고 있으며, Th2 알레르기 면역반응이 유발된 천식모델에서 Th1 cell을 투여할 경우 오히려 기도 염증성 병변이 악화되는 현상이 관찰되며, 임상에

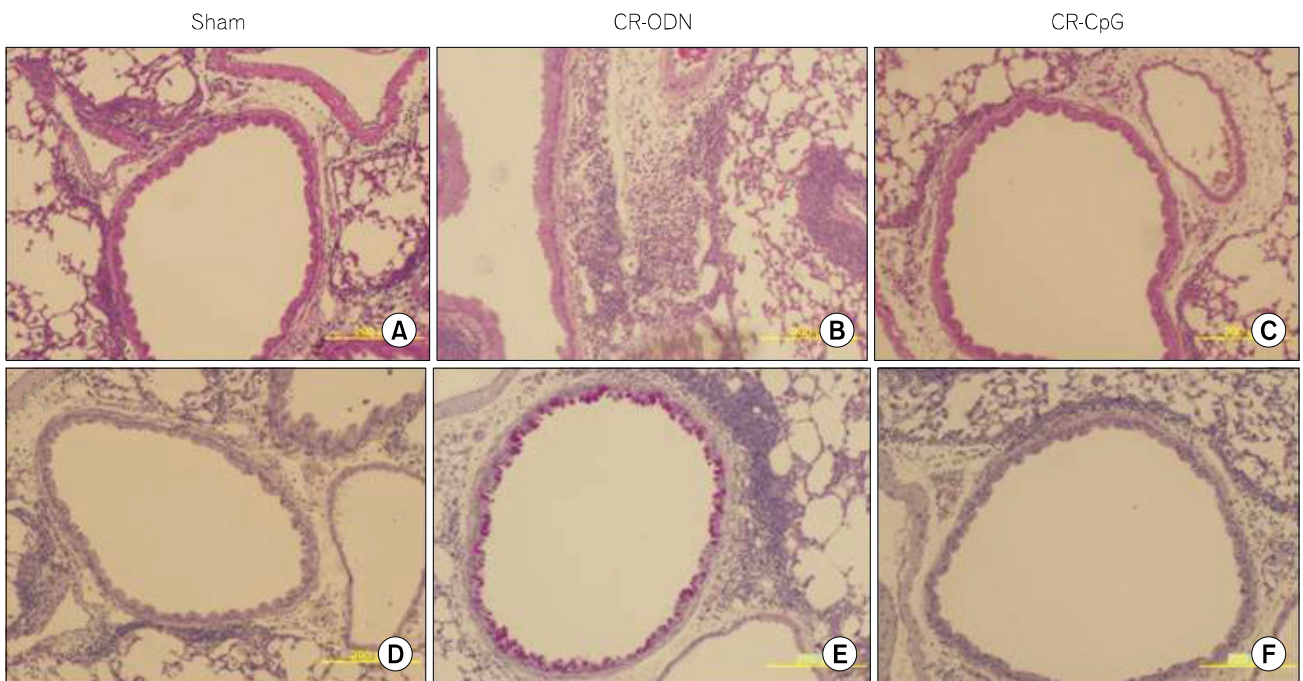
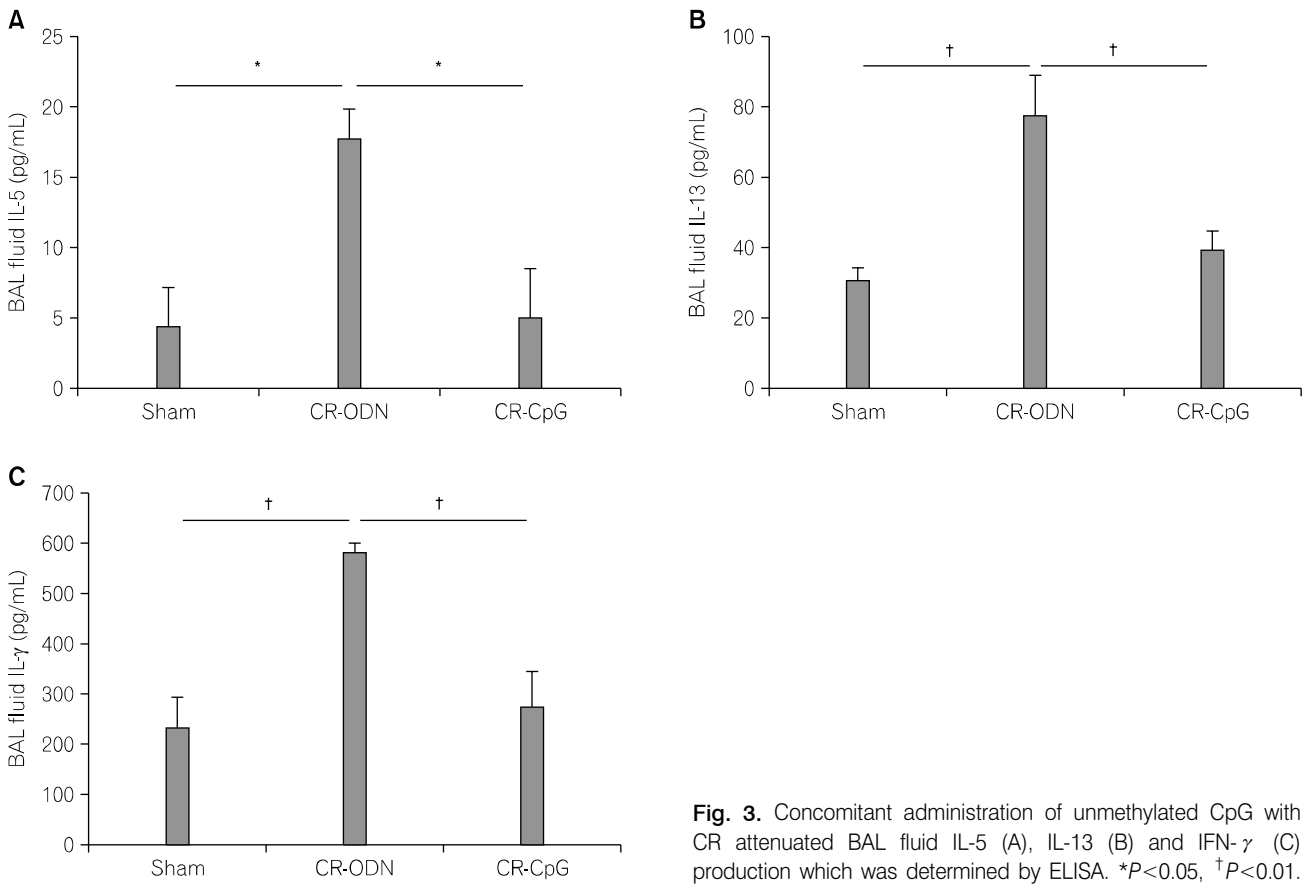


Fig. 4. Concomitant administration of CpG attenuated peribronchial and perivascular inflammation (A~C, H&E staining) and goblet cell hyperplasia of respiratory epithelium (D~F, PAS staining) compared to control ODN administration in CR asthma model.

서 보면 호흡기 바이러스 감염은 천식의 가장 중요한 악화요인이다. 최근에는 regulatory T cell 측면에서 위생가설을 설명하고 있다. 감염성 질환이 감소함에 따라 regulatory T cell의 발달이 미미하여 Th2 알레르기 면역반응이 억제되지 않아서 알레르기 질환이 발병하는 것으로 설명하고 있다. CpG의 작용기전은 아직까지도 알려져 있지 않은 부분이 많이 있다. CpG는 TLR 9과 결합하여 Th1 면역반응을 유도하여 plasmacytoid dendritic cell, B cell, NK cell에서 IL-12, IFN- γ 를 발현시키는 것으로 알려져 있으며, 이를 통해 Th1 면역반응이 강화되는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서도 unmethylated CpG 투여군에서 기관지세척액내 IL-5 및 IL-13의 발현이 현저하게 감소하였다. 그러나 특이한 점은 CpG 투여군에서 IFN- γ 측정치가 감소하였다는 점이다. Knock out 마우스를 이용한 연구를 통해서 보면 CpG가 마우스 천식모델에서 알레르기 염증반응을 억제하는데 IFN- γ 나 IL-12가 필요 없었으며,¹³⁾ in vitro 연구에서도 CpG가 IFN- γ /IL-12 knock out 마우스에서 얻은 splenocyte에서 IL-5생성을 억제하는 것으로 밝혀졌으며, 이때 IL-10이 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.^{13,14)} 이때 흥미로운 것은 CpG의 INF- γ 생성능력은 용량의존적이었으며, 낮은 농도의 CpG 농도에서 IFN- γ 생성능이 최대였으며, CpG 농도가 높을 때에는 오히려 IFN- γ 생성이 억제되었다.¹⁴⁾ 여러 실험모델을 통해서 CpG가 regulatory T cell을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.^{15,16)} 또한 CpG는 dendritic cell에서 indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)의 발현을 증가시키고 이를 통해 regulatory T cell의 숫자와 기능을 높이는 것으로 보고되고 있다.¹⁷⁾ 실제로 마우스 천식모델에서 CpG가 IDO pathway를 통해서 호산구성 기도염증반응을 억제할 수 있는 것으로 보고된 바 있다.¹⁸⁾ 본 연구에서는 바퀴 특이 IgE치, IL-10 및 TGF- β 치를 측정할 수 없어서 CpG가 과연 regulatory T cell의 발현을 증가시킬 수 있는지 알 수는 없었다. 또한 CpG 투여군에서 기관지세척액내 및 조직 병리 소견에서 볼 때 염증세포가 현저하게 감소하였으므로 CpG의 항염증효과에 의했을 가능성도 고려가 필요하다. 추후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

본 연구에서 CpG를 바퀴 항원과 같이 비강을 통해서 기도 투여하였다. 지금까지의 거의 모든 동물모델에서 OVA 또는 기생충난을 이용한 연구이었고, 집먼지진드기 알레르겐을 이용한 천식모델에서 CpG의 효과를 본 연구가 있었다.¹⁹⁾ 그러나 사람에서 천식을 유발하는 CR로 만든 천식모델을 이용한 연구는 찾을 수 없었다.

본 연구를 통해서 CR 천식모델에서 CpG와 CR 항원을 기도에 같이 투여할 경우 CpG가 면역조절능력이 있음을 확인할 수 있었다. CpG의 효과는 투여경로가 중요한 영향을 미친

다. CpG는 점막을 통해 투여할 경우 알레르기 염증을 억제하는 효과가 현저한 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ 또한 CpG는 알레르겐과 함께 투여하는 것이 CpG를 단독으로 투여한 것보다 더 효과적인 것으로 알려져 있다.²¹⁾ OVA에 감염된 마우스 천식 모델에서 OVA와 CpG를 병용 투여한 군에서 CpG를 단독으로 투여한 군에 비해 훨씬 더 알레르기 염증반응을 억제하는 효과가 더 뚜렷한 것으로 보고된 바 있다. CpG는 알레르겐 흡입에 의한 기도개형을 막을 수 있는 것으로 보고되고 있다. Cho 등은 만성 OVA 천식 모델에서 CpG투여에 의해서 기관지 평활근의 비후, peribronchial fibrosis, peribronchial myofibroblast 침윤 그리고 TGF- β 1의 발현을 억제할 수 있음을 보고하였다.²²⁾

CpG는 알레르기 환자에 이용한 2상 임상시험도 시도되었으며, 긍정적인 결과와 부정적인 결과가 모두 보고되고 있다. 돼지풀 꽃가루 알레르기 비염 환자에서 CpG와 Amb a 1 복합체를 매주 한번씩 6주간 투여한 무작위 배정 이중맹검 2상 임상시험에서 당해년도의 돼지풀 꽃가루 시즌뿐만 아니라 다음해의 돼지풀 꽃가루 시즌에서 알레르기 비염 증상과 삶의 질을 호전되었다.²³⁾ 그러나 알레르기 천식환자를 대상으로 한 것은 부분적인 연구말고는 없었다. 41명의 천식환자를 이중맹검대조법을 적용한 항원천식유발검사를 실시하였는데, CpG를 4주간 매주 1번씩 흡입 투여군과 비투여군간에 항원 유발시험 후 관찰되는 FEV1 및 객담 내 호산구 수에 유의한 차이가 없었다.²⁴⁾ 이 결과는 CpG만을 단독 투여하였으며, 측정 변수도 면역치료의 효과를 판정하는데 핵심적인 일상생활중의 천식의 증상점수, FEV1의 변화, 천식의 악화의 빈도가 아니고, 기관지 항원유발시험후의 조기 및 후기 천식반응만을 측정하였고, 천식환자에서 CpG의 효과를 판정하는데 미흡한 부분이 많다. 이러한 임상 시험결과로 볼 때 호흡기 알레르기 질환에서 CpG를 이용한 치료법을 개발하기 위한 여러 후속 연구가 진행될 것으로 생각되며, 본 연구는 천식환자에서 CpG가 면역치료의 효과를 향상시킬 수 있는 치료법으로 활용될 가능성을 시사한다.

결 론

결론적으로 본 연구는 사람에서 천식을 유발하는 CR항원으로 만든 마우스 천식모델에서 CR항원과 unmethylated CpG를 함께 투여할 경우 기도과민반응, 호산구성 기도염증반응, goblet cell hyperplasia를 막을 수 있음을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 unmethylated CpG를 알레르겐 면역치료 시 병용투여할 경우 면역조절 효과를 높일 가능성을 시사한다.

참 고 문 헌

- 1) Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *New Engl J Med* 2006;355:2226-35
- 2) Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *New Engl J Med* 2002;347:869-77
- 3) Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *New Engl J Med* 2000;343:538-43
- 4) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546-9
- 5) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-5
- 6) Fattouh R, Pouladi MA, Alvarez D, Johnson JR, Walker TD, Goncharova S, et al. House dust mite facilitates ovalbumin-specific allergic sensitization and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:314-21
- 7) Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998;160:2555-9
- 8) Kline JN, Kitagaki K, Businga TR, Jain VV. Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L170-L9
- 9) Jain VV, Kitagaki K, Businga T, Hussain I, George C, O'Shaughnessy P, et al. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:867-72
- 10) Chapman MD, Wünschmann S, Pomés A. Protease as Th2 adjuvants. *Current Allergy Asthma Reports* 2007;7:363-7
- 11) Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Cermain RN, BNL L. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Medicine* 2009;15:410-6
- 12) Johnson JR, Wiley RE, Fattouh R, Filip KS, Gajewska BU, Coyle AJ, et al. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:378-85
- 13) Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1258-64
- 14) Kitagaki K, Jain VV, Businga T, Hussain I, Kline JN. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on established Th2 responses. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1260-9
- 15) Farkas L, Kvale EO, Lund-Johansen F, Jahnsen FL. Plasmacytoid dendritic cells induce a distinct cytokine pattern in virus-specific CD4+ memory T cells that is modulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Scand J Immunol* 2006;64:404-11
- 16) Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004;173:4433-42
- 17) Mellor AL, Baban B, Chandler P, Marshall B, Jhaveri K, Hansen A, et al. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 2003;173:1652-5
- 18) Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, et al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2004;114:270-9
- 19) Hirose I, Tanaka H, Takahashi G, Wakahara K, Tamari M, Sakamoto T, et al. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on house dust mite-induced airway inflammation in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;147:6-16
- 20) Shirota H, Sano K, Kikuchi T, Tamura G, Shirato K. Regulation of T-helper type 2 cell and airway eosinophilia by transmucosal coadministration of antigen and oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:176-82
- 21) Jain VV, Businga TR, Kitagaki K, George CL, O'Shaughnessy PT, Kline JN. Mucosal immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides reverses a murine model of chronic asthma induced by repeated antigen exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L1137-L46
- 22) Cho JY, Miller M, Baek KJ, Han JW, Nayer J, Rodriguez M, et al. Immunostimulatory DNA inhibits transforming growth factor-beta expression and airway remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:651-61
- 23) Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a ragweed-Toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006;355:1445-55
- 24) Gauvreau GM, Hessel EM, Boulet LP, Coffman RL, O'Byrne PM. Immunostimulatory sequences regulate interferon-inducible genes but not allergic airway response. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:15-20