

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09189

研究課題名(和文) 難治性喘息の病態解明と治療戦略確立をめざす総合的検討

研究課題名(英文) Comprehensive approaches to pathophysiology and better treatment among severe asthma

研究代表者

滝澤 始 (Takizawa, Hajime)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80171578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息は吸入ステロイドを基本とする抗炎症療法によりコントロールが容易となった。しかしながら全体の5～10%の患者は難治例であり、多くの医療資源を必要とし、かつ喘息死の危険群である。そこでわが国における難治性喘息の病態の解明と治療戦略の確立を目的とした。喘息の病態に重要な気道上皮細胞はウイルス感染モデルでCCL5を産生し、喘息の悪化に関与しうることを、喘息治療薬のfluticasoneはこれを抑制すること、喘息の悪化のバイオマーカーとして酸化ストレスと可溶性ST2が期待できることを明らかにした。今後より大規模な確証試験が期待される。

研究成果の概要(英文)：Inhaled corticosteroid therapy has improved asthma control, but 5-10% of the patients still experience frequent exacerbations. We performed basic and clinical approaches to improve patients care and outcome among severe asthma. In vitro studies using airway epithelial cell culture showed that virus analogue poly(I:C) strongly induced CCL5 expression and release of its protein that has been believed to play an important role in asthma exacerbation. Potent anti-asthma drug fluticasone attenuated the process. Clinical studies indicated that oxidant marker H2O2 and soluble ST2 are potential biomarkers of exacerbations. Further verification studies might help improve care and treatment for the patients with severe asthma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：難治性喘息 気道炎症 細胞内シグナル 抗炎症薬 増悪 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 難治性喘息の病態解明への努力とその研究状況:

気管支喘息の中心的な病態として気道粘膜におけるアレルギー性炎症が位置づけられ、とくに IL-13 をはじめとする Th2 タイプのサイトカイン群が重要な役割を演じていることが示されてきた。吸入ステロイドを基本とする抗炎症療法により多くの症例で著効を示すことが明らかにされて、わが国の喘息死も年々減少傾向にある。しかしながら全体の 5 ~ 10 % の患者は、治療アドヒアランスや吸入法の不良などの要因を除外してもなおコントロール不良であり、時間外受診を繰り返すなど多くの医療資源を必要としかつ喘息死の危険群である。こうした難治群の病態の解明と治療法の確立を目的として、諸外国ではすでに Severe asthma research program (SARP) などの研究組織が立ち上げられ、基礎的、臨床的両面から多くの知見を得てきた。

喘息の臨床病態解析の大きな潮流としてクラスター解析が行われた結果、多様なフェノタイプが存在することも明らかになった。気道炎症の観点から注目されるのが好中球性炎症の役割であり、とくに喘息の重症化、ステロイド抵抗性と関連することが示されてきた。

しかしながら、こうした好中球性喘息の炎症病態を改善する方法は極めて乏しく、また十分に検討されてきたとは言えない。まず好中球性気道炎症を制御すると考えられるマクロライド系抗菌薬であるが、その重症ないし難治性喘息での検討は少ない。Gotfried MH らは 21 名のステロイド依存性喘息 (>5mg/d PSL) を対象に二重盲検比較試験を行い、クラリスロマイシン (CAM) 500mg/日の 6 週間投与により、胸部違和感、FVC、QOL スコアが有意に改善したと報告した (Chest.2004)。Simpson JL らは 45 例の重症抵抗性喘息に二重盲検比較試験、クロスオーバー方式で CAM500mg/日を 8 週間投与し、喀痰中の好中球数と IL-8、MMP9 および好中球エラストラーゼの低下を認めた。また、QOL スコアも改善した (Am J Respir Crit Care Med.2008)。この治療効果は非好酸球性喘息でより明らかだった。さらに最近、Brusselle GG らは重症発作を繰り返す難治性喘息を対象にアジスロマイシン (AZM) による二重盲検比較試験を行い、全体では一次評価項目である重症発作または治療を要する下気道感染症の頻度に有意差を認めなかったが、非好酸球性喘息群のサブ解析で有意な抑制効果が示された (Thorax.2013)。もとよりマクロライド療法はわが国においてアジア人に圧倒的に多いびまん性汎細気管支炎に対する治療法として発見されたものであり、好中球性難治性喘息におけるマクロライド療法の効果をぜひわが国で明らかにする必要がある。また、後

述するように難治性喘息には喫煙および COPD の併存の関与が示唆されており、長時間作用型ムスカリン作用薬であるチオトロピウム、ステロイド薬、および長時間作用型ベータ 2 作動薬も検討する必要がある。

### (2) 当科における今までの研究成果:

以上の背景から、我々はこれら難治群のわが国における臨床的背景を究明することが重要と考え、2013 年度から専門外来における系統的な検討を開始している。予備的検討の結果では、当院呼吸器内科専門外来に通院中の喘息患者の検討で、重症型の方が軽症・中等症型よりも過去 1 年間の予定外受診数並びに入院回数が有意に多く、また末梢血白血球数・好中球数が有意に多かった ( $P < 0.05$ )。軽症・中等症型の方が重症型よりも BMI は有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。一方、年齢や血中好酸球数、血清 IgE、呼気 NO 濃度では差を認めなかった。また、COPD および喘息・COPD オーバーラップ群との比較検討において、呼吸障害への好中球性炎症の関与が疑われた。気道炎症マーカーでの解析では、呼気凝縮液 (exhaled breath condensates, EBC) 中のサイトカイン・増殖因子の検討を種々の重症度の喘息患者で行い、IL-8 レベルは軽症群に比べ最重症群で有意に増加していることを認めた。

IL-17 は新しいリンパ球集団である Th17 細胞から産生される催炎症サイトカインとして注目されており、とくに好中球性炎症での役割が重要視されている。我々は、ヒト気道上皮細胞の IL-8 産生制御において、IL-17 が重症喘息で上昇が示されている TNF と協同的に作用することを認めた。さらにこの系において予備的な検討により CAM の添加により IL-8 の発現が低下した。さらに、IL-17 ノックアウトマウスにおいて短期喫煙暴露を行い、喫煙によって誘導される好中球性気道炎症や関連サイトカインの発現が減弱することを明らかにした。また短期喫煙暴露を行った野生型マウスの好中球性気道炎症が、CAM の投与により抑制されることも明らかにしている。

## 2. 研究の目的

気管支喘息は吸入ステロイドを基本とする抗炎症療法によりコントロールが容易となり、わが国の喘息死も年間 2000 名を下回るようになった。しかしながら全体の 5 ~ 10 % の患者は、治療アドヒアランスや不適切な吸入法などの要因を除外してもなおコントロール不良であり、時間外受診を繰り返すなど多くの医療資源を必要とし、かつ喘息死の危険群である。

そこでわが国における難治性喘息の病態、とくに好中球性喘息に焦点を当て、その機序の解明と治療戦略の確立を目的として、克服のための総合的な戦略を確立することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1)ヒト気道上皮細胞を標的としたウイルス感染などによる炎症増悪とその制御:

ヒト気道上皮細胞およびその細胞株 BEAS-B に種々の濃度の刺激 (IL-17をはじめとするサイトカイン、LPS や flagellin を含む細菌由来物質、さらに TLR3 アゴニストであるウイルス由来分子 polyinosinic-polycytidylic acid (poly[I:C]) を加え、CCL5(Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES)や IL-8をはじめとする炎症性サイトカインを multiplex cytokine ELISA kit (Signosis 社)により包括的に解析する。各々の濃度依存性、時間依存性を確認ののち、マクロライド薬 EM, CAM などの効果を検証する。ヒト気道上皮細胞の遺伝子発現の解析をおこなう。すなわち、刺激下の気道上皮細胞から RNA 抽出キット(RNAeasy など)を用いて RNA を抽出し、PCR primers と Taqman probes を外注にて作成し、SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)にて Thermal Cycler Dice® Real Time System で定量的に発現を評価する。そしてクラシロマイシンをはじめとする各種薬剤の抑制効果を検討する。細胞内シグナル系を解析するために、それぞれ特異的阻害薬による効果、および標的分子の RNA 干渉法(siRNA 法)を用いた。

(2)臨床的研究:

酸化ストレスマーカーなどのバイオマーカーと喘息の臨床像及び増悪リスクとの関連について、104 名の喘息患者の前向き観察研究。倫理委員会の承認のもと、説明と同意の得られた喘息患者を対象に検討した。主要評価項目は、「3 ヶ月以内の喘息発作」(入院または救急外来受診を要する)。患者をリクルートし、インフォームドコンセントの後に、血液検査、呼気凝集液採取、呼吸機能検査を行い、呼吸器内科医がガイドラインに従って治療した。血清中の sST2・他のサイトカイン濃度を ELISA で、血清・呼気凝集液中の H2O2 値を D-ROM テストで測定した。バイオマーカーが発作を予測する精度を、ROC 解析、COX 比例ハザード解析で評価した。多群間比較には Kruskal-Wallis 検定、多重比較には Steel 検定を用いた。

### 4. 研究成果

(1)ヒト気道上皮細胞を標的としたウイルス感染による炎症増悪とその制御:

正常ヒト気道上皮細胞およびその細胞株 BEAS-B を用いて、TLR3 アゴニストであるウイルス由来分子 polyinosinic-polycytidylic acid (poly[I:C])刺激を行い、ウイルス感染時に種々のサイトカイン・ケモカインの産生放出

が起こり、気管支喘息の増悪をきたす機序について検討した。種々の炎症性サイトカインの発現を検討した中で、とくに強く誘導されたものが、CCL5(Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES)であった。CCL5 は、1988 年 Schall らにより抗原や mitogen により T 細胞が刺激を受けた際に産生するケモカインとして発見された。主な産生細胞は気道上皮の他、T 細胞、B 細胞、単球、繊維芽細胞、好酸球などが知られている。好酸球に対する強い遊走活性を有し、好塩基球や肥満細胞に対しても遊走増強作用を示すことから、以前から喘息の気道炎症病態における役割が報告されている。臨床的報告でも、気管支喘息患者で血清中 CCL5 は健常人よりも高く、発作時の方が血清中や喀痰中の CCL5 が上昇する。(Chihara J. J Allergy Clin Immunol, 100 : S52-S55, 1997. Konno S. Int Arch Allergy Immunol, 109 : 73-78, 1996.)

ヒト気道上皮細胞においてウイルスの核酸アナログである poly(I:C)により CCL5 産生が強く誘導された(図 1、2)。その際の細胞内シグナル伝達系を検討した結果、TLR3、JAK1、PI3K を介し CCL5 産生が誘導された(図 3 ~ 5)。

また poly(I:C)刺激による CCL5 産生に NF- $\kappa$ B は関与しないことや、poly(I:C)刺激による CCL5 産生は Th2 サイトカインである IL-13 や IL-4 により更に増強することも見出した。IL-13 による poly(I:C)刺激の CCL5 産生への増強効果の機序に STAT6 は関与しない。

poly(I:C)刺激による CCL5 産生増強効果はステロイドである fluticasone propionate により抑制された(図 6)。

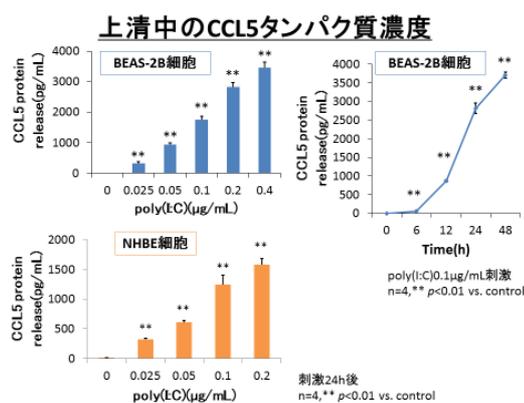


図 1 poly(I:C)による CCL5 産生

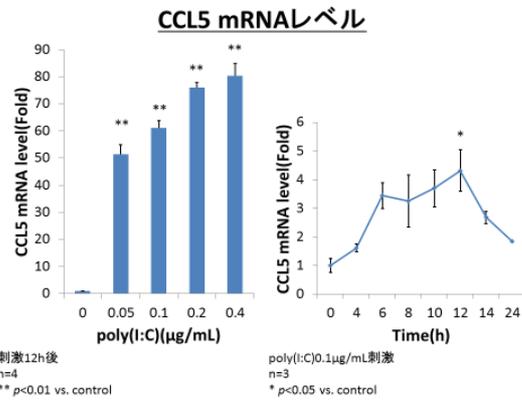


図2 poly(I:C)によるCCL5mRNAの誘導

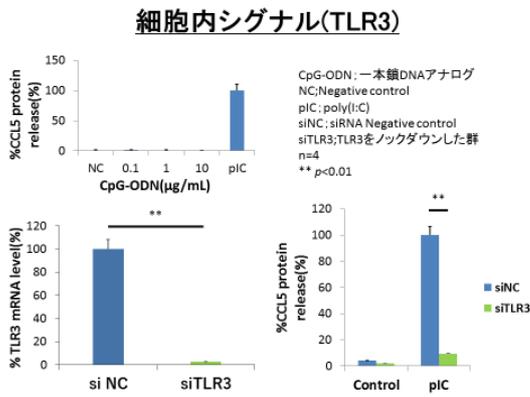


図3 poly(I:C)によるCCL5mRNAの誘導におけるTLR3の役割

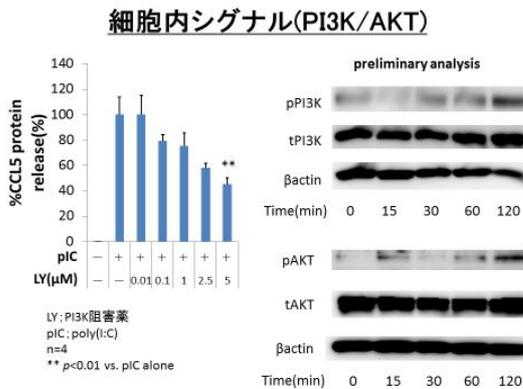


図4 poly(I:C)によるCCL5mRNAの誘導におけるPI3Kの役割

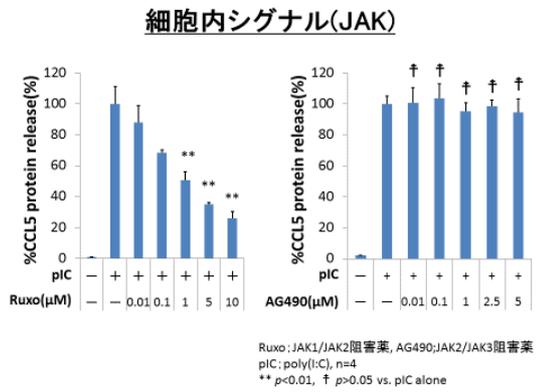


図5 poly(I:C)によるCCL5mRNAの誘導におけるJAKの役割

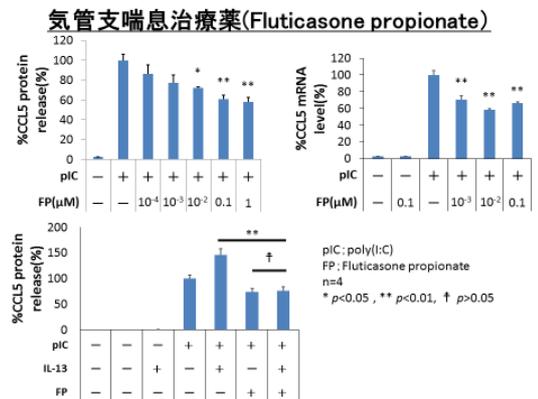


図6 poly(I:C)によるCCL5mRNAの誘導に対するfluticasoneの抑制効果

(2) 酸化ストレスマーカーと喘息の臨床像及び増悪リスクとの関連:

臨床的検討では杏林 SARP の症例組み入れ(倫理委員会承認済み)を進め、好中球性喘息群の抽出とそのほかの群との比較を行った。その結果、気管支喘息患者105人を対象とした検討で、酸化ストレスに注目すると、白血球数、好中球数、CRP、IL-6と正の相関を示し(それぞれ  $r=0.263, p<0.01, r=0.228, p<0.05, r=0.417, p<0.01, r=0.334, p<0.01$ )、%FEV1とは負の相関を認めた( $r=-0.217, p<0.05$ )。105例のうち、3か月以内に救急外来受診または緊急入院を要した患者は12例で、酸化ストレスが中等度以上の患者が軽度以下の患者と比べ有意に多かった[オッズ比=5.11(95% CI 1.06-24.60)]。

以上から酸化ストレスは喘息の治療・管理に有用なマーカーとなる可能性があると考えられた(図7~8)。

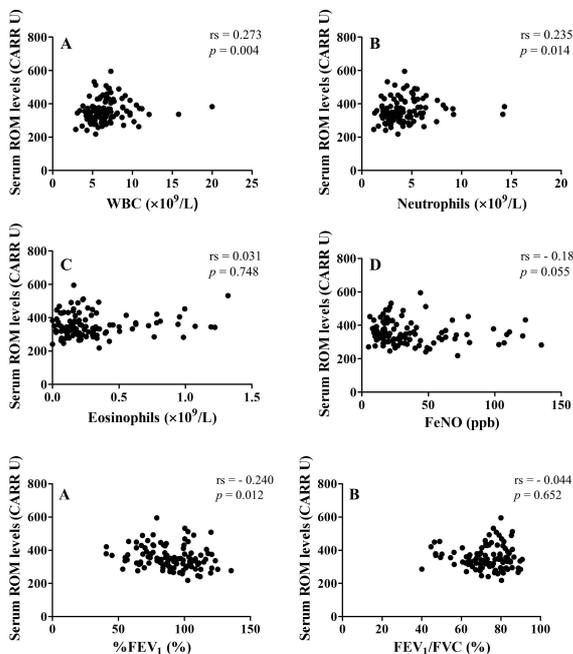


図7 気管支喘息における酸化ストレスと臨床諸標との関連

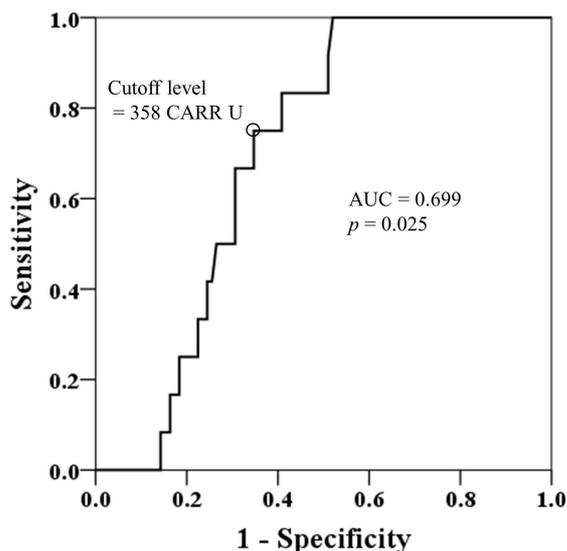


図8 酸化ストレス高値からみた喘息増悪群のROC解析

(3)血清中のsST2値の喘息発作の発症リスクにおける意義:

104例の気管支喘息患者のうち、11例が3ヶ月以内に増悪した。血清sST2高値(18 ng/ml, HR 9.2,  $P < 0.001$ )、血液中の好中球数増多(6,000/ $\mu$ L, HR 26.6,  $P < 0.001$ )は、喘息発作の危険因子であった。血清sST2値は呼気中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>値と相関し、血液中の好中球数は血清CRP、IL-6、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>値と相関した。血清sST2高値、血液中の好中球数増多は、独立した喘息発作の危険因子であった。次に、血清sST2高値を1点、血液中の白血球増多を2点として、発作を予測する重症度スコアを定義した。予測精度を示すAUCは0.91で、

最重症(3点)の群は、発作の頻度が86%、呼吸機能検査で気流閉塞を示した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Saraya T, Kimura H, Kurai D, Ishii H, Takizawa H. The molecular epidemiology of respiratory viruses associated with asthma attacks: A single-center observational study in Japan. *Medicine (Baltimore)*. 査読有 2017 Oct;96(42):e8204. doi: 10.1097/MD.00000000000008204.

Nakamoto K, Saraya T, Takizawa H. Asthma phenotypes: An important step for tailor-made therapy. *J Gen Fam Med*. 査読有 2017 Aug 31;18(5):315-316. doi: 10.1002/jgf2.72. eCollection 2017 Oct. No abstract available.

Nakamoto K, Watanabe M, Sada M, Inui T, Nakamura M, Honda K, Wada H, Mikami Y, Matsuzaki H, Horie M, Noguchi S, Yamauchi Y, Koyama H, Kogane T, Kohyama T, Takizawa H. Serum Reactive Oxygen Metabolite Levels Predict Severe Exacerbations of Asthma. *PLoS One*. 査読有 2016 Oct 24;11(10):e0164948. doi: 10.1371/journal.pone.0164948. eCollection 2016. Erratum in: *PLoS One*. 2016 Dec 9;11(12):e0168220.

[学会発表](計8件)

渡辺雅人, 滝澤始: 呼気ガス測定の将来気管支喘息における呼気NOの位置付け. 第21回日本医療ガス学会学術大会・総会, 東京, 2017年10月7日.

佐田充, 渡辺雅人, 乾俊哉, 中本啓太郎, 滝澤始: 成人喘息 病態 気道上皮細胞におけるウイルス感染時のCCL5の発現とその制御機構の基礎的検討. 第66回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017年6月16日 - 18日.

Watanabe M, Nakamoto K, Sada M, Inui T, Takata S, Yokoyama T, Saraya T, Kurai D, Ishii H, Takizawa H: Serum sST2 Levels Predict Severe Exacerbation of Asthma: A Potential Implication for Neutrophilic Asthma. American Thoracic Society 2017 International Conference, Washington May 19th-24th, 2017.

皿谷健, 倉井大輔, 木村博一, 滝澤始: 気管支喘息の病因・病態 気管支喘息発作におけるウイルス感染の前視的研究. 第57回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2017年4月21日 - 23日.

中本啓太郎, 渡辺雅人, 佐田充, 乾俊哉,

中村益夫, 本多紘二郎, 倉井大輔, 皿谷健, 和田裕雄, 石井晴之, 滝澤始: 気管支喘息患者における酸化ストレスの検討. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2016 年 6 月 17 - 19 日.

佐田充, 渡辺雅人, 乾俊哉, 中本啓太郎, 松崎博崇, 山内康宏, 滝澤始: 気道上皮細胞におけるウイルス感染時の CCL 5 の発現とその制御の検討. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2016 年 6 月 17 - 19 日.

皿谷健, 倉井大輔, 木村博一, 石井晴之, 滝澤始: 気道ウイルス感染が喘息発作に及ぼす影響に関する前向きコホート研究. 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会, 仙台, 2016 年 4 月 15 - 16 日.

乾俊哉, 渡辺雅人, 中本啓太郎, 佐田充, 辻晋吾, 小川ゆかり, 小出卓, 高田佐織, 横山琢磨, 倉井大輔, 皿谷健, 石井晴之, 和田裕雄, 滝澤始: ヒト気道上皮細胞の GRO 産生制御機構. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2016 年 4 月 8 10 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

滝澤 始 (Takiawa, Hajime)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号: 80171578

### (2) 研究分担者

渡辺 雅人 (Watanabe, Masato)  
杏林大学・医学部・学内講師  
研究者番号: 00458902

皿谷 健 (Saraya, Takeshi)  
杏林大学・医学部・講師  
研究者番号: 40549185

田村 仁樹 (Tamura, Masaki)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 80616607