

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15939

研究課題名(和文) 前向き難治性喘息コホートにおける、バイオマーカーの経年的変化についての研究

研究課題名(英文) Studies on the annual change of biomarkers in severe asthmatics.

研究代表者

木村 孔一 (Kimura, Hirokazu)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：90789330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙者を含む、前向き6年間の難治性喘息コホート研究のデータを用いて種々の解析を行った。サイトカインなどの分子の他、呼吸機能やその他喘息の状態を把握するための指標をバイオマーカーと捉え、経年変化に着目した。血液、喀痰中のサイトカインの経年変化に関しては、現在のところ有力な結果は得られておらず、今後も解析を続けていく。呼吸機能に関しては、現在解析中であり、今年度中に学会・論文発表の予定である。3年間の増悪調査において、3年間持続的に複数回増悪する群は、好酸球や呼気中一酸化窒素濃度など、いわゆるTh2マーカーとの関連が見られた。カットオフ値を用いた病型分類を試みており、現在論文作成中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では喫煙者を含む集団を対象として、より実臨床を反映している質の高いコホートである。現在の喘息治療における課題は、治療が難しい「難治性喘息」の患者を、いかに早期に見つけ出して介入するか、ということにあると考えられる。こういった意味では、本研究の結果から、将来の増悪リスクが高い患者群を見つけ出すことができるようになる可能性があり、そういった患者群に対してはより注意して治療介入を行うことができよう。

研究成果の概要(英文)：We conducted various analyzes using data from a prospective 6-year refractory asthma cohort study, including smokers. In this study, we used the terms 'biomarker' as not only the molecules such as cytokines, but also the asthma associated indices such as respiratory function or exacerbation.

We focused on the annual changes in several indices. To date, we obtained no significant results for annual change of cytokine in blood or sputum. We will continue to analyze. Regarding respiratory function, we are currently analyzing, and we will present the result in this year. In 3-year exacerbation study, the group with consistently frequent exacerbaters was associated with eosinophil and fractional exhaled nitric oxide, so called 'Th2 markers'. We are trying to identify the phenotype using cut-off value, and now we are preparing a paper.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：難治性喘息 バイオマーカー 増悪 個別化治療 経年変化 喫煙

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

吸入ステロイド薬の普及により、多くの気管支喘息患者のコントロールは良好となり、救急受診を余儀なくされる患者数は減少している。しかし、高用量の吸入ステロイドや経口ステロイドの使用下でもそのコントロールが不良である、いわゆる「難治性喘息」の存在が、現在の喘息診療の最重要課題である。喘息の難治化因子は、患者個々で多様であることが知られており、性別(女性)、肥満、非アトピー型喘息、長期罹病、気道リモデリング、喫煙、アスピリン感受性等が挙げられているが、未だにメカニズムが不明な点も多い(喘息予防・管理ガイドライン 2015)。

喘息における気道炎症については、古典的には好酸球、マスト細胞等による浸潤(Bousquet J, et al. N Engl J Med, 1990) (Ohasi Y, et al. Am Rev Respir Dis, 1992)や、IL-4、IL-5、IL-13等のTh2サイトカインによる影響(Woodruff PG, et al. Am J Respir Crit Care Med, 2009)等が特徴的であったが、近年では好中球炎症が主体である症例も喘息の一病型とする報告もあり(Moore WC, et al. J Allergy Clin Immunol, 2014)、病態の多様性が指摘されている。これらのことから、近年喘息は単一の疾患ではなく、様々な病型の集合による疾患群であると捉えられており(Wenzel SE, et al. Nat Med, 2012)、病型分類が重要であると考えられている。特に難治性喘息において、この病型分類に基づいた個別化治療を考慮することが、現在難渋している新規治療薬の開発・発展にも重要であると考えられている。

難治性喘息患者における病型分類を行うにあたっては、呼気NO、血液・喀痰中のサイトカイン等を含めたバイオマーカーの測定・解析を行い、気道炎症におけるエンドタイプを同定することが重要である。このような報告は過去に多数存在するが、ほとんどは非喫煙者に限ったものであり、長い期間においてそれらのバイオマーカーの経時的な変化に着目した研究はほとんどない。また、現在の実臨床においては、病型分類・個別化治療が十分な効果があるとは言い難く、現在も治療抵抗性の喘息患者が存在しているのが実情である。このため、新たな手法での病型分類が必要であると考えた。

当施設では、2010年より展開されている127名の難治性喘息患者を対象とした「北海道難治性喘息コホート研究(UMIN ID 000003254)」(Kimura H, et al. Ann Am Thorac Soc, 2017)を行っており、本研究開始当初においては、6年間の臨床経過の前向き調査が進行中であった(現在は終了している)。また、本研究においては、実臨床を反映するために喫煙者を含めているということが大きな特徴である(ただし、COPD単独の患者は除外されている)。本邦での喫煙率が欧米よりも高いことを考えると、喫煙者を除外した解析では、難治性喘息患者の一部のみしか当てはまらず、十分な結果が得られないと考えたからである。

申請者は、本コホート研究における登録時のデータにおいて、CTでの副鼻腔陰影の重症度(Lund-Mackay Score)と好酸球性炎症、呼吸機能低下についての関連を報告したが、喫煙の影響は一樣ではなく、個人によって多様であることが示唆された(Kimura H, et al. Ann Am Thorac Soc, 2017)。同様のことは、登録時のデータを使用したクラスター解析でも明らかになっており、特に喫煙の影響は、好酸球性・好中球性気道炎症の両者に関与し得ることを示した(Konno S, Kimura H, et al. Ann Am Thorac Soc, 2018)。

本コホート研究の強みを活かして、6年間のバイオマーカーの経年変化を含めた解析することで、新たな病型分類を行うことができる可能性があると考えた。これらのことから、本研究では、より細分化した個別化治療への可能性を見出すことを目的として、狭義のバイオマーカー(タンパク・サイトカインなどの分子)や呼吸機能など各種喘息指標の変動も含めた詳細な病型分類や関連因子の検討を行いたいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、特に重症喘息患者をターゲットとして、より細分化した個別化治療への可能性を見出すことである。このために、病型分類や、その病型についての関連因子の同定を行うこととした。6年間という長期間の前向きコホート研究を対象としていることから、特に経年変化に注目することとした。

### 3. 研究の方法

本研究では、北海道難治性喘息コホート研究(UMIN000003254)(Kimura H, et al. Ann Am Thorac Soc 2017)で得られたデータ、検体を使用している。北海道難治性喘息コホート研究は、北海道内各地の呼吸器科専門医のもとで最低1年以上通院している重症喘息患者127名を対象とした最大6年間の前向きコホート研究であり、実臨床を反映するために喫煙者を含めていることが特徴である。実際、本コホート研究に参加した対象においては、現喫煙者が10%、過去喫煙者が49%、非喫煙者が41%という結果であり、喫煙者を除外すると半数以上が不適格とされることになる。

重症喘息の定義は、2000年の米国胸部疾患学会の基準(Proceedings of the ATS Workshop on Refractory Asthma, Am J Respir Crit Care Med 2000)を一部改変したものを採用している。具体的には、軽症から中等症の持続性喘息に相当するレベルのコントロールを得るために、年間の半分以上の内服ステロイドの使用、または高容量の吸入ステロイド(ブデソニド換算で1200 µg/day以上)による治療を必要とし、かつ2ndコントローラーの併用や、短時間作用性刺激薬の使用、持続的な気道閉塞、年間1回以上の救急受診、年間3回以上の経口ステロイドのバースト使用、経口あるいは吸入ステロイドの25%以下の減量で悪化、致死性喘息の既往の小項目を

2つ以上満たすものを対象としている。

本コホート研究では、全員がエントリー時に北海道大学病院へ1泊2日で入院をして頂き、詳細な問診や身体診察、血液検査、呼吸機能検査等を含めた諸検査を行っている。その後は最大6年間にわたって、1年ごとに当院外来を受診して頂き、毎年の呼吸機能検査の他、血液検査を0・1・2・3・6年目に、喀痰採取を0・3・6年目に行っており、検体を保存している。すでに測定されている項目のほか、保存検体にて各種タンパクやサイトカインなど(狭義の)バイオマーカーを測定し、それらの結果を基に、病型分類を試みて関連因子を検索した。

#### 4. 研究成果

本研究においては、狭義のバイオマーカー(血液、喀痰中のタンパク、サイトカインなどの分子)、呼吸機能検査結果、その他喘息の状態を把握するための指標をバイオマーカーと捉えた。

##### (1) 血液、喀痰中の分子の経年変化

すでにコホート研究にて測定・記録されている、末梢血中の好酸球・好中球、血清IgE、喀痰中の好酸球・好中球といった指標に関しては、経年変化による病型分類を試みたが、現在のところは有力な結果は得られていない。また、血液の保管検体を用いて、ペリオスチン、Chitinase 3-like 1 (CHI3L1, YKL-40)、Chemokine C-C motif ligand 18 (CCL18)、Club cell secretory protein (CC16)、オステオポンチン(OPN)等を測定しているが、予算の関係もあり、すべての時期での保管検体で測定するには至っていない。現時点で測定できた範囲での経年変化を解析した限りでは、有意な結果は得られていない。今後も測定、解析を続けていく予定である。

##### (2) 呼吸機能検査結果の経年変化

呼吸機能検査は毎年行っており、合計で7回分の結果が保管されている。肺活量、一秒量、一秒率、肺拡散能力、呼気中一酸化窒素濃度(FeNO)といった指標に注目し、現在も解析を行っている。肺活量、一秒量、一秒率、肺拡散能力に関しては、統計モデルを用いて1年ごとの変化量の計算し、FeNOに関しては、変動の大きい群か否かで病型分類を試みている。また、これらにおける関連因子を検索している。

結果については、今年度中に、学会発表、論文発表を予定している。

##### (3) 増悪状況の経年変化

喘息のコントロールを把握することを考えた際、増悪は非常に重要な情報である。本コホート研究では、開始から3年間にわたって、増悪の状況を調査している。増悪調査を完遂したのは127名中105名である。増悪の定義は、3日間以上の全身性ステロイドの使用・増量、または喘息による入院(ICU入室含む)とした(Reddel HK, et al. Am J Respir Crit Care Med 2009)。1年間の増悪回数を2回以上、1回、0回、の3つに分類し、3年間の増悪状況をみると、3年間持続的に2回以上増悪する群は14.3%(頻回増悪群)、一度も増悪しない群は37.1%(無増悪群)、それ以外は48.6%(中間増悪群)であった(Kimura H, et al. Clin Exp Allergy 2018)。また、この結果からは、頻回増悪群において、末梢血好酸球数と、FeNOが高値であることが明らかになった。特にFeNOに関しては、前年の頻回増悪であることと独立して、将来の頻回増悪であることの有意な関連因子であった。呼吸機能検査は増悪とは関連がみられなかったことから、現在のTh2型気道炎症の存在が、喘息増悪における重要な指標と考えた。

##### (4) 増悪状況とTh2マーカーの検討

上記(3)の結果を基に、Th2型反応の指標と喘息増悪の関連性を検討しつつ、実臨床に応用することを主な目的として、簡便に広く利用できる項目を選択し、かつカットオフ値を設定することを試みた。日常診療において利用できることを重視し、Th2型反応の指標として、末梢血好酸球数、FeNO、アトピー素因の3つを選択した。

末梢血好酸球数、FeNOに関してはROC曲線を用いてカットオフ値を決定し、カットオフ値以上のものをTh2 features陽性、と定義した。また、アトピー素因のあるもの(1つ以上の吸入抗原に対する特異的IgE抗体陽性)も、Th2 features陽性と定義した。

105名の患者背景としては、男性が42.9%、年齢は $58.5 \pm 12.1$ 歳、喘息罹病期間は $19.7 \pm 14.6$ 年間、BMIは $25.5 \pm 5.0$  kg/m<sup>2</sup>、アトピー素因のあるものは65名(61.9%)であった。定期の経口ステロイド使用者は39名(37.1%)、IgE抗体使用者は5名(4.8%)であった。末梢血好酸球数、FeNOはそれぞれ幾何平均で197 / $\mu$ L、30.2 ppbであった。3年間にわたって年間2回以上増悪する頻回増悪者は、15名(14.3%)であった。頻回増悪に対するROC曲線から、末梢血好酸球数 250 / $\mu$ L (AUC = 0.627)、FeNO 31 ppb (AUC = 0.612)をカットオフ値として設定した。それぞれのTh2 features陽性となるもの的人数は、末梢血好酸球数 250 / $\mu$ Lが50名(47.6%)、FeNO 31 ppbが47名(44.8%)、アトピー素因ありが65名(61.9%)であった。

個々の患者におけるTh2 features陽性数の分布は図1に示す通りであり、陽性数0が16名(15.2%)、陽性数1が40名(38.1%)、陽性数2が25名(23.8%)、陽性数3が24名(22.9%)であった。また、図2に示す通り、Th2 features陽性数が多いほど頻回増悪者の割合が多く、特に陽性数が3つの者の群においては、有意に頻回増悪のリスクが高い結果であった(OR 16.8、95% CI: 1.13-247.8、P = 0.040)。

これらの結果からは、重症喘息患者の増悪においては、Th2 型反応を背景とする気道炎症の関与が示唆され、特に複数の Th2 features をもつ患者においては、より注意深い観察・治療強化を行う必要があると考えられた。  
この結果は、すでに学会発表を行っており、近日中に論文投稿の予定である。

図 1：各々の患者における Th2 features 陽性数の分布

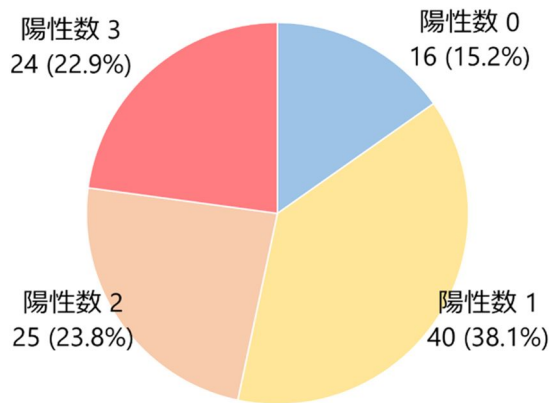


図 2：Th2 features 陽性数と頻回増悪の関係

Th2 features 陽性数	頻回増悪者*の割合	OR	95%CI	P値
0	6.3%	Ref.		
1	10%	1.93	0.16-23.1	0.604
2	16%	12.8	0.83-196.8	0.068
3	25%	16.8	1.13-247.8	0.040

\*頻回増悪者：3年間にわたって毎年2回以上の増悪をする者

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimura H., Konno S., Makita H., Taniguchi N., Shimizu K., Suzuki M., Kimura H., Goudarzi H., Nakamaru Y., Ono J., Ohta S., Izuhara K., Ito Y., Wenzel S. E., Nishimura M., for the Hi-CARAT investigators	4. 巻 48
2. 論文標題 Prospective predictors of exacerbation status in severe asthma over a 3-year follow-up	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Allergy	6. 最初と最後の頁 1137 ~ 1146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cea.13170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村孔一、今野哲、牧田比呂仁、谷口菜津子、木村裕樹、清水薫子、鈴木雅、西村正治、Hi-CARAT Investigators
2. 発表標題 重症喘息コホートにおける増悪状況とその関連因子についての検討
3. 学会等名 第116回日本内科学会総会・講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirokazu Kimura, Hironi Makita, Natsuko Taniguchi, Hiroki Kimura, Kaoruko Shimizu, Masaru Suzuki, Masaharu Nishimura, Satoshi Konno, and for the Hi-CARAT investigators
2. 発表標題 Determination of cut-off value of Th2 markers for prediction of future exacerbation in severe asthma: an analysis from the Hokkaido Severe Asthma Cohort Study
3. 学会等名 American Thoracic Society 2019 International Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村孔一、牧田比呂仁、谷口菜津子、木村裕樹、清水薫子、鈴木雅、武井望、松本宗大、Houman Goudarzi、西村正治、今野哲
2. 発表標題 重症喘息患者における増悪状況とTh2マーカー陽性数の検討
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村孔一, 今野哲, 牧田比呂仁, 谷口菜津子, 清水薫子, 鈴木雅, 小野純也, 出原賢治, 西村正治
2. 発表標題 難治性喘息における増悪頻度及びその予測因子の検討
3. 学会等名 第27回 Pneumo Forum
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----