

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08663

研究課題名（和文）質量分析法を用いた肥満による喘息の重症・難治化因子の同定と治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the Pathophysiology and Development of Novel Therapies for Obesity-Related Aggravation and Refractory Asthma

研究代表者

大河原 雄一（Ohkawara, Yuichi）

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40333801

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肥満により増加した腹部脂肪組織の喘息に及ぼす影響と因子について検討した。肥満喘息マウスの腹部脂肪組織細胞を非肥満喘息マウスの腹腔に移入した群の喘息反応は、非肥満喘息マウスの細胞を移入した群と比較して有意に増強したことから、肥満による腹部脂肪組織が喘息悪化に関与することが示された。次に、抗原吸入前後の腹部脂肪組織を薄層クロマトグラフィーで検討した結果、抗原吸入前後で発現が変化する複数の分子を確認した。今後、それらの分子を抽出し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析で検討して構造や機能を明らかにすることは、肥満やその他の原因による重症・難治性喘息の病態解明と新たな喘息治療の開発に有用と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肥満人口の増加と共に肥満に伴う多くの健康障害が問題となっている。更に肥満は、喘息の悪化・難治化の原因と考えられているが、詳細は不明である。本研究では、肥満と喘息はともに慢性炎症が基本病態であることに注目し、肥満による腹部脂肪組織の機能的変化が気道の慢性炎症に影響を及ぼして喘息悪化に関与していると仮説を立て検討した。本領域において腹部内臓脂肪に着目した研究は、これまでにない斬新で新たな視点に基づくもので、本研究で得られた結果は、肥満をはじめ患者因子の多様性が関与する難治性・重症喘息の新しい治療法の開発に寄与し、喘息死の減少や医療費の軽減といった社会的要請にかなうものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we created a diet-induced obese mouse asthma model to examine the impact of obesity-related visceral adipose tissue on asthma and identify contributing factors. The transfer of visceral adipose tissue cells from obese mice to non-obese mouse asthma models resulted in significantly enhanced asthma responses after antigen inhalation compared to the transfer from non-obese models, indicating that functional changes in abdominal adipose tissue due to obesity involved in the development of severe asthma. Additionally, multiple molecules with altered expression before and after antigen inhalation were observed in the visceral adipose tissue using thin-layer chromatography. Further investigation of these molecules, including their detailed structures and functions using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, holds promise for understanding the pathogenesis of severe and refractory asthma related to obesity and developing novel asthma therapies.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：気管支喘息 肥満 内臓脂肪組織 薄層クロマトグラフィー 液体クロマトグラフィータンデム質量解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満における内臓脂肪組織では活性化したマクロファージや CD8⁺T 細胞の集積が認められ、これらの細胞や肥大した脂肪細胞から産生される炎症性サイトカインやケモカイン、レプチンやアディポネクチンなどの脂質代謝に関与するアディポカインの産生調節異常が慢性持続性炎症を引き起こしていることが明らかになっている。そして、この慢性炎症が動脈硬化性疾患や代謝性疾患に関与しているのみならず自然免疫や獲得免疫に影響を及ぼして全身の各臓器の疾病発症にも関与していることが明らかになっている。以上のことから、肥満によるこのような慢性持続性炎症がアレルギー性慢性気道炎症にも影響を及ぼして喘息の重症・難治化に関与していることが推測される。従って、これら病態が異なる 2 つ慢性炎症の共通性や相互作用を詳細に検討することは、喘息患者の多様性や重症化・難治化の病態解明のみならず新しい治療法の開発、ひいては喘息死者数の減少といった社会的問題の解決と医療経済的効果が得られるという点で臨床的に非常に意義があると考えられる。

2. 研究の目的

食餌性肥満マウス喘息モデルを作成し、肥満による喘息の重症・難治化の機序を腹部内臓脂肪組織の免疫代謝的機能の変化、特に脂質分子の変化に絞って検討し、いまだ解明されていない増悪機序の解明ならびに新たな治療のターゲットに成り得る分子を同定することで新しい治療法への臨床応用に展開するための基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 食餌性肥満マウス喘息モデルの作成

オス 6 週齢 C57BL/6 マウスの腹腔内に水酸化アルミニウムをアジュバントとして抗原(卵白アルブミン)を 2 回、5 日間隔で投与して感作した。2 回目の腹腔投与 12 日目から高脂肪食を開始し、16 週間投与して肥満を誘導した(肥満群)。コントロールとして同様に感作後、通常食を 16 週間継続した(非肥満群)。高脂肪食または通常食 16 週間後に抗原をネブライザーで吸入させて抗原誘発喘息反応を惹起した。

(2) 抗原吸入後の喘息反応の評価

抗原吸入刺激後に十分な麻酔下のもと、両側肺を気管ごと摘出し、0.5 mL の生理食塩水で 2 回気管支肺胞洗浄(BAL)を行った。BAL 液中の細胞はサイトスピンを用いて標本化し、Diff-Quick 染色した後細胞分画を調べて気道の炎症を評価した。

(3) 腹部内臓脂肪組織細胞移入による喘息反応の評価

非肥満マウス喘息群と肥満マウス喘息群の腹腔から腹部内臓脂肪組織(腎周囲脂肪組織)を摘出し、重量を測定後、それぞれの脂肪組織を浮遊細胞化して処理し、非肥満マウス喘息モデルの腹腔内に移入した。内臓脂肪細胞移入 24 時間後に抗原をネブライザーで吸入させ、抗原吸入 5 日目に喘息反応の評価を非肥満または肥満マウス喘息モデル群の 2 群間で行った。

(4) 肥満マウス喘息モデルの内臓脂肪組織中の機能的変化の評価

抗原吸入前と吸入 1 日後に非肥満マウス喘息モデルまたは肥満マウス喘息モデルの腹腔から腎周囲脂肪組織を摘出し、-80℃で凍結保存した。後日、それぞれの脂肪組織を処理し、薄層クロマトグラフィー(TLC)で比較検討し、増悪因子として可能性のある候補分子をスクリーニングした。次に、そこで得られた候補分子の分子量や構造を詳細に検討するため、液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)を行った。

4. 研究成果

(1) 食餌性肥満マウス喘息モデルの作成

感作成立後から 16 週間の高脂肪食投与により、肥満マウス喘息モデル群の体重は約 50 g となり、非肥満マウス喘息モデル群と比較して体重が約 1.7 倍に増加した。

(2) 肥満による喘息反応(気道炎症)の増強

気管支肺胞洗浄(BAL)液中の炎症細胞は、抗原吸入後 1、3 日目では非肥満マウス喘息モデル群と肥満マウス喘息モデル群の 2 群間で有意な差を認めなかったが、抗原吸入 5 日目で総細胞数、好酸球数、リンパ球数の有意な増加を肥満マウス喘息モデル群で認めた。以上のことから、本マウス喘息モデルにおいて、肥満により喘息反応が増悪することが確認された。

(3) 肥満マウス腹部内臓脂肪組織細胞移入による喘息反応の変化

16 週間の高脂肪食投与により、肥満マウス喘息モデル群では体重増加とともに腎周囲脂肪組織の重量も増加し、非肥満マウス喘息モデル群と比較して約 4 倍と著明に増加しているのが認められた。そこで、非肥満マウス喘息モデルまたは肥満マウス喘息モデルの腎周囲脂肪組織細胞を非肥満マウス喘息モデルの腹腔内に移入し、抗原吸入 5 日後の喘息反応を気管支肺胞洗浄(BAL)液中の炎症細胞を 2 群間で比較検討した。その結果、肥満マウス喘息モデルの脂肪組織細胞を移入した群で有意に喘息反応が増強したのを認めた。以上のことから、肥満による内臓脂肪組織の機能的変化が喘息増

悪に関与していることが示唆された。

(4) 肥満マウス腹部内臓脂肪組織中の喘息増悪因子の検討

肥満による内臓脂肪組織の機能的変化が喘息の増悪に関与していることが示唆されたことから、抗原吸入前後で非肥満喘息モデル群と肥満喘息モデル群の腹腔から腎周囲脂肪を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて検討した。その結果、抗原吸入前後で発現が変化する複数の分子がこの 2 群間の腎周囲脂肪組織で認められた (図)。さらに今後、それらの分子を抽出し、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) で検討して詳細な構造や機能を明らかにすることは、肥満ならびにその他の原因による重症・難治性喘息の病態解明と新たな喘息治療の開発に有用と考える。

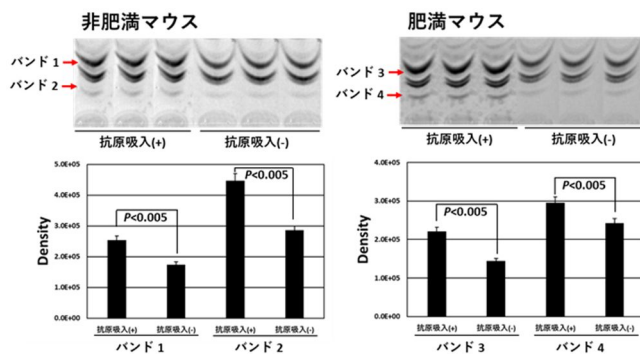


図 TLCによる内臓脂肪組織の脂質分子の変化
抗原吸入前後で、内臓脂肪組織内で発現が増加する脂質分子が複数存在することが認められる。
(バンド1、2、3、4)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 河野資、大内竜介、石井聖人、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子 |
| 2. 発表標題 精神的ストレスが免疫寛容に及ぼす影響と喘息発症 |
| 3. 学会等名 日本アレルギー学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 蓬田伸、渡邊一弘、染谷明正、數野彩子、上野隆、三浦芳樹、菅野秀一、大河原雄一、藤村務 |
| 2. 発表標題 Doxorubicin 耐性細胞に対するセサミン代謝物(7,7',8,8')-3,4-methylenedioxy-7,9:7,9'-diepoxylignane-3,4-diol (SC1) の効果 |
| 3. 学会等名 第96 回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 蓬田伸、渡邊一弘、染谷明正、數野彩子、上野隆、三浦芳樹、菅野秀一、大河原雄一、藤村務 |
| 2. 発表標題 セサミン代謝物(7,7',8,8')-3,4'-methylenedioxy-7,9:7,9'-diepoxylignane-3,4-diol (SC1) はDoxorubicin耐性K562細胞に有効か |
| 3. 学会等名 第45 回日本炎症・再生医学会 |
| 4. 発表年 2024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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 藤村 務 (Fujimura Tsutomu) (70245778) | 東北医科薬科大学・薬学部・教授 (31305) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 渡邊 一弘 (Watanabe Kazuhiro) (10382673) | 東北医科薬科大学・薬学部・准教授 (31305) | |
| 研究分担者 | 中川西 修 (Nakagawasai Osamu) (50296018) | 東北医科薬科大学・薬学部・准教授 (31305) | |
| 研究分担者 | 大野 賢一 (Ohno Kenichi) (20347272) | 帝京平成大学・薬学部・准教授 (32511) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |