

令和元年6月17日現在

機関番号：23803
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K18949
研究課題名(和文) 気管支喘息および慢性閉塞性肺疾患の新たな病態分類に基づいた個別化薬物療法の構築

研究課題名(英文) Development of precision medicine for patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者
平井 啓太(Hirai, Keita)
静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30740203
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：喘息と慢性閉塞性肺疾患(COPD)の両方の臨床症状を有する、喘息・COPDオーバーラップ(ACO)は、症状が悪化しやすいとされ、その原因の解明と適切な診断基準の構築が求められた。本研究は、臨床症状に加え炎症細胞の詳しい解析により、喘息とCOPD両方の特徴を有するサブタイプの特定に成功し、ACOの診断モデルを構築した。さらに、ACOの診断において血液中のペリオスチンとYKL-40を組み合わせて測定することの有用性を示した。また、喘息およびCOPD患者における増悪因子の解明においては、喘息の炎症病態に関わる誘導型一酸化窒素合成酵素の遺伝子型が喘息の増悪因子となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、慢性呼吸器疾患である喘息やCOPD患者を、臨床症状だけでなく、細胞レベルや遺伝子レベルの情報をを用いて病態の特徴ごとに分類し、それぞれのサブタイプに合わせた治療法の選択が求められている。本研究は、ACO患者を含む喘息患者やCOPD患者の病態を特徴付ける新たな情報を臨床に提供することにより、これら患者における適切な診断と最適な治療法の提供に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiology of asthma-COPD overlap (ACO) remains unclear. In this study, we identified the diagnostic model of ACO using phenotype and endotype analysis in patients with asthma and COPD. Moreover, we newly demonstrated the utility of serum biomarkers (periostin and YKL-40) for identifying patients with ACO. We also investigated the association of polymorphism in inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene with exacerbations in patients with asthma.

研究分野：医療薬学

キーワード：喘息 慢性閉塞性肺疾患 喘息・COPDオーバーラップ 重症喘息 遺伝子発現解析 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者の病態は一様ではなく、異なる炎症病態を有する複数のサブタイプに分類されることが報告されている。そのため、サブタイプに合わせた治療法の提供を行う precision medicine の重要性が唱えられている。Precision medicine では、ゲノム情報やその他の生体分子情報に基づいて精密な診断を行い、患者をサブタイプに分類(層別化)し、サブタイプごとに最適な治療法を確立することを目指している。

臨床において喘息と COPD の両方の臨床症状を有する患者が散見されており、このような症例は 2014 年に国際的ガイドラインにより、ACOS (asthma-COPD overlap syndrome) として提唱された。しかし、その後、症候群は原因不明で共通の病態の場合に使用される言葉であること、喘息も COPD も単一ではなくさまざまな機序によって病態が形成され、臨床的特徴も多様性を認める疾患であることなどから、症候群という言葉を除き、喘息・COPD オーバーラップ (Asthma and COPD Overlap, ACO) と呼称することが提唱された。ACO は慢性の気流閉塞を示し、喘息と COPD のそれぞれの特徴を併せもつ疾患と定義される。本邦において喘息および COPD 患者の内、ACO に該当する患者は約 15-27% 存在していると報告されている。ACO 患者では COPD 患者に比べ、健康関連 QOL の低下や疾患増悪頻度の上昇が起こることが報告されており、単独発症例の場合よりも厳密なコントロールが必要である。しかし、ACO を鑑別する確かな診断基準は設けられておらず、詳細な病態解析が望まれている。

同様に重症喘息においても、病態の適切な評価と最適な治療法の確立が急務とされている。重症喘息は喘息患者の 5-10% に存在するとされ、治療に抵抗性を示すなどにより喘息死に至るリスクが高いことが知られている。重症喘息の病態評価は十分に確立されておらず、病態の適切な理解が求められている。

2. 研究の目的

(1) 喘息および COPD 患者における新たな病態分類

ACO 患者における病態解析においては、ACO 患者を含む喘息および COPD 患者を対象に、疾患サブタイプを規定する因子の解明が重要となる。そこで本研究では、病態の層別化マーカーとしてヘルパー T 細胞 (Th 細胞) のサブセットに注目した。ヘルパー T 細胞はナイーブ T 細胞より各サブセットに分化し、特異的転写因子により、TBX21 より Th1 が、GATA3 より Th2 が、RORC より Th17 が、FOXP3 より制御性 T 細胞が分化し、喘息および COPD の病態に深く関与している。さらに近年、疾患サブタイプを分類する手法として、バイアスの掛からない数理的手法であるクラスター解析が多く用いられており、新たな病態理解に役立っている。

本研究は、喘息、COPD および ACO 患者の病態解析を行い、クラスター解析による新たな病態分類により、ACO の鑑別・診断に有用なマーカーを明らかにすることを目的とした。

(2) ACO 患者の診断バイオマーカーの構築

ペリオスチンは肺線維芽細胞より Th2 型サイトカインである IL-4、IL-13 により誘導される細胞外マトリックスタンパク質である。ペリオスチンは、好酸球性炎症および組織リモデリングにおいて重要な役割を果たすと考えられており、喘息の病態や病勢を特徴づけるバイオマーカーとしての有用性が報告されている。また、キチナーゼ様タンパク質の一つである chitinase-3-like protein 1 (YKL-40) は、マクロファージ、好中球、単球、気道上皮および血管平滑筋細胞を含む様々な細胞型によって産生され、気管支炎症および気道リモデリングを引き起こすと知られている。YKL-40 は COPD の病因に深く関与している可能性があり、また YKL-40 は喘息と COPD を区別する有用なバイオマーカーとなり得るとの報告がある。

本研究は、ACO の診断に対する、血清ペリオスチン濃度および血清 YKL-40 濃度の有用性を評価することを目的とした。

(3) 重症喘息患者の病態評価

喘息患者の多くでは、好酸球性の気道炎症が病態の主体となっている。好酸球性炎症を有する患者では Th2 細胞が分化・誘導され、Th2 細胞は IL-4 や IL-13 を介して、気道上皮において誘導型一酸化窒素合成酵素 (NOS2) の発現を誘導する。この際に、呼気中には一酸化窒素が放出されることから、呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO) は好酸球性気道炎症のマーカーとして、有用であることが知られている。このように喘息の炎症病態には NOS2 が関与していることから、その遺伝子多型と病態との関連を評価することが重要であると考えた。

NOS2 遺伝子のプロモーター領域には、5 塩基の反復配列が存在し、そのリピート数が異なる NOS2 (CCTTT)_n 多型は、遺伝子発現の安定化に関与することが知られている。喘息患者におけるこれまでの検討では、(CCTTT)_n 多型が吸入ステロイド治療導入前の喘息患者において、FeNO に影響を及ぼすことが報告されている。しかし、(CCTTT)_n 多型が吸入ステロイド治療導入後における治療アウトカムに与える影響についてはこれまでに検討されていない。そこで本研究は、NOS2 遺伝子多型および遺伝子発現量が喘息患者の病態および増悪発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 喘息および COPD 患者における新たな病態分類

研究デザインおよび対象患者

本研究は単施設前向き観察研究であり、静岡県立総合病院倫理委員会の承認 (SGH15-01-55) を得て実施した。患者からの同意取得においては、説明文書を用い各事項において理解を得て、書面にてインフォームドコンセントを取得した。対象患者は静岡県立総合病院に通院中で、喘息または COPD において、8 週以内に治療内容に変更のない 20 歳以上の患者とした。

測定項目および統計解析

同意取得日において、生化学検査により末梢血白血球分画および非特異的 IgE 濃度の測定を行った。呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO) の測定を NO analyzer を用いて行い、スパイロメトリーにより肺機能検査を行った。さらに、静脈血より Ficoll 法に従い末梢血単核球 (PBMC) を得た。PBMC より定法に従い RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。cDNA を用い Real-Time PCR 法により、Th 細胞特異的転写因子である *TBX21*、*GATA3*、*RORC* および *FOXP3* mRNA 量を定量した。

クラスター解析は、始めに因子分析により組み込む変数を選択し、データを正規化した後に階層的クラスタリングを Ward 法にて行った。

(2) ACO 患者の診断バイオマーカーの構築

研究デザインおよび対象患者

対象患者は静岡県立総合病院または日本大学医学部附属板橋病院に通院中で、喘息または COPD において治療中の 20 歳以上の患者 353 名とした。喘息治療を受けている患者 263 名の内、年齢 40 歳以上、一秒率 < 0.7 であることを共に満たし、さらに pack-years \geq 10、肺拡散能障害 ($DL_{CO}/VA < 80\%$)、胸部 CT における気腫性変化を示す低吸収領域の存在の内少なくとも一つを満たす患者 86 名を ACO と診断し、それ以外の患者 177 名を喘息とした。また、COPD 治療を受けている患者 90 名の内、喘息の既往、末梢血好酸球数 ≥ 250 cells/ μ L、FeNO > 35 ppb、血清 IgE 濃度 > 100 IU/mL の内、少なくとも二つを満たす患者 29 名を ACO と診断し、満たす項目が一つ以下の患者 61 名を COPD と診断した。ACO と診断された患者は計 115 名であった。なお、本研究は静岡県立総合病院 (SGH15-01-55) および日本大学医学部 (RK-130111) の各倫理委員会の承認を得たのち実施した。

測定項目および統計解析

患者登録日において採血を行い、血清ペリオスチン濃度および血清 YKL-40 濃度を免疫学的測定法により定量した。

(3) 重症喘息患者の病態解析

研究デザインおよび対象患者

対象患者は中等症から重症の 20 歳以上の気管支喘息患者とした。重症度分類は GINA ガイドラインにおける治療ステップを用い、ステップ 3, 4, 5 を中等症および重症と定義した。なお、本研究は静岡県立総合病院倫理委員会の承認 (SGH15-01-55) を得て実施した。

測定項目および統計解析

患者登録日において採血を行い、測定項目としてスパイロメトリー、FeNO、白血球数、IgE 濃度の測定を行い、マイクロサテライト解析により *NOS2* (CCTTT)_n リピート数を解析した。遺伝子の 2 つのアレルのうち、リピート数の短いアレルをショーターアレル、長いアレルをロングアレルと定義した。さらに、血液より末梢血単核球を分離し Real-Time PCR 法により *NOS2* mRNA 発現量の定量解析を行った。増悪発現は、患者登録日前後 1 年間において、緊急受診によりステロイドの全身投与がされた症例を増悪と定義した。

4. 研究成果

(1) 喘息および COPD 患者における新たな病態分類

喘息患者 152 名および COPD 患者 50 名を対象とした。クラスター解析の結果、202 名の患者は 4 つのクラスターに分類された。その内、3 つのクラスターは喘息患者と COPD 患者が顕著に分かれ、アトピー性喘息優位なクラスター、高齢の喘息患者優位なクラスターおよび COPD 患者優位なクラスターであった。4 つ目のクラスターでは、喘息患者の 28% と COPD 患者の 14% が分類され、ACO の特徴を有するクラスターであると考えられた。ACO クラスターでは、喘息様症状として、末梢血好酸球数、FeNO、血清 IgE 濃度の上昇が認められ、COPD 様症状として、高い喫煙歴と肺機能の低下が認められた。また、ACO クラスターは Th 細胞特異的転写因子の遺伝子発現量によっても特徴付けられ、Th1 細胞の転写因子である *TBX21* mRNA 発現量は高く、一方 Th2 細胞の転写因子である *GATA3* mRNA 発現量は低下が認められ、これらはアト

ピー性喘息のクラスターと有意な差異が認められた。以上の臨床症状および分子病態情報より、ACO クラスターを鑑別するモデルを作成したところ、血清 IgE 濃度、末梢血好酸球数、喫煙歴、1 秒率および *TBX21/GATA3* mRNA 発現量比が有意な因子として組み込まれ、ACO の病態を特徴付ける重要な因子であることが考えられた。(Hirai K, et al. *Clin Exp Allergy*. 47:1374–82, 2017)

(2) ACO 患者の診断バイオマーカーの構築

血清ペリオスチン濃度は、喘息および ACO 患者において、COPD 患者に比べて有意に高値を示した。一方、血清 YKL-40 濃度は、COPD および ACO 患者において、喘息患者に比べ有意に高値を示した。そこで、ROC 解析にて血清ペリオスチン濃度および血清 YKL-40 濃度が、喘息および COPD 患者より ACO 患者を鑑別する際に有用であるかを評価した。その結果、COPD 患者より ACO 患者を鑑別する際のマーカーとして、血清ペリオスチン濃度が有用であることが示された [ROC-AUC 0.61 (95% CI: 0.53-0.70)]。その際の実血清ペリオスチン濃度のカットオフ値は、55.1 ng/mL であり、感度 59%、特異度 62%、陽性的中率 75%、陰性的中率 45%にて ACO を鑑別可能であった。また、喘息患者より ACO 患者を鑑別するマーカーとして、血清 YKL-40 濃度が有用であり [ROC-AUC 0.71 (95% CI: 0.64-0.77)]、カットオフ値 61.3 ng/mL、感度 61%、特異度 73%、陽性的中率 60%、陰性的中率 74%にて ACO 患者の鑑別が可能であった。続いて、血清ペリオスチンおよび YKL-40 のカットオフ値に基づいて、喘息、COPD および ACO 患者を高濃度群と低濃度群に分類した。その結果、血清ペリオスチンおよび YKL-40 ともに高値であった患者の割合は、ACO 患者において喘息および COPD 患者よりも有意に高値であった (オッズ比: 2.6; 95% CI: 1.6-4.3; 感度 38%; 特異度 81%)。また、血清ペリオスチン高濃度群および YKL-40 低濃度群を有する患者の割合は、ACO または COPD 患者よりも、喘息患者において有意に高値を示した (オッズ比: 4.07; 95% CI: 2.49-6.81; 感度: 43.5%; 特異度: 84.1%)。血清ペリオスチン低濃度群および YKL-40 高濃度群であった患者の割合は、ACO または喘息患者よりも、COPD 患者において有意に高かった (オッズ比: 2.61; 95% CI: 1.39-4.82; 感度: 32.8%; 特異度: 84.2%)。(Shirai T, Hirai K, Gon Y, et al. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 7:134–45, 2019)

血清ペリオスチンおよび YKL-40 濃度が高値である患者の割合は、喘息または COPD 患者に比べ ACO 患者において有意に高かったことから、血清ペリオスチンと YKL-40 を組み合わせることにより、高い特異度で喘息または COPD 患者から ACO 患者を鑑別することが可能であると示唆された。

(3) 重症喘息患者の病態解析

対象患者は 136 名であり、治療ステップ 3, 4 および 5 の患者はそれぞれ 47 名 (35%)、76 名 (56%) および 13 名 (10%) であった。*NOS2* (CCTTT)_n リピート数は、9 から 22 リピートの範囲であり、13 リピートが最もアレル頻度が高いリピート数であった。*NOS2* (CCTTT)_n リピート数と *NOS2* mRNA 発現量との関連を解析した結果、2 つのアレルのリピート数の合計が大きくなるに従い、mRNA 発現量は減少することが示された ($P < 0.001$)。このように、リピート数の増加は mRNA 発現量の減少に関連することが示唆され、11 リピート以下のアレルを有する患者において最も mRNA 発現量が高いことが明らかとなった。

次に、11 リピート以下のアレルをショートアレル (S)、12 リピート以上のアレルをロングアレル (L) と定義し、増悪発現との関連を評価した。その結果、ショートアレルを有する患者 (S/S + S/L) において増悪発現率が 39%であったのに対し、ロングアレルのみを有する患者 (L/L) では 21%であり、ショートアレルを有する患者において有意に増悪発現率が高かった ($P = 0.002$)。ショートアレルを有することによる増悪発現に対するオッズ比は、2.4 (95%信頼区間, 1.1-5.3) であり、年齢、性別、BMI および予測 1 秒量により因子を調整した際のオッズ比も 2.8 (1.2-6.6) と有意な結果であった。(Hirai K, et al. *J Allergy Clin Immunol*. 142:663–5, 2018)

本研究は喘息患者の吸入ステロイド導入後の治療アウトカムに対し、*NOS2* (CCTTT)_n 遺伝子多型が影響を及ぼすことを示した初めての知見である。また、喘息患者において *NOS2* (CCTTT)_n 遺伝子多型と *NOS2* mRNA 発現量との関係をヒトにおいて示した報告はこれまでになく、リピート数の増加は mRNA 発現量の減少に関与していることを新たに示した。本研究により *NOS2* (CCTTT)_n 遺伝子多型は、*NOS2* mRNA 発現量を変動させ、11 リピート以下のアレルを有することは喘息患者において増悪発現のリスクを増大させる因子であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件, すべて査読有)

1. Shirai T*, **Hirai K***, Gon Y*, Maruoka S, Mizumura K, Hikichi M, Itoh K, Hashimoto S. (* as equal contributor). Forced oscillation technique may identify severe asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019. doi: 10.1016/j.jaip.2019.05.036.
2. Shirai T*, **Hirai K***, Gon Y*, Maruoka S, Mizumura K, Hikichi M, Itoh K, Hashimoto S. (* as equal contributor). Forced oscillation technique may identify asthma-COPD overlap. *Allergol Int*. 2019. doi: 10.1016/j.alit.2019.01.002.

3. Shirai T*, **Hirai K***, Gon Y*, Maruoka S, Mizumura K, Hikichi M, Holweg C, Itoh K, Inoue H, Hashimoto S. (* as equal contributor). Combined Assessment of Serum Periostin and YKL-40 May Identify Asthma-COPD Overlap. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 7:134–145, 2019. doi: 10.1016/j.jaip.2018.06.015.
4. **Hirai K**, Shirai T, Suzuki M, Shimomura T, Itoh K. Association between (CCTTT)_n repeat polymorphism in NOS2 promoter and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol.* 142:663–665, 2018. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.023.
5. **Hirai K**, Shirai T, Suzuki M, Akamatsu T, Suzuki T, Hayashi I, Yamamoto A, Akita T, Morita S, Asada K, Tsuji D, Inoue K, Itoh K. A clustering approach to identify and characterize the asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap phenotype. *Clin Exp Allergy.* 47:1374–1382, 2017. doi: 10.1111/cea.12970.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. **平井啓太**：ゲノム薬理と薬物動態解析を基盤とした薬物療法および病態の個別化研究. 第 64 回薬学会東海支部総会・大会. 2018 年 6 月 30 日. 愛知 (口頭発表)
2. **平井啓太**, 白井敏博, 鈴木将之, 下村建貴, 伊藤邦彦：喘息患者における増悪発現と NOS2 遺伝子多型との関連. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会. 2018 年 6 月 22 日 (ポスター発表)
3. Shirai T, **Hirai K**, Gon Y, Maruoka S, Mizumura K, Itoh K, Hashimoto S: Usefulness of the forced oscillation technique in diagnosing asthma-COPD overlap. American Thoracic Society International Conference. 2018 年 5 月 21 日. San Diego (ポスター発表)
4. **平井啓太**, 白井敏博, 岸山和樹, 山部喬之, 秋山紗記子, 下敷領貴之, 伊藤邦彦：喘息および COPD 患者における 1-メチルアデノシン濃度測定の意義. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会. 2018 年 4 月 27 日. 大阪 (ポスター発表)
5. 植田萌美, **平井啓太**, 下敷領貴之, 白井敏博, 伊藤邦彦：喘息・COPD オーバーラップの病態解析における micro-RNA の有用性. 日本薬学会第 138 年会. 2018 年 3 月 28 日. 金沢 (ポスター発表)
6. **Hirai K**, Shirai T, Suzuki M, Tsuji D, Inoue K, Itoh K: Association between pentanucleotide repeat polymorphism in NOS2 promoter and asthma exacerbations. European Respiratory Society International Congress. 2017 年 9 月 13 日. Milano (ポスター発表)
7. Shirai T, **Hirai K**, Gon Y, Inoue H, Hashimoto S: Comparable serum periostin levels among a Japanese population with asthma, COPD, and asthma-COPD overlap. European Respiratory Society International Congress. 2017 年 9 月 10 日. Milano (口頭発表)
8. **平井啓太**, 白井敏博, 赤松泰介, 鈴木貴人, 山本輝人, 秋田剛史, 森田 悟, 朝田和博, 伊藤邦彦：クラスター解析による喘息 COPD オーバーラップ症候群 (ACOS) の検出. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会. 2017 年 4 月 22 日. 東京 (口頭発表)
9. **平井啓太**, 白井敏博, 鈴木将之, 植田萌美, 辻 大樹, 井上和幸, 伊藤邦彦：クラスター解析による喘息・COPD オーバーラップ症候群における診断マーカーの構築. 日本薬学会第 137 年会. 2017 年 3 月 25 日. 仙台 (ポスター発表)
10. Shirai T, **Hirai K**, Suzuki M, Akamatsu T, Suzuki T, Hayashi I, Yamamoto A, Akita T, Morita S, Asada K: Usefulness of the forced oscillation technique in diagnosing asthma-COPD overlap syndrome. European Respiratory Society International Congress. 2016 年 9 月 7 日. London (ポスター発表)

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 邦彦
 ローマ字氏名：Itoh Kunihiko
 研究協力者氏名：白井 敏博
 ローマ字氏名：Shirai Toshihiro
 研究協力者氏名：権 寧博
 ローマ字氏名：Gon Yasuhiro
 研究協力者氏名：橋本 修
 ローマ字氏名：Hashimoto Shu

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、研究者個人に帰属されます。