

令和元年6月18日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09552

研究課題名(和文)肥満マウス喘息モデルを用いた重症・難治性喘息の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis and development of novel therapeutic strategies in severe and difficult asthma using murine allergic asthma model with obesity.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肥満による喘息の重症化・難治化の病態を明らかにし、新たな治療法を開発するために食餌性肥満マウスアレルギー性喘息モデルを作成して検討した。

肥満により内臓脂肪組織量は増加し、喘息による気道炎症は悪化した。DNAマイクロアレイ法を用いて内臓脂肪組織中の遺伝子発現変化を検討した結果、肥満により数種類の肥満・喘息関連遺伝子の発現がやせ型喘息マウスと比較して喘息反応惹起時に変化することが認められた。以上の結果、このような内臓脂肪組織中の遺伝子発現変化が重症・難治性喘息に対する新たな治療の標的になり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、ガイドラインが推奨する治療でもコントロール不良な重症・難治性喘息患者が多数存在し問題となっている。この原因には患者個々の多様性、中でも肥満が危険因子の一つとして関与していることが明らかとなっているが詳細は不明である。

近年、肥満の基本病態が慢性持続性炎症であることが明らかになり、同様に慢性の炎症性疾患である喘息の病態に肥満が影響を及ぼしていると考えられる。肥満と喘息患者はともに増加傾向で、この2つの異なる慢性炎症の相互作用を詳細に検討することは重症・難治性喘息の病態解明と新しい治療法の開発をもたらす、喘息死者数の減少といった社会的意義や医療経済的効果が得られる点で非常に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathogenesis of the severe and difficult asthma caused by obesity and develop novel therapeutic strategies for those asthma, a murine allergic asthma model with diet-induced obesity was developed and examined.

Obesity increased the weight of visceral adipose tissues and enhanced asthmatic airway inflammation. As a result of examining the gene expression alterations in visceral adipose tissues by the DNA microarray, the expression of several kinds of obesity and asthma-related genes was observed to change in murine asthma model with obesity during asthmatic response, as compared with lean one. These results suggest that alterations in those gene expression in visceral adipose tissue could be targets for novel therapeutic strategies for severe and difficult asthma.

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 DNAマイクロアレイ 遺伝子発現 Th2 サイトカイン アディポネクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 喘息は、気道の慢性炎症による種々の程度の気道狭窄と気道過敏性の亢進、そして臨床的には繰り返し起こる咳、喘鳴、呼吸困難を特徴とする気道のアレルギー性慢性炎症性疾患である。この気道炎症の成立には、好酸球、CD4⁺T細胞、マスト細胞などの炎症細胞、気道上皮細胞、線維芽細胞をはじめとする気道構成細胞、および種々の体液因子が関与している。以上のような喘息の病態が明らかになって以来、喘息治療ガイドラインでは喘息治療薬の中で最も抗炎症作用の強い吸入ステロイド薬を第一選択薬とすることを推奨している。しかし、このようなガイドラインが推奨する治療を行ってもコントロール不良な重症・難治性喘息患者が臨床的には多く存在することが問題視されている。そして、その重症・難治化の機序には患者個々の喘息の病態の多様性が関与していることが示唆されている。以前から喘息の発症・増悪の危険因子の一つに肥満が掲げられており、この病態の多様性に肥満が関与していると推測されているが、その詳細についてはいまだ明らかにされていない。

(2) 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 TNF- α 、IL-6、eotaxin などの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、この慢性炎症がインスリン抵抗性を介して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にも関与していることが示唆されている。従って、肥満におけるインスリン抵抗性のさらに上流に位置するこの慢性持続性炎症が同様の慢性炎症性疾患であるアレルギー性気道炎症を基本病態にもつ喘息の発症、増悪に関与していることが容易に予想できる。実際、重症・難治性喘息患者に肥満を伴うことが多いことから、この2つの異なる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の病態の多様性や重症化、難治化に対応できる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のみならず医療経済的効果が得られる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・難治化の機序を内臓脂肪組織の免疫代謝的調節機構の変化に注目して検討し、未知で重要な喘息増悪因子とその機能を明らかにすることで新たな治療法を開発することを目的とする。

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 週間後に抗原をネプ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

抗原吸入刺激前ならびに吸入刺激後に十分麻酔をした後、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。右肺は直ちに -80 で冷凍保存し、左肺はホルマリンで固定して後日、HE 染色と PAS 染色法を用いて組織学的検討を行った。BAL 液中の細胞はサイトスピンで標本を作成後 Diff-Quick 染色し、細胞分画を調べて気道の炎症を評価した。また、気道過敏性の亢進の有無に関しては、メサコリン（Mch）に対する気道反応性を測定して検討した。

(3) 肥満による内臓脂肪組織の量的変化と機能的変化の評価

気管支肺胞洗浄（BAL）後、腹部内臓脂肪組織として両側腎周囲脂肪組織と精巣上体周囲脂肪組織を摘出した。重量を測定後、一部は -80 で冷凍保存し、後日 DNA マイクロアレイ法により包括的に遺伝子発現の変化を検討した。

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、肥満マウス群の体重は約 50 g となり、非肥満群と比較して体重が約 1.7 倍に増加した。また、経口糖負荷試験では肥満群で耐糖能の異常を認めたと、非肥満群では認めなかった。

(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 日目では肥満により増加を認めなかったが、5 日目で総細胞数、好酸球数、リンパ球数の増加を認め、肺組織では気道上皮の PAS 陽性細胞の増加を認めた。また、Mch に対する気道反応性も肥満により有意に亢進を認めた。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

を確認した。

(3) 肥満による内臓脂肪組織の量的変化と機能的変化

16 週間の高脂肪食投与により、肥満マウスでは体重増加とともに腎周囲脂肪組織と精巣上体周囲脂肪組の重量も増加した。特に肥満マウスの腎周囲脂肪組織は非肥満マウスのものと比較して約 4 倍と著明に増加した。そこで、喘息反応惹起時の腎周囲脂肪組織中の遺伝子発現変化を非肥満・肥満の 2 群間で DNA マイクロアレイ法を用いて検討した。その結果、検出可能な全遺伝子 (34365 個) の中で、肥満関連遺伝子 2076 個のうち 99 個の遺伝子の発現が増強し、560 個の遺伝子の発現が低下していた。また、喘息関連遺伝子 764 個のうち、47 個の遺伝子の発現が増強し、182 個の遺伝子の発現が低下しているのが認められた (表 1)。以上の遺伝子発現変化の中で、特に高親和性 IgE 受容体遺伝子発現増強、toll-like receptor 4 遺伝子発現増強、interleukin-17A (IL-17A) 遺伝子発現増強、interleukin gamma receptor 1 (IFN- γ R1) 遺伝子発現低下、interleukin 4 receptor alpha (IL-4R α) 遺伝子発現低下が認められた。

表1 内臓脂肪組織における肥満による肥満・喘息関連遺伝子の発現変化

肥満関連遺伝子 2076中	発現が増加している遺伝子 (ratio >1.5)	発現が減少している遺伝子 (ratio <0.66)
肥満①/非肥満①ratio値	303	820
肥満②/非肥満①ratio値	311	941
肥満①/非肥満②ratio値	280	698
肥満②/非肥満②ratio値	282	845
	99	560

喘息関連遺伝子 764中	発現が増加している遺伝子 (ratio >1.5)	発現が減少している遺伝子 (ratio <0.66)
肥満①/非肥満①ratio値	131	275
肥満②/非肥満①ratio値	135	313
肥満①/非肥満②ratio値	132	226
肥満②/非肥満②ratio値	115	265
	47	182

(4) 結論

肥満による喘息悪化の機序には、肥満による内臓脂肪組織の量的・機能的変化が関与していると考えられた。さらに、喘息反応惹起時の内臓脂肪組織内で数種類の肥満・喘息関連遺伝子の発現変化が認められたことから、これらが重症・難治性喘息における新たな治療の標的になり得ると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Ouchi R, Kawano T, Yoshida H, Ishii M, Miyasaka T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Takahashi T, Ohno I. Maternal Separation as Early-Life Stress Causes Enhanced Allergic Airway Responses by Inhibiting Respiratory Tolerance in Mice. *Tohoku J Exp Med.* 2018 Nov;246(3):155-165. (査読有)

DOI: 10.1620/tjem.246.155

Kawano T, Ouchi R, Ishigaki T, Masuda C, Miyasaka T, Ohkawara Y, Ohta N, Takayanagi M, Takahashi T, Ohno I. Increased Susceptibility to Allergic Asthma with the Impairment of Respiratory Tolerance Caused by Psychological Stress. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;177(1):1-15. (査読有)

DOI: 10.1159/000488289

Miyasaka T, Okuyama-Dobashi K, Masuda C, Iwami S, Sato M, Mizoguchi H, Kawano T, Ohkawara Y, Sakurada S, Takayanagi M, Ohno I. The involvement of central nervous system histamine receptors in psychological stress-induced exacerbation of allergic airway inflammation in mice. *Allergol Int.* 2016 Sep;65 Suppl:S38-44. (査読有)

DOI: 10.1016/j.alit.2016.05.015

Morone M, Sato A, Ohno I, Ohkawara Y, Suzuki T, Nakamura H, Azuma Y. An Attempt to Measure Presentation Skill Acquisition Using Peer and Self-evaluation. *Yakugaku Zasshi.* 2016;136(7):1041-9. (査読有)

DOI: 10.1248/yakushi.15-00239

[学会発表](計 11 件)

大内竜介、河野 資、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子、大野 勲. 幼少期ストレスによる喘息発症モデル 幼少期ストレスと免疫寛容の抑制、第 67 回日本アレルギー学会学術大会、千葉 幕張、2018 年 6 月

大河原雄一、宮坂智充、河野 資、高橋知子、大野 勲．肥満という表現型は必ずしも喘息増悪と関係しない—マウス喘息モデルを用いた検討—、第 66 回日本アレルギー学会学術大会、東京、2017 年 6 月

河野 資、大内竜介、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子、大野 勲．精神的ストレスによる喘息発症モデル—精神的ストレスによる免疫寛容、第 66 回日本アレルギー学会学術大会、東京、2017 年 6 月

河野 資、大内竜介、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子、大野 勲．幼少時ストレスによる成人喘息発症モデル—幼少時ストレスによる免疫寛容—、第 57 回日本呼吸器学会学術大会、東京、2017 年 4 月

OUCHI Ryusuke, KAWANO Tasuku, MIYASAKA Tomomitsu, OHKAWARA Yuichi, TAKAYANAGI Motoaki, TAKAHASHI Tomoko, OHNO Isao. Early life stress increased the risk of adult onset asthma through the inhibition of the development of respiratory tolerance in murine model. 第 45 回日本免疫学会総会、宜野湾 沖縄、2016 年 12 月

大河原雄一、宮坂智充、河野資、高橋知子、大野勲．肥満による気管支喘息増悪と内臓脂肪組織の機能的変化について、アレルギー・好酸球研究会 2016 東京、学術総合センター 2016 年 10 月

河野資、下田奈々、加羽香澄、大内竜介、新田典秀、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、高橋知子、大野勲．好中球・好酸球混合型喘息発症における精神的ストレスの関与～精神的ストレスによる免疫寛容の抑制と Th17 細胞の分化誘導～、第 55 回日本薬学会東北支部大会、郡山、2016 年 9 月

宮坂智充、伊藤ちひろ、増田千愛、佐藤美希、河野資、大河原雄一、菊地利明、高柳元明、大野勲．アレルギー性気道炎症の性差における IFN- γ の役割、第 65 回日本アレルギー学会学術大会 東京、2016 年 6 月

河野資、大内竜介、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、大野勲．精神的ストレスによる免疫寛容の抑制と喘息発症の感受性増大、第 65 回日本アレルギー学会学術大会、東京、2016 年 6 月

大内竜介、河野資、吉田仁美、新田典秀、宮坂智充、大河原雄一、高柳元明、大野勲．幼少期ストレスによる免疫寛容の抑制と喘息発症リスクの増大、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、京都、2016 年 4 月

宮坂智充、伊藤ちひろ、増田千愛、奥山香織、佐藤美希、河野資、大河原雄一、菊地利明、高柳元明、大野勲．気管支喘息における女性優位な IL-4 産生における IFN- γ の関与、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、京都、2016 年 4 月

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 中川西 修

ローマ字氏名: (NAKAGAWASAI, osamu)

所属研究機関名: 東北医科薬科大学

部局名：薬学部
職名：准教授
研究者番号(8桁): 50296018

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。