

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09625

研究課題名(和文) 肥満を伴う重症喘息患者のステロイド治療抵抗性の機序解明と新規治療戦略開発の試み

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of steroid resistance in severe asthma with obesity

研究代表者

党 雅子 (Masako, To)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90595597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肥満を有する気管支喘息患者のステロイド感受性についてex vivoの系で測定し、その変化を修飾する肥満由来因子について検討した。その結果、肥満(体脂肪率で定義)を有する女性気管支喘息患者では、体脂肪率正常の女性気管支喘息患者と比較して、ステロイドの感受性が低下していることが判明した。さらに患者由来の末梢血中単核細胞(PBMC)を用いたex vivoの検討で、メトフォルミン(AMPK活性化薬)がこのステロイドの感受性の低下を改善することが示された。肥満(体脂肪率で定義)を有する女性気管支喘息患者のステロイド感受性の低下には、AMPKの活性の変化が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は気管支喘息の重症化因子として臨床的に認識されている。しかしその重症化機序については十分には解明されていない。そのため、肥満を有する重症喘息患者の治療に際しては、コントロールに苦慮することがしばしばある。本研究では、肥満を有する女性気管支喘息患者ではステロイド感受性の低下があり、これにはAMPKが関与している可能性が示唆された。肥満患者ではAMPKの低下が知られており、AMPK低下とステロイド感受性低下の関連をさらに深く探索することで、肥満を有する重症喘息患者に対する新しい薬剤の開発につなげていける可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The main aim of this study was to investigate steroid sensitivity of asthmatic patients with obesity and clarify obesity-related factors that modulate steroid sensitivity. The steroid sensitivity in female asthmatic patients with obesity was impaired compared to that in no-obese asthmatic patients. The impaired steroid sensitivity in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from female asthmatic patients with obesity was restored by metformin, an AMP-activated protein kinase activator. From the result, the obesity-related modulation of AMPK activity potentially involves in the impaired steroid sensitivity in female asthmatic patients with obesity.

研究分野：気管支喘息の病態と治療

キーワード：気管支喘息 肥満 ステロイド抵抗性 体脂肪率

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息治療は、吸入ステロイド導入により著明な進歩をとげたが、今なおステロイド抵抗性の重症喘息患者が 5~10%存在する。このような患者は、高用量の吸入ステロイドを使用してもなお喘息コントロールが不良で喘息発作を反復し、学業や仕事の継続に支障を来している。さらに、これらの重症喘息患者の医療コストは、全喘息患者の医療コストの 50%以上を占めていると言われている。ステロイド抵抗性重症喘息の治療戦略の開発は重要な課題である。

近年、気管支喘息のフェノタイプ分類が注目され、各フェノタイプに合わせた治療の重要性が考慮され始めている。肥満を有する重症喘息は注目を集めているフェノタイプのひとつである。肥満は気管支喘息の重症化因子として臨床的に認識されており、このフェノタイプの喘息の重症化機序の解明は重要な課題である。

肥満を有する気管支喘息患者の臨床的特徴としては、非肥満の患者と比較して、喘息増悪による救急外来受診の割合が高く、救急受診時には症状がより重く、人工呼吸管理を必要とする可能性が高いと報告されている。このような肥満と喘息重症化の関連性には性差があり、女性でより強いとの報告もある。さらに肥満を有する喘息患者は、ロイコトリエン受容体拮抗薬への反応性は変わらないものの、吸入ステロイド薬への治療反応性低下が認められることが示されていた。

肥満を有する気管支喘息患者の重症化の機序については、若干の知見が報告されていた。肥満者では、脂肪細胞からのアディポサイトカインの産生と分泌が増加し、肥満自体やメタボリック症候群の病態成立に関与している。このような生体の変化が気管支喘息の重症化にも関与している可能性が考えられていた。アディポサイトカインの炎症促進作用が気管支喘息の重症化に関与している可能性を示す知見が出始めていたが、その多くは動物実験での証明の域を出ていない状況であった。また、先に述べたように、肥満を有する喘息患者では、臨床的にステロイド治療への反応性が低下していることが報告されているが、この機序に関しても十分には解明されていなかった。

さらに近年の臨床研究では、BMI で定義された肥満よりも、体脂肪率が喘息重症化との関連が強いとの知見もみられるはじめていた。これまでの肥満と気管支喘息病態との関連についての研究では、BMI により定義された肥満を用いた研究が多いのが実情であった。体脂肪率と気管支喘息の病態およびその分子機序の関連についての研究が望まれていた。

AMP-activated protein kinase (AMPK)は、酵母から哺乳類に至るほとんどすべての細胞に見られる蛋白であり、レプチンを介した糖や脂肪酸の利用の調節作用を仲介する重要な蛋白である。肥満やカロリー過剰は、AMPK の低下を来し、エネルギー代謝の攪乱を来すことが報告されていた。一方で AMPK のエネルギー代謝以外の働きも知られてきており、AMPK の活性の上昇は、ステロイド受容体の働きを増強することが報告されていた。

### 2. 研究の目的

以上に述べた背景より、我々は、肥満を有する気管支喘息患者においては、AMPK 活性が低下しており、そのためにステロイド感受性の低下が見られ、これが、気管支喘息の重症化に寄与しているとの仮説を立てた。本研究の目的は、肥満を有する気管支喘息患者において、ステロイド感受性の低下を確認し、その低下に関与する因子を同定することであった。この目的のために次の検討を行った。

- (1) 気管支喘息患者を体脂肪率で2群に分けて、体脂肪率とステロイド感受性(ex vivo の系で測定)の関連を検討した。
- (2) 体脂肪率がステロイド感受性低下をきたす機序を AMPK に注目して検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 重症気管支喘息患者のリクルートおよび臨床データ収集

気管支喘息患者を同愛記念病院アレルギー呼吸器科に通院中の患者からリクルートした。エントリー条件は、以下の通りである。

リクルートの日から遡って1年以上の定期受診歴があること

過去1か月以内に感染および急性増悪がないこと

BMI、体脂肪率(体組成計 BC-331:タニタで測定)、スパイロメトリー、喘息罹患年数、喘息治療内容、合併症、過去1年間の重症喘息発作の回数等の臨床データを収集した。末梢血を 20 mL(ヘパリン添加採血管とブレイン採血管を使用)採取し、血清、および末梢血中単核細胞(PBMC)を分離した。

#### (2) 臨床検体の処理

ヘパリン添加採血管を用いて得られた血液からは PBMC を分離した。PBMC の分離にあたっては、Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) と ACCUSPIN™滅菌チューブ (Sigma-Aldrich)を用いた。

5~10×10<sup>6</sup>個の PBMC から細胞内蛋白浮遊液を得て(Nuclear Extraction Kit(Active Motif)を使用)、-80度で保存した。

1×10<sup>6</sup>個の PBMC から総 RNA を抽出し(RNeasy Mini Kit (Qiagen)を使用)、逆転写により cDNA を得て(High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific Inc)を使用)、-80度で保存した。

残りの PBMC を RPMI-1640 培地に懸濁し 96 穴プレートにまいて、ステロイドの感受性の測定を行った。AMPK の活性化薬の影響を観察する目的で、メトフォルミン存在下および非存在下で測定を行った。PBMC に対して、段階的希釈を行ったデキサメサゾン(10<sup>-11</sup>M

~ 10<sup>-6</sup>M)を加えて 30 分培養した。その後 TNF- $\alpha$  を加えて、一晚培養した。翌日に上清を採取し、上清中の CXCL8 を ELISA 法で測定した。この結果からデキサメサゾンの 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を計算した。

### (3) 解析

本研究では、日本肥満学会「肥満・肥満症の指導マニュアル第 2 版」に従い、男性は体脂肪率 20% 以上、女性は体脂肪率 30% 以上を体脂肪により定義された肥満と判断した。対象患者をこの基準によって、体脂肪率過剰群と正常群に分けて、臨床データを比較した。さらに、両群間でステロイド感受性を比較するとともに、メトフォルミンの効果の有無を比較した。

統計は、対応のない 2 群の比較は Mann-Whitney の U 検定を用い、対応のある 2 群の比較には、Wilcoxon の符号順位検定を用いた。p<0.05 を有意とした。

## 4. 研究成果

全体で 96 人の患者から、解析に必要な検体が採取できた。肥満が気管支喘息に与える影響は男女で相違がある可能性が報告されておりこと、体脂肪率の基準値は男女によって異なるので、男女別に解析を行った。現在女性の解析を完了している。

女性患者は全体で 59 人、体脂肪率過剰群 (体脂肪率 $\geq$ 30%) 42 人、正常群 (体脂肪率<30%) 17 人であった。背景因子は、両群で有意差がみられる項目はなかった。1年間の重症発作の回数は体脂肪率過剰群で多い傾向がみられたが、統計的には有意なレベルには至らなかった。

メトフォルミン非存在下で培養した PBMC の IC<sub>50</sub>-デキサメサゾン (ステロイド感受性の指標、値が高いほどステロイド感受性の低下を示す) は、体脂肪率過剰群で有意に高い値を示した。メトフォルミン存在下と非存在下の IC<sub>50</sub>-デキサメサゾンを比較すると、体脂肪率過剰群では、メトフォルミン存在下で IC<sub>50</sub>-デキサメサゾンが有意に低下したが、正常群では有意差が見られなかった。

臨床データとステロイド感受性の相関をみると、IC<sub>50</sub>-デキサメサゾンと 1年間の重症発作の回数間に有意な正の相関がみられた (r=0.451, p=0.018)。これに対して、体脂肪率と IC<sub>50</sub>-デキサメサゾンの間には、有意な相関は見られなかった。

以上のことから、次のことが判明した。

- (1) 体脂肪率が基準値以上の女性喘息患者においては、ステロイドの感受性が低下していることが示された。このステロイドの感受性の低下は、1年間の重症発作の回数と相関しており、ステロイド感受性低下は喘息コントロールと密接に関連している可能性が示唆された。なお、体脂肪率過剰群と正常群の間でステロイドの感受性に有意差がみられたにも関わらず、ステロイド感受性と体脂肪率の間には、相関はみられなかった。この理由は、体脂肪率増加とステロイド感受性低下の間の関連には、閾値が存在するからであると思われる。
- (2) 体脂肪率が基準値以上の女性喘息患者ステロイド感受性の低下は、メトフォルミンにより改善することが示された。このことから、体脂肪率が基準値以上の女性喘息患者においては、AMPK の活性がステロイド感受性低下に関与していると考えられる。

現在のところ、保存してある cDNA を用いて AMPK の mRNA の発現測定と、細胞内蛋白浮遊液を用いて AMPK 活性の測定が進行中であり、間もなく完了する予定である。今後、IC<sub>50</sub>-デキサメサゾンとこれらの関連を解析する。これによって、体脂肪率過剰の女性喘息患者のステロイド感受性低下の機序としての AMPK の関与をさらに確認していく予定である。

表 1 患者背景

	体脂肪率過剰	正常	p
n	42	17	
体脂肪率 (%)	34.5 (32.8 - 37.7)	27.1 (24.8 - 28.6)	<0.001
年齢	61 (48 - 75)	67 (43 - 74)	0.927
喘息罹患年数	15 (9 - 32)	18 (12 - 31)	0.657
重症喘息	55 (3%)	41 (9%)	0.399
重症発作/年	1 (0 - 4)	0 (0 - 3)	0.056
%FVC	99.7 (83.8 - 112.9)	102.4 (87.4 - 116.5)	0.377
%FEV <sub>1</sub>	98.2 (75.8 - 110.5)	92.0 (80.7 - 103.5)	0.382
FEV <sub>1</sub> /FVC	79.5 (72.0 - 85.3)	75.5 (61.6 - 86.2)	0.392

median (interquartile range) または n (%)

表 2 ステロイド感受性

	体脂肪率過剰	正常	p
IC <sub>50</sub> -デキサメサゾン (nM)			
NT	6.8 (5.0 - 9.0)	3.8 (3.6 - 5.5)	0.035
Metformin	5.4 (3.7 - 7.9)	3.6 (2.1 - 5.5)	0.164
Metformin の効果 (NT と Metformin の比較)			
P 値	0.030	0.465	
median (interquartile range)			

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 To Masako, Tsuzuki Ryuta, Katsube Otohiro, Yamawaki Satoshi, Soeda Seiko, Kono Yuta, Honda Natsue, Kano Ichino, Haruki Kosuke, To Yasuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Persistent Asthma from Childhood to Adulthood Presents a Distinct Phenotype of Adult Asthma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice	6. 最初と最後の頁 1921 ~ 1927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.jaip.2020.01.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 党 雅子、黨 康夫	4. 巻 8
2. 論文標題 肥満を有する成人喘息患者の病態と治療への展望	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本呼吸器学会誌	6. 最初と最後の頁 365 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 To Masako, Tsuzuki Ryuta, Katsube Otohiro, Yamawaki Satoshi, Soeda Seiko, Kono Yuta, Honda Natsue, Kano Ichino, Haruki Kosuke, To Yasuo	4. 巻 57
2. 論文標題 A difference in the effects of a comorbidity of allergic rhinitis on asthma symptoms between obese and non-obese patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 286 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2019.02.006	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 -
1. 著者名 Kono Yuta, To Masako, Tsuzuki Ryuta, Haruki Kosuke, To Yasuo	4. 巻 57
2. 論文標題 Elevated serum periostin level in patients with chronic cough and airway hyperresponsiveness	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 122 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2018.11.003	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 -

1. 著者名 To Masako, Kono Yuta, Yamawaki Satoshi, Soeda Seiko, Katsube Otohiro, Kishi Hirohisa, To Yasuo	4. 巻 6
2. 論文標題 A case of chronic eosinophilic pneumonia successfully treated with mepolizumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice	6. 最初と最後の頁 1746 ~ 1748.e1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaip.2018.06.017	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 -

1. 著者名 To M, Kono Y, Ogura N, Mikami S, Honda N, Hitani A, Kano I, Haruki K, To Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Obesity-related systemic oxidative stress: An important factor of poor asthma control	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergology international	6. 最初と最後の頁 147 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2017.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 To Masako, Hitani Akihiro, Kono Yuta, Honda Natsue, Kano Ichino, Haruki Kosuke, To Yasuo	4. 巻 56
2. 論文標題 Obesity-associated severe asthma in an adult Japanese population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 440 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2018.07.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 党 雅子
2. 発表標題 肥満を有する成人喘息患者の病態と治療への展望
3. 学会等名 GSK Severe Asthma Seminar (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Masako To, Ryuta Tsuzuki, Satoshi Yamawaki, Yuta Kono, Natsue Honda, Ichino Kano, Kosuke Haruki, Yasuo To
2. 発表標題	Persistent asthma from childhood to adulthood presents a different phenotype in adult asthma
3. 学会等名	24th congress of Asian Pacific Society of Respirology (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	党 雅子、本田なつ絵、叶 一乃、春木宏介、黨 康夫
2. 発表標題	肥満を伴う気管支喘息患者におけるステロイド治療抵抗性の機序の検討
3. 学会等名	第40回日本肥満学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	党 雅子
2. 発表標題	肥満合併喘息患者の特徴と治療戦略
3. 学会等名	秋季・東京東部呼吸器フォーラム (招待講演)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	M. To, R. Tsuzuki, O. Katsube, S. Yamawaki, S. Soeda, Y. Kono, N. Honda1, I. Kano, K. Haruki, Y. To
2. 発表標題	History of Childhood Asthma: A Potential Risk Factor for Poor Asthma Control in Adult Asthma
3. 学会等名	American Thoracic Society, International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 Masako To, Ryuta Tsuzuki, Otohiro Katsube, Satoshi Yamawaki, Seiko Soeda, Yuta Kono, Natsue Honda, Ichino Kano, Kosuke Haruki, MD, Yasuo To
2. 発表標題 Different impacts of comorbidity of allergic rhinitis on obese and non-obese patients with asthma
3. 学会等名 23rd Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 党 雅子
2. 発表標題 肥満と気管支喘息
3. 学会等名 西日本閉塞性肺疾患シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 党 雅子、本田なつ絵、叶 一乃、春木宏介、黨 康夫
2. 発表標題 肥満と気管支喘息重症化の関連について
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 党 雅子
2. 発表標題 小児喘息から成人喘息への移行症例の臨床的特徴
3. 学会等名 GSK Severe Asthma Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. To, O. Katsube, S. Yamawaki, S. Soeda, Y. Kono, N. Honda, I. Kano, K. Haruki, Y. To
2. 発表標題 Impact of Co-morbidity of Rhinitis on Asthma Symptoms Is Less in Obese Asthmatic Patients Compared to Non-obese Asthmatic Patients
3. 学会等名 American Thoracic Society, International Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. To, Y. Kono, S. Yamawaki, O. Katsube, N. Honda, A. Hitani, I. Kano, K. Haruki, Y. To
2. 発表標題 Obesity, defined by body mass index of equal or more than 25 kg/m2, is a risk factor for severe acute exacerbation of asthma in East-Asian female populations
3. 学会等名 22nd congress of Asian Pacific Society of Respiriology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. To, N. Ogura, Y. Kono, S. Mikami, N. Honda, A. Hitani, I. Kano, K. Haruki, Y. To.
2. 発表標題 Obesity associated severe asthma in East Asian population
3. 学会等名 American Thoracic Society, International Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究協力者	黨 康夫 (To Yasuo)	同愛記念病院・アレルギー呼吸器科・部長	

## 6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	中島 あつ子  (Nakajima Atsuko)	獨協医科大学・埼玉医療センター臨床検査部・技師長  (32203)	