

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08546

研究課題名(和文)肥満を有する重症喘息患者のステロイド治療抵抗性の規定因子の同定と治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of factors associated with steroid insensitivity in obese asthmatic patients

研究代表者

党 雅子 (To, Masako)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：90595597

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)：気管支喘息患者のステロイド感受性をex vivoの系で測定し、これを修飾する肥満由来因子を検討した。高体脂肪率の喘息患者では、正常体脂肪率の患者と比較してステロイド感受性が低下していた。高体脂肪率の患者では、ステロイド感受性は、喘息発作回数および全身性酸化ストレスレベルと相関していた。よって、高体脂肪率の喘息患者のステロイド感受性低下が喘息増悪と関連していること、そして肥満由来の全身性酸化ストレスがステロイド感受性低下に関与している可能性が示唆された。さらに、末梢血単核細胞を用いたex vivoの検討で、メトフォルミンが、酸化ストレス抑制を介し、ステロイド感受性を回復させ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であることが臨床的に認識されており、また肥満合併喘息患者はステロイド治療への反応性が低下していることも知られている。しかし、その機序および対策についてはまだ十分なデータが得られていなかった。本研究では、高体脂肪率を有する喘息患者におけるステロイド感受性低下の機序として、肥満由来の全身性酸化ストレスの関与を明らかにした。また本研究の結果から、メトフォルミンは、酸化ストレス抑制を介して、高体脂肪率を有する喘息患者のステロイド感受性を回復させる可能性が示唆された。これらの結果は、肥満合併喘息患者の病態解明および新しい治療薬の開発の一助となることと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine the steroid sensitivity of asthmatic patients with high body fat percentages and identify obesity-related factors that affect steroid sensitivity. We measured steroid sensitivity on peripheral blood mononuclear cells. Asthmatic patients with high body fat percentages had reduced steroid sensitivity compared to those with normal body fat percentages. Furthermore, in these patients, steroid sensitivity was correlated with the frequency of severe acute exacerbations and systemic oxidative stress levels. Therefore, it is suggested that the decreased steroid sensitivity in asthma patients with high body fat percentages is related to the exacerbation of asthma and that obesity-related systemic oxidative stress may be involved in the decreased steroid sensitivity. Furthermore, our ex vivo investigation using peripheral blood mononuclear cells revealed that metformin has the potential to restore steroid sensitivity through suppression of oxidative stress.

研究分野：呼吸器病学、臨床アレルギー学

キーワード：気管支喘息 肥満 体脂肪率 ステロイド抵抗性 酸化ストレス 急性増悪

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息治療は、吸入ステロイドの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。重症喘息の治療戦略の開発は重要な課題である。

肥満は、世界的に重要な健康問題の1つであり、喘息を含む様々な全身疾患に影響を与えることが知られている。肥満は、喘息コントロール悪化の危険因子である。肥満者の脂肪組織では、酸化ストレスの上昇、アディポサイトカインの増加等があり、その結果、肥満者では全身性の酸化ストレスとサイトカインの上昇が誘導されている。これらの因子は、気道炎症の増強を引き起こし、喘息重症化に寄与する可能性がある。しかし、肥満が喘息を悪化させる詳細な機序は十分には解明されていなかった。

臨床研究では、肥満合併喘息患者では、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 (Peters-Golden et al. Eur. Respir. J. 2006, Boulet et al. Respir. Med. 2007, Anderson et al. Ann. Allergy Asthma Immunol. 2012)。さらに、肥満合併喘息患者では、非肥満喘息患者に比べて末梢血単核細胞 (PBMC) におけるステロイド感受性が低下していることが報告されている (Sutherland et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2008)。

このように、肥満合併喘息患者はステロイド感受性が低下しており、これが肥満合併喘息患者のコントロール悪化と関連していると考えられる。しかし、このステロイド感受性の低下の機序は、十分には解明されていない。一方、慢性閉塞性肺疾患や気管支喘息患者において、酸化ストレスはステロイド感受性低下の原因の1つとされている。このことから、肥満由来の全身性酸化ストレス上昇が、肥満喘息患者におけるステロイド感受性低下を引き起こす可能性があると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、肥満合併喘息患者におけるステロイド感受性の低下メカニズムを解明し、さらに肥満由来の全身性酸化ストレスがステロイド感受性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) 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

以下の条件をエントリー条件とした。

年齢が20-79歳であること

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

気管支喘息以外の肺疾患の合併していないこと

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20mL (ヘパリン添加採血管とプ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 PBMC を分離した。PBMC の分離には、Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) と ACCUSPIN™ 滅菌チューブ (Sigma-Aldrich) を使用した。

5~10×10⁶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。

1×10⁶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。PBMC に段階的に希釈したデキサメサゾン (10⁻¹¹M ~ 10⁻⁶M) を加え、30 分間培養した。その後、TNF- α を加えて一晩培養した。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 (IC₅₀-Dex) を計算した。

プレイン採血管を用いて採血した血液は、3000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、血清を得た。その血清は -80 度で保存した。

(3) 血清の解析

血清中のレプチン、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) はサンドイッチ ELISA 法 (R&D Systems, Minneapolis, MN) で測定した。血清中の 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG、酸化ストレスマーカー) は競合 ELISA 法 (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA) で測定した。

(4) 解析

近年の臨床研究において、BMI で定義された肥満よりも、体脂肪率の方が喘息重症化との関連が強いとの知見が得られている。そこで本研究では、対象患者を高体脂肪率群 (男性>25%、女性>30%) と正常体脂肪率群に分けて、各種データを比較した。統計は、対応のない2群の比較には Mann-Whitney U 検定を、対応のある2群の比較には、Wilcoxon の符号順位検定を用いた。相関の強さの解析には、Spearman の順位相関係数を用いた。p<0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1) 対象患者

対象は、高体脂肪率 (HBF) の喘息患者 50 名と正常体脂肪率 (CONT) の喘息患者 20 名であった。HBF 群と CONT 群の年齢の中央値は、それぞれ 53 歳と 65 歳であり、両群間で有意差は認められなかった。女性の割合は、HBF 群で有意に高かった (p=0.016)。GINA 治療ステップ、1 年間の重症喘息発作の回数、末梢血好酸球数および IgE レベルは、群間で有意差は認められなかった。

(2) 気管支喘息患者由来の PBMC のステロイド感受性

血液から PBMC を分離し、段階的に希釈したデキサメサゾン存在下で培養し、IC₅₀-Dex を算出した。HBF 群の IC₅₀-Dex は 7.3nM (5.3-10.9nM、中央値 (四分位範囲))、CONT 群の IC₅₀-Dex は 4.8nM (3.8-6.8nM) で、HBF 群が有意に高い値を示した (p=0.001、図 1)。

(3) 高体脂肪率群におけるステロイド感受性と臨床データおよび血清マーカーとの相関

HBF 群の患者の IC₅₀-Dex と 1 年間の重症喘息発作の回数との間に正の有意な相関が認められた (ρ = 0.291、p=0.045、図 2)。これに対して、%FEV₁、%PEF、%FEF₇₅ と IC₅₀-Dex との間には有意な相関が見られなかった。

HBF 群の喘息患者における肥満関連要

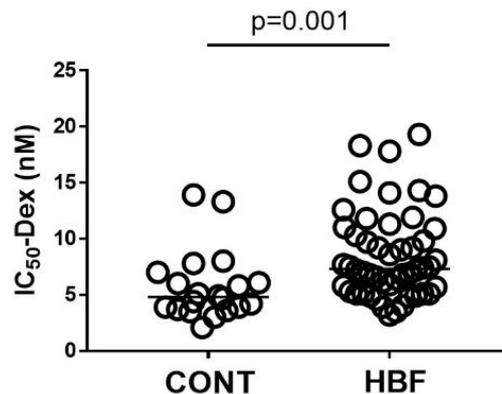


図1 末梢血単核細胞のステロイド感受性
CONT: 正常体脂肪率群、HBF: 高体脂肪率群、
IC₅₀-Dex: デキサメサゾンの50%阻害濃度

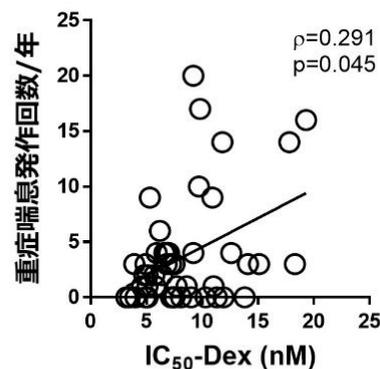


図2 高体脂肪率群の患者のステロイド感受性と臨床データとの相関
IC₅₀-Dex: デキサメサゾンの50%阻害濃度

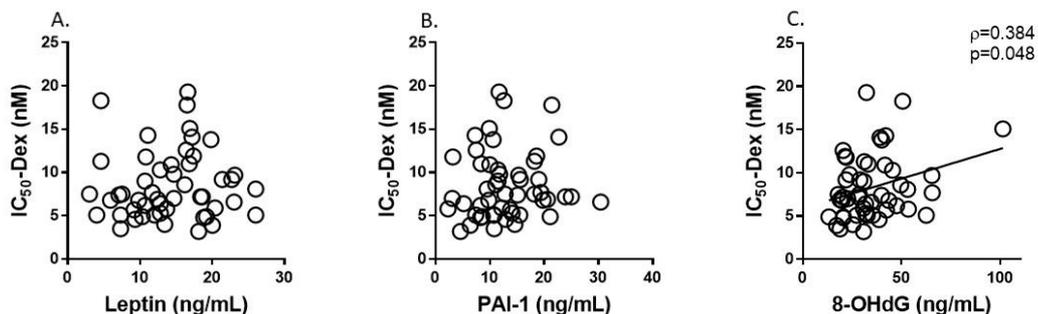


図3 高体脂肪率群におけるステロイド感受性と血清マーカーとの相関

IC₅₀-Dex: デキサメサゾンの50%阻害濃度、

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1、8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

因とステロイド感受性との関連を調べるため、血清アディポサイトカインレベルと酸化ストレスレベルを測定し、これらの変数と IC_{50} -Dex との関連を評価した。その結果、HBF 群の血清レプチンレベルは CONT 群よりも有意に高かった ($p < 0.001$)。しかし、両グループ間の血清 PAI-1 レベルには有意差は認められなかった ($p = 0.612$)。また、HBF 群の全身性酸化ストレス (8-OHdG) は CONT 群と比べて有意に高かった ($p = 0.017$)。血清レプチンと PAI-1 は、 IC_{50} -Dex との間に有意な相関が認められなかった (図 3AB)。これに対して、 IC_{50} -Dex と 8-OHdG との間には有意な正の相関が認められた ($r = 0.384$, $p = 0.048$, 図 3C)。

(4) HBF 群におけるステロイド感受性低下とメトフォルミンの効果

HBF 群および CONT 群の患者から採取した PBMC の培養系にメトフォルミンを添加し、 IC_{50} -Dex の変化を測定した。HBF 群の患者の PBMC をメトフォルミン存在下で培養すると、 IC_{50} -Dex は有意に低下した (メトフォルミン添加なし: 7.3 nM ($5.3\text{-}10.9 \text{ nM}$)、メトフォルミン添加あり: 6.1 nM ($3.7\text{-}8.4 \text{ nM}$), $p < 0.001$, 図 4)。しかし、CONT 群では、メトフォルミンの添加の有無で有意差は見られなかった (メトフォルミン添加なし: 4.8 nM ($3.8\text{-}6.8 \text{ nM}$)、メトフォルミン添加あり: 5.2 nM ($3.5\text{-}8.4 \text{ nM}$), $p = 0.926$)。さらに HBF 群の患者から採取された PBMC をメトフォルミンの存在下で培養し、上清液中の酸化ストレスマーカー (8-OHdG) を測定した。その結果、メトフォルミン存在下では、上清中の 8-OHdG 濃度が有意に低下した (メトフォルミン添加なし: 13.7 ng/mL ($9.0\text{-}16.3 \text{ ng/mL}$)、メトフォルミン添加あり: 13.6 ng/mL ($7.9\text{-}15.2 \text{ ng/mL}$), $p = 0.046$, 図 5)。

(5) 結果のまとめ

本研究において、高体脂肪率の喘息患者の PBMC は正常体脂肪率の患者に比べ、ステロイド感受性が低下していることが確認された。高体脂肪率の喘息患者では、ステロイド感受性と 1 年間の重症喘息発作の回数および、全身性酸化ストレスマーカーのレベルとの相関が認められた。このことから、高体脂肪率の喘息患者のステロイド感受性低下が喘息急性増悪と関連していることが判明した。また、肥満関連の全身性酸化ストレス亢進がステロイド感受性低下に参与している可能性が示唆された。

さらに、高体脂肪率の喘息患者から採取した PBMC をメトフォルミン存在下で培養した場合、酸化ストレスレベルが有意に低下し、ステロイド感受性が回復することが明らかになった。この結果から、高体脂肪率の喘息患者のステロイド感受性低下と酸化ストレスの関連が再確認されるとともに、メトフォルミンが酸化ストレスの抑制を介して、ステロイド感受性を回復させる可能性が示唆された。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究では、高体脂肪率を有する喘息患者において、ステロイド感受性が低下する機序として、肥満由来の全身性酸化ストレス亢進の関与を初めて明らかにした。さらに高体脂肪率を有する喘息患者において、メトフォルミン及びその誘導体が治療薬となりうる可能性を示唆した。本研究の成果は、現在英文雑誌に投稿中である。

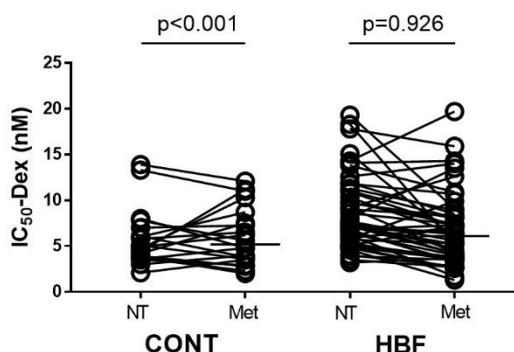


図4 メトフォルミンによるステロイド感受性改善効果

Met:メトフォルミン添加あり、NT:メトフォルミン添加なし、CONT:正常体脂肪率群、HBF:高体脂肪率群、 IC_{50} -Dex:デキサメサゾンの50%阻害濃度

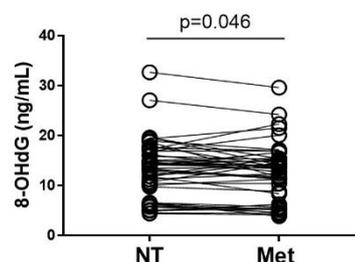


図5 高体脂肪率群におけるメトフォルミンの酸化ストレス抑制効果

Met:メトフォルミン添加あり、NT:メトフォルミン添加なし、8-OHdG:8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 To M, Tsuzuki R, Katsube O, Yamawaki S, Soeda S, Kono Y, Honda N, Kano I, Haruki K, To Y.	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 J Allergy Clin Immunol Pract	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） 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 Tsuzuki R, To M, Yamawaki S, Kono Y, To Y.	4. 巻 126
2. 論文標題 Inhibitory effect of calcium channel blockers on the deterioration of lung function in adult-onset asthma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Allergy Asthma Immunol .	6. 最初と最後の頁 731-733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anai.2021.02.029.	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 Y, Kono Y, Tsuzuki R, Kaneko H, To M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Rheumatoid arthritis-like polyarthralgia after the initiation of omalizumab treatment: A case series	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol Pract .	6. 最初と最後の頁 3510-3512.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaip.2021.05.027.	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 党 雅子	4. 巻 27
2. 論文標題 いずれ悔れず-これからの肥満関連健康障害を学ぶ 肥満と気管支喘息.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 肥満研究	6. 最初と最後の頁 66-72
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 無
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 党 雅子、黨 康夫	4. 巻 41
2. 論文標題 肥満関連喘息	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 呼吸器内科	6. 最初と最後の頁 99-105
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 無
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 党 雅子	4. 巻 140
2. 論文標題 肥満と気管支喘息	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床栄養	6. 最初と最後の頁 978-980
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 無
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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 M. To, N. Honda, K. Haruki, Y. To
2. 発表標題 Metformin: A potential drug candidate to restore poor corticosteroid sensitivity in obese asthmatic patients
3. 学会等名 European Respiratory society annual congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masako To, Natsue Honda, Kosuke Haruki, Yasuo To
2. 発表標題 Metformin restored steroid response in peripheral blood mononuclear cells in obese asthmatic subjects
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 党 雅子、本田なつ絵、春木宏介、黨 康夫
2. 発表標題 肥満合併喘息患者の治療反応性低下と 肥満由来の酸化ストレスとの関連
3. 学会等名 第43回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 党 雅子
2. 発表標題 肥満喘息患者の病態とTreatable Traitsアプローチ
3. 学会等名 Medical Scientific Workshop (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masako To, Natsue Honda, Ichino Kano, Kosuke Haruki, Yasuo To
2. 発表標題 Steroid resistance in obese asthmatic patients: a potential role of obesity-related systemic oxidative stress.
3. 学会等名 European Respiratory society annual congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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 肥満合併喘息患者におけるステロイド反応性低下と治療の可能性
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masako To, Ryuta Tsuzuki, Satoshi Yamawaki, Natsue Honda, Ichino Kano, Kosuke Haruki, Yasuo To
2. 発表標題 Clinical characteristics of adult obese asthma with type 2 inflammation dominant
3. 学会等名 International Congress of the European Respiratory Society 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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) (00700311)	国際医療福祉大学・呼吸器内科・教授 (32206)	

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
---------	---------