

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10429

研究課題名(和文)新しい気管支喘息難治化機構の解明と臨床応用 -抗原由来の肺沈着物質Xを探る-

研究課題名(英文)clearification of novel mechanism for refractory asthma and clinical application

研究代表者

小川 博久(OGAWA, Hirohisa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：50403754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：難治性喘息において複数抗原が代謝され、その代謝物が炎症の難治化をもたらすのではないかと考え、ダニ、スギ花粉、真菌の複数抗原に感作させた慢性喘息モデルにおける難治性因子を質量分析法を用いて網羅的に探索した。複数抗原喘息モデルでは、ステロイド抵抗性を示した。質量分析によって凍結肺で検出された物質は7000種あったが、イメージング質量分析法や統計学的処理で、23種類に絞られた。特にセラミド2種、デアミノノイラミン酸というシアル酸は重要因子と考えられた。セラミド(18:0)は複数抗原の抗原液中にも検出された。これらの物質は抗原由来の物質から代謝された物質であり、難治性獲得への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デアミノノイラミン酸、セラミド、セラミド1-リン酸が喘息の難治化に重症な沈着物と考えられた。デアミノノイラミン酸はシアル酸の一種で、哺乳類には微量しか存在しない物質であるが、スギ花粉の代謝により肺内に合成される物質である。セラミドはセラミド-1-リン酸は炎症などに関与する脂質メディエータの一種である。

これらは抗原由来の物質やそれらが代謝された物質であり、抗原を吸入することで、新たな分子が肺内に合成され、喘息が難治化する可能性が示された。これらの物質の作用について解明されれば、難治性喘息の治療ターゲットとなり得るし、代謝の結果の産物であるならば、難治性喘息のバイオマーカーになり得ると考えられる

研究成果の概要(英文)：Refractory asthma patients are sensitized to various inhalant antigens, and animal models of multiple antigen sensitization are considered to be refractory models. We investigated the factors that contribute to refractoriness in a chronic asthma model sensitized to multiple antigens, such as mites (Dp), cedar pollen, and fungi, using mass spectrometry. The multiple antigen asthma model showed steroid resistance. There were 7,000 substances detected in frozen lungs by mass spectrometry, but imaging mass spectrometry and statistical processing narrowed the number of substances to 23. In particular, two ceramides and sialic acid were considered important factors. These may have been metabolized from antigen-derived substances, suggesting their involvement in refractory acquisition.

研究分野：アレルギー 気管支喘息

キーワード：気管支喘息 難治性喘息 複数抗原監査喘息モデル セラミド デアミノノイラミン酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は好酸球浸潤や Th2 反応に特徴づけられる気道炎症性疾患である。吸入ステロイドの普及により、多くの症例で症状の改善や喘息死の減少がみられるが、ステロイド抵抗性喘息などの難治性喘息の増加が近年問題となっている。アトピー性皮膚炎では抗原に対するアレルギー性炎症の他、Th2 反応 + 好酸球炎症によるペリオスチンタンパク産生が増加し、それが皮膚に沈着することにより、炎症が遷延化すると報告がある (Masuoka M, J Clin Invest, 2012)。喘息でのメジャーアレルゲンであるダニ抗原はセリンプロテアーゼ活性があり、上皮を直接傷害し、構成タンパクや脂質を変性、代謝し、別の物質に変化させる可能性がある。以上の研究報告から、難治性喘息では、抗原の酵素活性や、アレルギー混合型炎症により浸潤した好中球の酵素反応により、抗原由来あるいは組織由来の新たな物質が生成(または代謝)され、肺に沈着して炎症の遷延化、難治化(ステロイド抵抗性)を促進するのではないかと考えられた。

### 2. 研究の目的

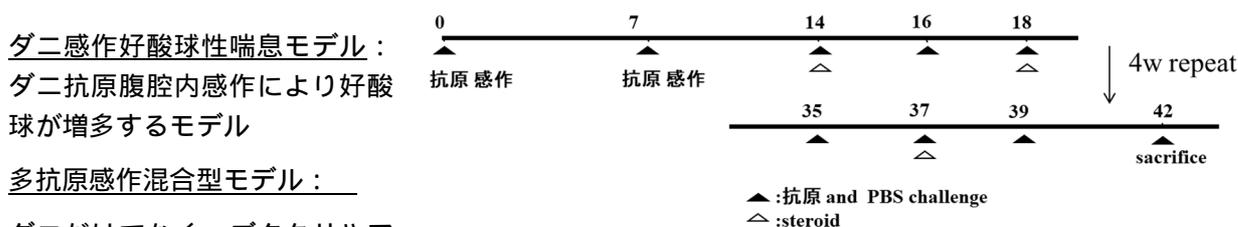
本研究の目的は、難治性喘息の新規病態増悪因子(すなわち肺沈着物質 X)を解明することである。そのために様々な抗原を用いて作った好中球混合型喘息マウスモデルにおいて、ステロイドに抵抗性を示す気管支・肺で沈着する抗原由来の物質、または炎症反応によって生成された物質(タンパク質/ペプチド/脂質)をプロテオーム解析や質量分析法で網羅的に解析する。これにより肺沈着物質 X が、どの抗原由来のものか明らかにする。そしてその難治性獲得の機序を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスモデルの作成

モデルは2種類を作成する。

図1 マウス作成プロトコル



上記マウスモデルのいずれにおいて気管支喘息が増悪しているかを明らかにするために、以下の実験を行う。

day42 に呼吸機能を呼吸機能測定装置 Flexivent, (emka, USA) を使用し測定する。

肺を取り出し、ホルマリン固定組織を作成し、炎症細胞の種類、炎症細胞浸潤の範囲や強さ、気道リモデリング(線維の厚さ、粘液細胞の面積、平滑筋の厚さ)を比較する。

肺胞気管支洗浄液(BALF)を採取する、また肺の一部をホモジナイズし、その上清を採取する。これらの検体でサイトカイン、増殖因子を ELISA および、Western blot で測定する。

#### (2) 難治性沈着物 X の特定

質量分析法(液体クロマトグラフィ併用質量分析法(LC-MS/MS)、イメージング質量分析法(IMS))にて脂質、アミン類、肺沈着物質 X を解析する(研究分担者 福島大学 平教授に依頼する)、物質 X を特定する。

LC-MS: 肺サンプルを凍結融解し 30%アセトニトリルを入れ、超音波破碎。上清を LC-MS にて解析する。網羅的解析で検出された物質をデータベースと照合し候補物質を特定する。また統計解析(heatmap, PLSDA)を行い、重要な物質を絞り込む。

IMS: 肺凍結サンプルを薄切して、ITO スライドガラスに固定。IMS にて上記 LC-MS 解析で絞り込んだ物質が気管支炎症部位に一致して発現するかを確認する。

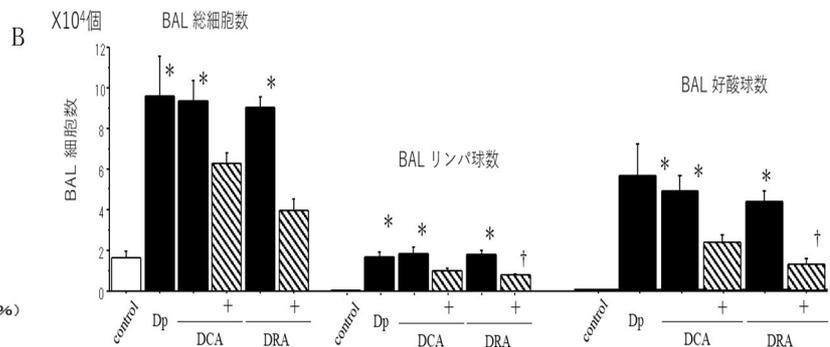
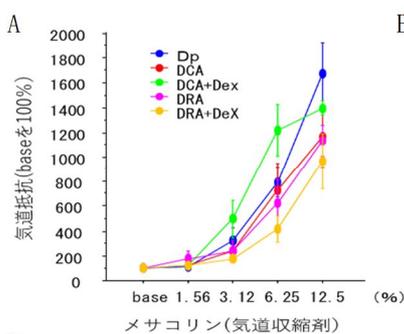
## 4. 研究成果

### (1) モデルマウスの確立

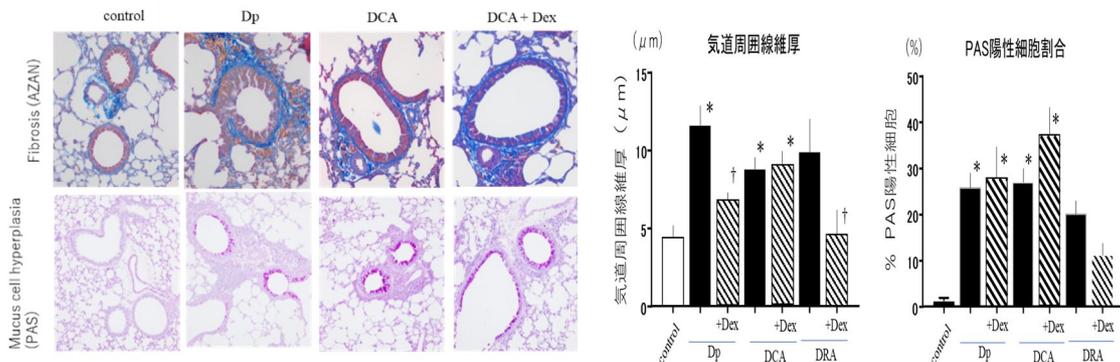
ダニ感作モデルマウスはすでに確立されていたので、まず、複数抗原モデルの作成を行った。複数抗原は各抗原抽出液を一定の割合で混合して作成した。すでに文献で報告があるダニ(Dp, D)+ブタクサ(ragweed, R)+アスペルギルス(aspergillus, A) (DRA, D:R:A=2:20:1の割合)(文献)と、日本ではスギ花粉が問題になっていることから、ダニ+スギ+アスペルギルス(DCA:D:C:A=2:2:1の割合)の2つの複数抗原を用いて慢性期モデルの作成を行った。喘息の指標として気道抵抗、炎症細胞浸潤、気道リモデリングの3つで評価を行った。

図2 作成マウスの気道抵抗、炎症細胞、気道リモデリング

#### 気道抵抗



#### C



気道抵抗では喘息群(Dp, DCA, DRA群)それぞれ気道収縮剤で上昇したが、ステロイド処理(Dex)では、DRA群で低下、DCA群では低下しなかった(図2A)。気道炎症細胞浸潤をBALFの細胞数で見ると、喘息群(Dp, DCA, DRA群)で増加した総細胞数、リンパ球、好酸球数は、Dex処理では、DRA群で低下したが、DCA群では有意な減少は認めなかった(図2B)。気道周囲線維厚の評価でもDp, DRA喘息群ではDex処理で指標が低下したが、DCA群ではDex処理で減少は認めなかった(図2C)。粘液細胞陽性率はDRA群を除く喘息群でDexの効果はなかった(図2C)。

このことから、DRA群よりはDCA群の方がステロイド抵抗性を示すことが分かり、以降の研究

での複数抗原感作モデルは DCA を抗原として使用することとした。

(2) 難治性沈着物 X の特定

コントロール、Dp 喘息群、Dp 喘息 + Dex 治療群、DCA 喘息群、DCA 喘息 + Dex 治療群の 5 群の凍結肺を質量分析法を用いて、低分子化合物を網羅的に解析した。

結果として、7430 個の低分子化合物が検出され、データベースと照合し、分子構造や物質名が判明している "known" 群 3716 個、m/z 値のみしか判明してないものを "unknown" 群が 3714 個であった。このうち DCA 群 > コントロール群で有意に 1.5 倍以上発現し Dp 群よりも大きく、Dex 治療で減少しないものを選別すると、known 群 73 個、unknown 群 70 個に絞られた。この計 143 個の候補物質でイメージング質量分析を行い、気管支周囲の炎症部位にシグナルがある物質を調べると known 群、14 個、unknown 9 個の計 23 個が検出できた(表 1)。

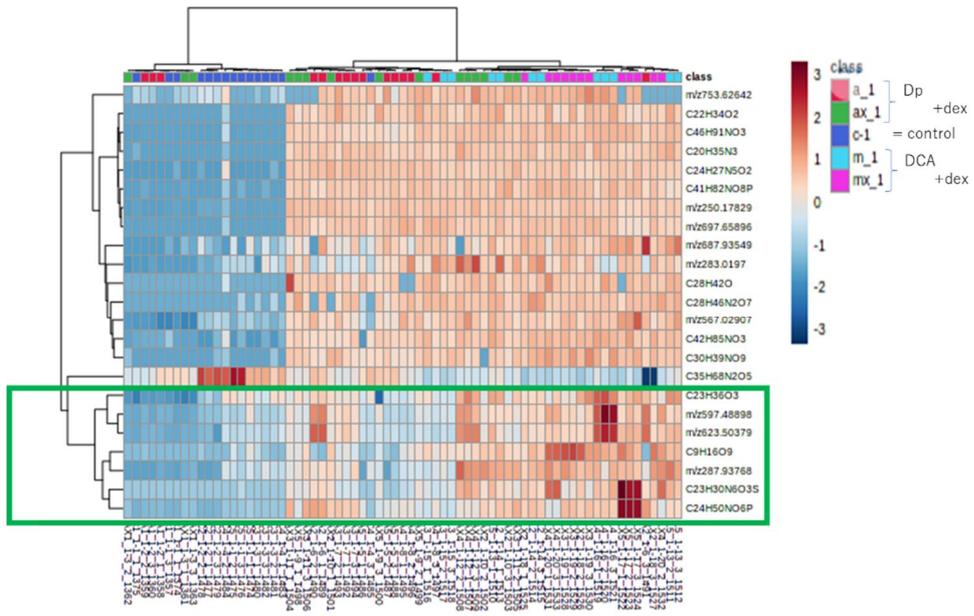
表 1

	保持時間	m/z	分子量	モード	分子式	分子名
known	3.72	748.586	747.58	[M+H] <sup>+</sup>	C41H82NO8	PE 8:0_28:0
	0.88	471.216	470.21	[M+H] <sup>+</sup>	C23H30N6C	1-[6-(3,4-dimethylphenyl)pyridazin-3-yl]-3,5-dimethyl-N-(2-morpholin-4-ylethyl)pyrazole-4-sulfonamide
	6.31	331.263	330.26	[M+H] <sup>+</sup>	C22H34O2	22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z) osbond acid
	0.59	269.088	268.08	[M+H] <sup>+</sup>	C9H16O9	3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid
	1.44	361.274	360.27	[M+H] <sup>+</sup>	C23H36O3	3beta-Hydroxy-5alpha-pregnan-20-one acetate
	5.03	558.27	557.26	[M+H] <sup>+</sup>	C30H39NO9	NGGC00347572-02_C30H39NO9_Pentanedioic acid, 2-[(2R,2'R,6'S,8a'S)-6'-(acetyloxy)-3',4',4'a,5',6,6',7',8,8',8'a-decahydro-4-
	4.3	597.516	596.51	[M+H] <sup>+</sup>	C35H68N2C	NAOrn 19:0/11:0
	2.68	480.346	479.34	[M+H] <sup>+</sup>	C24H50NO6	CerP 14:0;20/10:0
	3.34	523.339	522.33	[M+H] <sup>+</sup>	C28H46N2O7	(((4R)-4-((3R,5S,7R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-
	11.75	418.224	417.22	[M+H] <sup>+</sup>	C24H27N5C	1-[4-[3-(2-propylimidazo[4,5-b]pyridin-3-yl)pyrrolidine-1-carbonyl]phenyl]pyrrolidin-2-one
unknown	3.98	395.33	394.32	[M+H] <sup>+</sup>	C28H42O	(3beta,22E,24R)-Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ol
	6.75	652.661	651.65	[M+H] <sup>+</sup>	C42H85NO3	Cer 19:0;20/23:0
	6.74	706.71	705.7	[M+H] <sup>+</sup>	C46H91NO3	Cer 18:0;20/28:1
	3.18	318.287	317.28	[M+H] <sup>+</sup>	C20H35N3	Templetine
	7.88	697.659	696.65	[M+H] <sup>+</sup>		
	0.63	283.02	282.01	[M+H] <sup>+</sup>		
	0.62	287.938	286.93	[M+H] <sup>+</sup>		
	0.62	567.029	566.02	[M+H] <sup>+</sup>		
	5.58	597.489	596.48	[M+H] <sup>+</sup>		
	5.76	623.504	622.5	[M+H] <sup>+</sup>		
	0.62	687.935	686.93	[M+H] <sup>+</sup>		
	7.83	753.632	752.62	[M+H] <sup>+</sup>		
	2.7	250.178	249.17	[M+H] <sup>+</sup>		

23 個の候補物質を統計処理し、heat map を作成した(図 3)。DCA 群で特に増加している分子は 7 種類であることが示された(緑枠)。

23 個の候補物質と、この heat map から DCA 群に有意に増加している 7 個の物質について、VIP score の算出を行った(図 4)。VIP score が 1 を超えているものは known 群、unknown 群を含め計 5 個となり、known 群は "3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid" (デアミノノイラミン酸)、Ceramide 18:0,2/28:1 (セラミド)、cearamide-1-phosphate 14:0;02/10:0 (セラミド 1 リン酸)、unknown 群では "m/z 623.5"、"m/z

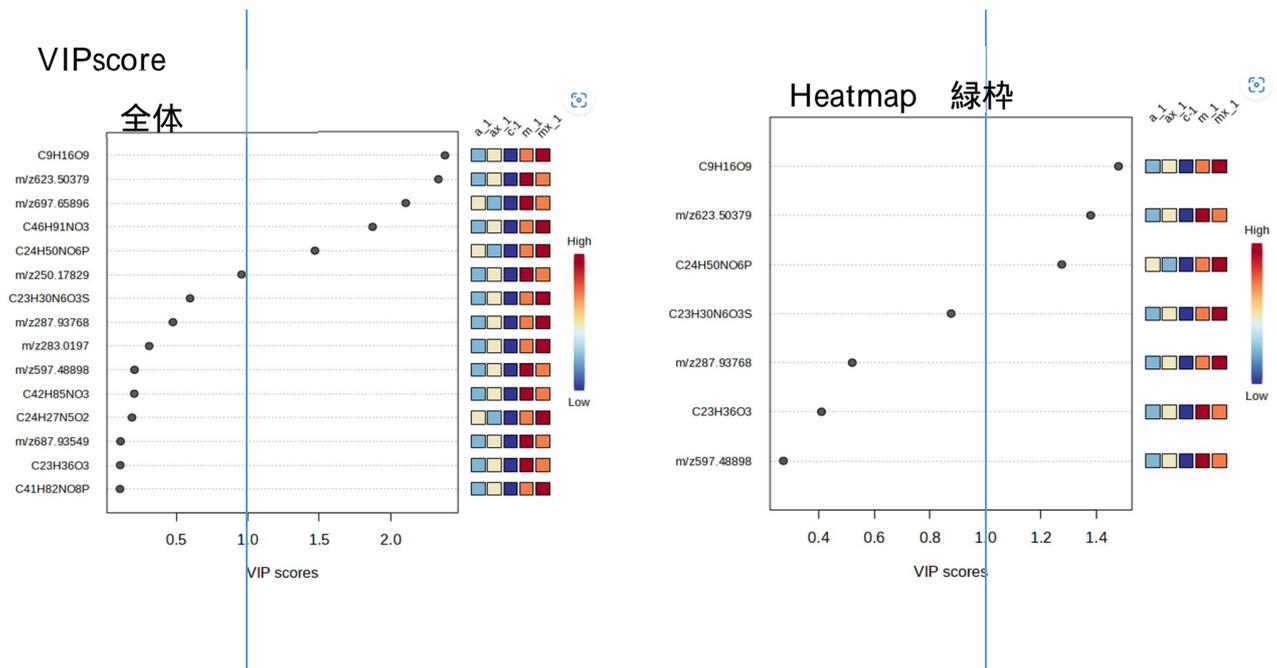
図 3 heat map



の m/z 値のみしか判明してないものを "unknown" 群が 3714 個であった。

697.6” が難治性に重要な因子と考えられた。

図 4 VIP score



デアミノノイラミン酸はアシル酸の一種で、哺乳類には微量しか存在しない物質である。マンノースの代謝により合成される物質で、そのマンノースはスギ花粉の構成物質であり、アスペルギルスに存在する酵素(KDNase)はこの物質を切り出して生成する(文献 )ことができる。現在のところ、デアミノノイラミン酸は難治性因子として直接の作用があるのか、作用を有さず代謝の結果として生成された物質かは不明である。

セラミドはセラミド-1-リン酸とともにスフィンゴ脂質から生合成される物質であり、脂質メディエータの一種である。セラミドから生合成されるスフィンゴ 1-リン酸は喘息においてアレルギー性炎症や気管支収縮に関する多くのデータがあるが、セラミド合成系路については喘息との関連性は不明である(文献 )。

重要な点はこれらは抗原由来の物質やそれらが代謝/生合成された物質であり、抗原を吸入することで、アレルギー性炎症に加えて、新たな分子が肺内に合成され、喘息が難治化する可能性が示されたことである。これらの物質の作用について、直接喘息悪化の作用がある場合はその代謝経路の調節が難治性喘息の治療ターゲットとなり得るし、代謝の結果の産物であるならば、難治性喘息のバイオマーカーになり得ると考えられるので、今後、さらに研究を進める必要がある。

#### <引用文献>

Goplen N, Combined sensitization of mice to extracts of mice to extracts of dust mite, rahweed, and Aspergillus species breaks through tolerance and establishes chronic feature of asthma, J allergy Clin Immunol 123(4),2009

Telford JC, The Aspergillus fumigatus sialidase is a 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid hydrolase (KDNase): structural and mechanistic insights. J Bio Chem, 286(12), 10783-92,2011

Petrache I, Ceramide Signaling and Metabolism in Pathophysiological States of the Lung, Annu Rev Physiol, 78, 463-48, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小川博久、立花尚太郎、清水真祐子、常山幸一
2. 発表標題 リゾフォスファチジン酸は慢性気管支喘息の気道リモデリング形成に關与する
3. 学会等名 第67回日本病理学会秋季特別總會
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立花尚太郎 小川博久 清水真祐子 常山幸一
2. 発表標題 慢性気管支喘息の気道リモデリングにおけるリゾフォスファチジン酸受容体の役割
3. 学会等名 第111回日本病理学会總會
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川博久、清水真祐子、佐藤正大、常山幸一、西岡安彦
2. 発表標題 リゾフォスファチジン酸(LPA)はLPA1受容体を介して粘液細胞過形成を促進する.
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会學術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川博久 清水真祐子、宮上 侑子、住田智志、柿本拓海、常山幸一
2. 発表標題 -アミノ酪酸 (GABA) は喘息における粘液細胞過形成に關与するのか
3. 学会等名 第112回日本病理学会總會
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川博久 清水真祐子、平 修、坂東弘基、佐藤正大、常山幸一、西岡安彦
2. 発表標題 メタボローム解析による複数抗原感作喘息モデルにおける難治性因子の探索
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2023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	平 修  (TAIRA Shu)  (30416672)	福島大学・食農学類・教授   (11601)	
研究分担者	吾妻 雅彦  (AZUMA Masahiko)  (80325282)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授   (16101)	

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