

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591137

研究課題名(和文)肥満による喘息悪化・難治化の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiology and development of novel therapeutic strategies in obesity-related severe asthma.

研究代表者

大河原 雄一(OHKAWARA, YUICHI)

東北薬科大学・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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肥満による喘息増悪の病態を明らかにし新たな治療法を開発するため食餌性肥満マウス喘息モデルを用いて検討した。肥満により抗原吸入後の喘息反応は増悪し、肺組織内のTh2反応は増強した。腎周囲脂肪組織ではadiponectin遺伝子発現が低下し、leptin、TNF- α 、MCP-1、IL-10遺伝子発現は増強したが、抗原吸入後に著明なTNF- α 遺伝子発現増強とIL-10遺伝子発現低下を認めた。以上の結果から、肥満による内臓脂肪組織の機能的変化とアレルギー性気道炎症との相互作用により肺組織内でTh2反応増強が生じて喘息悪化に関与していることが示唆され、この相互作用が新たな治療標的になり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To provide the novel therapeutic strategies for obesity-related severe asthma, we investigated the pathophysiology of a murine allergic asthma model with high-fat diet-induced obesity (DIO). Compared with the lean mice, the DIO mice exhibited increased airways inflammation and airway responsiveness to Mch after antigen challenge. Bronchoalveolar lavage fluid and lung Th2 cytokine expression was increased in the DIO mice. In perirenal adipose tissue in the DIO mice, an increase in adiponectin mRNA expression and decreases in leptin, TNF- α , MCP-1, IL-10 mRNA expressions were observed, whereas, a remarkable increase in TNF- α mRNA expression and a remarkable decrease in IL-10 mRNA expression were observed after antigen challenge. These results suggest that the interaction between functional change of visceral adipose tissue and allergic airways inflammation may play an important role in the development of obesity-related severe asthma, providing new therapeutic targets for severe asthma.

研究分野：医学

キーワード：気管支喘息 肥満 アレルギー性気道炎症 内臓脂肪 アディポカイン サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 気管支喘息(以下、喘息)は、気道の慢性炎症と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起こる咳、喘鳴、呼吸困難を特徴とする気道の慢性炎症性疾患である。その気道炎症には、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。以上のような事実から、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に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おり、その理由の一つとして喘息の発症、重症化、難治化の病態における患者個々の多様性の関与が示唆されている。

(2) 以前から喘息の発症・増悪の危険因子の一つとして肥満が掲げられており、この喘息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。近年、肥満における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産生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他の多くの疾患の病態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予想できる。実際、重症・難治性喘息患者に肥満が多いことから、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し、医療経済的効果も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用いて、肥満による喘息悪化の機序を気道・肺組織と内臓脂肪組織の臓器間相互作用に焦点を絞り詳細に検討し、肥満による喘息増悪に対する新たな治療戦略となる治療標的を見つけ出す。

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週間後に抗原をネブライザーで吸入させて抗原誘発喘息反応を惹起した。

(2) 体重と脂肪組織重量の測定と耐糖能の検討

体重測定は、高脂肪食または通常食期間中に週1回と抗原吸入直前に行った。内臓脂肪重量の測定は、喘息反応評価直後に腎周囲脂肪組織と精巣上体周囲脂肪組織を摘出して行った。重量測定後は後日、遺伝子発現評価のために-80度Cで凍結保存した。耐糖能の異常は、抗原吸入1週間前(高脂肪食15週目)に経口糖負荷試験を行い評価した。

(3) 喘息反応の評価

抗原吸入による喘息反応誘発後1、3、5日後に気管支肺胞洗浄(BAL)を行い、気道炎症の評価を行った。また、5日目にはメサコリン(Mch)に対する気道反応性を測定した。肺組織は、一部を組織学的検討(HE染色、PAS染色)のためホルマリン固定し、残りはサイトカイン測定と遺伝子発現検討のために-80度Cで凍結保存した。

(4) 気管支肺胞洗浄液(BALF)と肺組織中のサイトカイン測定

BALF中ならびに肺組織中のIL-4、IFN- γ 、TNF- α はELISA法を用いて測定した。

(5) 内臓脂肪組織中のサイトカイン、アディポカイン遺伝子発現の検討

腎周囲脂肪組織中のアディポネクチン、レプチン、TNF- α 、MCP-1、IL-10、TGF- β の各遺伝子発現は、CYBER Green Iを用いたReal-Time PCR法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食による体重と内臓脂肪増加と耐糖能の異常

感作成立後の16週間高脂肪食投与により、肥満マウス群は体重約50gとなり、非肥満群と比較して体重は約1.7倍に増加した。また、内臓脂肪組織重量は肥満群で、腎周囲脂肪組織、精巣上体周囲とも増加したが、腎周囲のものが非肥満群と比較して約4倍と著明に増加した。経口糖負荷試験では、肥満群で耐糖能の異常を認めたが、非肥満群では認めなかった。

(2) 肥満による喘息反応の増強

BALF中の炎症細胞は、抗原吸入後1、3

日目で、肥満群で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群で亢進を認めた。以上のことから、本モデルでも肥満により喘息反応が増悪することを確認した。

(3) 肥満による気道ならびに肺組織中のサイトカイン産生の変化

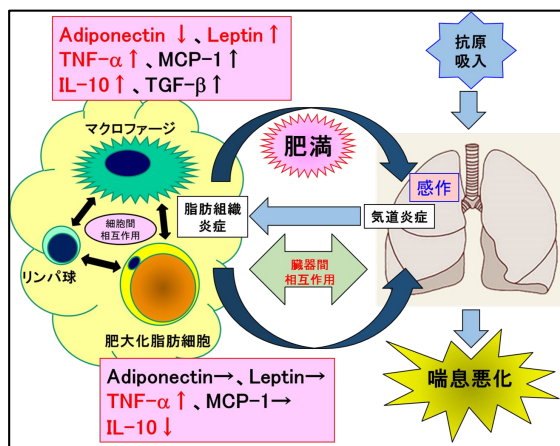
肥満による喘息悪化の機序を明らかにするため、BALF中ならびに肺組織中のサイトカイン(IL-4、IFN- γ 、TNF- α)産生量を測定した。肥満により、抗原吸入後の肺組織中のIL-4産生量は増加し、BALFと肺組織中のIFN- γ 産生量は低下した。肺組織でのIL-4/IFN- γ 値は非肥満群と比較して肥満群で約2倍高い結果となった。TNF- α 産生量は2群間で差を認めなかった。

(4) 肥満ならびに喘息反応による内臓脂肪組織中のサイトカイン、アディポカイン遺伝子発現の変化

肥満により、腎周囲組織でのアディポネクチンの遺伝子発現は低下したが、レプチン、TNF- α 、MCP-1、IL-10、TGF- β の各遺伝子発現は増強した。抗原吸入後では、肥満群でTNF- α 遺伝子発現の著明な上昇とIL-10遺伝子発現の著明な低下を認めた。

(5) 結論

肥満による喘息増悪には、肺組織中のTh2反応の増強が関与してことが示唆された。さらに、そのTh2反応増強は、肥満とともに生じた内臓脂肪組織の機能的変化と肺組織におけるアレルギー性気道炎症との相互作用によってもたらされ、この臓器間相互作用に關与するアディポカインやサイトカインが肥満による喘息悪化の治療標的になると考えられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1) Nakagawasai O, Yamada K, Nemoto W,

Sato S, Ogata Y, Miya K, Sakurai H, Tan-No K. Liver hydrolysate attenuates the sickness behavior induced by concanavalin A in mice. *J Pharmacol Sci* 2015;127(4):489-92. (査読有)

DOI: 10.1016/j.jphs.2015.03.007.

2) Nemoto W, Ogata Y, Nakagawasai O, Yaoita F, Tadano T, Tan-No K. Angiotensin (1-7) prevents angiotensin II-induced nociceptive behavior via inhibition of p38 MAPK phosphorylation mediated through spinal Mas receptors in mice. *Eur J Pain* 2014;18:1471-1479. (査読有)

DOI: 10.1002/ejp.512.

3) Okuyama K, Suenaga M, Furuki S, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. Contribution of CD4⁺ T cells and dendritic cells to female-dominant antigen-induced T helper type 2 cytokine production by bronchial lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161 Suppl 2:58-65. (査読有)

DOI: 10.1159/000350426.

4) Nakagawasai O, Yamada K, Nemoto W, Fukahori M, Tadano T, Tan-No K. Liver hydrolysate assists in the recovery from physical fatigue in a mouse model. *J Pharmacol Sci.* 2013; 123(4):328-35. (査読有)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/123/4/123_13084FP/_article

5) Okuyama K, Kashimura T, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. Higher sensitivity of male CD4⁺ T cells to suppressive effects of CD8⁺T cells on IL-5 production compared to female CD4⁺ T cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;158 Suppl 1:35-41. (査読有)

DOI: 10.1159/000337759.

6) Okuyama K, Ide S, Sakurada S, Sasaki K, Sora I, Tamura G, Ohkawara Y, Takayanagi M, Ohno I. μ -opioid receptor-mediated alterations of allergen-induced immune responses of bronchial lymph node cells in a murine model of stress asthma. *Allergol Int.* 2012; 61(2):245-258. (査読有)

DOI: 10.2332/allergolint.11-OA-0304.

[学会発表](計24件)

1) 大河原雄一, 岩田敏信, 宮坂智充, 河野資, 石垣貴裕, 伊藤ちひろ, 佐藤美希, 増田千愛, 高柳元明, 大野 勲. 肥満による気管支喘息増悪と内臓脂肪組織の免疫代謝的調節機構の変化. 第64回日

- 本アレルギー学会学術大会，2015年5月27日 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール（東京都港区）。
- 2) 宮坂智充, 伊藤ちひろ, 奥山香織, 佐藤美希, 増田千愛, 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 CD8⁺T 細胞の役割. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 2015年5月26日 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール（東京都港区）。
 - 3) 河野 資, 石垣貴裕, 新田典秀, 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 64 回日本アレルギー学会学術大会, 2015年5月26日 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール（東京都港区）。
 - 4) 佐藤美紀, 宮坂智充, 伊藤ちひろ, 奥山香織, 増田千愛, 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 CD8⁺T 細胞の抑制的関与. 第 55 回日本呼吸器学会学術大会, 2015年4月17日 東京国際フォーラム（東京都千代田区）。
 - 5) 河野 資, 石垣貴裕, 新田典秀, 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の機序. 第 55 回日本呼吸器学会学術大会, 2015年4月17日 東京国際フォーラム（東京都千代田区）。
 - 6) Miyasaka T, Itho C, Dobashi O K, Sato M, Masuda C, Kawano T, Ohkawara Y, Kikuchi T, Takayanagi M, Ohno I. Possible roles for CD8⁺ T cells in female-dominant IL-4 production in allergic asthma. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Dec 10, 2014, Kyoto International Conference Center (Kyoto City, Kyoto).
 - 7) Ishigaki T, Kawano T, Miyasaka T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Ohno I. The increased susceptibility to allergic asthma with the impairment of respiratory tolerance by psychological stress. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Dec 10, 2014, Kyoto International Conference Center (Kyoto City, Kyoto).
 - 8) 佐藤美紀, 宮坂智充, 伊藤ちひろ, 奥山香織, 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における CD8⁺T 細胞の関与. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2014年5月9日 国立京都国際会館（京都府京都市）。
 - 9) 石垣貴裕, 河野 資, 宮坂智充, 大河原雄一, 高柳元明, 大野 勲. 喘息の発症と精神的ストレスによる免疫寛容の抑制. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2014年5月9日 国立京都国際会館（京都府京都市）。
 - 10) 佐藤美紀, 宮坂智充, 伊藤ちひろ, 奥山香織, 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における CD8⁺T 細胞の関与. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会, 2014年5月25日 大阪国際会議場（大阪府大阪市）。
 - 11) 大河原雄一, 大柏芳彰, 生川千紗, 永福正和, 奥山香織, 河野 資, 高柳元明, 井ノ口仁一, 大野 勲. 内臓肥満と気管支喘息増悪の関係 マウスモデルを用いた検討. 第 25 回日本アレルギー学会春季学術大会, 2013年5月11日 パシフィコ横浜会議センター（神奈川県横浜市）。
 - 12) Ohkawara Y, Ohkashiwa Y, Narukawa C, Nagafuku M, Nakagawasai O, Kawano T, Takayanagi M, Ohno I. Impact of obesity and glucose intolerance on allergic airways inflammation in a murine asthma model. The 23rd Congress of Interasma Japan/North Asia. June 28, 2013, Toshi Center Hotel Tokyo (Chiyoda-ku, Tokyo).
 - 13) 中川西修. 嗅球摘出マウスのうつ様行動に対する新規化合物 BE360 の改善効果. 生体機能と創薬シンポジウム 2013, 2013年9月30日 九州大学百年講堂（福岡県福岡市）。
 - 14) 山香香織, 渡部紗香, 伊藤ちひろ, 河野資, 大河原雄一, 菊地利明, 高柳元明, 大野 勲. 中枢性 型ヒスタミン受容体を介した精神的ストレスによる気管支喘息悪化. 第 25 回日本アレルギー学会春季学術大会, 2013年5月11日 パシフィコ横浜会議センター（神奈川県横浜市）。
 - 15) 河野 資, 石垣貴裕, 佐久間美佳, 富田さゆみ, 奥山香織, 大河原雄一, 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. 第 25 回日本アレルギー学会春季学術大会, 2013年5月11日 パシフィコ横浜会議センター（神奈川県横浜市）。
 - 16) 奥山香織, 伊藤ちひろ, 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 CD4⁺T 細胞の関与. 第 25 回日本アレルギー学会春季学術大会, 2013年5月11日 パシフィコ横浜会議センター（神奈川県横浜市）。
 - 17) 河野 資, 石垣貴裕, 酒井百恵, 佐久間美佳, 富田さゆみ, 宮坂智充, 大河原雄一, 高柳元明, 大野 勲. 免疫寛容に対する精神的ストレスの影響と喘息の病

- 態発症．第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会，2013 年 11 月 29 日 ホテルニューオータニ（東京都千代田区）。
- 18) 宮坂智充，奥山香織，河野 資，大河原雄一，高柳元明，大野 勲．中枢神経系 1 型および 2 型ヒスタミン受容体を介した精神的ストレスによるアレルギー性気道炎症の悪化．第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会，2013 年 11 月 29 日 ホテルニューオータニ（東京都千代田区）。
- 19) 宮坂 智充，奥山 香織，河野 資，大河原雄一，高柳 元明，大野 勲．気管支喘息におけるストレス誘発性気道炎症の悪化に対する中枢性ヒスタミン受容体の関与．第 17 回日本ヒスタミン学会，2013 年 11 月 22 日 松江テルサ（島根県松江市）。
- 20) 奥山香織，河野 資，大河原雄一，高柳元明，大野 勲．中枢性 1 型ヒスタミン受容体を介した精神的ストレス誘発性気管支喘息悪化．第 16 回日本ヒスタミン学会，2012 年 10 月 20 日 岡山プラザホテル（岡山県岡山市）。
- 21) 奥山香織，末永正俊，古木俊也，河野 資，大河原雄一，菊地利明，大野 勲．抗原誘発性 Th2 サイトカイン産生の性差樹状細胞の機能の性差 - ．第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会，2012 年 11 月 30 日 大阪国際会議場（大阪府大阪市）。
- 22) 山香織，渡部紗香，伊藤ちひろ，河野 資，大河原雄一，菊地利明，高柳元明，大野 勲．気管支喘息重症度の性差における CD4⁺T および CD8⁺T 細胞の関与 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会，2012 年 11 月 30 日 大阪国際会議場（大阪府大阪市）。
- 23) 奥山香織，山崎直希，河野 資，大河原雄一，高柳元明，大野 勲．ストレスホルモンによるアレルギー性気道反応の増悪．第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会，2012 年 11 月 30 日 大阪国際会議場（大阪府大阪市）。
- 24) 大河原雄一，永福正和，生川千紗，奥山香織，河野 資，高柳元明，井ノ口仁一，大野 勲．肥満がアレルギー性気道炎症に及ぼす多様性について - マウスモデルを用いた検討 - ．第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012 年 11 月 30 日 大阪国際会議場（大阪府大阪市）。

〔その他〕

ホームページ等

- (1)東北薬科大学病態生理学教室
<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/byotai/index.html>
- (2)東北薬科大学薬理学教室
<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/yakuri/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

大河原雄一（OHKAWARA, YUICHI）
東北薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：40333801

(2)研究分担者

中川西修（NAKAGAWASAI, OSAMU）
東北薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：50296018