

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461504

研究課題名(和文)メタボローム解析による重症喘息の分子フェノタイピング

研究課題名(英文)Metabolomics-based molecular phenotyping of severe asthma

研究代表者

浅野 浩一郎 (ASANO, Koichiro)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60192944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的なパラメーターを用いたクラスター解析に基づく重症喘息のフェノタイピングは、この疾患が多様な病態を背景として生じる疾患の集合体であることを明らかにした。今回の研究ではメタボロミクスを応用した分子レベルでのフェノタイピングにより、重症喘息の診断・予後推定・治療選択のための優れたバイオマーカーの同定を目指した。特に繰り返し測定がしやすい呼気ガスや血液中のバイオマーカーを対象として検討した結果、呼気中の揮発性有機化合物であるベンゼン、キシレン、ノナンが喘息の重症度と比例して増加していること、血清中のペリオスチン濃度は重症度ではなく特定の病型と関連していることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Cluster analyses using clinical parameters have identified several phenotypes of severe asthma, including early-onset allergic phenotype and later-onset eosinophilic phenotype. In the present study, we aimed to clarify molecular phenotypes of severe asthma using metabolomic approach. We have identified that the levels of volatile organic compounds including benzene, xylene, and nonan in exhaled air of the patients with severe asthma were increased. In addition, serum levels of periostin were increased in a subpopulation of patients with severe asthma, who exhibited later-onset, non-atopic eosinophilic disease often accompanied with eosinophilic rhinosinusitis with nasal polyps. In conclusion, we were able to identify several non-invasive biomarkers that reflect either the severity or the phenotype of asthma.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：重症喘息 バイオマーカー メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 重症喘息の個別化治療を目指した分子フェノタイピング研究の意義

喘息患者の 5-10% が標準的治療でコントロール困難である重症喘息に該当し、日本国内だけで数万人の患者がいると想定される。それだけに、この病態に対する新たな治療法の開発は重要な課題である。クラスター解析に基づいたフェノタイピングの成果からも明らかのように、重症喘息は多様な病態を背景として生じる疾患の集合体であり、個々の患者の病態を正確に把握した上での個別化治療が治療の成功に不可欠である。

そのためにも、臨床的なパラメーターに基づくフェノタイピングに加え、分子レベルでの研究(分子フェノタイピング)による優れたバイオマーカーの同定が重要である。一例を挙げると、気道上皮細胞のトランスクリプトーム解析研究から見いだされたバイオマーカー、ペリオスチンの血中濃度が抗 IL-13 抗体治療の効果予測に有用であったとの報告 (Corren ら、N Engl J Med、2011) は、重症喘息の個別化治療における分子フェノタイピング研究とそれに基づくバイオマーカー同定の重要性をあらためて実証した。

(2) 分子フェノタイピング研究におけるメタボローム解析の利点と欠点

分子フェノタイピング研究の手法としては、トランスクリプトーム解析だけでなく、プロテオーム解析、メタボローム解析などの手法も可能である。喘息気道局所の病態をトランスクリプトームやプロテオーム解析で把握するためには気管支鏡を用いた気道細胞・洗浄液の採取といった侵襲的な手法が必要である。これに対して低分子量物質を解析対象とするメタボローム解析は、非侵襲的に、繰り返し採取できる呼気や呼気凝縮液などの試料でも可能である点が大きな利点である。しかし、トランスクリプトーム解析の DNA マイクロアレイやプロテオーム解析の 2 次元電気泳動/アミノ酸配列同定という確立された実験手法と比較して、メタボローム解析は対象とする分子群ごとにアクセスシステムを個々に確立しなければならないという技術的な困難が伴う。

われわれは連携研究者とともに、有機揮発性化合物 (VOC) を対象としたメタボローム解析系をすでに確立しており、これを応用して喘息気道の病態に迫ることを目指した。

2. 研究の目的

揮発性有機化合物に対するメタボローム解析を呼気解析に応用し、重症喘息患者の分子フェノタイピングを行うとともに、その気道病態を反映するバイオマーカーを見いだすことを目的とした。

特に今回の研究で明らかにすることとして、測定系の調整、健康人、軽症～中等症喘息患者、重症喘息患者の呼気 VOC 解析を実

施し、病態と関連する分子を同定すること、重症喘息患者については増悪時と寛解後にも上記の測定を行い、増悪と関連する分子を同定することを目指した。

当初の研究目的であるメタボロミクス解析を用いた新規バイオマーカー探索に加えて、既知のバイオマーカーであるペリオスチンの臨床的意義を明らかにすることについても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 呼気 VOC 濃度

大気をおよそマイナス 80 度に冷却した純化管に通すことで大気中の VOC 成分を冷却圧縮し、スチールウールにトラップさせる (コールドトラップ法) ことで、不純物を取り除かれた純化空気を調整する。純化空気を吸入した被験者の呼気を再度純化管に通し、トラップされた VOC を加熱・遊離した後に無極性の大口径中空カラム (G-100, CERI) で分離し、ガスクロマトグラフィー (GC-FID, GC-2014, Shimadzu Corp) にて測定 (現在までに約 50 の VOC ピークについて同定済) する。このダブルコールドトラップ法は大気中の VOC 成分の影響をほぼ完全に除去できるとともに、生体由来の VOC 成分を 200 倍以上に濃縮した上で成分分析することを可能とした。

このプロトコルを用いて 12 種類の呼気 VOC 濃度を健康成人、喘息患者 (軽症～中等症、重症) について測定を行った。併せて疾患コントロール群として睡眠時無呼吸症候群患者についても同様の検討を行った。

(2) 血清ペリオスチン濃度

連携研究者の福永興彦 (慶應義塾大学) と共同で多施設コホート研究 Keio-SARP を実施し、そこで採取した血清 (健康人 11 名、軽症～中等症喘息 42 名、重症喘息 148 名) について、血清ペリオスチン濃度を ELISA 法で解析し、臨床データと比較検討した。

4. 研究成果

(1) 呼気 VOC 濃度

ダブルコールドトラップ法を用いた呼気 VOC 測定システムの手法について論文化し、Adv Biomed Eng 誌にアクセプトされた。実際にこの手法を用いて呼吸器疾患患者 (肺癌、睡眠時無呼吸症候群) について呼気 VOC 濃度を検討し、その有用性を確認できた。喘息患者についてもこの手法を用いて解析を進めていたが、入院患者を対象として行われた肺癌、睡眠時無呼吸症候群患者での検討と異なり、主に外来患者を対象とした検討となっており、測定手技の効率化が必要となった。そこで以下の様な測定システムの改良を行った。

1) 大気中の VOC を除去するための純化空気を作成する手法としてガスマスク用のフィルターを利用することにより、大幅に時間短縮が可能となった、2) 呼気 VOC を吸着するための素材としてグラスウールを用いたが、注射針の中に固体吸着剤を組み込んだ

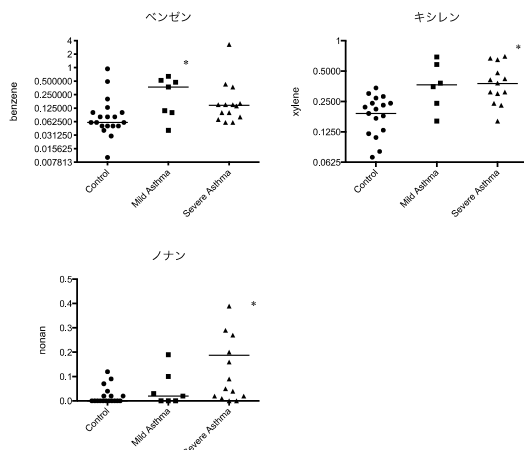
NeedleEx を用いることで直接 GC・MS にサンプルを注入できるようになり、測定の迅速化と再現性の向上がえられるようになった。ただし、これらの測定手順の変更にとともに、アセトンとイソプレンの測定値に大きな変動があり、この原因を検討した。その結果、呼気保存用バッグに呼気を保持する時間によりこの2つのVOC濃度が大きく変動することが明らかとなった。従来は呼気採取から測定までの時間が半日程度あったため、濃度の変動が少なかったと思われる。この問題に関しては呼気採取後30分以内に測定することで解決できた。

このプロトコルを用いて12種類の呼気VOC濃度を健康成人19例、喘息患者28例(軽症~中等症10例、重症18例)について測定を行った。併せて疾患コントロール群として睡眠時無呼吸症候群患者19例についても同様の検討を行った。

その結果、3種類の呼気VOC(ベンゼン、キシレン、ノナン)について、喘息群で健康成人あるいは睡眠時無呼吸症候群患者と比較して有意な濃度上昇が確認された(図1)。この濃度上昇は特に重症喘息患者で顕著であった。以上より、呼気VOC濃度は喘息患者、特に重症喘息患者で上昇することが明らかとなった。しかし呼気VOC濃度には個体差が大きく、また健康人と喘息患者との弁別能は低いことから、さらなる検討が必要と考えられた。

図1 呼気VOC濃度の比較

健康者、軽症~中等症喘息、重症喘息患者で比較した結果を示す。* $p < 0.05$

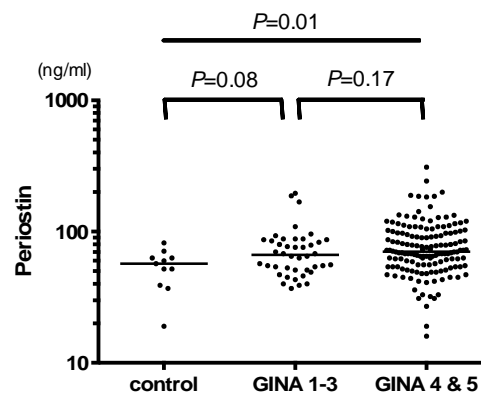


(2) 血清ペリオスチン濃度

喘息患者190例での血清ペリオスチン中央値は健康人と比較して有意に高値であったが、重症度と血清ペリオスチン値に有意な関連はなかった(図2)。重症喘息患者を血清ペリオスチン値に基づき3群に分類したところ、血清ペリオスチン高値の患者は成人発症、好酸球性炎症優位、鼻合併症、低肺機能などの特徴を呈する喘息の臨床像と関連すること

が示唆された。一方、吸入ステロイド量や内服ステロイド使用率、ACTスコアやQOLスコアには血清ペリオスチン値による有意差は認めなかった。ペリオスチン濃度はステロイド治療によっても変動が少ないとされ、喘息のコントロール状態や重症度ではなく、病型を反映するバイオマーカーであると考えられた。

図2 血清ペリオスチン濃度と喘息重症度 (Allergol Int 64:175-180, 2015 より引用)



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2件)

1. T. Nagaoka, N. Kobayashi, M. Kurahashi, T. Oguma, T. Aoki, T. Urano, C. Tsuji, K. Asano, T. Abe, K. Magatani, S. Takeda. Double cold-trap method to determine the concentrations of volatile organic compounds in human expired gas. Adv Biomed Eng(査読有) 4: 112-8, 2015
2. M. Matsusaka, H. Kabata, K. Fukunaga, Y. Suzuki, K. Masaki, T. Mochimaru, F. Sakamaki, Y. Oyamada, T. Inoue, T. Oguma, K. Sayama, H. Koh, M. Nakamura, A. Umeda, J. Ono, S. Ohta, K. Izuhara, K. Asano, T. Betsuyaku. Phenotype of asthma related with high serum periostin levels. Allergol Int(査読有) 64:175-180, 2015.

[学会発表](計8件)

1. K. Asano. Invited lecture. Understanding How Allergic Responses End: The Allergy Resolvome. American academy of allergy asthma and immunology (AAAAI) 2014 Annual Meeting. San Diego, USA, 2014. 3. 2.
2. K. Asano. Symposium "Pathophysiology of severe asthma in adult" Heterogeneity of severe asthma and biomarkers. The 24th congress of INTERASMA in Japan/North Asia, Tokyo, Japan, 2014.7.19.
3. K. Asano, H. Kabata, K. Moro, S. Koyasu. Plenary symposium. Clinical and molecular

phenotypes of severe asthma. 8th Hong Kong Allergy Convention. Hong Kong, China, 2014. 10. 4

4. 浅野浩一郎 シンポジウム「個別化治療に向けた呼吸器疾患バイオマーカーの現状と未来」重症喘息のバイオマーカーと個別化医療 第55回日本呼吸器学会学術講演会 大阪, 2015. 4.17
5. K Asano. Symposium. Clinical phenotypes and molecular mechanisms of severe asthma. XXIV World Allergy Congress. Seoul, Korea, 2015. 10. 16
6. 浅野浩一郎 気管支喘息の新規バイオマーカー ペリオスチン 第12回呼吸器バイオマーカー研究会、東京、2015, 11
7. K Asano. Invited lecture. Clinical phenotypes and molecular mechanisms of severe asthma. 121st Spring Congress of Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases. Seoul, Korea, 2016. 4. 16
8. K Asano. Symposium. Joint ATS/ERS/JRS symposium on severe asthma. Severe Asthma: Lessons Learned from Global Studies. ATS2016 American Thoracic Society International Conference, San Francisco, USA, 2016. 5. 15

〔図書〕(計1件)

松坂雅子、浅野浩一郎 気管支喘息とバイオマーカー p92-97 Annual Review 2016 呼吸器 永井厚志、巽浩一郎、桑野和善、高橋和久編集、中外医学社、2015

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅野 浩一郎 (ASANO, Koichiro)
東海大学・医学部内科学系呼吸器内科学・教授
研究者番号：60192944

(2)研究分担者(2013年度のみ)

阿部 直 (ABE Tadashi)
東海大学・医学部内科学系呼吸器内科学・教授
研究者番号：80129311

(3)連携研究者

福永 興彦 (FUKUNAGA Koichi)
慶應義塾大学・医学部呼吸器内科・講師
研究者番号：60327517

永岡 隆 (NAGAOKA Takashi)
早稲田大学・理工学術院・講師
研究者番号：00367054

有田 誠 (ARITA Makoto)
東京大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：80292952