

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32666
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26860762
研究課題名(和文)小児喘息のphenotype-endotypeに寄与するバイオマーカーの解明

研究課題名(英文)Insight into phenotype-endotype of childhood asthma

研究代表者

林 美雪 (Hayashi, Miyuki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70350113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：喘息群30名、喘息及び炎症性疾患の無い対照群11名について呼吸機能検査、FeNO(呼気中一酸化窒素濃度)、EBT(呼気温度)、総IgE、各種アレルゲン特異的IgEを測定・記録した。喘息群におけるFeNOは、対照群に比べ有意に高値であり($p=0.005$)、発作時は非発作時よりも有意に上昇していた($p=0.04$)。EBTは喘息群で非発作時よりも発作時に有意に上昇していた($p=0.001$)。対照群のEBTは、喘息群と比較して差を認めなかった($p=0.33$)。喘息群のピークフロー(PEF)は非発作時より発作時に有意に低下しており($p=0.005$)、FEV1.0%に関して同様であった($p=0.03$)。

研究成果の概要(英文)：Thirty patients with asthma (BA) and eleven controls who did not have asthma or any other inflammatory disease were recruited. Fraction of exhaled nitric oxide (FeNO), exhaled breath temperature (EBT), total and specific IgE to different inhalant allergens were tested. According to American Thoracic Society guidelines, high FeNO is >50ppb for ages 12-19 years and >35ppb for ages 6-11 years. The levels of FeNO was significantly higher in BA patients as compared to that of control patients ($p=0.005$). There was significant elevation of FeNO in the asthmatics during acute attack compared to asymptomatic period ($p=0.04$). EBT in patients with BA was elevated during an acute attack of asthma as compared to that when asymptomatic ($p=0.001$). However no difference was noted in the EBT between asymptomatic asthmatics and controls($p=0.33$). In spirometry, PEF declined during acute attack compared to that when asymptomatic ($p=0.005$), the same was true about FEV1.0%($p=0.03$).

研究分野：小児科

キーワード：気管支喘息 小児 endotype phenotype バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1)喘息は、気道炎症を基礎とし発作性の可逆的気道狭窄を反復して生じる慢性呼吸器疾患であり、1960年以降特に先進国で有病率が増加し全世界で約三億人が罹患していると考えられ、人類共通の健康問題となっている。喘息は単一の疾患ではなく、遺伝的・環境的・免疫学的に異なる背景を持った個体が類似の呼吸器症状を呈する複合的な疾患であるという認識が広がり、既存の治療に対する効果にもばらつきがあると考えられている (phenotype) (Wenzel SE. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2013)。小児においても、治療抵抗性の重症喘息が問題となっており、早期に気道リモデリングを来す患者は気道炎症及び気道閉塞性が長期に残存し、アウトグローストという特徴が明らかになっている (Fitzpatrick AM et al. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012)。

(2)成人領域では、これまでに臨床的特徴、発作誘発因子、炎症発生機序など様々な方面から複数の phenotype が報告されているが、いずれも喘息の特徴の一面に過ぎず、独立したグループとしては確認できていない。また、遺伝子や各種バイオマーカーの検索が可能となるにつれ、endotype (機序として明確な病的あるいは機能的特徴をもつ疾患グループ) という考え方が出現した (Anderson GP. *Lancet* 2008)。まず、好酸球性炎症は糖質コルチコイドによく反応するが、好酸球性炎症非依存性喘息も存在することが明らかになった (Haldar P, et al. *Am J Resp Crit Care Med* 2008)。また、IL-13 関連遺伝子 (periostin を含む) 上昇例で低容量吸入ステロイドが著効し (Woodruff PG et al. *Thorax* 2007)、抗 IL-13 抗体は periostin 高値の患者で特異的に効果を示した (Corren J et al. *New Engl J Med* 2011)。また、periostin 及び呼気中一酸化窒素濃度 (FeNO) 上昇を認める患者は、ステロイドに最も反応すると考えられている。喘息の endotype 解明への動きは更に活発化を見せ、多数の関連バイオマーカーが研究されている。

(3)上皮細胞から産生される TSLP (thymic stromal lymphopoietin) は、未熟樹状細胞に働きかけ、Th2 細胞の選択的な分化誘導・機能維持に寄与する (Soumelis V et al. *Nat Immunol* 2002)。IL-5 は、好酸球の分化・増殖、活性化、寿命延長を促進するが、抗 IL-5 抗体の有効性から、鼻茸を伴う好酸球性喘息への IL-5 の関与が判明した (Castro M et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2011)。また、一部の喘息では、好中球が気道に浸潤し、IL-17A, IL-17F などの炎症性サイトカインを産生する Th17 が関与している (中島裕史、廣瀬晃一. *アレルギー* 2013)。Th17 による気道炎症はステロイド抵抗性で、重症度との関連が示唆される (McKinley L et al. *J Immunol* 2008)。

IL-33 と IL-25 (IL-17E) は上皮細胞由来のサイトカインであり、獲得免疫非依存性に IL-5, IL-13 による Th2 誘導に寄与し好酸球浸潤を伴う気道炎症を誘導する (Ohno T et al. *Allergy* 2012) (Swaidani S et al. *J Immunol* 2009)。喀痰中好中球増多は、好中球性喘息の特徴と位置づけられるが、経時変化が大きく、cut off point の決定も難しいことから、小児喘息における好中球性喘息という phenotype の存在は明らかになっておらず、検討が待たれている。(Wenzel SE. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2013) Th1 炎症のマーカーである IFN- γ と IL-18 は、重症喘息との関連が指摘される (Poon AH et al. *Clinical & Experimental Allergy* 2012)。

(4)アレルゲンとしては、ハウスダスト、ダニによる感作が中心であるが、それ以外にも花粉や動物抗原、更に NO₂, O₃, DEP (diesel exhaust particles), PM (particulate matter) などの大気汚染物質が喘息悪化に関連していることがわかっている (Takizawa H, *Korean J Med* 2011)。また、LPS (lipopolysaccharide) はグラム陰性細菌の細胞膜構成成分であるが、LPS を多く含むアレルゲンに経気道的に感作されると TLR4 及び Th1, Th17 応答を介して好中球性炎症が惹起されると考えられている (Tae YM et al. *J Immunol* 2012)。

2. 研究の目的

(1)本研究では、以下の手法により小児喘息における phenotype-endotype の存在を明らかにすることを目的とした。

血中炎症性バイオマーカーの分析

呼気中の炎症性バイオマーカーの分析

呼気温度測定

呼吸機能検査による気道閉塞性の評価

喀痰中炎症性バイオマーカーの分析

アレルゲン・LPS・DEP の刺激による Tリンパ球及びバイオマーカーの変化の分析

(2)目標とする phenotype および関連するバイオマーカーの組み合わせとして、早期発症 Th2 依存型 (アトピー性) 喘息と IL-5, IL-13, TSLP, periostin, FeNO アレルギー性鼻炎関連喘息と IL-13, TSLP, SAEsIgE Th2 非依存性好酸球依存型喘息と IL-5, 喀痰中好酸球 受動喫煙関連型喘息と IFN- γ , 喀痰中好中球 重症ウイルス感染症既往型喘息と IL-33, IL-25, IFN- γ を候補として解析する。これらのバイオマーカーを非発作時と発作時に測定することにより、発作に関連する因子の特定を目指す。

3. 研究の方法

(1)2014年4月から2017年3月の期間に、日本医科大学付属病院小児科外来に通院中の5歳から18歳の喘息患者のうち、過去2年の間に症状のコントロールのためにロイ

コトリエン受容体拮抗薬に加え吸入ステロイド薬(プロピオン酸フルチカゾン 100 μ g/日以上、長時間作用型 β 刺激薬との合剤を含む)の治療を半年以上継続して使用した既往がある者を対象として登録した。喘息の定義は、Global Initiative for Asthma (GINA) GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION 2011に従った。また、経過観察の脳波記録目的に来院する喘息を持たない患者を対照群とした。両群ともに、患者本人および保護者に説明を行い、書面によるインフォームド・コンセントを取得した。

(2)GINA2011の定義する”Controlled”の状態(日中・夜間ともに症状なし、活動性制限なし、頓用薬の使用が週に2回以下、呼吸機能正常)を喘息群のベースラインとし、短時間作用型 β 刺激薬に関しては、発作時頓用のみ使用可とした。末梢血中非特異的IgEが $10\times$ (年齢)IU/ml以上又はダニ・ハウスダストに対する皮膚プリックテスト陽性をアトピー素因ありと判断した。病歴として、年齢、性別、身長、体重、BMI、喘息診断年齢、喘息・アレルギー性鼻炎・アレルギー性結膜炎・アトピー性皮膚炎・食物アレルギーなどの家族歴、同胞数、集団保育の有無、家庭内喫煙者数、ペット飼育の有無と種類、入院を要する重症RSV感染症既往、RSV反復感染既往、研究参加時点および乳幼児期の住環境(戸建てか集合住宅か、築年数、幹線道路からの距離)を記録した。

(3)喘息のコントロール状況は、15歳以上ではAsthma Control Test(ACT)を、5歳~14歳では小児用ACTを参考に評価した。経過中にコントロール状況が悪化した場合は、治療をステップアップした。発作の定義は、咳嗽、息切れや息苦しさの自覚症状、喘鳴などが進行性に増悪することとし、意識状態、呼吸数、会話の状態、SpO₂(room air)、PEF値、血液ガス所見などを参考に、発作の程度を小発作、中発作、大発作、重積発作に分類した(GINA 2011)。尚、気管支喘息以外の呼吸器疾患(肺炎、BPDなど)、循環器疾患、膠原病、炎症性腸疾患、悪性腫瘍を有する者、検査に協力できない者、喫煙者は除外した。

(4)連続変数の解析には、喘息群の非発作時と発作時の検査値の比較においてはWilcoxon符号付順位和検定を用い、喘息群とコントロール群の検査値の比較においてはMann-Whitney検定を用いた。

4. 研究成果

(1)最終年度終了時の研究参加者は喘息群30名(男性20名、女性10名)、非発作時年齢中央値11.5[5-17]歳、うち中等症が25名、重症が5名であった。

コントロール群は11名(男性5名、女性6名、初回検査時年齢中央値11.5[6-18]歳であった。

(2)喘息群の呼吸機能検査におけるPEF

の中央値は、非発作時229.5[102.0-507.6]L/min、発作時183.7[132.4-471.2]L/minであり、発作時に有意に低下していた($p=0.005$)。また、コントロール群のPEFは171.2[116.2-325.2]L/minであり、喘息群の非発作時と差を認めなかった($p=0.09$)。FEV₁0%については、喘息群非発作時中央値93.3[79.2-99.7]、発作時中央値92.9[77.5-98.7]%であり、発作時に低下していた($p=0.03$)。コントロール群では94.0[80.6-99.4]%であり、喘息群非発作時と比較して有意な差を認めなかった($p=0.72$)。

(3)喘息群におけるFeNOの中央値は、非発作時19[7.5-96]ppbであり、発作時18[5-152]ppbであり、発作時に上昇していた($p=0.04$)。喘息群の非発作時FeNOは、コントロール群のFeNO(9[5-45]ppb)と比較して有意に上昇していた($p=0.005$)。

(4)EBT(呼気温度)は喘息群で非発作時34.5[33.0-35.3]、発作時34.4[33.3-35.1]であり、発作時に有意に上昇していた($p=0.001$)。一方、コントロール群のEBTは34.7[33.9-35.2]であり、喘息群の非発作時と比較して差を認めなかった($p=0.33$)。

(5)非特異的IgEは、喘息群の非発作時中央値505.5[1.0-86300]IU/mlはコントロール群45[9.0-591]IU/mlと比較して有意に高値であり($p=0.01$)、アトピー素因が喘息に関与していると考えられた。

(6)黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA特異的IgEは、喘息群で非発作時中央値0.1[0.1-1.46]UA/ml、発作時0.1[0.1-1.86]UA/mlであった($p=0.04$)。TARCについては、非発作時483[221-1023]、発作時438.5[216-706]と非発作時が発作時に比較し有意に高値であった($p=0.03$)が、アトピー性皮膚炎の増悪を認めている症例が含まれていたためと考えられた。

今後、末梢血中periostin、TSLP、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17、IFN- γ 、IL-25、IL-33、LTC₄及び呼気中のIL-4、IL-5、IL-13、IL-17、IFN- γ 、IL-25、IL-33、LTC₄測定を行い、解析を行う方針である。

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3件)

1. 気道アレルギー. 林 美雪、パワンカール・ルビー 「医学と薬学」 第72巻 第9号 2015年9月 p1455-1464.

2. 日本アレルギー学会「アナフィラキシーガイドライン」の解説. 林 美雪、パワンカール・ルビー 「小児科」 第56巻7号 2015年7月 p985-994

3. 大豆アレルギー. 林 美雪、Pawankar Ruby 「小児科」 55巻5号 Page 703-713 (2014.04)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Miyuki Hayashi, Pawankar Ruby, Shingo Yamanishi, Toru Igarashi, Yasuhiko Ito. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis due to soy product - a case report

第 17 回世界アレルギー学会 (World Allergy Congress)(2015 年 10 月)

2. 林美雪、Pawankar Ruby、山西慎吾、五十嵐徹、伊藤保彦

大豆に製品による食物依存性運動誘発性アナフィラキシー (FDEIA) の一例

第 53 回日本小児アレルギー学会(2016 年 10 月)

3. 林美雪、Pawankar Ruby、山西慎吾、五十嵐徹、伊藤保彦

大豆製品 (がんもどき) が原因と考えられる食物依存性運動誘発性アナフィラキシー (FDEIA) の一例

第 64 回日本アレルギー学会 (2015 年 5 月)

4. 林美雪、Ruby Pawankar、尾崎優介、山西慎吾、五十嵐徹、伊藤保彦

Immuno CAP ISAC により PR-10 関連が疑われた食物依存性運動誘発性アナフィラキシー (FDEIA) の一例

第 51 回日本小児アレルギー学会 (2014 年 11 月)

5. 林美雪、Ruby Pawankar、山西慎吾、五十嵐徹、伊藤保彦

大豆製品 (がんもどき) が原因と考えられた食物依存性運動誘発性アナフィラキシー (FDEIA) の一例

第 38 回日本小児皮膚科学会(2014 年 7 月)

〔図書〕(計 3 件)

1. Pawankar R, Hayashi M, Yamanishi S. Dep. of Pediatrics, Nippon Medical School, Air pollution, asthma and allergic airway diseases.. Studies on Respiratory Disorders.(Ganguly NK Jindal SK, Biswal S, Barnes PJ, Pawankar R), 2014; pp 151-161, Springer (NY).

2. Pawankar R, Hayashi M et al. Medicine. (SK Jindal.), 2015; pp 868-879, Jaypee Brothers Medical Publishers

3. Pawankar R, Yamanishi S, Hayashi M, et al. Allergic rhinitis and comorbid Asthma: Update. Textbook of Pulmonary & Critical Care Medicine.(Jindal SK.), 2015; pp 839-848, Jaypee Brothers Medical Publishers.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 美雪 (HAYASHI MIYUKI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：70350113