

(2) 気管支ぜん息・COPD 患者の健康回復に関する調査研究

④客観的指標によるぜん息コントロール状態の評価

気道炎症、気流閉塞、および気道リモデリングに関するそれぞれの客観的指標を用いたぜん息コントロール状態評価法の確立

代表者：石井 幸雄

【研究課題の概要・目的】

本調査研究では、既存の評価法に、我々が見いだした新規指標を加えることで、喘息患者の気道炎症、気流閉塞から、気道リモデリングの状態まで一括して評価可能な、鋭敏かつ非侵襲的客観評価法を開発することを目的とする。気道上皮の改変状況を反映する E-カドヘリン細胞外ドメイン、コラーゲン新生の程度を反映するプロコラーゲン C 末鎖を気道リモデリングの新規指標として利用する。また、気道炎症評価に酸化ストレスや Th2 反応に関する緒指標を加えることで、気道炎症のフェノタイプを区別する。肺機能検査に胸部 CT による低吸収領域の定量評価を加えることで、様々なタイプの喘息の気流閉塞評価を行う。これらの指標を経時的に測定し、喘息重症度、発作増悪回数（救急外来受診回数）、治療反応性、予後などの臨床緒指標と対比することで、同評価法のバリデーションを行い、多彩な喘息の長期コントロール状態を的確に把握し、健康相談や、薬物治療に活用することを最終目標とする。また、本研究で開発する客観的評価法はディーゼル排気等の大気汚染物質による喘息増悪の影響評価にも利用可能と思われる。

1. 研究従事者

- 石井幸雄（筑波大学医学医療系）
- 森島祐子（筑波大学医学医療系）
- 橋本健一（美浦中央病院）
- 菊池教大（国立病院機構霞ヶ浦医療センター）

2. 平成24年度の研究目的

喘息は気道の慢性炎症、気道狭窄によって特徴づけられる疾患である。一般に気道狭窄は可逆的であるが、長期に気道炎症の持続した喘息患者では気道構築の改変（気道リモデリング）による不可逆性の気道狭窄が加わり、治療難渋の原因となる。従って、長期管理を適切に継続するためには、気道炎症、気道狭窄の評価だけでなく、気道リモデリングを加えた総合的評価が必要である。更に、これらの評価を喘息コントロールに役立てるためには、より軽症の段階でそれぞれの病態を把握できる客観的指標を開発し、早期より治療介入できる体制を確立する必要がある。

我々はE-カドヘリンの細胞外ドメイン、およびI型プロコラーゲンのC末鎖(PICP)がいずれも喘息患者の喀痰中に検出され、気道リモデリングの進行に伴い増加することを見いだした。これらを指標に加えることにより気道リモデリングの非侵襲的かつ早期の評価が可能になるものと思われる。Th2 サイトカインおよび酸化ストレスは喘息、特に大気汚染物質による喘息増悪に重要であり、気道炎症評価にこれらの測定を加える。更に本研究では、気道狭窄の評価法として胸部CTを用いた気流閉塞（エアートラッピング）の定量解析を加えることで、肺機能検査に反映されない軽微な気流閉塞、末梢気道の気流閉塞を客観的に評価する。

既存の評価法にこれら一連の新規指標を加えることにより、鋭敏、包括的で、非侵襲的な客観評価法を確立し、喘息の長期管理に役立てることを目的に調査を行う。一般に公害喘息は長期化している患者が多く、気道リモデリングまで含めた評価は公害喘息の病態把握や、治療薬選択に重要であると思われる。また、本研究で検討する評価項目は、上述のごとくディーゼル排気微粒子を始めとした大気汚染物質に由来する喘息増悪の把握にも応用できる可能性がある。

3. 平成24年度の研究対象及び方法

- ①呼吸器内科専門医によって過去または現在に喘息と診断された成人患者のうち、文書で説明し、同意を得られた患者を今回の調査の対象とする。
- ②各患者の背景、病歴、喘息罹患年数、喘息治療歴、身体所見などを定められた調査票に記録する。過去、現在に使用した薬剤についても、同様に記録する。
- ③各患者より採血を行い、通常の数値、生化学検査に加え総IgE、特異的IgE(MAST33)を測定し、記録する。
- ④各患者で肺機能検査を行い、肺活量(VC)、%VC、一秒量(FEV1)、%FEV1、一秒率(FEV1/FVC)、ピークフロー(PEF)、最大中間呼気速度($FEF_{25-75\%}$)、および気管支拡張剤使用後のFEV1改善率を記録する。
- ⑤各患者の呼気一酸化窒素(NO)濃度をNIOX MINOを用いて測定し、調査票に記録する。
- ⑥各患者より、アールチューブを用いて呼気濃縮液を採取する。
- ⑦各患者より喀痰を採取する。喀痰排出困難な患者では2%食塩水吸入後の誘発喀痰を採取する。喀痰をジチオトレイトール(DTT)およびDNaseにて処理した後、遠心する。ペレットは生理食塩水にて洗浄後、細胞数を計測する。細胞をサイトスピンにてスライドグラスに塗布し、炎症細胞、特に好酸球分画を計測する。上清はマイクロチューブに分割し、使用時まで-80℃で保存する。
- ⑧喀痰上清中E-カドヘリン細胞外ドメイン、PICP、およびI型コラーゲン-C-テロペプチド(ICTP)の各濃度は特異的抗体を用いたELISAにて測定する。これらの濃度と、喘息罹患年数

や気管支拡張剤使用後の FEV1 改善率との関連を調べ、気道リモデリングの指標としての有用性を検証する。Th2 サイトカイン(インターロイキン(IL)-4、IL-5、IL-13 など)、インターフェロン(IFN)- γ 、tumor necrosis factor(TNF)- α 、transforming growth factor(TGF)- β 、CC ケモカイン、CXC ケモカインの各濃度は ELISA、あるいはマルチプレックスアッセイを用いて一括して行う。

- ⑨呼気濃縮液、ないしは喀痰中の過酸化水素濃度を FRAS4 フリーラジカル自動分析装置を用いて測定し、酸化ストレスの指標とする。
- ⑩Th2 サイトカインや過酸化水素濃度と、呼気 NO 濃度や喀痰好酸球数など既存の炎症指標との関連を調べ、気道炎症における Th2 サイトカインや酸化ストレスの寄与について検証する。
- ⑪胸部 CT を撮影された患者では Low attenuation area (LAA) の計測による気流閉塞の画像的評価を行う。胸部 CT を吸期・呼期で撮影する。気腫の影響を避けるため評価部位を下肺野に設定する。同部位で明らかな気腫性変化のある症例は CT 評価からは除外する。高分解能アルゴリズムを用い、1mm のスライス厚(120 kVp, 200 mA)で撮影し、CT 値-950 HU 以下を LAA と定義する。呼期時 CT における%LAA を気流閉塞(エアートラッピング)の程度として記録する。さらに気管支拡張剤使用前後で胸部 CT を撮影された患者では、前後の%LAA を計測することで、気流閉塞の可逆性を評価する。これらの結果と肺機能検査より得られた気流閉塞との関連について詳細に検討する。

(倫理面の配慮)

当研究計画は当該施設の倫理委員会で審査、承認されている。

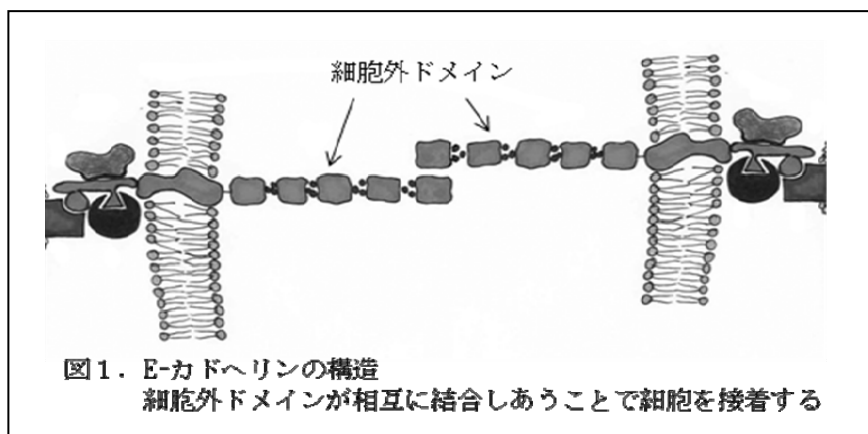
4. 平成 24 年度の研究成果

研究の提案に至った予備研究の結果も含め報告する。

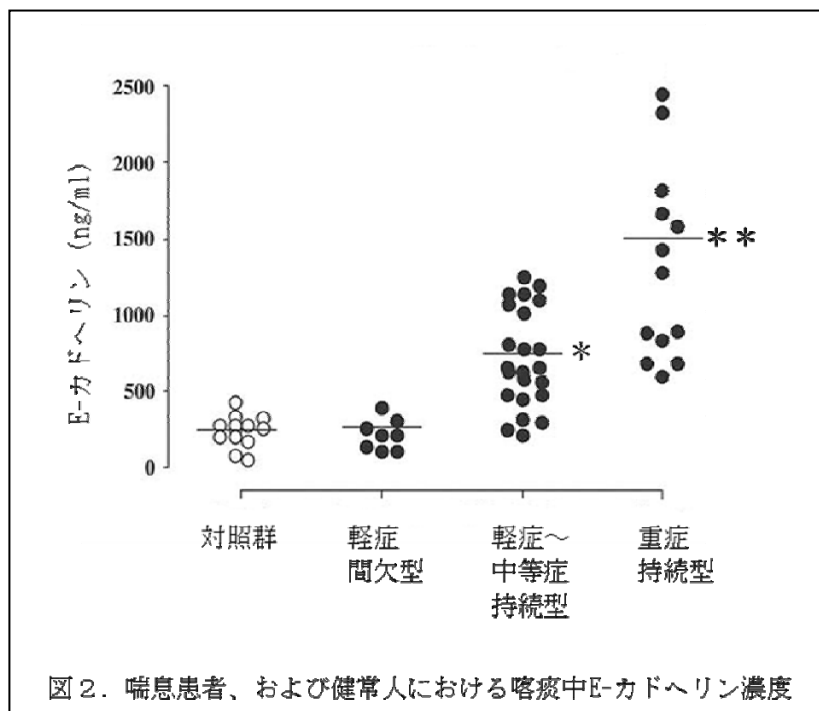
(1) 喀痰上清中 E-カドヘリン細胞外ドメインについて

カドヘリン(Cadherin)は細胞表面のアドヘレンス・ジャンクションに存在する上皮細胞間の接着分子である。古典的カドヘリン(E-カドヘリン、N-カドヘリン、P-カドヘリン)のうち、気道上皮では E-カドヘリンが発現している。E-カドヘリンは膜貫通型の細

胞接着分子であり、その細胞外ドメインが、カルシウム依存的に相互に結合することで細胞接着に関与する(図1)。

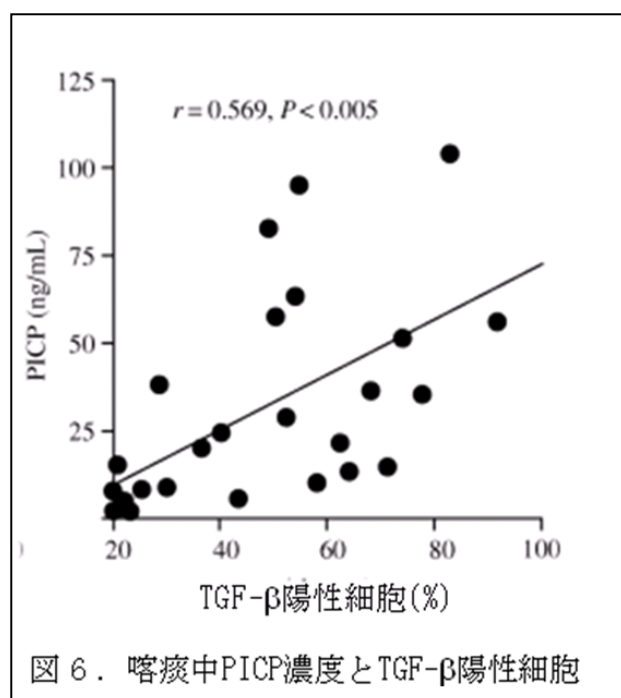
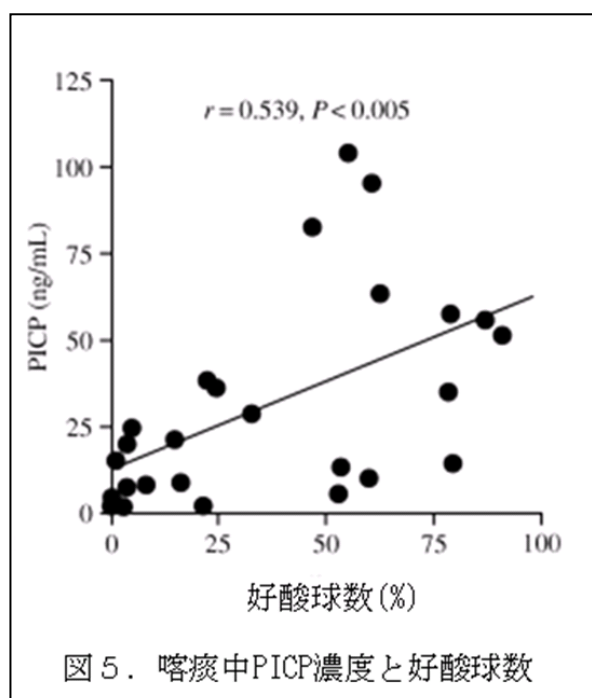
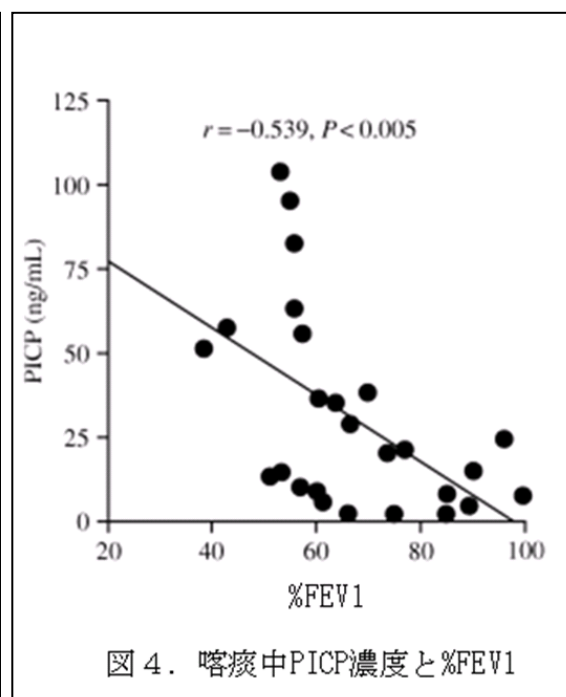
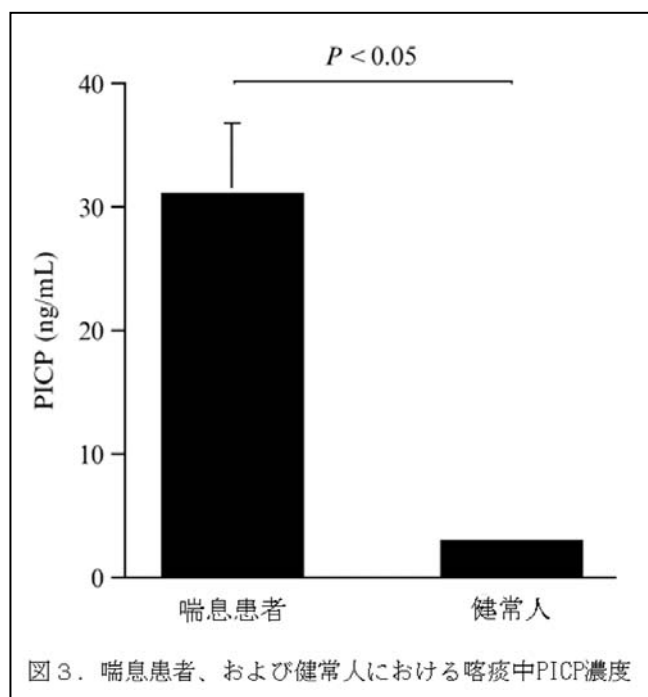


癌化などの上皮細胞の構築異常に伴い、E-カドヘリン細胞外ドメインが切断され、血中などに流出することが知られている。喘息における慢性気道炎症は上皮細胞の傷害やリモデリングと称する構築改変を引き起こす。従って、喘息患者における気道腔内の E-カドヘリン細胞外ドメイン量は、気道傷害やリモデリングの指標になりうるか検討した。喀痰上清中 E-カドヘリン細胞外ドメインは喘息の重症度に一致して増加を認めた。軽症間欠型喘息の患者では健常対照群と差を認めなかったが、軽症持続型、重症持続型と重症度が増加するに伴い E-カドヘリン細胞外ドメイン濃度も増加した（図 2）。喀痰上清中 E-カドヘリン細胞外ドメイン量は罹患年数に正の相関を示し、気管支拡張剤使用後の FEV1 増加率と負の相関を示した。ステロイド薬使用の有無は E-カドヘリン細胞外ドメイン量に影響を及ぼさなかった。



（2）喀痰上清中 PICP について

気道の、特に基底膜下の I 型コラーゲン沈着による線維化は気道リモデリングの主要病理変化である。I 型コラーゲンは I 型プロコラーゲンの形で細胞から分泌された後、特異的プロテアーゼにより N 末端、C 末端がそれぞれ切断されることにより形成される。この C 末端の可溶性プロペプチドが PICP であり、コラーゲンと 1 : 1 の関係であることから、その測定はコラーゲン生成の直接の指標となると考えられる。一方、ICTP は I 型コラーゲンの可溶性分解産物であり、骨吸収や悪性腫瘍骨転移のマーカーとして臨床応用されている。PICP はコラーゲン生成の、ICTP はコラーゲン分解のそれぞれ指標と考えられるため、喘息気道におけるコラーゲン代謝を検討する目的で喀痰上清中の PICP および ICTP 濃度を測定した。喀痰上清中 PICP 濃度は喘息患者では健常対照群に比べ有意に高値であった（図 3）。喘息患者における PICP 濃度は%FEV1 と負の相関を、喀痰好酸球数と正の相関を、TGF- β 陽性細胞数と正の相関をそれぞれ示した（図 4-6）。喀痰上清中 ICTP 濃度は喘息患者と健常対照群の間で差を認めなかった。



(3) 胸部 CT における気流閉塞評価について

前述の条件で胸部 CT 画像における LAA を可視化した。喘息症例では LAA は微細な点状に認められた (図 7)。%LAA は FEV1/FVC と逆相関する傾向にはあったが、FEV1/FVC が正常 (70% 以上) の症例でも画像上明らかな LAA を認める症例も見られた。また、咳喘息の症例でも喘息同様の点状の LAA を認め、これらは気管支拡張薬吸入後に軽減したことは興味深い所見であった。

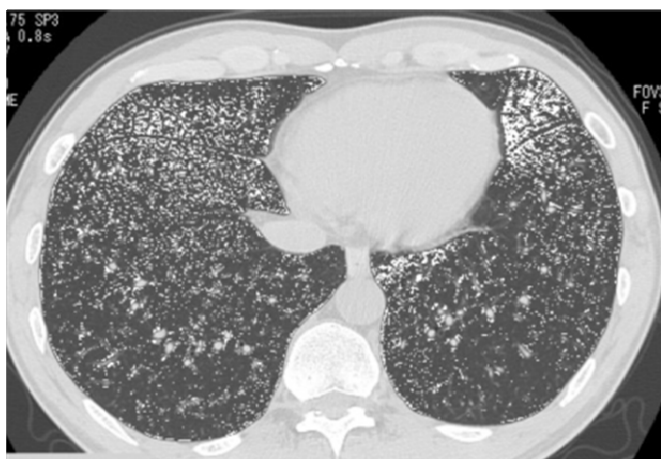


図 7. 喘息患者における気流閉塞の画像評価

胸部CTによるLow attenuation area (LAA)を
白色に可視化した

5. 考察

気道リモデリングは持続的な炎症によって生じる気道構築の改変であり、基底膜下の線維化、気道平滑筋増生、杯細胞過形成、血管新生を病理学的特徴とする。気道壁の肥厚と内腔の狭窄により気流閉塞不可逆化の原因となる。気道壁の肥厚は重症であるほど顕著であり、喘息発症年齢が若いほど、罹患年数が長いほどその程度は強くなる。

喘息患者における喀痰 E-カドヘリン細胞外ドメイン量は重症度が高い症例ほど、罹患年数が長い症例ほど、さらには気管支拡張薬の効果が低い症例ほど高値であった。一方、E-カドヘリン量は抗炎症薬であるステロイド薬の影響を殆ど受けなかった。以上より気道に遊離した E-カドヘリン細胞外ドメインは気道炎症ではなく気道構築の異常、すなわち気道リモデリングを反映するものと考えられた。E-カドヘリン細胞外ドメイン切断はリモデリングの過程で生じたものと考えているが、上皮細胞の接着に異常があると気道リモデリングを生じやすいとの報告もあり、逆に E-カドヘリンの異常が気道リモデリングに及ぼす影響についても検討していきたい。

喀痰 PICP 濃度は気流閉塞が大きいほど、TGF- β 発現が強いほど、好酸球炎症が強いほど高値であった。好酸球は細胞傷害性蛋白の放出により喘息気道における上皮傷害を引き起こすことが知られている。上皮傷害の強い気道では TGF- β を介したコラーゲン産生による気道修復が生じており、これらが長期化すると気道リモデリングを引き起こす。PICP の増加はこれら一連の

過程が亢進していることを示しており、E-カドヘリン細胞外ドメインと組み合わせることでリモデリングの新規指標になりうるものと考える。

喘息、COPD 患者における%LAA の検討は他にもなされている。喘息では CT 値の設定、測定領域、喫煙の有無で結果が異なっているため、当該研究でも喫煙の影響は充分考慮に入れて評価する必要がある。予備検討では 1 秒率が正常範囲でも%LAA の増加を認める症例があり、気流閉塞の把握に関して肺機能検査よりも鋭敏な指標となりうる可能性も考えられた。今回の研究と主旨は異なるが、咳喘息における気流閉塞の把握、さらには咳喘息とアトピー咳の鑑別に有用である可能性も示唆された。

6. 次年度に向けた課題

年度評価における指摘を踏まえ、次年度に向けた課題を列記する。

- ・平成 24 年度は研究開始時期が遅かったため、十分な症例、データの集積が行えなかったのが一番の課題である。喘息は珍しい病気ではないので、なるべく多くの症例を登録し、十分な数の臨床情報、および検体を確保したい。
- ・酸化ストレス評価に関して、過酸化水素濃度測定は呼気濃縮液だけでなく喀痰でも検討し、より患者負担を減らす方向を模索したい。また、可能であれば喀痰中の 8-hydroxy-2-deoxy guanosine (8-OHdG) やイソプロスタン濃度測定を試み、酸化ストレスを多角的に検討したい。
- ・PICP、ICTP 濃度は非濃縮の喀痰上清では検出感度付近であるため、Centricon 等の遠心ろ過装置を用いた濃縮を検討したい。アルブミン濃度等による補正も考慮する。
- ・可能なら喘息以外の疾患（COPD や間質性肺炎など）の喀痰中 E-カドヘリン、PICP、ICTP 濃度を測定し、喘息における特異性を検証したい。
- ・胸部 CT によるエアートラッピング評価に際し、LAA という言葉は気腫性病変を示す略語であるという指摘に基づき、 Δ LAA% など機能的な細気管支狭窄を示す別な表記に変える。
- ・本研究の最終目標は、喘息患者の状態を一括して評価できる非侵襲的指標を開発し、健康相談、薬物選択、さらには大気汚染物質による喘息増悪の影響評価に活用することであるが、2 年間の調査期間でここまで行うのは難しく、研究計画書に記載したように平成 25 年度計画は各項目の有用性検証までである。従って、目標を達成すべく次年度以降も研究を継続していく予定である。

7. 期待される成果及び活用の方向性

気道リモデリングは病理学的変化であり、診断には気管支鏡検査等による侵襲的組織採取が必要であった。今回提案する諸指標の有用性が検証されれば、気道リモデリングを非侵襲的に診断することが可能となり喘息患者への利益は大きい。また、気道炎症、気道狭窄、気道リモデリングを包括的に評価することにより喘息管理をより厳密に行うことが可能になる。一般に公害喘息は長期化している患者が多く、気道リモデリングまで含めた評価は公害喘息の病態把握や、治療薬選択に特に重要であると思われる。Th2 偏移や酸化ストレスも含めた炎症フェノタイプの把握は、ディーゼル排気微粒子を始めとした大気汚染物質に由来する喘息増悪の把握にも応用できる可能性があり、予防事業に寄与することができると考える。CT による評価は視覚的であるため、患者指導において有用な資料になりうると思う。また、CT による Δ LAA% の評価は咳喘息とアトピー咳の鑑別等、慢性咳嗽の補助診断にも活用できる可能性がある。

【学会発表】

1. 阿野哲士、森島祐子、石井幸雄、大塚茂男、松山政史、中澤健介、松野洋輔、川口未央、坂本透、檜澤伸之：OVA 誘発好中球性気道炎症に対する抗 IL-6 受容体抗体の有効性. 第 62 回アレルギー学会秋季学術大会（大阪）2012
2. Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Kaneko Y, Fujita J, Ohtsuka S, Matsuyama M, Nakazawa K, Ohta K, Matsuno Y, Kawaguchi M, Sakamoto T, Hizawa N. Anti-IL-6 receptor antibody attenuates neutrophilic airway inflammation in ROR γ t-overexpressing mice. American Thoracic Society International Conference 2013 (Philadelphia)