学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

喫煙の気管支喘息の病態に与える影響

研究代表者 山崎 進 (大学病院 呼吸器内科)

研究分担者 中込 一之¹⁾, 内田 義孝¹⁾, 宮内 幸子¹⁾,柚 知行¹⁾, 野口 哲²⁾, 小林 威仁²⁾, 永田 眞¹⁾

緒言

気管支喘息は、吸入ステロイドを中心とした抗炎症療法の普及により、以前と比べコントロール良好な疾患となったが、現在もなお年間約2000人の喘息死があり、重症喘息の病態解明は急務である。重症喘息の気道では、好中球性炎症及び好酸球性炎症が同時に発動し¹⁾、両者が互いに関係することによって、治療抵抗性を獲得することが想定されている。我々は、難治性喘息患者では、喀痰中好酸球数と好中球数が相関し²⁾、好中球遊走因子であるinterleukin (IL)-8の気道での産生が亢進していることを明らかにした³⁾。またin vitroの検討では、好中球と好酸球の共存下でIL-8により好中球の基底膜通過遊走反応を誘導させると、好酸球刺激因子が存在しない状況でも、好酸球の基底膜通過遊走が同時に亢進し⁴⁾、好中球が好酸球の組織集積を先導する可能性が強く示唆された。従って、好中球性炎症は重症喘息の重要な治療標的の一つと考えられる。好中球性気道炎症を誘導する因子の一つとして、喫煙があげられる。喫煙は、直接気道や肺に刺激し悪影響を与えるだけでなく、ヒストン脱アセチル酵素(histone deacetylase; HDAC)活性を低下させ、吸入ステロイドの効果を減弱させることが知られている⁵⁾。またButlandらは、アレルギー素因だけでなく喫煙も、喘息再発に関与することを報告している⁶⁾。近年、気管支喘息と慢性閉塞性肺疾患(COPD)との合併、オーバーラップ症候群(ACOS; Asthma-COPD overlap syndrome)が注目されている⁷⁾。喘息は、ダニなどのアレルゲンの曝露で誘導され、気道可逆性と気道過敏性が特徴である。一方、COPDは、タバコ煙などの有害物質の曝露で誘導され、呼吸機能検査で正常に復すことのない気流閉塞を示すと定義されている。ACOSは、気道可逆性と過敏性はあるが一秒量は正常化しないなど、喘息とCOPDの両方の特徴を持つ疾患群と定義されるが、喘息単独またはCOPD単独

患者と比べて、予後が悪いと考えられている⁷⁻¹⁰⁾。元来喘息では、気管支拡張薬を吸入すれば、気流閉塞は改善して、一秒量が正常化する。気管支拡張薬を吸入しても、一秒量が正常化しない(70%以下)症例では、喫煙が重要な役割を果たす可能性が示唆されている。Jamesらは、喘息における喫煙が呼吸機能に及ぼす影響を観察したところ、喘息喫煙者が、喘息非喫煙者や健常喫煙者と比較して、有意に呼吸機能が低下することを報告し¹¹⁾、喘息と喫煙が相互に作用してACOSの病態を形成する可能性が示唆された。我が国での喘息死症例の大部分は高齢者であり、この中にはACOSも相当含まれていると推測される。重症喘息の病態形成において、好中球性炎症が重要な役割を果たすことが知られている。喫煙は、好中球性炎症を誘導する因子の一つであり、直接気道や肺に刺激し悪影響を与えるだけでなく、吸入ステロイドの効果を減弱させることが知られている。しかしながら、喘息の臨床研究において、喫煙者は除外されていることが多く、喫煙の、喘息の気道炎症や重症度などに与える影響については、わかっていないことも多い。本研究は、喫煙の気管支喘息に与える影響について、①誘発喀痰・呼気凝縮液の解析を含む臨床プロファイル②好酸球(+好中球)の組織浸潤・活性化実験システム③マウスモデルを使用し、多面的に解析することを目的とする。喫煙が気管支喘息の増悪因子であることは知られているが、COPDにおける喫煙の役割ほど明確にはされていない。当科での喘息患者の診療は、アレルギー診療に特化したアレルギー喘息センターで行われている。その中で、誘発喀痰及び呼気凝縮液を採取し、解析するシステムはすでに確立している。モストグラフの測定、呼気NOの測定も日常的に行われており、これらとの相関の有無も検討できる状態にある。また当科では年余にわたり好酸球を研究標的とし、好酸球及び好中球の組織浸潤・活性化のin vitroの実験系を日常的に運用してきた。論文として多数報告しており^{4, 12-14)}、今回の研究を十分に遂行できる準備状況である。またマウスを用いた実験的研究も、以前より行わ

1) 大学病院 呼吸器内科

2) 大学病院 総合診療内科

れており、現在までに論文として多数報告している¹⁵⁻²⁰⁾。本研究は①ACOSにおける気道炎症の病態を含む臨床プロファイル②タバコ (cigarette smoking extract) の好酸球・好中球の組織浸潤及び活性化の過程における直接的影響③喫煙曝露の好酸球性気道炎症の誘導における影響などが検証・解明される。これら新規情報の最大の意義として、喫煙歴のある重症喘息の新規の治療標的が推定できる可能性が考えられる。

材料と方法

① 気管支喘息患者における閉塞性換気障害合併例 (ACOS群) と非合併例 (非ACOS群) における臨床プロファイルの検討

埼玉医科大学呼吸器内科及びアレルギー喘息センターに通院している20歳以上の治療ステップ4 (喘息予防・管理ガイドライン2015) 気管支喘息を対象とした。呼吸機能検査で閉塞性換気障害を合併している例をACOS群、合併していない例を非ACOS群として2群の臨床プロファイルを検討した。初めに年齢、性別、身長、体重、BMI (body mass index)、喘息歴、COPD歴、アレルギー合併歴、喫煙歴などのデータを記録した。また血液検査 (好酸球数、総IgE (immunoglobulin E)、IgE RAST (radioallergosorbent test)、TARC (thymus and activation-regulated chemokine)、抗核抗体、リウマチ因子、抗CCP (cyclic citrullinated peptide) 抗体など)、呼吸機能検査、モストグラフ検査、呼気NO検査を行った。呼気NOの測定は、NIOX MINO (Aerocrine社) を用い、呼出流速50 mL/s、口腔内圧5~20 cmH₂Oで行った。さらに、喘息コントロールテスト (ACT) や、COPDアセスメントテスト (CAT)、修正MRC (Medical Research Council) 質問表も検討した。またCOPD stageを評価し、これらの臨床プロファイルを2群で比較検討した。

② タバコ (cigarette smoking extract) の好酸球または好中球活性化に対する影響

タバコはマルボロ[®]を用い、本学研究室で抽出を行った。好酸球や好中球は、今まで当科で行ってきたプロトコルに準じて、デキストラン、Percoll液、及びimmunomagnetic beadsによるnegative selectionにて分離する。

(1) タバコの好酸球接着・遊走・活性酸素産生に対する直接的な影響

好酸球をcigarette smoking extractで刺激した後、①抗ICAM-1またはVCAM-1抗体をcoatしたplateとincubateし、残存好酸球ペルオキシダーゼ測定法で接着反応を測定②Boyden chamber変法を用い、遊走因子として下層にIL-5を用い、残存好酸球ペルオキシダーゼ測定法で遊走反応を測定③チトクロームC還元法を用い、活性酸素産生能を測定し、タバコの好酸球のeffector機能に対する直接的効果を検討する。

(2) タバコの好中球活性酸素産生に対する直接的な影響

好中球をcigarette smoking extractで刺激した後、活性酸素産生能を測定する。

③ マウスアレルギー性気道炎症モデルにおける喫煙の影響

BALB/cマウス (6-8週) を用いる。喫煙曝露は、群馬大学との共同研究で行う。Kentucky Research Cigaretteを用いマウスに吸入させる。タバコ量及び曝露頻度は、肺気腫モデル (1日2本・週6日・6カ月) より減量する。実際には予備実験を行ったうえで決定する。卵白アルブミン (OVA) の感作及び吸入は、当院で行ってきたプロトコルに準じて行う。2 µgのOVAと2 mgの水酸化アルミニウムを混合し、第0日と第11日に腹腔内注射を行い全身感作する。吸入感作は、第18日から20日にかけて、3% OVA/PBSで10分間行う。コントロールマウスは、第0日と第11日に生理食塩水を腹腔内投与し、第18日から20日にかけてPBSを吸入させる。OVA最終吸入の24時間後に、(1) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞分画 (2) 病理組織 (3) BALFサイトカイン (4) 肺抽出液サイトカイン (5) 血清IgEの評価を行う。

結果

① 気管支喘息患者における閉塞性換気障害合併例 (ACOS群) と非合併例 (非ACOS群) における臨床プロファイルの検討

80例の成人重症気管支喘息患者が診療録より抽出され、そのうちACOS群が42例、非ACOS群が38例であった。患者背景ではACOS群において有意に高齢 ($p<0.01$) で、男性に多く ($p=0.02$)、喘息歴が長かった ($p=0.01$)。また、喫煙指数 ($p=0.01$) や呼気NO ($p=0.03$) はACOS群で高値であった。呼吸機能検査では閉塞性換気障害を認めるものの拡散能の低下を伴う症例は少数であり、ACOSの有無による差は確認されなかった。臨床検査ではSP-AがACOS群において有意に高値であった ($p=0.03$)。モストグラフ検査ではACOS群においてR5-R20が有意に高値であった ($p=0.02$)。

② タバコ (cigarette smoking extract) の好酸球または好中球活性化に対する影響

本年度はタバコの抽出を行った。マルボロ[®]を用い、タバコ煙を生理食塩水に溶解させた。今後、in vitroにおける、タバコ抽出液の好酸球及び好中球機能に対する直接的影響を検討する予定である。

③ マウスアレルギー性気道炎症モデルにおける喫煙の影響

本研究は群馬大学との共同研究であり、本年度は書類の作成、実験環境の整備にとどまった。今後、in vivoにおける、タバコ曝露のアレルギー性気道炎症に対する影響を検討する予定である。

考 察

臨床プロフィール検討においてACOS群は非ACOS群と比較して有意に喫煙指数が高値であった。これは喫煙が気管支喘息を基礎疾患とする閉塞性換気障害の発症に寄与することを示唆するものと推測された。また、呼吸機能検査では閉塞性換気障害を認めるものの拡散能の低下を伴う症例は少数であり、ACOSの有無による差は確認されず、気道障害の部位には差があることが示唆された。特徴的な身体所見を伴わない膠原病関連自己抗体陽性者を認めたがACOSの有無による差は確認されず、重傷気管支喘息における閉塞性換気障害の発症において自己免疫の要素はあるにせよ有意なものではないことが示唆された。実際にタバコがアレルギー性気道炎症をどのように悪化させるかのメカニズムはよくわかっていない。今後①タバコ抽出液の好酸球及び好中球機能に与える直接的影響 (in vitro) ②タバコ曝露のマウスアレルギー性気道炎症に与える影響 (in vivo) を検討する予定である。

参考文献

- 1) The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J* 2003; 22: 470-7.
- 2) Kikuchi S, Nagata M, Kikuchi I, Hagiwara K, Kanazawa M. Association between neutrophilic and eosinophilic inflammation in patients with severe persistent asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137 Suppl 1: 7-11.
- 3) Kikuchi S, Kikuchi I, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, et al. Neutrophilic inflammation and CXC chemokines in patients with refractory asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149 Suppl 1: 87-93.
- 4) Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, Hagiwara K, Sakamoto Y, Kanazawa M, et al. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006 Jun; 34: 760-5.
- 5) Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001 Apr; 15: 1110-2.
- 6) Butland BK, Strachan DP. Asthma onset and relapse in adult life: the British 1958 birth cohort study. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007 Apr; 98: 337-43.
- 7) Gibson PG, Simpson JL. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it? *Thorax* 2009 Aug; 64: 728-35.
- 8) Silva GE, Sherrill DL, Guerra S, Barbee RA. Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study. *Chest* 2004; 126: 59-65.
- 9) Hoppers JJ, Postma DS, Rijcken B, Weiss ST, Schouten JP. Histamine airway hyper-responsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study. *Lancet* 2000; 356: 1313-7.
- 10) Hardin M, Silverman EK, Barr RG, Hansel NN, Schroeder JD, Make BJ, et al. The clinical features of the overlap between COPD and asthma. *Respir Res* 2011; 12: 127.
- 11) James AL, Palmer LJ, Kicic E, Maxwell PS, Lagan SE, Ryan GF, et al. Decline in lung function in the Busselton Health Study: the effects of asthma and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 109-14.
- 12) Takaku Y, Nakagome K, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. IFN- γ -inducible protein of 10 kDa upregulates the effector functions of eosinophils through β 2 integrin and CXCR3. *Respir Res* 2011; 12: 138.
- 13) Kobayashi T, Takaku Y, Yokote A, Miyazawa H, Soma T, Hagiwara K, et al. Interferon-beta augments eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells. *Eur Respir J* 2008; 32: 1540-7.
- 14) Kobayashi T, Kouzaki H, Kita H. Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *J Immunol* 2010; 184: 6350-8.
- 15) Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, To Y, Sato A, Komagata Y, et al. Antigen-sensitized CD4+CD62Llow memory/effector T helper 2 cells can induce airway hyperresponsiveness in an antigen free setting. *Respir Res* 2005; 6: 46.
- 16) Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Komagata Y, Nagatani K, Tanaka R, et al. In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 2005; 174: 6955-66.
- 17) Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Tanaka R, Kouro T, Kano MR, et al. IL-5-induced hypereosinophilia suppresses the antigen-induced immune response via a TGF- β -dependent mechanism. *J Immunol* 2007; 179: 284-94.
- 18) Nakagome K, Okunishi K, Imamura M, Harada H, Matsumoto T, Tanaka R, et al. IFN- γ attenuates antigen-induced overall immune response in the airway as a Th1-type immune regulatory cytokine. *J Immunol* 2009 Jul 1; 183(1): 209-20.
- 19) Nakagome K, Imamura M, Okada H, Kawahata K,

Inoue T, Hashimoto K, et al. Dopamine D1-like receptor antagonist attenuates Th17-mediated immune response and ovalbumin antigen-induced neutrophilic airway inflammation. J Immunol 2011; 186: 5975-82.

- 20) Nakagome K, Imamura M, Kawahata K, Harada H, Okunishi K, Matsumoto T, et al. High expression of IL-22 suppresses antigen-induced immune responses and eosinophilic airway inflammation via an IL-10-associated mechanism. J Immunol 2011; 187: 5077-89.

研究成果リスト

論文

なし

学会発表

- 1) 山崎 進, 中込一之, 内田義孝, 宮内幸子, 柚 知行, 野口 哲, 小林威仁, 永田 眞. 重症喘息における呼吸機能と関連因子の臨床的検討, 第55回日本呼吸器学会学術講演会, 平成27年4月, 東京
- 2) 山崎 進, 中込一之, 内田義孝, 宮内幸子, 柚 知行, 野口 哲, 小林威仁, 永田 眞. 成人重症気管支喘息における呼吸機能と関連因子の臨床的検討, 第56回日本呼吸器学会学術講演会, 平成28年4月, 京都

特許出願等

なし