

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09783

研究課題名(和文) 歯周病による慢性閉塞性肺疾患(COPD)増悪機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation for the mechanisms of the periodontitis-induced pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease

研究代表者

水田 健太郎(MIZUTA, KENTARO)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40455796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の発症・増悪因子として歯周病の関与が注目されており、両者の相関性を示唆する知見が集積しつつある。しかし、歯周病がCOPDを増悪させる機序は不明であった。そこで本研究は、歯周病原細菌から産生される短鎖脂肪酸が、気管平滑筋上に発現する短鎖脂肪酸受容体FFAR3を介して気管収縮作用をもたらすCOPD症状の悪化に寄与するとの仮説を立て検証した。その結果、短鎖脂肪酸がFFAR3を介してアセチルコリン誘発性のヒト気管平滑筋収縮作用を増強させること、またこの作用はcAMP減少シグナルと細胞内カルシウム増加シグナルを介して生じることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、歯周病が全身疾患の増悪に寄与するとのデータが集積しつつ有り注目を集めている。歯周病は慢性閉塞性肺疾患(COPD)の発症・増悪因子としても注目されており、両者の相関性を示唆する疫学的知見が集積しつつあるものの、その病態生理機構は不明であった。本研究は、歯周病原細菌から産生される短鎖脂肪酸が、気管平滑筋上に発現する短鎖脂肪酸受容体FFAR3を介して気管収縮作用をもたらすCOPD症状の増悪に寄与することを明らかにしたものである。

研究成果の概要(英文)：Emerging evidence suggests that oral microbiota-derived short-chain fatty acids (SCFAs) are important modulators of pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, it was unclear how periodontitis induces COPD. Therefore, we examined whether SCFAs modulates human airway smooth muscle tone through short chain fatty acid receptor FFAR3, and its intracellular mechanisms. Activation of FFAR3 in human airway smooth muscle with SCFAs potentiated acetylcholine-induced human airway smooth muscle contraction through the reduction of cAMP production and the increase in intracellular calcium.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 短鎖脂肪酸受容体 気管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、発症率が世界的に増加傾向にある慢性炎症性疾患である。気道炎症、肺胞破壊、気道閉塞を主徴とする慢性炎症性呼吸器疾患であり、2020年には世界の死亡順位の第3位になると予測されている。これまでCOPDはタバコ煙などの有害物質の長期吸入により発症すると考えられてきたが、実際には喫煙者の約2割にしか発症しないため、他の因子の関与が指摘されている。

近年、COPDの発症・増悪因子として歯周病の関与が注目されており、両者の相関性を示唆する疫学的知見が集積しつつある（図1）。

- ① COPDと歯周病は共通のリスク因子を有する（年齢、性差、喫煙、社会的地位）。
- ② COPDと歯周病は共に、結合組織の破壊を伴う進行性の慢性炎症性疾患である。
- ③ 歯周病罹患患者のCOPD罹患率は、正常者に比べて5倍以上高い。

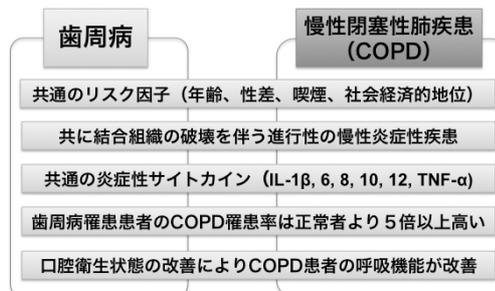


図1. 歯周病とCOPDの相関性

しかし、「歯周病がこういった機序でCOPDを増悪させるのか？」については解明されておらず、両者の直接的な因果関係は証明されていなかった。

そこで本研究は、歯周病原細菌から産生される短鎖脂肪酸および長鎖脂肪酸が、気管平滑筋上に発現する短鎖脂肪酸受容体 FFAR3 や長鎖脂肪酸受容体 FFAR1 を介して気管平滑筋収縮作用をもたらす COPD 症状の悪化に寄与するとの仮説を立て検証した。

2. 研究の目的

気管平滑筋上の短鎖脂肪酸受容体 FFAR3 及び長鎖脂肪酸受容体 FFAR1 を介した COPD 症状増悪機構の解明

- (1) 短鎖脂肪酸による気管平滑筋張力調節機構の解明
- (2) 短鎖脂肪酸受容体 FFAR3 を介した気管収縮作用増強機構の細胞内機序の解明
- (3) 短鎖脂肪酸受容体 FFAR3 を介した気道リモデリング作用の評価
- (4) 長鎖脂肪酸受容体 FFAR1 を介した気道粘液分泌産生機構の細胞内機序の解明

3. 研究の方法

- (1) 短鎖脂肪酸受容体による気管平滑筋張力調節機構の解明

短鎖脂肪酸（プロピオン酸、酢酸、酪酸）がヒト気管平滑筋の等尺性張力を調節するかを評価するため、肺移植ドナーより採取したヒト気管リングを organ bath に浸漬し、短鎖脂肪酸を投与した際の張力変化を測定した(ex vivo)。また、短鎖脂肪酸がアセチルコリン誘発性の気管平滑筋収縮作用を増強させるか、cAMP 刺激薬（フォルスコリン）やアドレナリンβ刺激薬（イソプロテノール）投与により生じる気管平滑筋弛緩作用を阻害するかについても評価した。

さらに、短鎖脂肪酸がヒト気管平滑筋細胞の張力を調節するかについて、ストレスファイバー形成を指標に F/G actin 比で評価した(in vivo)。

- (2) 短鎖脂肪酸受容体 FFAR3 を介した気管収縮作用増強機構の細胞内機序の解明

FFAR3 受容体が属する G_{i/o} 蛋白共役型受容体を介した気管平滑筋収縮作用は、細胞内 Ca²⁺濃度上昇作用と cAMP 産生抑制シグナルを介して生じる。そこで、短鎖脂肪酸がヒト気管平滑筋

細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させるかについて、蛍光 Ca^{2+} インジケータ (Fluo-4AM) を負荷したヒト気管平滑筋細胞の蛍光強度変化を多機能プレートリーダー (Appliskan) で測定した。また、短鎖脂肪酸がアセチルコリン誘発性の気管平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用をさらに増強させるかについても評価した。さらに、その作用が $G_{i/o}$ 蛋白阻害剤 (百日咳毒素; 100 ng/ml, 240 min)、 $G_{\beta\gamma}$ シグナリング阻害剤 (Gallein; 10 μ M, 30 min)、PLC 阻害剤 (U73122; 5 μ M, 30 min)、 IP_3 受容体拮抗薬 (Xestospongin C; 20 μ M, 30 min) の前投与により阻害されるかについても検討した。

次に、短鎖脂肪酸がヒト気管平滑筋細胞における cAMP 産生を抑制させるかについて、cAMP ELISA kit (HitHunter cAMP assay kit) を用いて多機能プレートリーダー (Appliskan) で測定した。またその作用が、百日咳毒素 (100 ng/ml, 240 min) や HDAC 阻害剤 (Trichostatin A; 10 μ M, 15 min)、FFAR2 受容体拮抗薬 (CATPB) の前投与により抑制されるか、siRNA による短鎖脂肪酸受容体群 (FFAR2、FFAR3 受容体) あるいは短鎖脂肪酸を検知するとされる嗅覚受容体 OE51E2 の knockdown により阻害されるかについても検討した。

(3) 短鎖脂肪酸受容体 FFAR3 を介した気道リモデリング作用の評価

短鎖脂肪酸がヒト気管平滑筋の細胞増殖促進作用を有するかについて、気管平滑筋細胞増殖に関与する ERK, Akt のリン酸化シグナルを中心に Western blot 法で検討した。

(4) 長鎖脂肪酸受容体 FFAR1 を介した気道粘液分泌産生機構の細胞内機序の解明

単離したモルモット気管に長鎖脂肪酸 (オレイン酸) または選択的 FFAR1 作動薬 (GW9508) を 24 時間投与した際に、気管上皮における気道粘液 (ムチン) 産生が増加するかについて PAS 染色で評価した。またヒト気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) へのオレイン酸あるいは GW9508 の投与により *MUC5AC* の遺伝子発現量が増加するか、またその作用が $G_{q/11}$ 蛋白阻害剤 (YM-254890)、 $G_{i/o}$ 蛋白阻害剤 (百日咳毒素)、MEK 阻害剤 (U0126; 5 μ M, 120 min) の前投与により抑制されるかについて RT-qPCR 法で評価した。

次に、NCI-H292 細胞へのオレイン酸の投与により、粘液分泌機構に関わる Akt、ERK、CREB がリン酸化されるかについて Western blot 法で評価した。またその作用が YM-254890、百日咳毒素、U0126 の前投与により抑制されるかについても検討した。

4. 研究成果

(1) 短鎖脂肪酸による気管平滑筋張力調節機構の解明

短鎖脂肪酸 (プロピオン酸) 自体はヒト気管平滑筋の張力を変化させなかったものの、アセチルコリン誘発性のヒト気管収縮作用を有意に増強させた。一方、プロピオン酸はフォルスコリンやイソプロテレノールにより生じる気管平滑筋弛緩作用には影響を与えなかった。

一方、ヒト気管平滑筋細胞のストレスファイバー形成作用については、短鎖脂肪酸投与自体でも有意に形成が促進された。またアセチルコリン誘発性のストレスファイバー形成作用も短鎖脂肪酸の同時投与により増強された。

以上より、短鎖脂肪酸は気管平滑筋収縮作用を増強させることが明らかになった。

(2) 短鎖脂肪酸受容体 FFAR3 を介した気管収縮作用増強機構の細胞内機序の解明

1. 細胞内 Ca^{2+} シグナリング

短鎖脂肪酸をヒト気管平滑筋細胞に投与したところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度が有意に上昇した。またこの上昇作用は百日咳毒素、Gallein、U73122、Xestospongin C の前投与により有意に阻害された。また短鎖脂肪酸はアセチルコリン誘発性の気管平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用を増強させ、この増強作用は $G_{i/o}$ 蛋白阻害剤の前投与により有意に阻害された。

以上よりこの作用は $G_{i/o}$ 蛋白 $G_{\beta\gamma}$ サブユニット — PLC — IP_3 受容体経路を介して筋小胞

体から Ca^{2+} を放出させることで生じることが示唆された。

2. cAMP シグナリング

フォルスコリン投与により生じるヒト気管平滑筋細胞における cAMP 産生作用は、短鎖脂肪酸投与により有意に抑制された。またこの抑制作用は、百日咳毒素の前投与により有意に抑制されたものの、Trichostatin A や CATPB の前投与では抑制されなかった。さらにこの抑制作用は、FFAR3 の knockdown により有意に抑制されたが、FFAR2 または OE51E2 の knockdown では抑制されなかった。

以上より、短鎖脂肪酸は FFAR3 受容体を介して cAMP 産生を抑制し、気管平滑筋収縮に寄与することが示唆された。

(3) 短鎖脂肪酸受容体 FFAR3 を介した気道リモデリング作用の評価

ヒト気管平滑筋細胞への短鎖脂肪酸（プロピオン酸； 10 mM）投与は ERK, Akt のリン酸化をもたらさなかった。

以上より、短鎖脂肪酸は気管平滑筋細胞増殖作用を呈しない可能性が示唆された。

(4) 長鎖脂肪酸受容体 FFAR1 を介した気道粘液分泌産生機構の細胞内機序の解明

モルモット気管への長鎖脂肪酸（オレイン酸）または選択的 FFAR1 作動薬 (GW9508) の投与により、気管上皮における気道粘液（ムチン）の産生が増加した。また、ヒト気道上皮細胞 (NCI-H292 細胞) へのオレイン酸あるいは GW9508 の投与により MUC5AC の遺伝子発現量が増加し、この遺伝子発現増強作用は $G_{q/11}$ 蛋白阻害剤 (YM-254890)、 $G_{i/o}$ 蛋白阻害剤（百日咳毒素）、MEK 阻害剤 (U0126) の前投与により有意に抑制された。さらに、NCI-H292 細胞へのオレイン酸の投与により ERK、CREB がリン酸化されたのに対し、Akt のリン酸化は認められなかった。オレイン酸投与による ERK リン酸化は YM-254890、百日咳毒素の前投与により有意に抑制され、CREB リン酸化は U0126 の前投与により有意に抑制された。

以上より、長鎖脂肪酸による気道粘液分泌作用は、 $G_{q/11}$ 及び $G_{i/o}$ 蛋白に共役した FFAR1 受容体が刺激されることで MEK-ERK-CREB 経路を介して MUC5AC 産生が促進される可能性が示唆された。

(研究成果のまとめ)

短鎖脂肪酸および長鎖脂肪酸が、気管平滑筋上に発現する短鎖脂肪酸受容体 FFAR3 や長鎖脂肪酸受容体 FFAR1 を介して気管平滑筋収縮作用をもたらすことが明らかとなった。短鎖・長鎖脂肪酸は COPD をはじめとする慢性閉塞性肺疾患の病態形成に寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizuta Kentaro, Sasaki Haruka, Zhang Yi, Matoba Atsuko, Emala Charles W.	4. 巻 318
2. 論文標題 The short-chain free fatty acid receptor FFAR3 is expressed and potentiates contraction in human airway smooth muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology	6. 最初と最後の頁 L1248 ~ L1260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00357.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hoshijima Hiroshi, Takeuchi Risa, Kikuchi Kimiharu, Mizuta Kentaro	4. 巻 34
2. 論文標題 Anesthetic management in MAO-A and MAO-B deficiency: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 773 ~ 776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02808-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuta K, Matoba A, Shibata S, Masaki E, Emala CW Sr.	4. 巻 55(1)
2. 論文標題 Obesity-induced asthma: Role of free fatty acid receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Jpn Dent Sci Rev	6. 最初と最後の頁 103-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2019.07.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nao Matsuyama, Sumire Shibata, Atsuko Matoba, Tada-aki Kudo, Jennifer Danielsson, Atsushi Kohjitani, Eiji Masaki, Charles W. Emala, Kentaro Mizuta	4. 巻 19
2. 論文標題 The dopamine D1 receptor is expressed and induces CREB phosphorylation and MUC5AC expression in human airway epithelium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-018-0757-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Haruka Sasaki, Charles W. Emala, Kentaro Mizuta
2. 発表標題 The Melatonin Receptors MT1 and MT2 Are Expressed and Modulate Cell Signaling in Human Airway Smooth Muscle
3. 学会等名 American Thoracic Society Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 志典, 水田 健太郎
2. 発表標題 ヒスチジン脱炭酸酵素レポーターマウスを用いた新規ヒスタミン産生細胞の同定
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水田健太郎
2. 発表標題 生体情報モニタリングとCrew Resource Management
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sumire Shibata, Charles W. Emala, Mizuta Kentaro
2. 発表標題 The Free Fatty Acid Receptor 1 is Expressed and Induces MUC5AC Expression and CREB Phosphorylation in Human Airway Epithelium
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 晴香, 的場 あつ子, 水田 文子, 水田 健太郎
2. 発表標題 短鎖脂肪酸によるヒト気管平滑筋収縮作用の細胞内シグナリング機構
3. 学会等名 第47回日本歯科麻酔学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 明子, 水田 健太郎
2. 発表標題 未来の歯科麻酔学研究 AIによる自動鎮静システムの開発
3. 学会等名 第47回日本歯科麻酔学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水田 健太郎
2. 発表標題 歯科麻酔科医と歯科治療 ~若手歯科麻酔科医は麻酔科学の研鑽に注力すべきである~
3. 学会等名 第47回日本歯科麻酔学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水田 健太郎
2. 発表標題 顎変形症治療のトラブルシューティング ~歯科麻酔科医の立場から~
3. 学会等名 第29回日本顎変形症学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 的場 あつ子、柴田 董、正木 英二、水田 健太郎
2. 発表標題 遊離脂肪酸受容体FFAR4はMEK/ERK及びPI3K/Akt経路を介してヒト気管平滑筋細胞を増殖させる
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田 董、水田 健太郎、正木 英二
2. 発表標題 気管上皮における長鎖脂肪酸受容体FFAR1の発現とMUC5AC分泌機構
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sumire Shibata, Atsuko Matoba, Kentaro Mizuta
2. 発表標題 The free fatty acid receptor 1 is expressed and induces ERK and CREB phosphorylation and MUC5AC expression in human airway epithelium
3. 学会等名 IFDAS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kentaro Mizuta
2. 発表標題 Should general anesthesia be avoided in the elderly dental patients?
3. 学会等名 IFDAS 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kentaro Mizuta
2. 発表標題 Obesity-induced asthma: Role of free fatty acid receptors
3. 学会等名 China-Japan Dental Science Symposium 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 福島和昭 監修	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 614
3. 書名 歯科麻酔学 第8版	

1. 著者名 丹羽 均、入舩 正浩、小長谷 光、澁谷 徹 他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 272
3. 書名 第6版 臨床歯科麻酔学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

米国	コロンビア大学医学部麻酔科学 講座			
----	----------------------	--	--	--