

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689072

研究課題名(和文)肥満による気管支喘息誘発機序の解明と特異的治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of obesity-induced asthma

研究代表者

水田 健太郎(Mizuta, Kentaro)

東北大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40455796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は気管支喘息の主要なリスク因子であるがその機序は不明であった。本研究は、 ω -6脂肪酸が肥満と気管支喘息を繋ぐ鍵分子であるとの仮説を基に、長鎖遊離脂肪酸受容体(FFAR1, FFAR4)の気管平滑筋上での発現、及びその気管平滑筋収縮作用と気道リモデリング作用について検討した。その結果、気管平滑筋上における長鎖遊離脂肪酸受容体群の発現が同定された。また ω -6脂肪酸は、気管平滑筋収縮を促進させること、また気道リモデリングを促進することが明らかとなった。これらの結果は ω -6長鎖遊離脂肪酸が肥満者に特異的な気管支喘息誘発因子であることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Obesity is one of the major risk factors for asthma. Previous studies have demonstrated that free fatty acid levels are elevated in the plasma of obese individuals. Recently, medium- and long-chain free fatty acids have been reported to act as endogenous ligands for the free fatty acid receptors (FFAR1 and FFAR4). We investigated whether FFAR1 and FFAR4 are expressed on airway smooth muscle, modulate airway smooth muscle tone, and induce airway remodeling. We detected the expression of FFAR1 and FFAR4 in airway smooth muscle. The long-chain free fatty acids potentiated airway contraction and remodeling. These results suggest that functional FFAR1 and FFAR4 are expressed in airway smooth muscle. These free fatty acid sensors expressed on airway smooth muscle could be an important regulator of airway smooth muscle tone and airway remodeling.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：気管支喘息 肥満 遊離脂肪酸 受容体

1. 研究開始当初の背景

近年、飽食と運動不足を背景に、肥満者が世界的に急増している。肥満者の周術期麻酔管理上の問題点として、気管支喘息の併発による呼吸管理の困難性が挙げられる。年齢を問わず、肥満者は周術期に気管支喘息発作を発症しやすいことは古くから知られていたが、近年の疫学的知見の集積により、肥満患者やメタボリック症候群患者の気管支喘息有病率は、正常者に比べて数倍高いことが明らかになっている。しかし、肥満が気管支喘息を発症させるメカニズムについては、確たる証左が得られておらず、基礎医学的知見が欠落している。

肥満患者の気管支喘息は難治性であり、既存の治療薬や麻酔薬に抵抗性を示す。肥満患者を手術前に減量させ、周術期の気管支喘息発作発症リスクを低減することも理論上は可能であるが、手術の緊急性を考慮すると非現実的であるため、肥満者の気管支喘息に対し、特異的に治療効果を発揮する気管支喘息治療薬の登場が切望されている。

肥満者では、脂肪分解により脂肪組織から放出された遊離脂肪酸が、血中に過剰に存在する。近年、遊離脂肪酸をリガンドとする4種のG蛋白共役型受容体(FFAR1-4)が同定された。遊離脂肪酸受容体は $G_{q/11}$ 、または $G_{i/o}$ 蛋白共役型受容体群に属すが、気管支喘息の主病態である気管平滑筋収縮、並びに気道リモデリングは、これら $G_{q/11}$ 、 $G_{i/o}$ 蛋白共役型受容体を介して生じる。つまり、肥満者における血中の過剰な遊離脂肪酸が、気管平滑筋上の遊離脂肪酸受容体を介して、気管平滑筋収縮作用や気道リモデリングをもたらす可能性を示唆している。

一方、肥満は全身性に軽度の慢性炎症をもたらす。中でも ω -6長鎖遊離脂肪酸は悪玉アディポカインとして振る舞い、慢性炎症形成に寄与する。これは、遊離脂肪酸が気道の慢性炎症を介して気道リモデリングを誘発する可能性を示唆している。

本研究は、気道に遊離脂肪酸受容体群が発現しているか、また遊離脂肪酸が遊離脂肪酸受容体を介して気管平滑筋収縮作用や気道リモデリング促進作用をもたらすか検討することで、肥満者における気管支

喘息機構を解明し、さらに特異的治療法を確立することを目的として行った。

2. 研究の目的

遊離脂肪酸を介した気管支喘息誘発機構の解明。

- (1) 遊離脂肪酸受容体の気管平滑筋上での発現の検索
- (2) 遊離脂肪酸受容体を介した気管平滑筋収縮機構の解明
- (3) 遊離脂肪酸受容体を介した気道リモデリング機構の解明

3. 研究の方法

(1) 遊離脂肪酸受容体の気管平滑筋上での発現の検索

各種遊離脂肪酸受容体の気管平滑筋上での発現を、RT-PCR法、Western blot法、免疫組織化学染色にて確認した。サンプルには、ヒト気管平滑筋細胞/組織、モルモット気管平滑筋組織を用いた。

(2) 遊離脂肪酸受容体を介した気管平滑筋収縮機構の解明

気管平滑筋収縮は、 $G_{q/11}$ 、 $G_{i/o}$ 蛋白共役型受容体を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により生じる。そこで、長鎖遊離脂肪酸(オレイン酸、リノール酸)、FFAR1受容体作動薬(GW9508)及びFFAR4受容体作動薬(TUG-891)投与により、ヒト気管平滑筋細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するか、 IP_3 生成量が増加するかを、 Ca^{2+} イメージング法及びカラムクロマトグラフィで測定した。またオレイン酸、リノール酸、GW9508、TUG-891投与によるモルモット気管平滑筋収縮作用の有無を、オーガンバス法を用いて測定し比較検討した。

(3) 遊離脂肪酸受容体を介した気道リモデリング機構の解明

気道リモデリングの主体である気管平滑筋細胞の増殖作用は、気管平滑筋細胞でのERK、Aktのリン酸化を介して生じる。

そこで、長鎖遊離脂肪酸及びFFAR1受容体作動薬投与によるヒト気管平滑筋細胞増殖作用を、BrdU細胞増殖アッセイで評価した。オレイン酸または選択的FFAR1刺激薬(GW9508)投与によるAkt、ERK、p70S6K、S6のリン酸化はWestern blot法で評価した。またこれらのリン酸化が、siRNAによるFFAR1受容体またはFFAR4受容体のノック

クダウン、G_i 蛋白阻害薬 (百日咳毒素; 100 ng/ml, 240 min) Src 阻害薬 (PP1; 10 μM, 60 min) G サブユニットシグナリング阻害薬 (gallein; 10 μM, 60 min) PI3K 阻害薬 (LY294002; 3 μM, 60 min) MEK 阻害薬 (U0126; 5 μM, 120 min) mTOR 阻害薬 (rapamycin; 1 μM, 60 min) の前投与により阻害されるかを Western blot 法で評価した。

4. 研究成果

(1) 遊離脂肪酸受容体の気管平滑筋上での発現

RT-PCR 法により、気管平滑筋における遊離脂肪酸受容体 FFAR1, 2, 3, 4 の mRNA レベルでの発現を確認した。このうち、FFAR4 また、Western blot 法により、ヒト気管平滑筋組織・細胞、モルモット気管平滑筋組織における FFAR1 及び FFAR4(GPR120) 受容体の蛋白レベルでの発現を確認した。さらに免疫組織科学染色により、ヒト気管平滑筋組織及びモルモット気管平滑筋組織における FFAR1 及び FFAR4 受容体の蛋白レベルでの発現を確認した (図 1)。

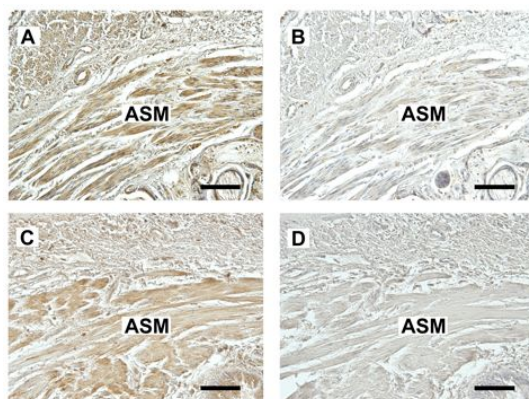


図 1 . ヒト気管平滑筋 (ASM) における長鎖遊離脂肪酸受容体の発現

(A, C) ヒト気管平滑筋における FFAR1 受容体 (A), FFAR4 受容体 (C) の発現 (褐色)

(B, D) Isotype negative control

Scale bar: 100 μm

(2) 遊離脂肪酸受容体を介した気管平滑筋収縮機構の解明

FFAR1 受容体の天然リガンドである長鎖脂肪酸 (オレイン酸、リノール酸)、FFAR1 選択的作動薬 (GW9508)、FFAR4 選択的作動薬

(TUG-891) 投与により、ヒト気管平滑筋細胞内 Ca²⁺ 濃度が一過性に上昇した。またこれらの反応は用量依存性に増加した (図 2)。

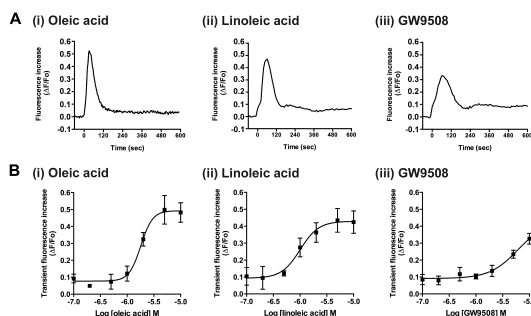


図 2 . (i) オレイン酸、(ii) リノール酸、(iii) GW9508 によるヒト気管平滑筋細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇作用 . (A) 典型波形、(B) 用量反応曲線。

オレイン酸、リノール酸により生じる細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇作用は、siRNA による FFAR1 または FFAR4 のノックダウン、ホスホリパーゼ C 阻害剤 (U73122; 5 μM)、IP₃ 受容体拮抗薬 (Xestospongin C; 20 μM) 投与により遮断されたのに対し、リアノジン受容体拮抗薬 (ryanodine; 100 μM) G_i 蛋白阻害剤 (百日咳毒素; 100 ng/ml) では遮断されなかった。さらに、ヒト気管平滑筋細胞にオレイン酸、リノール酸、GW9508 を投与すると、IP₃ 生成が有意に増加した。しかしその合成量は、気管平滑筋に作用する既知の Gq 蛋白共役型受容体作動薬 (bradykinin, acetylcholine, histamine) により生じる IP₃ 合成量より少なかった。

アセチルコリンにより生じるモルモット気管輪収縮作用は、オレイン酸、リノール酸、または GW9508 の投与により有意に増強された (図 3) のに対し、TUG-891 の投与では増強されなかった。同様に、ヒト気管平滑筋細胞へのオレイン酸、リノール酸、または GW9508 の投与により、アクチンストレスファイバーの形成が生じたのに対し、TUG-891 の投与では生じなかった。

さらに、オレイン酸、リノール酸を投与した場合、イソプロテレノール誘発性のモルモット気管平滑筋弛緩作用は有意に減弱した。

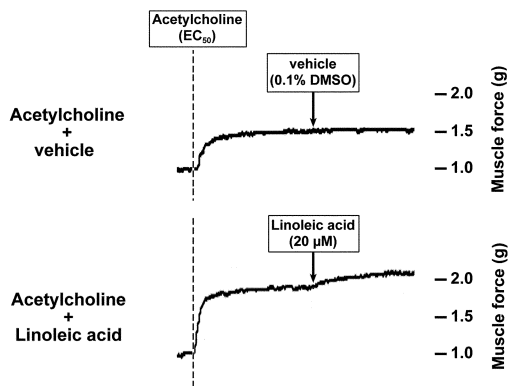


図3 . リノール酸投与によるモルモット気管平滑筋収縮増強作用

以上の結果は気管平滑筋上の FFAR1 受容体が G_q 蛋白及びホスホリパーゼ C を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度及び IP_3 合成量を増加させ、気管収縮をもたらす可能性を示唆するものである。一方、FFAR4 は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用をもたらすものの、気管平滑筋収縮には関与しないことが示唆された。

(3) 遊離脂肪酸受容体を介した気道リモデリング機構の解明

オレイン酸またはGW9508の投与により、ヒト気管平滑筋細胞の増殖が促進され、LY294002またはU0126の前投与で有意に抑制された(図4)。

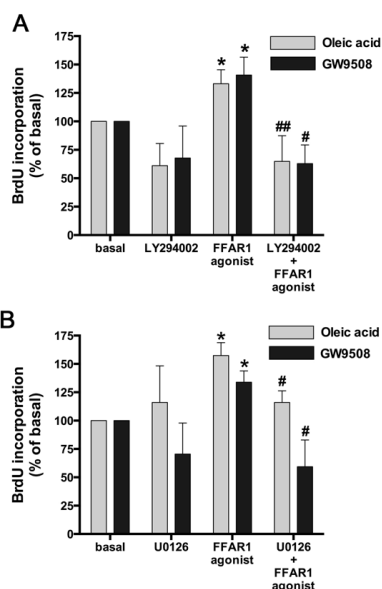


図4 . オレイン酸、GW9508によるヒト気管平滑筋細胞増殖促進作用とPI3K阻害薬(LY294002)、MEK阻害薬(U0126)による抑制。

また、オレイン酸、リノール酸またはGW9508の投与により、ERK、Akt、p70S6Kのリン酸化が生じた。オレイン酸によるERK及びAktのリン酸化は、FFAR1受容体のノックダウンにより有意に抑制されたのに対し、FFAR4受容体のノックダウンによる影響を受けなかった。

オレイン酸投与により生じるAktリン酸化は、百日咳毒素、PP1、LY294002の前投与で有意に抑制されたのに対し、ERKリン酸化は百日咳毒素、gallein、U0126の前投与により有意に抑制された。オレイン酸によるp70S6K及びS6のリン酸化はLY294002、U0126、rapamycinの前投与により有意に抑制された。

以上の結果は、FFAR1を介した気管平滑筋細胞増殖作用とp70S6Kリン酸化は、 G_i -Src-PI3K/Akt及び G_i -G -MEK/ERK経路を介して生じることを示唆している。これらの知見は、FFAR1受容体が気道リモデリングに重要な役割を果たすことを示唆するものである。

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1件)

Mizuta K, Zhang Y, Xu D, Mizuta F, D' Ovidio F, Masaki E, Emala CW. The dopamine D1 receptor is expressed and facilitates relaxation in airway smooth muscle. *Respir. Res.* 14: 89, 2013. (査読有)
DOI: 10.1186/1465-9921-14-89

〔学会発表〕(計15件)

的場 あつ子、滝口 晃嗣、正木 英二、水田 健太郎

遊離脂肪酸受容体 FFAR1 を介した気道リモデリング作用における細胞内シグナリング機構の解析

第42回日本歯科麻酔学会学術集会
平成26年10月11日 新潟市

山本 奈央、水田 健太郎、星島 宏、正木 英二

脊髄性筋萎縮症 型患者の全身麻酔経験
第42回日本歯科麻酔学会学術集会
平成26年10月11日 新潟市

水田 健太郎

気管平滑筋における遊離脂肪酸受容体
FFAR1 の発現と気管収縮促進作用
第 5 4 回日本呼吸器学会学術講演会
平成 2 6 年 4 月 2 6 日 大阪市

水田 健太郎

口腔顔面領域における自律神経の役割～
三叉神経-自律神経反射を中心に～
国際先進学際歯科学会アジア部会第 6 回
学術大会 (招待講演)
平成 2 6 年 3 月 2 2 日 札幌市

水田 健太郎

GABA 受容体を介した気管支喘息抑制機構
第 1 2 回口腔医学科学フロンティア (招待講
演)
平成 2 6 年 3 月 9 日 東京都

Mizuta K, Zhang Y, Xu D, Mizuta F,
Masaki E, Emala CW.

Free fatty acid receptor 1 is expressed
and potentiates contraction in airway
smooth muscle.
American Society of Anesthesiologists
Annual Meeting 2013
平成 2 5 年 1 0 月 1 2 日 サンフランシ
スコ市 (米国)

水田 健太郎、水田 文子、正木 英二
遊離脂肪酸受容体 FFAR1 を介した気管平
滑筋収縮促進作用
第 4 1 回日本歯科麻酔学会学術集会
平成 2 5 年 1 0 月 3 日 横浜市

水田 健太郎、工藤 忠明

遊離脂肪酸は気管平滑筋上の遊離脂肪酸
受容体 FFAR1 を介して気管収縮を促進さ
せる
第 5 5 回歯科基礎医学会学術大会
平成 2 5 年 9 月 2 2 日 岡山市

水田 健太郎、水田 文子、正木 英二
気管平滑筋における遊離脂肪酸受容体
FFAR1 の発現とその役割
日本麻酔科学会第 6 0 回学術集会
平成 2 5 年 5 月 2 3 日 札幌市

Chang H-Y, Funayama H, Mizuta K, Emala
CW, Gallos G.

Anti-proliferative effects of the
neurokinin 1 receptor in human airway
smooth muscle cells
American Thoracic Society 2013
International Conference
平成 2 5 年 5 月 1 9 日 フィラデルフィア
市 (米国)

Goto A, Mizuta K, Danielsson J, Mizuta
F, Masaki E, Emala CW.

The Dopamine D₁ receptor is expressed
and stimulates cyclic AMP production in
airway epithelium.
American Society of Anesthesiologists
Annual Meeting 2012
平成 2 4 年 1 0 月 1 5 日 ワシントン DC
(米国)

水田 健太郎、後藤 阿裕美、正木 英二
気管平滑筋における遊離脂肪酸受容体
FFAR1 の発現と気道リモデリング促進作
用
第 4 0 回 日本歯科麻酔学会学術集会
平成 2 4 年 1 0 月 6 日 福岡市

後藤 阿裕美、正木 英二、水田 健太郎
気管上皮におけるドーパミン D1 受容体の
発現と MUC5AC 遺伝子発現促進作用
第 4 0 回 日本歯科麻酔学会学術集会
平成 2 4 年 1 0 月 6 日 福岡市

Mizuta K, Zhang Y, Xu D, Mizuta F,
Masaki E, Emala CW.

Dopamine D1 receptor-mediated airway
smooth muscle relaxation is mediated
via a cyclic AMP pathway
Euroanaesthesia 2012
2012 年 6 月 10 日 パリ市 (フランス)

後藤 阿裕美、Charles W. Emala、正木 英二、水田 健太郎
気管上皮におけるドーパミン D1 受容体の
発現と CFTR 活性化作用
第 5 9 回 日本麻酔科学会学術集会
平成 2 4 年 6 月 7 日 神戸市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

水田 健太郎 (MIZUTA, Kentaro)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40455796