

令和 2 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：2017～2019

課題番号：17K11893

研究課題名(和文)腸内細菌叢による神経障害性疼痛制御機構の解明と革新的治療法の開発

研究課題名(英文)Control of neuropathic pain and development of innovative therapy by intestinal bacterial flora

研究代表者

的場 あつ子(青井あつ子)(MATOBA, ATSUKO)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：70547257

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文): 腸内細菌叢によって産生された短鎖脂肪酸(プロピオン酸・酢酸・酪酸等)は短鎖脂肪酸受容体FFAR2およびFFAR3に作用する。神経節にはFFAR3が発現しており、神経活動を制御している可能性がある。短鎖脂肪酸は、(1)作用時間によって反応に違いが生じ、(2)細胞内カルシウムイオン濃度を一過性に増加させ、(3)cAMPの産生を抑制していることが明らかとなった。

以上より、短鎖脂肪酸はFFARを介して神経活動を制御している可能性が高まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛の患者数は全世界で7,000万人を数える。しかし未だに有効な治療法が確立されていないために、臨床症状が慢性化することが多く、症状の寛解を得ないままに漫然と薬剤の投与を受けているのが現状である。この既存の治療法では患者の満足が得られないばかりか、医療費の無駄遣いの問題が生じる。これに対し本研究は『生体内』に常在する腸内細菌叢を利用して神経障害性疼痛を治療しようとする手法であり、安価で副作用も少ないと考えられる。

また本研究は、口腔顔面領域の神経障害性疼痛の治療のみならず、がん性疼痛、糖尿病神経障害、帯状疱疹後神経痛などの他部位の神経障害性疼痛に対する治療法としても広く応用出来る。

研究成果の概要(英文): The gut microbiota-derived short-chain free fatty acids (propionate, acetate, and butyrate) affect short-chain free fatty acid receptor (FFAR2 and FFAR3). There is a possibility that FFAR3 expressed in ganglion control neural activity. We have demonstrated about short-chain free fatty acid (1) a reaction varies according to action time, (2) transient increase of Ca²⁺ concentration in the cell, and (3) control of cAMP production.

These results suggest that short-chain free fatty acid control neural activity through short-chain free fatty acid receptor.

研究分野：医歯薬学

キーワード：短鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛治療の現状と課題：神経障害性疼痛 (neuropathic pain) は、痛覚神経系の損傷により発症する難治性の慢性痛である。その原因は口腔外科手術時の三叉神経側枝の偶発的損傷、末期がん、抗がん剤の副作用、糖尿病、帯状疱疹後など多岐にわたる。この疼痛には生体警告系としての役割はなく、慢性化する堪え難い痛みから患者の QOL は著しく低下する。

しかし、その疼痛発症機構には不明な点が多く、既存の鎮痛薬などによる薬物療法や神経ブロック療法も奏功し難い。その発症機構の解明と革新的な治療法の登場が切望されている。

腸内細菌叢による中枢神経系の制御：「腸」と「脳」は、共通の情報伝達物質と受容体を介して双方向的なネットワークである腸脳相関 (Gut-brain axis) を形成する。

近年のマイクロバイーム解析の進歩により、腸内細菌叢が自閉症やうつ病をはじめとする宿主の情動変化に深く関わること、すなわち腸内細菌叢が第二の脳として宿主の中枢神経系を制御することが明らかにされ注目を集めている。

神経障害性疼痛と腸内細菌叢との相関性：

(1) 腸内細菌叢の多様性低下 (図 1)：

慢性痛を抱える患者では腸内細菌叢の多様性が低下する。逆に、腸内細菌叢の多様性低下により正常な疼痛感覚の受容が障害される。

この双方向性の腸脳相関の悪循環は、神経障害性疼痛の病態形成及び慢性化に寄与すると考えられる。

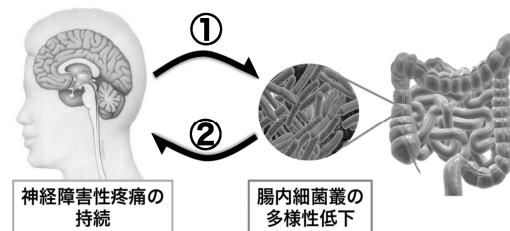


図 1. 双方向性の腸脳相関による神経障害性疼痛の慢性化機序 (仮説)

(2) ミクログリアの関与：

- 神経障害性疼痛は、神経損傷刺激により脊髄 / 延髄のミクログリアの形態が活性化型に変化して、脳由来神経栄養因子 (BDNF) を多量に産生放出することで生じる (図 2)。

- 腸内細菌叢の多様性低下は、ミクログリアの形態変化をもたらすだけでなく、その数も増加させる。

すなわち、腸内細菌叢の多様性が低下すると活性化型ミクログリアが増加し、神経障害性疼痛が増悪すると考えられる。

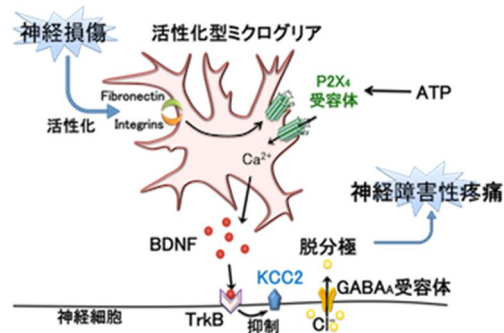


図 2. ミクログリアを介した神経障害性疼痛発症機序

(3) 短鎖脂肪酸の関与：

腸内細菌は食物繊維を発酵することで短鎖脂肪酸 (酢酸、プロピオン酸、酪酸) を産生する。これらの脂肪酸は腸管から吸収され血行を介して神経節に発現する短鎖脂肪酸受容体 (FFAR3) に作用し、神経活動を制御する。すなわち、短鎖脂肪酸産生菌が豊富に存在する腸内環境に改変することで、神経障害性疼痛により生じる異常な神経活動を抑制できると考えられる。

本研究は、腸内細菌叢による神経障害性疼痛の病態修飾機構を解明し、腸内細菌叢を利用した神経障害性疼痛の革新的治療法の技術基盤を確立するものである。

2. 研究の目的

腸内細菌叢による神経障害性疼痛制御機構の解明

(1) 神経障害性疼痛に対する腸内細菌叢の影響の評価

腸内細菌叢の有無が、三叉神経 / 坐骨神経障害性疼痛の病態に影響を与えるかを検討する。

(2) ミクログリアを介した神経障害性疼痛制御機構の解明

腸内細菌叢の多様性の低下が、三叉神経脊髄路核尾側亜核 / 脊髄後角に存在するミクログリアを活性化させて神経障害性疼痛を増悪させるかを *in vivo*、*in vitro* の両面から検討する。

(3) 神経節上の短鎖脂肪酸受容体を介した神経障害性疼痛制御機構の解明

腸内細菌叢から産生される短鎖脂肪酸が、三叉神経節 / 脊髄後根神経節に発現する短鎖脂肪酸受容体を介して神経障害性疼痛を抑制するかを *in vivo*、*in vitro* の両面から検討する。

腸内細菌を利用した神経障害性疼痛の革新的治療法の開発

(1) 短鎖脂肪酸産生菌の投与 (プロバイオティクス) による神経障害性疼痛抑制作用の評価

短鎖脂肪酸産生能の高い菌種 (Bifidobacterium, Lactobacillus) を経口投与した場合に神経障害性疼痛が抑制されるかを、神経障害性疼痛モデル動物を用いて評価する。

3. 研究の方法

腸内細菌叢による神経障害性疼痛制御機構の解明

(1) 神経障害性疼痛に対する腸内細菌叢の影響の評価

「腸内細菌叢の多様性が、神経障害性疼痛の病態に影響を与えるか」について以下の動物を用いて比較検討する。

《使用動物》

腸内無菌群：無菌ラット (Germ-free: GF ラット)

腸内細菌叢多様性低下群：無菌ラットに既知の3種の常在菌のみを腸管に定着させて作製 (ノトバイオラット)

腸内細菌叢正常群 (対照群)：正常な腸内細菌叢を有する SPF ラット

《神経障害性疼痛モデルの作成と疼痛行動評価 (上記①～③の動物で作成)》

(A) 眼窩下神経の絞扼性神経損傷モデル (三叉神経性の神経障害性疼痛モデル)

(B) 坐骨神経部分損傷モデル (Seltzer モデル; 神経障害性疼痛の標準的モデル)

両モデルとも神経損傷手術後 1～14 日間、機械刺激に対する逃避行動を評価する。

なお、とを用いた実験は、神経損傷モデル作成から行動評価までの一連の実験を別々のピニールアイソレーター飼養・実験システム内で無菌下に行う。

(2) ミクログリアを介した神経障害性疼痛制御機構の解明

上述の3種のラット (、 、) から作成した神経障害性疼痛モデル (A, B) を用い、「腸内細菌叢の多様性低下が、三叉神経脊髄路核尾側亜核 / 脊髄後角でのミクログリアを活性化させ、BDNF の産生を増加させるか」を、免疫組織化学染色と Western blot 法で評価する。

(3) 短鎖脂肪酸受容体を介した神経障害性疼痛制御機構の解明

「腸内細菌が産生した短鎖脂肪酸が、三叉神経節と脊髄後根神経節上の FFAR3 を介して神経障害性疼痛により生じる異常な神経活動を抑制するか」を3種のラット (、 、) から作成した疼痛モデル (A, B) を用いて、以下の方法で評価する。

1. 短鎖脂肪酸の経口投与により、三叉神経脊髄路核尾側亜核 / 脊髄後角での活性化型ミクログリアと BDNF の産生が減少するかを、免疫組織化学染色、Western blot 法で評価する。

2. 短鎖脂肪酸の経口投与による神経障害性疼痛の症状の改善を、疼痛行動評価で解析する。

* さらに FFAR3 の関与を明らかにするため、正常な腸内細菌叢を有する FFAR3 ノックアウトマウス (*Ffar3*^{-/-}) と野生型マウスを用いて上記 1～2 の実験を行う。

腸内細菌を利用した神経障害性疼痛の革新的治療法の開発

本実験では、短鎖脂肪酸を継続的かつ安定的に産生・供給する腸内環境に改変する方法として、「短鎖脂肪酸産生菌の経口投与（プロバイオティクス）が、神経障害性疼痛の症状を抑制するか」を 2 種のラット（、）から作成した疼痛モデル（A, B）で疼痛行動評価する。

特に、短鎖脂肪酸合成能の特に高い菌種（果糖トランスポーターを発現する *Bifidobacterium* など）を経口投与することで、神経障害性疼痛の症状抑制が可能となると考えられる。

4. 研究成果

交付された助成金では無菌下でのラットの飼養・飼育が困難であるため、神経障害性疼痛の研究の予備研究として、腸内細菌叢が食物繊維を発酵して産生する短鎖脂肪酸（プロピオン酸・酢酸・酪酸）が、短鎖脂肪酸受容体（FFAR2 および FFAR3）に対してどのような作用を及ぼすかを検討することとした。

（1）作用時間による短鎖脂肪酸の反応の差異

FFAR3 の存在が明らかとなっている気管平滑筋細胞に対して、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸・酢酸・酪酸を実際に投与した際にどのような変化を起こすかどうかを探索した。短鎖脂肪酸であるプロピオン酸・酢酸・酪酸を投与した際、短時間作用（15分）させた場合と長時間作用（60分）させた場合で、気管のトーンに対して生じる作用が異なったため（図 3, 4）、神経障害性疼痛に対する影響も作用時間によって反応に違いが生じる可能性があることが予測される。

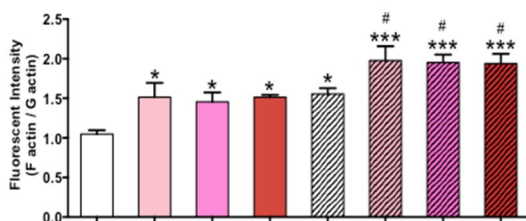


図 3 . 短鎖脂肪酸の短時間投与の影響

短鎖脂肪酸の投与は気管のトーンに影響を及ぼす。
* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ compared with basal. # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ compared with Ach. Data represents mean \pm SEM. $n = 6$.

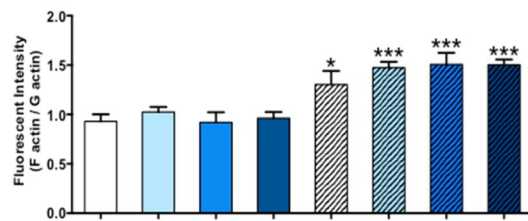


図 4 . 短鎖脂肪酸の長時間投与の影響

短鎖脂肪酸の投与は気管のトーンに影響しない。
* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ compared with basal. Data represent mean \pm SEM. $n = 6$.

（2）細胞内カルシウムイオン濃度を一過性に増加

短鎖脂肪酸を投与すると、細胞内のカルシウムイオン濃度は一過性に増加し、その効果は、 G_i タンパク阻害剤、 G サブユニット阻害剤、 PLC 阻害剤等で抑制されることが明らかとなった。神経障害性疼痛の神経伝達機構には、カルシウムイオンも深く関わっており、阻害剤によってカルシウムイオンの濃度上昇を抑えることができれば、疼痛制御に応用可能と考えられる。

（3）cAMP の産生の制御

短鎖脂肪酸による cAMP 産生抑制作用は FFAR3 の knockdown で有意に遮断されたが、FFAR2 の knockdown 及び FFAR2 の拮抗薬の前投与では変化が認められなかった。それゆえ、短鎖脂肪酸は FFAR3 を介して cAMP の産生を抑制していることが示された。神経節には FFAR3 が発現していることが知られており、短鎖脂肪酸は FFAR3 を介して神経活動を制御している可能性が高まった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 The Japanese dental science review	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 的場あつ子、水田文子、正木英二、水田健太郎
2. 発表標題 短鎖脂肪酸受容体FFAR3を介したヒト気管平滑筋張力制御機構
3. 学会等名 第45回 日本歯科麻酔学会
4. 発表年 2017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
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	正木 英二 (MASAKI EIJI) (40221577)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	削除：2018年3月12日

