

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560376

研究課題名(和文)腸内細菌を利用した気管支喘息新規治療法の開発

研究課題名(英文)Targeting gut microbiota as a novel therapy for asthma

研究代表者

水田 健太郎(MIZUTA, Kentaro)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：40455796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：気管支喘息は近年世界的に有病率が増加傾向にある。その一因として、近年の衛生環境の改善や抗生物質の多用による、腸内細菌叢の多様性の低下が指摘されている(衛生仮説)。本研究は腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸が気管支喘息の病態修飾因子であるとの仮説を基に、気管平滑筋における短鎖脂肪酸受容体の発現、短鎖脂肪酸による気管トーン調節機構、及び気道リモデリング制御機構を検討した。その結果、気管平滑筋における短鎖脂肪酸受容体FFAR3の発現が同定された。また短鎖脂肪酸自体は気道リモデリングを誘発しないものの、cAMP減少シグナルを介して気管平滑筋収縮を増強させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The incidence of asthma has increased greatly over the past decades. Hygiene hypotheses have suggested that the lack of exposure to microbial products in early life or the overuse of antibiotics would be the possible cause of this increase. Gut microbiota produces short-chain fatty acids (SCFAs), which acts on their sensors (FFAR2 and FFAR3 receptor). We investigated whether the receptors for SCFAs are expressed on human airway smooth muscle, modulate airway smooth muscle tone, and induce airway remodeling. We detected the expression of FFAR3 in human airway smooth muscle. SCFAs potentiated airway smooth muscle contraction through inhibition of cAMP, while they did not induce airway remodeling. These results suggest that SCFAs stimulates FFAR3 receptor expressed on human airway smooth muscle, and modulates airway smooth muscle tone.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：気管支喘息 短鎖脂肪酸 FFAR3 腸内細菌

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は、気管平滑筋の収縮による気道狭窄を主病態とする疾患であり、近年世界的に有病率が増加傾向にある。その一因として、近年の衛生環境の改善や抗生物質の多用による、腸内細菌叢の多様性の低下が指摘されている(衛生仮説)。しかし、腸管細菌叢が気管支喘息の病態を修飾する機序については、基礎医学的知見に乏しく、確たる証左が得られていない。

近年、腸内細菌が食物繊維を発酵することで産生される短鎖脂肪酸(酢酸、プロピオン酸、酪酸)が、宿主のエネルギー源として利用されるのみならず、腸管から吸収され、血行を介して遠隔臓器の短鎖脂肪酸受容体(FFAR2, FFAR3)に作用することが明らかとなり、注目を集めている。これらの受容体は、脂質代謝やエネルギー調節のみならず、血管平滑筋を弛緩させ降圧作用を呈することから、新たな創薬標的としても注目されている。しかしこれまで、気管平滑筋における短鎖脂肪酸受容体の発現は明らかにされていなかった。

短鎖脂肪酸受容体のうち、FFAR2(GPR43)はG<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>蛋白共役型受容体に属すのに対し、FFAR3(GPR41)はG<sub>i</sub>蛋白共役型受容体に属する。気管平滑筋上のG<sub>i</sub>蛋白共役型受容体を短時間刺激した場合、アデニル酸シクラーゼ活性の低下/cAMP産生減少シグナルを介して気管平滑筋を収縮させるのに対し、持続刺激時にはアデニル酸シクラーゼ活性のsensitization/cAMP産生増加により気管が弛緩する。以上の知見は、「腸内細菌叢により産生された短鎖脂肪酸が、血行を介して気管平滑筋上の短鎖脂肪酸受容体に作用し、気管平滑筋のトーンを調節する」、すなわち気管支喘息の主症状である気道狭窄を改善/増悪させる可能性を示唆している。

本研究は、気道における短鎖脂肪酸受容体の発現、短鎖脂肪酸受容体を介した気管平滑筋トーン調節機構と気道リモデリング抑制作用を解明することで、腸内細菌と気管支喘息の相関性を探索することを目的として行った。

## 2. 研究の目的

(1) 短鎖脂肪酸受容体 FFAR2, FFAR3 の気管平滑筋上での発現の検索

(2) 短鎖脂肪酸受容体を介した気管平滑筋トーン調節機構の解明

(3) 短鎖脂肪酸受容体を介した気道リモデリング制御機構の解明

## 3. 研究の方法

(1) 短鎖脂肪酸受容体 FFAR2, FFAR3 の気管平滑筋上での発現の検索

短鎖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) 短鎖脂肪酸受容体を介した気管平滑筋トーン調節機構の解明

### cAMPの関与

FFAR3受容体が属するG<sub>i</sub>蛋白共役型受容体群は、短時間刺激時にはアデニル酸シクラーゼ活性の低下/cAMP産生減少シグナルを介して気管平滑筋を収縮させるのに対し、持続刺激時にはアデニル酸シクラーゼ活性のsensitization/cAMP産生増加により気管を弛緩させる。そこで、ヒト気管平滑筋細胞への短鎖脂肪酸ナトリウム塩(酢酸ナトリウム、酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム: 10 mM)を短時間/長時間投与した場合に、forskolin (10 μM) 刺激によるcAMP生成作用が抑制/増強するかをHitHunter cAMP assay kitで評価した。

### 細胞内Ca<sup>2+</sup>の関与

ヒト気管平滑筋細胞への短鎖遊離脂肪酸投与が、アセチルコリン投与により生じる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇作用を増強・抑制させるかを細胞内Ca<sup>2+</sup>イメージング法で評価した。

### 気管トーン調節機構評価 (ex vivo)

アセチルコリン投与により収縮させた肺移植ドナー由来ヒト気管輪が、短鎖脂肪酸の投与により収縮・弛緩するかを、オーガンバス法で解析した(本実験はコロムビア大学にて実施)。

(3) 短鎖脂肪酸受容体を介した気道リモデリング制御機構の解明

気道リモデリングの主体である気管平滑筋細胞の増殖には、ERK, 及び Akt のリン酸化が寄与している。そこで、ヒト気管平滑筋細胞への短鎖脂肪酸投与により ERK, Akt

リン酸化が増強 / 抑制されるかを Western blot 法で検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 短鎖脂肪酸受容体 FFAR2, FFAR3 の気管平滑筋上での発現の検索

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 FFAR3 の蛋白レベルでの発現を確認した (図 1)。さらに免疫組織化学染色により、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 FFAR3 受容体の蛋白レベルでの発現を確認した。一方、FFAR2 は、mRNA の発現は認められたものの、蛋白レベルでの発現は見られなかった。

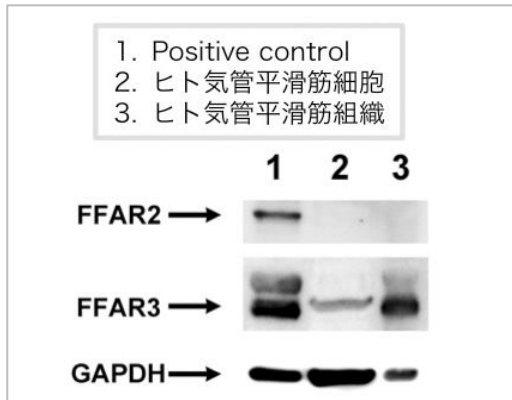


図 1 . 気管平滑筋による FFAR3 の発現 (Western blot)

##### (2) 短鎖脂肪酸受容体を介した気管平滑筋トーン調節機構の解明

###### cAMPの関与

ヒト気管平滑筋細胞への短鎖脂肪酸ナトリウム塩(酢酸ナトリウム、酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム: 10 mM)の短時間投与(15分)により、forskolin(10 μM)によるcAMP生成作用が抑制された。この作用は、siRNAでFFAR3をノックダウンしたヒト気管平滑筋細胞では見られなかったことから、短鎖脂肪酸がFFAR3を介してcAMP産生量を減少させることが明らかになった。一方、短鎖脂肪酸ナトリウム塩の長時間投与(60~120分)では、forskolinによるcAMP生成作用が増強された。

###### 細胞内Ca<sup>2+</sup>の関与

短鎖脂肪酸ナトリウム塩の短時間投与により、アセチルコリン投与により生じる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇作用が増強された。一方、短鎖脂肪酸ナトリウム塩の長時間投与で

は、アセチルコリン投与により生じる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇作用が減弱された (図 2)。

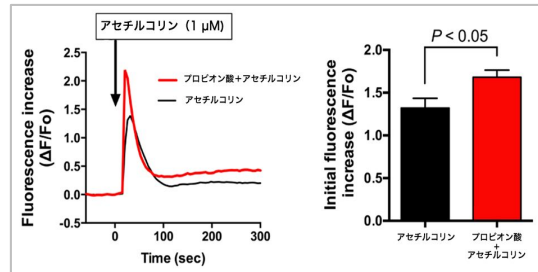


図 2 . プロピオン酸ナトリウムは、アセチルコリンにより生じるヒト気管平滑筋細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇作用を増強させる

###### 気管トーン調節機構評価 (ex vivo)

アセチルコリンによるヒト気管収縮作用は、プロピオン酸ナトリウム(10 mM)の短時間投与(15分)により増強された(図 3)。一方、プロピオン酸ナトリウムの長時間投与(60分)ではアセチルコリンによる気管収縮作用は減弱されなかった。

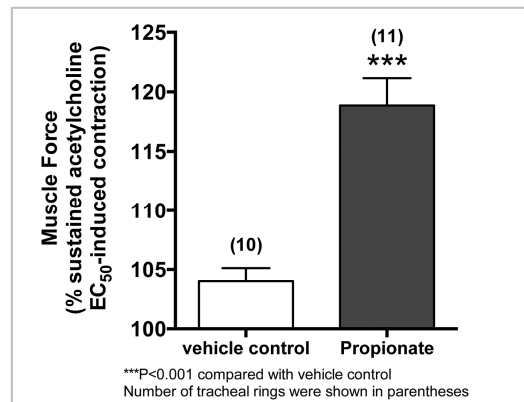


図 3 . プロピオン酸ナトリウムの短時間投与は、アセチルコリンにより生じるヒト気管輪収縮作用を増強させる

これらの結果は、気管平滑筋上の FFAR3 受容体が短時間刺激された場合には、cAMP 減少シグナルを介して気管平滑筋細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させ、気管収縮をもたらすことを示唆するものである。一方、FFAR3 受容体の長時間刺激時には、cAMP 産生増強作用と細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇作用の減弱が認められたにもかかわらず、気管輪の弛緩には寄与していなかった。以上より気管平滑筋における FFAR3 受容体は、もっぱら気管収縮に寄与することが明らかとなった。

(3)短鎖脂肪酸受容体を介した気道リモデリング制御機構の解明

プロピオン酸ナトリウム (10 mM) の短時間投与 (15分) や長時間投与 (60分) では、ERK 及びAktのリン酸化は生じなかった。また、アセチルコリンにより生じるERK, Aktリン酸化も、プロピオン酸ナトリウム (10 mM) の短時間投与 (15分) や長時間投与 (60分) により抑制や増強を受けなかった (図4)。

以上の結果は、FFAR3受容体は気道リモデリングには寄与していないことを示唆するものである。

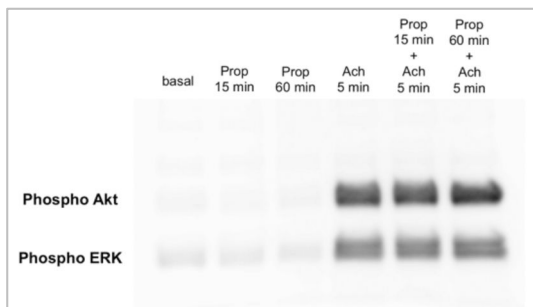


図4 . ヒト気管平滑筋細胞へのプロピオン酸ナトリウムの短時間投与 (15分) 及び長時間投与 (60分) はAkt、ERKリン酸化を変化させない

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3件)

Masaki E, Mizuta K, Ohtani N, Kido K. Early postoperative nociceptive threshold and production of brain-derived neurotrophic factor induced by plantar incision are not influenced with minocycline in a rat: Role of spinal microglia. *Neurosignals*. 24(1): 15-24, 2016. (査読有)  
DOI: 10.1159/000442608

水田 健太郎. 遊離脂肪酸受容体を介した気管支喘息誘発機構. *BIO Clinica* 30(9): 84-87, 2015. (査読無)

Mizuta K, Zhang Y, Mizuta F, Hoshijima H, Shiga T, Masaki E, Emala CW Sr. Novel identification of the free fatty acid receptor FFAR1 that promotes contraction in airway smooth muscle *Am*

*J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 309(9): L970-982, 2015. (査読有)  
DOI: 10.1152/ajplung.00041.2015

〔学会発表〕(計11件)

水田 健太郎

気管支痙攣と麻酔 -受容体と細胞内シグナリングを中心に-

第44回日本歯科麻酔学会学術集会  
平成28年10月29日 札幌市

水田 健太郎、的場 あつ子、松山 奈央、水田 文子、正木 英二

気管平滑筋における短鎖脂肪酸受容体FFAR3の発現と細胞内シグナリング機構

第44回日本歯科麻酔学会学術集会  
平成28年10月29日 札幌市

Kentaro Mizuta, Atsuko Matoba, Nao Matsuyama, Fumiko Mizuta, Eiji Masaki, Charles W. Emala

The short chain free fatty acid receptor FFAR3 is expressed and sensitizes cAMP accumulation in human airway smooth muscle.

The annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2016

平成28年10月23日 シカゴ市 (米国)

的場 あつ子、山本 奈央、堀 綾子、正木 英二、水田 健太郎

ω-3遊離脂肪酸受容体FFAR4を介した気道リモデリング作用

第43回日本歯科麻酔学会学術集会  
平成27年10月31日 東京都

堀 綾子、的場 あつ子、正木 英二、水田 健太郎

オメガ3脂肪酸受容体FFAR4は気管の収縮・弛緩に関与するか?

第43回日本歯科麻酔学会学術集会  
平成27年10月31日 東京都

Kentaro Mizuta, Atsuko Matoba, Ayako Hori, Nao Yamamoto, Eiji Masaki, Charles W. Emala

The free fatty acid receptor 1 promotes

human airway smooth muscle cell proliferation through PI3K/Akt and MEK/ERK activation

The annual meeting of American Society of Anesthesiologists 2015

平成27年10月25日 サンディエゴ市(米国)

水田 健太郎

長鎖遊離脂肪酸受容体 FFAR1 を介した気管平滑筋細胞増殖作用とその細胞内機序

第57回歯科基礎医学会学術大会

平成27年9月13日 新潟市

水田 健太郎、的場 あつ子、水田 文子、堀之内 節、佐藤 港、正木 英二

長鎖遊離脂肪酸受容体による気道リモデリング促進作用の細胞内機序

第62回日本麻酔科学会学術集会

平成27年5月29日 神戸市

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54回日本呼吸器学会学術講演会

平成26年4月26日 大阪市

〔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

(2)研究分担者

正木 英二 (MASAKI, Eiji)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 40221577

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

Charles W. Emala

コロンビア大学・医学部麻酔科学講座・教授