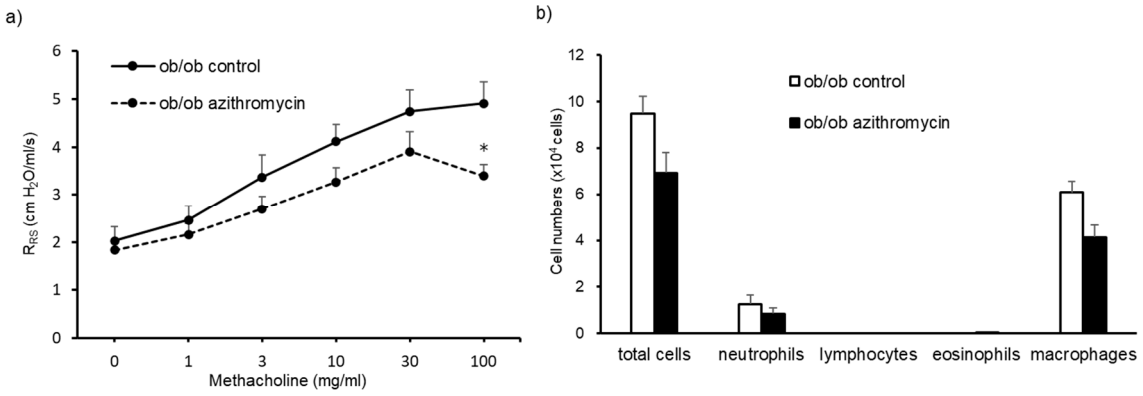
154　酪酸誘導による腸内細菌叢を標的とした肥満喘息の制御	田代　宏樹

【目的】肥満は喘息の難治化因子であり、喘息の発症率の増加にも関与するが、増悪メカニズムは明らかではない。肥満による喘息難治化のメカニズムの一つとして腸内細菌叢が注目されている。細菌が食物繊維を代謝し直接産生する酪酸をはじめとした短鎖脂肪酸は腸内細菌叢と遠隔臓器の状態を制御する重要なメッセンジャーの一つとして注目されている。よって、本研究では腸内細菌自体が遠隔臓器の病態、特に気管支喘息増悪を反映する気道過敏性亢進・気道炎症増悪に関与するメカニズムとしては腸内細菌自体が産生する代謝産物である酪酸に注目し研究を行うこととした。

【方法】BALB/c マウス、C57BL/6J マウス、C57BL/6JHamSlc-ob/ob マウスに無刺激およびオゾン暴露を行い気道過敏性・気管支肺胞洗浄液解析を行った。気管支肺胞洗浄液は細胞数と細胞分画、たんぱく濃度および細胞障害アッセイを行った。アジスロマイシン投与を行い気道過敏性・気道炎症に変化があるか評価を行った。

【結果】Balb/c マウスにオゾンを暴露すると気道過敏性および気管支肺胞洗浄液中の総細胞数・好中球が有意に増加した。さらに総蛋白濃度および細胞障害活性が有意に上昇し、オゾンは気道上皮障害を誘導し気道過敏性・気道炎症を誘導することが分かった。さらに、肥満マウスである ob/ob マウスは C57BL6/J マウスと比較しオゾンによる気道過敏性の有意な上昇を認めたが、気管支肺胞洗浄液中の細胞数の増加は見られず、むしろ低下することが分かった。ob/ob マウスにアジスロマイシンを投与するとオゾンによる気道過敏性亢進は有意に抑制されたが、気管支肺胞洗浄液には差は見られなかった（下図）。

肥満マウスにおけるアジスロマイシンが気道炎症・気道過敏性に与える影響



154. 酪酸誘導による腸内細菌叢を標的とした肥満喘息の制御

田代　宏樹

佐賀大学 医学部附属病院 呼吸器内科

Key words：喘息，肥満，腸内細菌叢，酪酸

緒　言

肥満は喘息の難治化因子であり、喘息の発症率の増加にも関与する。体重減量により喘息症状や気道過敏性・気道炎症が改善することから、肥満は喘息病態の重要な因子である。肥満喘息患者は、好酸球ではなく好中球性気道炎症が優位の表現型を呈し、ステロイド抵抗性を示す［1］。結果として増悪による予定外の受診や入院率が増加するが［2］、現時点では減量以外にエビデンスがある治療法は確立されていない。従って、肥満が喘息難治化を生じるメカニズムを解明する事は、新規治療標的の発見につながる可能性がある。

肥満による喘息難治化のメカニズムの一つとして腸内細菌叢が注目されている。我々は、大気汚染物質の一つであり気管支喘息のトリガーであるオゾンを用いた喘息マウスモデルにおいて、オゾン暴露により上昇した気道過敏性は肥満により増強することを報告した［3］。興味深いことに、16s rRNA 解析における主成分解析により通常マウスと肥満マウスは腸内細菌叢が異なることを発見した。さらに、無菌（Germ free）マウスへの通常マウスまたは肥満マウスの腸内細菌を移植した実験において、腸内細菌叢自体が気道過敏性および気道炎症の増悪を誘導することを発見した［4］。しかしながら、腸内細菌を標的とした肥満喘息増悪に対する治療は未だ確立されていない。よって本研究の目的は腸内細菌叢を標的とした介入により肥満難治性喘息の改善を期待するとともに新規治療薬として確立することである。

肥満による腸内細菌叢変化がどのような分子メカニズムで喘息病態を制御しているかは不明である。腸内細菌自体が遠隔臓器の病態、特に気管支喘息増悪を反映する気道過敏性亢進・気道炎症増悪に関与するメカニズムとしては腸内細菌自体が産生する代謝産物や腸管由来のホルモン等が直接血流を介して肺に作用する可能性が示唆されている［3］。その中でも、細菌が食物繊維を代謝し直接産生する酪酸をはじめとした短鎖脂肪酸は腸内細菌叢と遠隔臓器の状態を制御する重要なメッセンジャーの一つとして注目されている。よって、本研究では腸内細菌自体が遠隔臓器の病態、特に気管支喘息増悪を反映する気道過敏性亢進・気道炎症増悪に関与するメカニズムとしては腸内細菌自体が産生する代謝産物である酪酸に注目し研究を行うこととした。

方　法

1. マウスとオゾン暴露

8～9 週齢の BALB/c マウス、C57BL/6J マウス（Japan SLC、Hamamatsu、Japan）または C57BL/6JHamSlc-ob/ob マウスを使用。マウスは密閉化されたチャンバー内でモニターによる濃度監視をされながらオゾン（2 ppm、3 時間）およびコントロールとして大気暴露を行った。暴露期間中は水や餌は取れない状態とした。暴露後ただちにマウスをケージに戻し水や餌にアクセスできる状態とした。最終暴露から 24 時間後に解析を行った。

2. 実験プロトコール

アジスロマイシン投与実験においてマウスはアジスロマイシン 35 mg/L を溶解した水または通常の水を 2 週間マウスに与え、オゾン暴露を行った。

3. メサコリンに対する気道過敏性

マウスにペントバルビタールおよびキシラジンによる麻酔を行った後、気道を露出させ 18 ゲージの金属針を留置し、flexivent system（SCIREQ、Montreal、Canada）と接続し強制オシレーション法で気道過敏性の評価を行った。メサコリンクロライドの低濃度から濃度別にネブライザーで吸入させ、全気道抵抗値を測定した。

4. 気管支肺胞洗浄液採取および解析

気管支肺胞洗浄液は、リン酸緩衝液 1 ml を 2 回肺を洗浄し 100×g、5 分間遠心後上清を保存した。細胞数についてはヘモサイトメーターを使用し、細胞分画についてはディフクイック染色を行い最低 300 個カウントし評価を行った。気管支肺胞洗浄液中の総蛋白は BCA アッセイで行い、細胞障害性については LDH 活性の評価を行った。

5. 統計検定法

2 群間の検定については t 検定を行い、$p<0.05$ を有意差ありと規定した。

結果および考察

1. オゾン暴露は気道上皮障害を誘導し気道過敏性および気道炎症を誘導する

Balb/c マウスにオゾン暴露を行い無刺激との比較において気道過敏性試験を行ったところ、無刺激と比較しオゾンを暴露されたマウスでは気道過敏性が有意に亢進することを確認した（図 1a）。次に気管支肺胞洗浄液について、無刺激と比較しオゾンを暴露されたマウスは総細胞数の有意な上昇を認めた。その他好中球およびマクロファージ分画の有意な上昇を認めた。リンパ球や好酸球の増加は見られなかった（図 1b）。次に気管支肺胞洗浄液中の剥離された気道上皮細胞の数を数えたところオゾン暴露により有意に上昇し（図 1c）、気管支肺胞洗浄液中の総蛋白数も有意に上昇を認めた（図 1d）。さらに、気管支肺胞洗浄液の細胞障害性評価を行ったところ、無刺激と比較しオゾン暴露により有意に上昇することが確認された（図 1e）。以上から無刺激と比較しオゾン暴露は気道上皮障害を誘導し気道過敏性および気道炎症を誘導することが分かった。

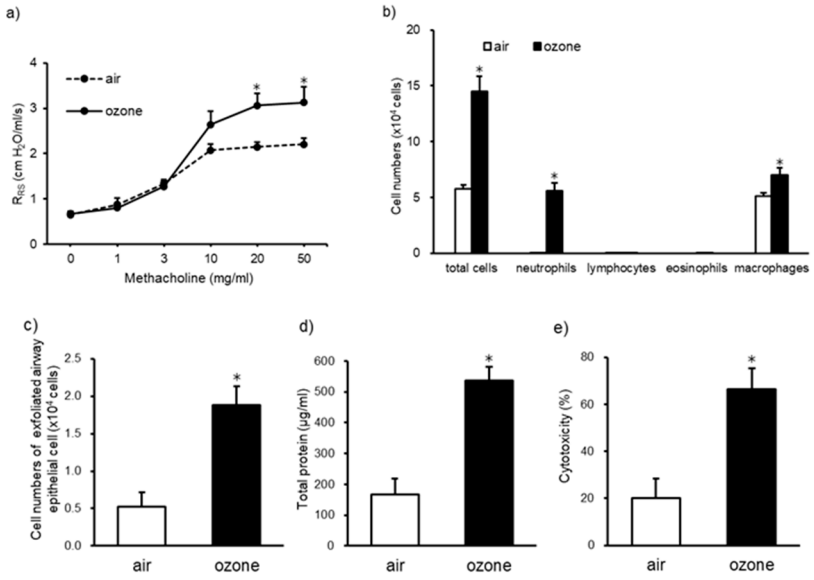


図 1. オゾンによる気道炎症・気道過敏性および気道上皮障害の評価

a） 気道過敏性試験結果。

b） 気管支肺胞洗浄液の細胞分画。

c, d） 気管支肺胞洗浄液中の剥離された細胞数、総蛋白濃度。

e） 気管支肺胞洗浄液の細胞障害性評価。

2. ob/ob マウスは通常マウスと比較しオゾンによる気道過敏性が亢進する。

C57BL/6J マウスと ob/ob マウスにオゾンを暴露し気道過敏性試験および気管支肺胞洗浄液中の細胞数および細胞分画の評価を行った。C57BL/6J と比較し ob/ob マウスは著明に多重増加を認め、オゾン暴露による気道過敏性試験についても ob/ob マウスが有意に亢進することがわかった（図 2a）。気管支肺胞洗浄液については C57BL/6J と比較し ob/ob マウスは総細胞数および好中球数が有意に減少することが分かった（図 2b）。以上の結果から通常体重マウスと比較し肥満マウスではオゾンによる気道過敏性は有意に亢進するが、気道炎症の増悪は起こらずむしろ軽減を認めることが分かった。

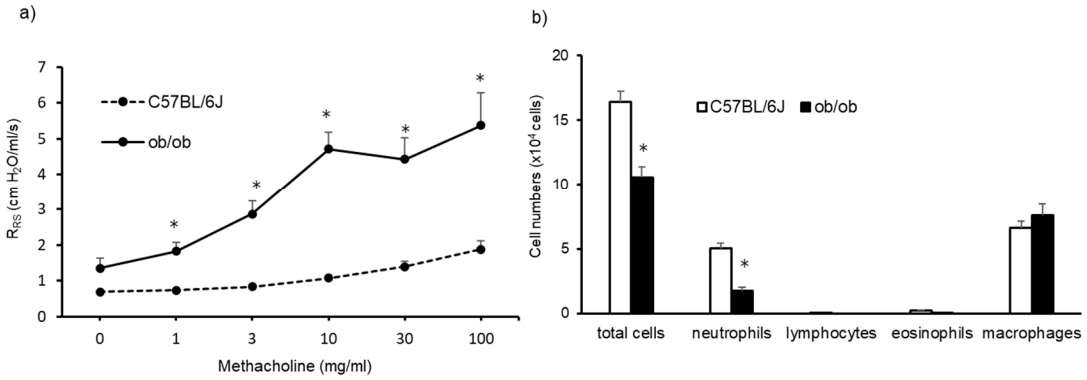


図 2. 通常マウスおよび肥満マウスのオゾンによる気道炎症・気道過敏性の比較

a） 気道過敏性試験結果。

b） 気管支肺胞洗浄液の細胞分画。

3. ob/ob マウスにアジスロマイシンを投与すると気道過敏性が抑制される。

アジスロマイシンは抗菌剤の一つであり、酪酸産生菌を変化されることが報告されている［5］。よって ob/ob マウスにアジスロマイシンを 2 週間投与し、無治療群との気道過敏性および気管支肺胞洗浄液の細胞数および細胞分画の比較を行った。アジスロマイシン投与により明らかな体重減少は認めず 2 群間に体重の差は見られなかったが、オゾンによる気道過敏性はコントロールと比較しアジスロマイシン投与により有意に気道過敏性が抑制することが分かった（図 3a）。気管支肺胞洗浄液中の細胞数および細胞分画についてはコントロールと比較しアジスロマイシン投与により明らかな変化は見られなかった。以上から酪酸産生菌を抑制するアジスロマイシンは肥満マウスにおいてオゾンによる気道過敏性抑制効果を示すことが変わった。

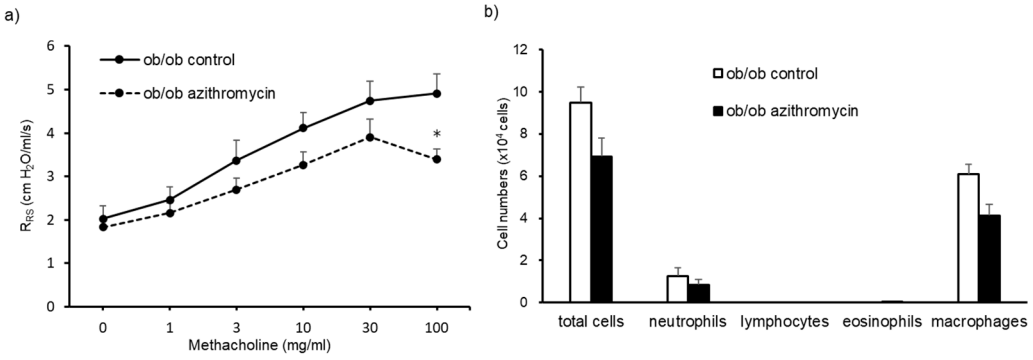


図 3. 肥満マウスにおけるアジスロマイシンが気道炎症・気道過敏性に与える影響

a） 気道過敏性試験結果。

b） 気管支肺胞洗浄液の細胞分画。

考　察

今回の結果はまず、通常マウスにおいてオゾンが気道過敏性および気道炎症にどのように作用するかの評価を行った。オゾン暴露において喘息病態で重要な表現型である気道過敏性および気道炎症を有意に誘導することが分かった。さらに、その気道過敏性および気道炎症の誘導メカニズムとして気道上皮障害が原因として考えられる可能性が示唆された。次に肥満は臨床的には喘息の増悪因子であり、今回肥満マウスとして ob/ob マウスを使用し通常マウスである C57BL6/J マウスとオゾンによる気道反応の評価を行ったところ、非常に興味深いことに肥満マウスではオゾンによる気道炎症の増悪は認めずむしろ抑制傾向である反面、気道過敏性は有意に亢進することが分かった。これまでの報告において気道過敏性および気道炎症は必ずしもパラレルに起こる現象ではないことを考慮すると［6］理にかなった結果であったと考えられる。最後に酪酸産生菌自体が腸内細菌叢を介して肥満喘息に関与する可能性があることから、まずは酪酸産生菌を低下させる可能性があるアジスロマイシン投与により肥満による喘息病態増悪に関与するかの評価を行ったところ、アジスロマイシンは有意に気道過敏性の抑制効果を認めた。酪酸自体が肥満による気道過敏性増悪に関与する可能性が示唆された。今後は酪酸自体を肥満マウスに投与し気道過敏性増悪が抑制されるか、酪酸産生菌であるクロストリジウムブチリカム菌（ミヤ BM）投与により気道過敏性が抑制されるかを検証する予定としている。

文　献

1） H. Tashiro, Y. Kurihara, Y. Kuwahara, K. Takahashi, Impact of obesity in asthma: Possible future therapies, Allergol Int, 73 (2024) 48-57. PMID: 37659887 DOI: 10.1016/j.alit.2023.08.007

2） H. Tashiro, S.A. Shore, Obesity and severe asthma, Allergol Int, 68 (2019) 135-142. PMID: 30509734 PMCID: PMC6540088 DOI: 10.1016/j.alit.2018.10.004

3） H. Tashiro, S.A. Shore, The Gut Microbiome and Ozone-induced Airway Hyperresponsiveness. Mechanisms and Therapeutic Prospects, Am J Respir Cell Mol Biol, 64 (2021) 283-291. PMID: 33091322 DOI: 10.1165/rcmb.2020-0288TR

4） H. Tashiro, Y. Cho, D.I. Kasahara, J.D. Brand, L. Bry, V. Yeliseyev, G. Abu-Ali, C. Huttenhower, S.A. Shore, Microbiota Contribute to Obesity-related Increases in the Pulmonary Response to Ozone, Am J Respir Cell Mol Biol, 61 (2019) 702-712. PMID: 31144984 DOI: 10.1165/rcmb.2019-0144OC

5） R. Li, H. Wang, Q. Shi, N. Wang, Z. Zhang, C. Xiong, J. Liu, Y. Chen, L. Jiang, Q. Jiang, Effects of oral florfenicol and azithromycin on gut microbiota and adipogenesis in mice, PLoS One, 12 (2017) e0181690. PMID: 28742883 DOI: 10.1371/journal.pone.0181690

6） H. Tashiro, D.I. Kasahara, R.S. Osgood, T. Brown, A. Cardoso, Y. Cho, S.A. Shore, Sex Differences in the Impact of Dietary Fiber on Pulmonary Responses to Ozone, Am J Respir Cell Mol Biol, 62 (2020) 503-512. PMID: 31913653 DOI: 10.1165/rcmb.2019-0124OC