

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08700

研究課題名(和文)慢性腎臓病患者における腸内細菌叢の変化とその改善による新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Changes of microbiome in patients with chronic kidney disease and new therapeutic strategy by their improvement

研究代表者

加藤 佐和子 (Kato, Sawako)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：80625757

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)：血液透析導入時と一年後の患者検体を用いて、循環白血球に取り込まれた細菌由来のDNA断片の解析(Microbiome)を行った。透析導入時の循環白血球に取り込まれた細菌の菌株は、患者の腎不全の原疾患(糖尿病、多発嚢胞腎、腎硬化症、慢性腎炎)によって、大きく異なっていた。糖尿病の有無や心血管合併症の既往の有無では異差を認めなかった。次に、透析導入時、導入1年後の細菌叢と健常人の細菌叢と比較した。透析導入患者の細菌叢のクラスター解析では、健常人と比較し炎症と関与している鍵となる細菌叢属の比率に異差があった。また、血液透析導入時の血清カルシウム値の上昇とバチルス菌の増殖と相関関係があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病患者は、末期には人工透析療法など高負荷の治療を必要とし、心臓病や脳卒中などの血管合併症の罹患率も高い。そのため、慢性腎臓病の進行を抑制と、合併症の予防は社会的にも重要な問題である。今回、循環白血球内に取り込まれた細菌由来のDNA断片を解析したところ、末期腎不全患者の細菌叢は健常人と異なることを見いだした。炎症に関与している可能性のある細菌叢群の比率と血清カルシウム上昇に関与する可能性のある菌の増殖が認められた。慢性腎臓病患者の管理において、腸内細菌叢の変調が炎症の惹起や動脈石灰化に関与している可能性が示唆され、あらたな治療戦略の開発につながるものと思われた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed bacterial DNA fragments in the circulating leukocytes collected from the patients who had just started dialysis therapy and one year after dialysis initiation. The bacterial strains in the circulating leukocytes at the start of dialysis differed greatly according to the primary disease of renal failure (diabetes mellitus, polycystic kidney, nephrosclerosis, chronic nephritis). There was no difference in bacterial strains between diabetic and non-diabetic, or patients with and without a history of cardiovascular disease. Next, we compared the bacterial genera among patients at the start dialysis, those one year after the start of dialysis therapy and healthy subjects. We found the difference in key bacterial genera involved with induction of inflammation between dialysis patients and healthy subjects. In addition, there was a correlation between the increase in serum calcium levels at the start of dialysis and the growth of Bacillus bacteria.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腸内細菌叢 慢性腎不全 細胞老化 コホート研究 炎症 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

**学術的背景**; CKD 患者では、心血管合併症、感染症が高率にみられ若年死亡の一因である。その病態は、尿毒症物質の蓄積により、慢性炎症、酸化ストレスの亢進など様々な障害の悪循環が形成され動脈硬化、栄養障害、フレイルなど老化にみられる諸変化に酷似している。この腎不全患者の表現型から、我々は「腎不全は老化を促進する」という仮説を立てた。

ヒトの腸管には、数千種類、100 兆個以上の腸内細菌が生息している。ヒトの健康維持（恒常性の維持）の為には、腸内細菌と適切な共存が重要で、腸内細菌叢に影響を与える因子について多方面から研究が進められている。腸内細菌叢の多様性の消失や菌種構成の異常 (Dysbiosis) が、消化器疾患だけでなく、糖尿病などの代謝性疾患、動脈硬化、アレルギーなどの免疫疾患の発症にも深く関与していることが最近の研究で明らかになってきた。食物栄養素の腸内細菌による分解産物トリメチルアミン N オキシド (TMAO) の発見は、食生活-腸内細菌-血管疾患を結びつけた画期的な物質であり、「腸内細菌叢の管理-TMAO の産生抑制-心血管疾患抑制」となる可能性が見出された。

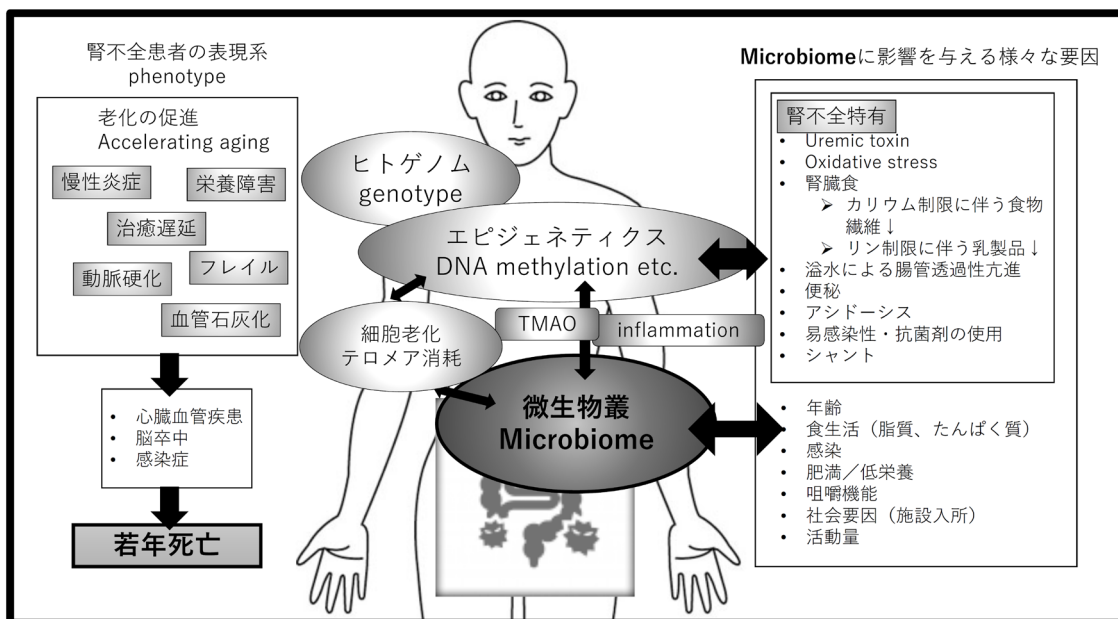


図1.慢性腎臓病患者における Microbiome の変調と死亡率上昇の仮説

さらに腎不全患者では、尿毒症物質の蓄積や腎臓食など腎不全特有の要因が、腸内細菌叢を始めとする微生物叢 (Microbiome) に影響を及ぼし腎不全特有の環境を形成している。よって腎不全患者の予後改善には腎不全特有の要因を考慮した研究が必須である。

2. 研究の目的

**本研究の目的**:「Dysbiosis が代謝物質 TMAO や、慢性炎症に関与し遺伝子発現制御 (Epigenetic)、老化 (Aging) に変調をきたすことを検証すること」

我々は 2007 年より日本人新規透析導入患者 (CKD5D) の前向きコホート研究;NICE-GENE 研究を

遂行し、遺伝子-遺伝子発現-環境の相互関係を解析してきた。遺伝子発現の制御 (Epigenome)、それを制御する環境 (allostatic load) を解析することはゲノム関連解析によって得られた情報と表現型 (実臨床データ) の齟齬を解消する大きな手がかりである。「腎不全は老化を促進する」という先進的な考え方は、NICE-GENE コホート研究を含めた、現在進行中のストックホルム、グラスゴーとの国際共同研究の中で創造された。この国際共同研究で、CKD 患者の慢性炎症を合併症と捉え、慢性炎症が遺伝子発現制御 (Epigenetic) に変調を来たし、老化の指標であるテロメア長に影響することを発見し報告してきた。

近年の次世代シーケンサーの開発により、腸内細菌叢といった多種多様なものが混在するものの解析が一気に飛躍した。今回の研究で、新規透析導入患者と透析導入後一年後の循環白血球に取り込まれた細菌由来の DNA 断片を解析する。この研究の**学術的独自性と創造性**は、腎不全患者において、腎不全関連、非関連のどのような背景や臨床データが Dysbiosis (腸内細菌叢の多様性や菌種構成の異常) を惹起するか、TMAO を増加させるか、慢性炎症等の既知の危険因子に影響を及ぼすか検討する。さらに、心血管疾患、感染症発症率、死亡率に関与しているかを世界で初めて検討するところにある。

### 3. 研究の方法

(1) 最も深刻な尿毒症下にある従来透析療法施行中 (NICE-GENE コホート研究) の患者のサンプルの収集を行った。患者背景につき、情報収集を行った。環境因子 (allostatic load) の情報収集を行った。

(2) 循環白血球に取り込まれた細菌由来の DNA 断片の解析 (**Microbiome**) を行った。

- ① 微生物叢分析のための DNA 分離と 16S アンプリコンライブラリーの調製
- ② バイオインフォマティクス: 各サンプルの OUT テーブルの作成。[operational taxonomic unit; 細菌の必須遺伝子 (一般に、16S リボソーム RNA 遺伝子) の塩基配列をコンピュータ上でその類似度を指標に分類したときに得られる単位] を 97% の類似性をもって同一菌種として生成した。

### 4. 研究成果

透析導入時に採取された循環白血球から抽出した DNA の解析より、循環白血球に取り込まれた細菌の菌株、多様性、割合は、患者の腎不全の原疾患 (糖尿病、多発嚢胞腎、腎硬化症、慢性腎炎) によって、大きく異なっていたことが示された。過去の論文より糖尿病、非糖尿病で大きくことなるかと予想されたが、我々の患者群では糖尿病の有無ではあまり異差がなかった。これは、過去論文の糖尿病患者は実際の血糖値が高いことが予想されるが、腎不全が進行するとインシュリンの代謝遅延より見かけ上血糖コントロールが改善するためと推測された。心血管合併症の既往の有無も異差を認めなかった。腸管からの細菌の translocation を考えるならば、心不全の有無を加味する必要があったと考えられた。

次に、透析導入時、導入 1 年後患者から採取された循環白血球から抽出した DNA の細菌叢と、

健常人のものと比較した。透析患者の細菌叢は健常人と比較すると細菌叢の種類は大きく異なり、有意に多様性が増していた。また、2次元の多様性解析(Beta Diversity)においても、透析導入患者の細菌叢のクラスターは健常人のものと異なる分布を認め、とくに、炎症と関与している鍵となる細菌叢属(Key Genera)において Propionibacterium (IL-6, IL-8 をリリースすると言われている)の比率に異差があった。また、血液透析導入時の血液データと細菌叢解析結果の比較を行った。バチルス菌がカルシウム産生に関与するという報告もあるが、今回の我々のデータにおいて、バチルス菌の増殖と血清カルシウム上昇に相関関係を認めた。ただし、実際のバチルス菌の増殖と PWV などの動脈硬化性指標や心血管合併症の発症と直接的な関与を見出すことはできなかった。

結論として、日本人の血液透析患者における循環白血球から抽出した DNA の解析から推察される、生体内細菌叢の解析により、透析前には腸内細菌叢が変化していることが確認され、なかでも炎症誘発性細菌への変化は、尿毒症の進行にともない、酸化的負荷の増大をきたし炎症性の負担が増加する臨床的兆候と一致していると考えられた。また、腸内細菌叢の変化が透析患者の心血管疾患合併症の発生率の増加をきたしている可能性も示唆された。発酵食品などを多用する日本人の食習慣によって、よりバランスの取れた健康促進微生物叢の回復に効果が期待でき、あらたな治療戦略の開発へつながるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	石本 卓嗣  (Ishimoto Takuji)  (00534835)	愛知医科大学・医学部・准教授    (33920)	
研究分担者	丸山 彰一  (Maruyama Shoichi)  (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授    (13901)	
研究分担者	小杉 智規  (Kosugi Tomoki)  (90584681)	名古屋大学・医学系研究科・准教授    (13901)	

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