

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17256

研究課題名（和文）アルドステロンと腸内細菌に関連する新規血圧調節機序の解明とヒトにおける検証

研究課題名（英文）Novel Blood Pressure Regulatory Mechanisms Associated with Aldosterone and Gut Bacteria and Validation in Humans

研究代表者

川合 未来（KAWAI, MIKI）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：70868041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：基礎研究として、腸管上皮特異的ミネラルコルチコイド受容体欠損（MRKO）マウスを用いて、食物繊維の含有量の異なる食事負荷を行い、腸管におけるトランスポーターの発現の変化の検討を行った。野生型マウスにおいて高食物繊維食負荷により空腸回腸におけるSMCT2の発現および結腸におけるSMCT1の発現上昇がみられた一方で、腸管MRKOマウスにおいてはそれらの上昇がみられず、SMCTと腸管MRの関係性が示唆された。臨床研究としては30名近くの前発症性アルドステロン症患者から同意を得て、治療介入前後の腸内細菌叢の変化と血中便中短鎖脂肪酸濃度の変化を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年高血圧発症における腸内細菌叢の意義が注目されており、腸内細菌が食物繊維を発酵することにより産生する短鎖脂肪酸が、血圧調節機序において重要な媒介因子であることが知られてきている。これまで腸管における短鎖脂肪酸の輸送機構と高血圧発症の関連性について検討した報告はなく、本研究はそこに着目し、新たな血圧調節機構の解明を目的とした。また二次性高血圧症で代表的な原発性アルドステロン症は手術加療により根治可能な疾患であるが、術後の高血圧予後には個人差があり、腸内細菌に着目し新たな予後予測因子としての意義を検討することで、既知の原発性アルドステロン症の術後のスコアモデルの再構築を目的とした。

研究成果の概要（英文）：As a basic study, we examined changes in transporter expression in the intestinal tract of intestinal epithelial-specific mineralocorticoid receptor-knockout (MRKO) mice by subjecting them to diets containing different amounts of dietary fiber. In wild-type mice, high-fiber dietary load increased expression of SMCT2 in the jejunal ileum and SMCT1 in the colon, whereas in intestinal MRKO mice they were not elevated, suggesting a relationship between SMCT and intestinal MR.

In a clinical study, nearly 30 patients with primary aldosteronism have agreed to participate in the study, and changes in the intestinal microbiota and blood fecal short-chain fatty acid concentrations before and after treatment intervention are being investigated.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：原発性アルドステロン症 腸内細菌叢 短鎖脂肪酸 腸管上皮特異的ミネラルコルチコイド受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高血圧症は現在 4 人に 1 人の生活習慣病であり、脂質異常症や糖尿病と並んで心血管疾患のリスクとなる common disease である。近年高血圧発症の新たな成因として腸内細菌叢の関与が着目されており、高血圧モデルラットにおいて Firmicutes/Bacteroidetes 比が増加し、腸内細菌叢の多様性が低下すること、またヒトにおいても小規模なサンプルサイズの検討ではあるものの高血圧患者において腸内細菌叢の多様性の減少が報告されている (Yang et al. Hypertension, 2015)。腸内細菌は食物繊維を発酵させることにより短鎖脂肪酸を産生するが、このような腸内細菌叢の多様性の低下が短鎖脂肪酸の産生減少をもたらし、高血圧発症の一因となっていると考えられている。また短鎖脂肪酸は GPR41 や GPR43 といった G 蛋白共役型受容体を介して作用することが知られているが、GPR41 欠損マウスで血圧上昇がみられることが報告されており (Natarajan et al. Physiol Genomics, 2016)、短鎖脂肪酸の血圧降下作用が示唆される。また、短鎖脂肪酸は主に自由拡散により吸収されると考えられていたが、複数のトランスポーターが存在しており、これらのトランスポーターを介した能動的な輸送機構にも注目が集まっている。このトランスポーターの発現を制御づける因子についてはほぼ未解明であり、またこの短鎖脂肪酸の輸送機構と高血圧発症を関連付ける報告はなく、この点に着目した。

当教室では腸管上皮特異的ミネラルコルチコイド受容体欠損マウス (MRKO マウス) を作出し、その表現型解析を通じて腸管上皮ミネラルコルチコイド受容体が腎尿細管ミネラルコルチコイド受容体と同程度に血圧調節に寄与することを世界で初めて明らかにした。このマウスを用いて腸管 MR と短鎖脂肪酸トランスポーターの関連を結びつける予備検討として、10 週齢のマウスに皮下埋め込み型浸透圧ポンプを用いてアルドステロンを 1 週間負荷し、短鎖脂肪酸トランスポーターの発現を vehicle 群と比較した。また同様のアルドステロン負荷を腸管 MRKO マウスにも行い、control マウスにアルドステロン負荷を行った群と比較したところ、Na⁺ 共役型トランスポーター-1 は空腸・回腸に比べ結腸で発現が上昇しており、腸管 MRKO マウス群においてはアルドステロン負荷下において発現の上昇がみられたことから、腸管上皮におけるアルドステロン作用でその発現が抑制されている可能性が示唆され、腸管上皮 MR 作用により短鎖脂肪酸トランスポーターの発現が制御されているという仮説をたてた。

また臨床研究においては、原発性アルドステロン症の多施設共同 National コホート研究である「JPAS 研究」に教室として参加しており、原発性アルドステロン症は片側性病変の場合、手術加療により根治が可能であるが、原発性アルドステロン症自体は治癒するものの、術後に血圧が正常化する症例は約 1/3 であり、残りの約 2/3 の患者は何らかの降圧薬の内服を継続しているという現状がある。術前に術後の高血圧予後を予測することは、原発性アルドステロン症診療アルゴリズムにおける decision-making に非常に重要な要素であり、上記基礎研究の背景から、腸内細菌叢の個人差が術後の高血圧予後の個人差を規定している可能性は十分にあり、その点に着目し臨床研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究は腸管上皮における短鎖脂肪酸のトランスポーターの発現制御に着目し、腸管上皮ミネラルコルチコイド受容体作用と短鎖脂肪酸・腸内細菌叢の関連性の解析を通じて、新たな血圧調節機構を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 基礎研究

まず最初に腸管内における Na⁺ 共役型トランスポーター (SMCT) およびミネラルコルチコイド受容体 (MR) の発現局在の評価を行った。

つぎに、血中短鎖脂肪酸の上昇を評価する目的に高食物繊維食負荷を考え、低食物繊維食および高食物繊維食負荷下での短鎖脂肪酸の輸送体と MR の発現および血圧の変化を評価することとした。Control 群として 10 週齢の C57BL6 の野生型マウスを 13 匹、腸管 MRKO マウスを 20 匹用意し、低食物繊維食を与える野生型マウス群、高食物繊維食を与える野生型マウス群、低食物繊維食を与える腸管 MRKO マウス群、高食物繊維食を与える腸管 MRKO マウス群の 4 群に分け、12 週間の負荷を行い、4 週ごとに体重や摂餌量、血圧、OGTT、尿中便中電解質の評価を行い、また 4 週時点においては腸管での短鎖脂肪酸の輸送体の発現を評価した。なお食事に関しては通常 5% 程度のセルロース含有が一般的であるため、低食物繊維食ではセルロース含有量を 1% に減量し、一方の高食物繊維食負荷では水溶性食物繊維であるイヌリンを 10% 添加したものと、イヌリン 10% を添加する代わりにコーンスターチの含有量を減らしいずれの食事のカロリー量も揃えるように調整を行った。二つの食事の脂肪含有量や電解質バランスに変わりはない。

(2) 臨床研究

当院当科に通院中の原発性アルドステロン症患者のうち、副腎静脈サンプリング目的に入院し、文書同意が得られた患者を対象にした。両側性病変では薬物治療介入前後の 2 ポイントにおいて血液および便検体の採取を行い、片側性病変では薬物治療介入前後

および、術後の3ポイントにおいて検体採取を行った。

4. 研究成果

(1) 基礎研究

通常食摂取下における15週齢の野生型C57BL/6雄マウス3匹を用いてSMCT1・2とMRの発現を、SYBR greenを用いたqPCRで定量化した。SMCT1は結腸優位に発現しており、MRも既報と同様に腸管内で結腸優位に発現していた。

4週時点での腸管でのSMCTおよびMRの発現をqPCRで定量化したところ、Control群では高食物繊維食負荷により空腸・回腸におけるSMCT2の発現および、結腸におけるSMCT1の発現の上昇がみられた一方、腸管MRKOマウスではそれらの発現上昇がみられず、このことから輸送体の発現に腸管MRが関与している可能性が考えられた。次に実際に便中および血中短鎖脂肪酸の測定を行ったが、負荷4週時点での盲腸内容物中の短鎖脂肪酸を測定するも4群において目立った差は得られなかった。このことから、4週時点では短鎖脂肪酸の産生自体に差がついていない、あるいは高食物繊維食負荷において産生亢進は起きているものの、小腸におけるSMCT2の発現亢進により盲腸に到達するまでに吸収され、盲腸レベルでは短鎖脂肪酸濃度に差がみられていない可能性が考えられた。なお腸内細菌叢のメタゲノム解析に関しては行えていないため、今後評価を予定している。血中短鎖脂肪酸に関しては、Control群で高食物繊維食負荷で血中短鎖脂肪酸が増加している一方で腸管MRKOマウスではその増加がみられず、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸に差がみられなかったこととあわせ、この血中短鎖脂肪酸の違いはcontrol群と腸管MRKOマウス群で短鎖脂肪酸の輸送機構、SMCTの発現に違いが起きた結果と考えられ、qPCRでの発現の違いに一致した結果と考えた。4週時点での24時間蓄尿・蓄便検査では、高食物繊維食負荷によりcontrol群、腸管MRKO群で便量の増加がみられており、実験系としては十分にワークしていると考えられた。蓄尿検査では尿量、電解質いずれも群間で有意差がみられなかった一方で、蓄便検査では高食物繊維食負荷で便中Kの排泄亢進がみられ、高食物繊維食負荷によりSMCT1・2の発現が亢進しNa吸収が促進し、K排泄が亢進した可能性を考えた。体重およびその増加量、摂餌量においてはControl群では高食物繊維食負荷下において食事を十分に摂取しているにも関わらず、体重増加が抑えられる傾向にあったが、腸管MRKO群では体重増加の抑制が減弱している傾向がみられた。いずれも統計学的な有意差までは至らなかった。耐糖能の評価としては4週ごとにOGTTも行ったが、高食物繊維食負荷のControl群で血糖値の低下傾向がみられるも、有意差は得られなかった。血压に関しては高食物繊維食負荷下において負荷8週目にControl群で腸管MRKO群と比べ平均血压、拡張期血压が低下していたものの、4・12週では差がみられなかったため、再現性がなく検討が必要と考えられた。

(2) 臨床研究

COVID-19感染症の影響で原発性アルドステロン症患者の入院が滞っていたため、目標とする50名までのエントリーは得られていないが、現在までに25名がエントリーしている。今後もエントリーを継続し、目標人数に達し次第、腸内細菌叢のメタゲノム解析や、血中便中短鎖脂肪酸濃度の差異を検討することを予定している。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------