

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03201

研究課題名（和文）腸内細菌叢メタゲノムおよびメタボローム情報を用いた腎疾患診断モデルの構築

研究課題名（英文）Development of diagnostic models for kidney diseases using gut microbiota metagenomic and metabolomic information

研究代表者

田中 茂（Tanaka, Shigeru）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80596396

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 23,570,000円

研究成果の概要（和文）：IgA腎症では、Bifidobacteriumが増加し、Clostridium cluster XIが減少。膜性腎症では、Lactobacillales目が増加し、Clostridium subcluster XIVaが減少した。IgA腎症の組織学的疾患活動性と腸内細菌叢の関連については、分節性硬化（S1）を有する群ではBacteroidesが優勢で、他の菌種が減少することが判明した。遺伝子解析ではIgA腎症群で特定の代謝経路の遺伝子存在量に差が見られ、メタボローム解析により原疾患毎の代謝特徴が明らかになった。特に胆汁酸やジカルボン酸、L-トリプトファン代謝物に顕著な変動が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腸内細菌叢と腎炎の関連性を明らかにすることで、腸内細菌のバランスが腎疾患の病態に影響を及ぼす可能性を示唆している。特に、IgA腎症や膜性腎症で観察された特定の細菌の増減は、腸内環境が免疫機能に与える影響を示しており、これが腎症の進行や治療反応に関与する可能性がある。また、腸内細菌叢の変化が特定の機能遺伝子の推定存在量や代謝物及ぼす影響が病態を悪化させるメカニズムを解明する手がかりとなる。これらの知見が、腸内細菌叢のプロファイリングにより、腎疾患の早期診断や個別化医療の実現にむけた基盤になり得ると考える。

研究成果の概要（英文）：In IgA nephropathy, Bifidobacterium increased and Clostridium cluster XI decreased. In membranous nephropathy, Lactobacillales order increased and Clostridium subcluster XIVa decreased. Regarding the association between histological disease activity and gut microbiota in IgA nephropathy, Bacteroides predominated in the group with segmental sclerosis (S1) and other bacterial species decreased. The other bacterial species were found to be reduced. Genetic analysis showed differences in gene abundance for specific metabolic pathways in the IgA nephropathy group, and metabolomic analysis revealed metabolic characteristics for each primary disease. In particular, significant variations were observed in bile acids, dicarboxylic acids and L-tryptophan metabolites.

研究分野：腎臓病

キーワード：腸内細菌叢 メタゲノム解析 メタボローム解析 PICRUSt 機能遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

末期腎不全医療のコスト増大は世界的にも大きな課題であり、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD)の進展抑制を目的とした対策の確立は急務である。CKDは進展危険因子や予後の異なる多様な原疾患から構成される不均一な集団であるため、その診療においては、各々の原疾患に関して、正確な診断と精度の高い予後予測が求められる。しかしながら、現時点で最も信頼しうる原疾患の確定手段としては、出血や感染症のリスクを伴う侵襲的な経皮的腎生検に頼らざるを得ないのが現状であり、**より低侵襲で安全性の高い腎疾患診断方法の開発**が求められている。

## 2. 研究の目的

本申請研究では腎疾患に対する腸内細菌の関与を明らかにするため、経皮的腎生検を受けた糸球体腎炎患者の糞便を用いて、腎炎の各組織診断型と関連の強い腸内細菌叢属種や代謝産物を同定し、臨床病理学重症度との関連を検討する。さらに、腸内細菌情報を含め、腎炎の病型識別に寄与する因子を包括した機械学習モデルを作成し、従来の組織診断を代替し得る**新たな非侵襲的腎疾患診断システムの開発**を目指す。

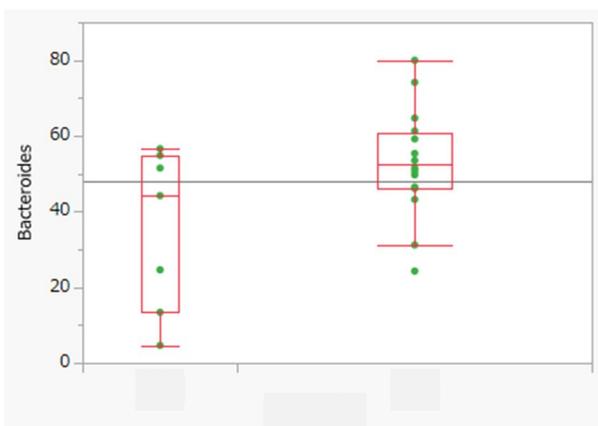
## 3. 研究の方法

本申請研究では、腎炎の各組織病型毎に特徴的な腸内細菌叢属種群や腸内細菌由来代謝産物を同定し、臨床病理学重症度との関連を検討する。さらに、腸内細菌情報を含め腎炎の病型識別に寄与する因子を包括した非侵襲的腎疾患診断モデルを構築する。

## 4. 研究成果

非糸球体疾患との比較において、IgA腎症では Actinobacteria 門の Bifidobacterium の増加と Clostridium cluster XI の減少が認められ、膜性腎症では、Lactobacillales 目の増加および Clostridium subcluster XIVa の減少が認められた。

次に、IgA腎症例(23例)に限定して、オックスフォード分類に基づく組織学的疾患活動性と腸内細菌叢プロファイルの関連を検討したところ、分節性硬化(S1)を有する群において、Bacteroides が優勢菌種である一方、その他の菌種 (Bacteroides、Firmicutes、Clostridium、Actinobacteria など以外) が減少することが明らかとなった。



ヒト腸内細菌叢の構成は、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門、Actinobacteria 門、Proteobacteria 門に属する細菌で全体の 98%以上を占める。炎症性腸疾患患者では健常人と比べ、嫌気性菌 Bacteroides 属が増加する一方、Clostridium 属、Firmicutes 門の比率が減少し、細菌叢の多様性が失われることが報告されている。本研究においては、IgA腎症、膜性腎症いずれにおいても、Clostridium 属の減少と Lactobacillales 目、Bifidobacterium の増加が認められた。これらの菌属は、Interleukine-10(IL-10)の産生に関わる T 細胞を誘導し免疫制御

に関連することも報告されている。今後、症例数を増やし、健常人との比較を行うことによって特定の腎炎に関連する特異的な腸内細菌叢の存在が明らかとなる可能性がある。また、IgA腎症患者においては、Clostridium 属の細菌叢の減少が認められた。マウスの消化管から単離された Clostridium 属を無菌マウスに経口投与することによって、Treg が強力に分化誘導され、Lactobacillus 属や Bacteroides 属などの投与ではそのような現象が観察されないことが報告されている。また、IgA腎症や微小変化群のフローサイトメトリー分析において、末梢血 Treg が健康人よりも抑制されており、ステロイド治療によって健康人と同等のレベルまで回復することも知られている。これらのことより、腸内細菌叢が Treg

制御を通じて IgA 腎症や微小変化群の病勢に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆される。また、16S rRNA 遺伝子のシーケンス結果からマッチする細菌の遺伝子データベースにアクセスし、機能遺伝子情報をピックアップして全ゲノムショットガン解析を代替する予測メタゲノム解析: PICRUSt (n=37, 1885 遺伝子) を実施したところ、パントテン酸の生合成経路に關与する 2-dehydropantoate 2-reductase が IgA 腎症群 (n=18) において膜性腎症群 (n=6) よりも有意に推定遺伝子存在量が多く (P=0.04)、メタンの生合成経路に關与する Formylmethanofuran dehydrogenase は IgA 腎症群においてより推定存在量が少ないことが分かった (P=0.04)。

さらに、患者血漿を用いてメタボローム解析を実施し、原疾患グループ毎 (IgA 腎症; IgA、膜性腎症: MGN、巣状糸球体硬化症: FGS、糖尿病: DM、非 IgA 増殖性腎炎: non\_IgA\_CGN、その他: Other) のメタボリズムの特徴を抽出した。

#### <原疾患毎の解析>

MGN 群および FGS 群は、Non\_CGN 群と比較し、二次胆汁酸である Ursodeoxycholic acid の増加が認められた。また、MGN 群、MCNS 群、FGS 群および DM 群では、Non\_CGN 群と比較し、ジカルボン酸である Azelaic acid および Dodecanedioate の増加が認められ、脂肪酸酸化が亢進した可能性が示唆された。IgA 群は、non\_IgA\_CGN 群と比較し、一次胆汁酸である Cholic acid および Chenodeoxycholate の減少が認められ、これら胆汁酸の合成が低下していると推測された。また、Others 群は、non\_IgA\_CGN 群と比較し、二次胆汁酸である Ursodeoxycholic acid の増加が認められた。Others 群は、IgA 群および non\_IgA\_CGN 群と比較し、L-Kynurenine の増加が認められた。また、Others 群は、IgA 群と比べ L-Tryptophan が減少した。Others 群では、L-Tryptophan から L-Kynurenine の反応を触媒する Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 活性が増大している可能性が考えられた。

#### <CKD ステージによる解析>

G4 群および G5 群は、G1 群と比較し、L-Tryptophan の減少、Indoxyl sulfate の増加が認められた。G4 群および G5 群では、腸内環境の悪化による Indole 産生の増加、および腎機能の低下による Indoxyl sulfate の蓄積が示唆された。また、G3 群、G4 群および G5 群は、G1 群と比較し、L-Kynurenine の増加が認められ、Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 活性が増大していると推測された。

#### <胆汁酸の変動>

MGN 群および FGS 群は、Non\_CGN 群と比較し、Ursodeoxycholic acid の増加が認められた (二次胆汁酸の一つである Ursodeoxycholic acid は、一次胆汁酸の Chenodeoxycholate から、7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (7 $\alpha$ -HSDH) および 7 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (7 $\beta$ -HSDH) により生成される。Lepercqらは、7 $\alpha$ -HSDH および 7 $\beta$ -HSDH 活性を持つ腸内細菌として、Clostridium 属、Eubacterium 属 および Ruminococcus 属を報告している)。

#### <ジカルボン酸の変動>

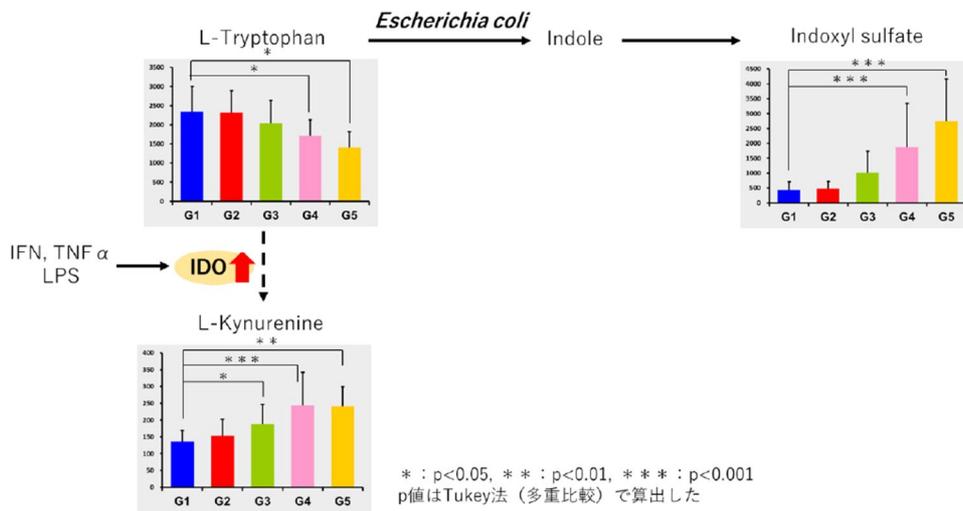
MGN 群、MCNS 群、FGS 群および DM 群では、non\_CGN 群と比較し、ジカルボン酸である Azelaic acid および Dodecanedioate の増加が認められた (一般に、ジカルボン酸は、脂肪酸酸化により生成され、MGN 群、MCNS 群、FGS 群および DM 群では、酸化が亢進した可能性が示唆された。また、Guoらは、血清 Dodecanedioate 濃度は、腸内細菌の Fusicatenibacter 属 および Faecalibacterium 属の存在量と正の相関があり、Bacteroides 属 および Parabacteroides 属とは負の相関があることを報告している)。

#### <L-Kynurenine の変動>

Others 群は、IgA 群および non\_IgA\_CGN 群と比較し、L-Kynurenine の増加が認められた。また、Others 群は、IgA 群と比べ L-Tryptophan が減少した。Others 群では、L-Tryptophan から L-Kynurenine の反応を触媒する Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 活性が増大している可能性が考えられた。IDO はキヌレニン経路の律速酵素であり、IFN、TNF の様な炎症性サイトカイン および Lipopolysaccharide (LPS) により発現誘導されることが知られている。

#### <L-Tryptophan 代謝物の変動>

G4 群および G5 群は、G1 群と比較し、L-Tryptophan の減少、Indoxyl sulfate の増加が認められた (Indoxyl sulfate は、L-Tryptophan 由来の Indole Escherichia coli により産生される腐敗物質) が肝臓で硫酸抱合されて合成されたものであり、腎機能が正常である場合は尿として排出される。G4 群および G5 群では、腸内環境の悪化による Indole 合成の増加、および腎機能の低下による Indoxyl sulfate の蓄積が示唆された。また、G3 群、G4 群および G5 群は、G1 群と比較し、L-Kynurenine の増加が認められた (G3 群、G4 群および G5 群では、Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 活性が増大していると推測された。IDO 活性増大の一因として、IFN や TNF のような炎症性サイトカインの産生増加が示唆された)。



本研究は横断的検討であり、クラスターでの優先菌種であった腸内細菌属と疾患活動性の間の因果関係については明らかにできていない。また、健常コントロールとの比較において腎疾患の発症に關与し得る腸内細菌属種を特定することが可能となると考えられる。今後、本集團の縦断的検討を加える事によって腎炎の予後と特定の腸内細菌叢の關連性が明らかになることができれば、腸内細菌叢の分析が、非侵襲的かつ反復測定可能な病勢モニタリングやマススクリーニングによる潜在的腎炎の拾い上げなどにも役立つ可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Toshiaki, Tanaka Shigeru, Tsuruya Kazuhiko, Kitazono Takanari	4. 巻 12
2. 論文標題 Low intake of carotene and dietary fiber from vegetables and fruits in patients with chronic kidney disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-24471-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akihiro Tsuchimoto, Shigeru Tanaka, Hiromasa Kitamura, Hiroto Hiyamuta, Kazuhiko Tsuruya, Takanari Kitazono, Toshiaki Nakano	4. 巻 26
2. 論文標題 Current antihypertensive treatment and treatment-resistant hypertension in Japanese patients with chronic kidney disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1100 ~ 1110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-022-02250-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitamura Hiromasa, Yotsueda Ryusuke, Hiyamuta Hiroto, Taniguchi Masatomo, Tanaka Shigeru, Yamada Shunsuke, Tsuruya Kazuhiko, Nakano Toshiaki, Kitazono Takanari	4. 巻 26
2. 論文標題 Serum alkaline phosphatase and infection-related mortality in hemodialysis patients: ten-year outcomes of the Q-cohort study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1119 ~ 1129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-022-02255-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Shigeru, Kitamura Hiromasa, Tsuruya Kazuhiko, Kitazono Takanari, Nakano Toshiaki, for the FKR?Study Collaboration Group	4. 巻 26
2. 論文標題 Prevalence, treatment status, and predictors of anemia and erythropoietin hyporesponsiveness in Japanese patients with non-dialysis-dependent chronic kidney disease: a cross-sectional study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 867 ~ 879
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-022-02227-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Shigeru, Nakano Toshiaki, Hiyamuta Hiroto, Tsuruya Kazuhiko, Kitazono Takanari	4. 巻 29
2. 論文標題 Association between Multimorbidity and Kidney Function among Patients with Non-Dialysis-Dependent CKD: The Fukuoka Kidney Disease Registry Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 1249 ~ 1264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.62900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Hiromasa, Tanaka Shigeru, Hiyamuta Hiroto, Shimamoto Sho, Tsuruya Kazuhiko, Nakano Toshiaki, Kitazono Takanari, for the FKR Study Collaboration Group	4. 巻 ePub
2. 論文標題 Cardiovascular Risk Factor Burden and Treatment Control in Patients with Chronic Kidney Disease: A Cross-Sectional Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 63891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.63891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Shigeru, Nakano Toshiaki, Tsuruya Kazuhiko, Kitazono Takanari	4. 巻 26
2. 論文標題 Clinical epidemiological analysis of cohort studies investigating the pathogenesis of kidney disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02121-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中茂、北村博雅、鶴屋和彦、北園孝成、中野敏昭
2. 発表標題 保存期慢性腎臓病患者における心血管治療に対する年齢の影響：福岡腎臓病データベース (FKR) 研究
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会
4. 発表年 2022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	山田 俊輔  (Yamada Shunsuke)  (10419608)	九州大学・大学病院・助教   (17102)	
研究 分担者	中野 敏昭  (Nakano Toshiaki)  (10432931)	九州大学・医学研究院・准教授   (17102)	

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