

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06783

研究課題名（和文）腸腎連関・慢性腎臓病に影響を及ぼす腸内細菌叢と細菌由来代謝産物の探索

研究課題名（英文）Gut-kidney axis: Microbiota and bacterial-derived metabolites affect chronic kidney disease.

研究代表者

鳥巢 剛弘（Torisu, Takehiro）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30453228

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：腸内細菌叢が慢性腎臓病にどのように関わっているか？消化管の吸収に影響があると考えられる十二指腸の粘膜に存在する細菌叢を分析した。その結果、腎臓病患者では腸内細菌叢の多様性が低下し偏りが見られた。尿毒素物質の代謝にかかわる細菌叢が増加しており慢性腎臓病による尿毒症には腸内細菌が関係していることが明らかとなった。さらに腎移植レシピエントは胃十二指腸潰瘍が発症しやすいことも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢が慢性腎臓病による症状に関わっていることを示した。腸内細菌叢の制御により尿毒症の緩和や慢性腎臓病の進展が予防できるかもしれない。一般的に腸内細菌が様々な臓器に影響を与えていることが知られているが機序はよく分かっていない。今回の研究は代謝物を介して影響していることを示しており、ほかの臓器でも代謝物に着目した検討が有用であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：How is the intestinal microbiota involved in chronic kidney disease? We analyzed the microbiota in the duodenum, which is important absorption in digestive tract. The results showed that the diversity of microbiota was reduced in chronic kidney disease patients. The microbiota involved in the metabolism of uremic toxins was increased, indicating that microbiota is involved in uremia in chronic kidney disease. Furthermore, kidney transplant recipients were found to be more developed gastroduodenal ulcer.

研究分野：消化器内科

キーワード：腸内細菌 慢性腎臓病 メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢は、人の持つ遺伝子の 100 倍もの総遺伝子が存在し、人の健康や疾患に腸内細菌は様々な働きを果たすことが予想されている。消化吸収に関して、ヒトが摂取した食物を腸内細菌叢が含む消化酵素や発酵作用により食物を分解しより吸収しやすくしている。腸内細菌はヒト生理的機能のみならず多くの疾患に関与している。腸内細菌の偏りが、当初肥満との関連が報告され、その後同様の視点で、炎症性腸疾患などの消化管疾患、肥満、糖尿病、精神疾患など全身の様々な病態との関連が報告されている。マウスレベルでは個体だけでなく次世代の脳の発達にまで影響がある報告もある。

慢性腎臓病は糖尿病や高血圧を背景に進行し、本邦では 1 年で 4 万人の患者が腎代替療法を必要とする緊迫した医療課題の病態の一つである。慢性腎臓病が進行すると尿素素が蓄積し、インドキシル硫酸やトリメチルアミン N オキシド(TMAO)など腸内細菌叢由来の代謝産物が主な尿素素として知られている。治療面でも原疾患の治療に加え、タンパク制限などの食事療法が行われているが、細菌の酵素が食事療法に影響を及ぼすことが報告されるなど、腸内細菌叢は慢性腎臓病の病態の進行にも治療ターゲットとしても着目されている。そこで本研究は腸内細菌叢が慢性腎臓病の病態にいかに関わるか研究することとした。

2. 研究の目的

本研究は消化吸収の中心臓器である小腸内の細菌叢のメタゲノム解析により同定し、小腸内の細菌由来の代謝産物などの腸内環境が全身疾患へ与える影響を解析することである。

小腸は消化吸収の中心的役割を果たす。3 大栄養素の糖もアミノ酸も脂質も吸収の大部分は小腸で行われている。しかし小腸はアプローチが困難な臓器であり、検体採取にはダブルバルーン内視鏡など特殊な内視鏡が必要である。世界的に見てもバルーン小腸内視鏡は日本発のモダリティーであり小腸内視鏡の普及度や操作技術は世界トップクラスであり、小腸粘膜を用いた研究は他国よりも優位性がある。当研究室では豊富な小腸内視鏡の検査件数を経験し小腸内細菌叢の採取方法においてもブラシ採取を確立することで侵襲の軽減に成功している。

多くの研究が容易に採取できる便検体を用いている。近年の網羅的メタボローム解析から個体の細菌代謝産物の影響は消化管粘膜のほうが影響が大きい代謝産物が多く報告されている。代謝産物の吸収部位を考えると妥当であり、その中で尿素素はアミノ酸代謝産物であるから十二指腸や小腸での産生が重要と予想されるが小腸の細菌叢は採取が困難であることから健常者においてもいまだ報告がほとんどない。尿素素の産生は腸管の細菌叢由来のものが多く小腸の細菌叢と慢性腎臓病関係を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

小腸の細菌叢の検討としてバルーン小腸内視鏡を経口と経肛門法で施行した 29 名の患者より、胃、十二指腸、空腸、回腸、回腸末端、直腸の 6 部位をブラシ法により擦過し粘膜関連細菌叢を得、また検査前後に便を採取し合計 133 サンプルの DNA を抽出し PCR で 16S リボソームを増幅し、次世代シーケンサーにより DNA 配列を解析し菌叢解析を行った。

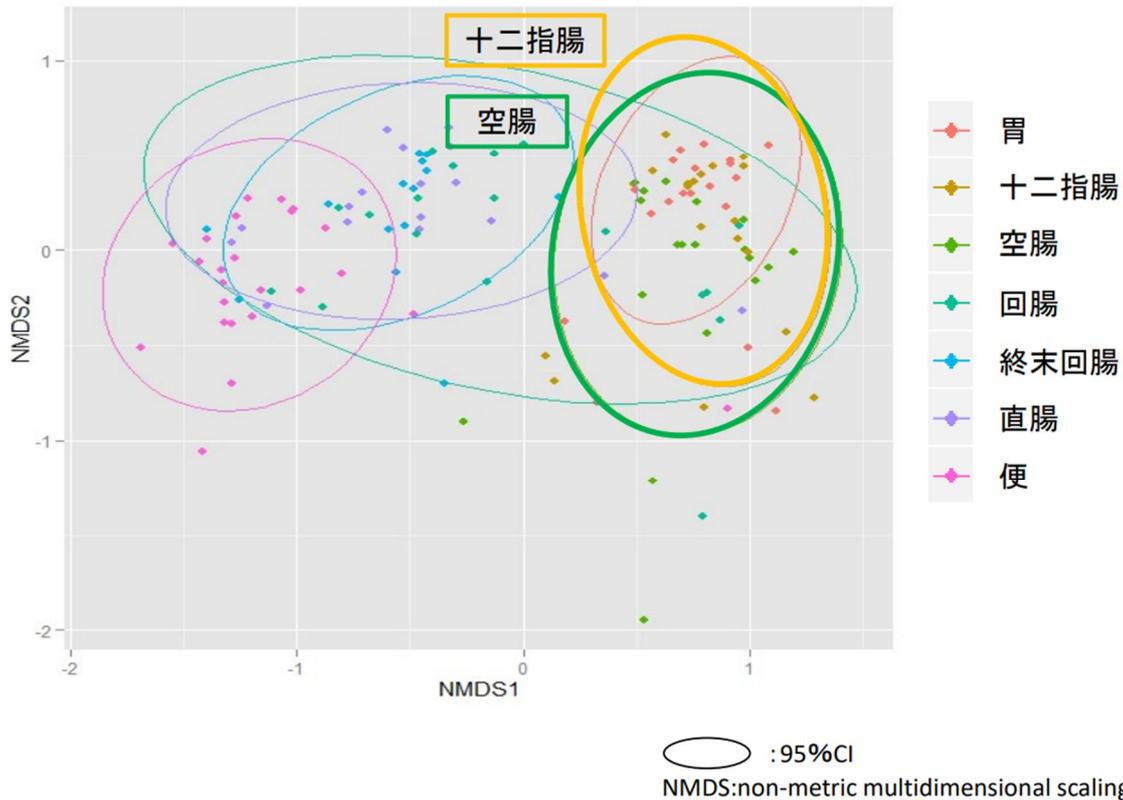
CKD にかかわる細菌の研究対象は CKDstage5 の 28 名と健常者の 21 名で上部消化管内視鏡検査を行い、十二指腸粘膜を擦過し粘膜関連細菌叢を得た。また関連して便検体も採取した。QIIME2 で細菌叢の構成を解析し、PICRUST2, STAMP を用いて機能予測を行った。また CKD にかかわる内視鏡検査を後方視的に見直し 1304 名について画像評価を行った。臨床情報を採取し消化性潰瘍のリスクファクターについて多変量解析により抽出した。

4. 研究成果

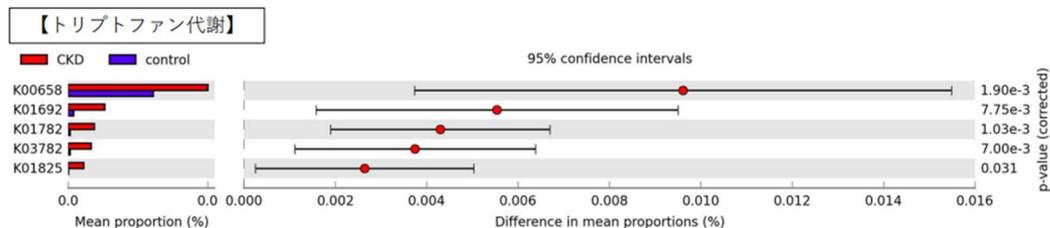
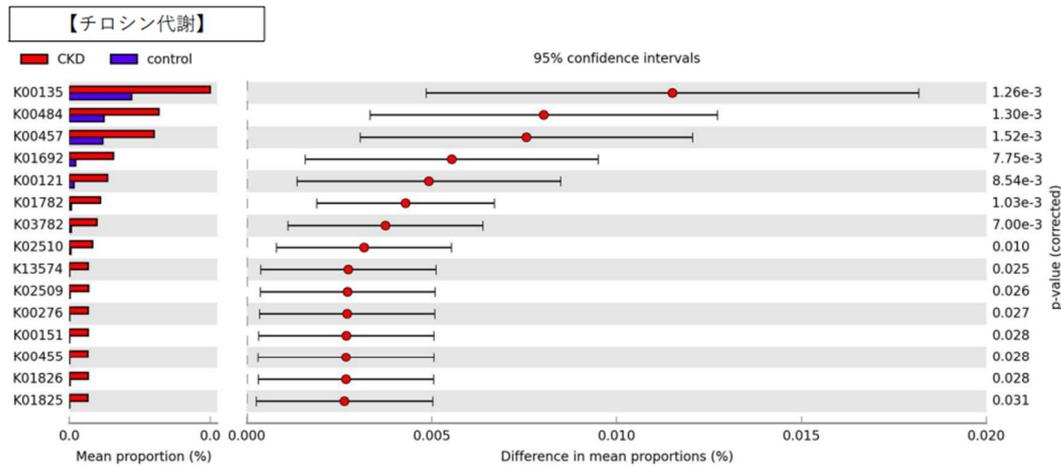
消化管の各部位と便との細菌叢の違い

小腸内視鏡を経口と経肛門法で施行した患者より、胃、十二指腸、空腸、回腸、回腸末端、直腸の 6 部位と便の全消化管の腸内細菌叢を網羅的に比較した。対象患者の疾患として内視鏡の結果異常なしが 20%、濾胞性リンパ腫 27%Peust-Jeghes 症候群 10.3%などの患者から採取した。便はより直腸に近く、大腸や小腸とは明らかに異なっていた。小腸(空腸・回腸)は十二指腸の細菌叢と類似性が高いことが明らかとなった。多様性を図に示す(図 1)。Vellonella や Streptococcus が空腸に多いことが特徴的でこれらは直腸や便と大きく異なった。過去の多くのメタゲノム研究は便検体を用いているが、消化管各所と便では細菌組成が異なっており、粘膜細菌叢の重要性が示唆された。以後の検討は主に十二指腸でおこなった。小腸内視鏡は上部内視鏡に比べると侵襲がややあることと疾患の偏りを生じないため検査頻度が多い、十二指腸細菌叢をターゲットとすることにした。また尿素素に関連している細菌や予想機能解析から十二指腸での解析が意義があることを確認した。これらの内容は文献 1 にまとめ報告した。

β多様性 (Unweighted UniFrac distance) 主座標分析



CKD 患者の粘膜関連細菌叢
腎腸連関について CKD 患者における十二指腸の粘膜関連細菌叢と便中細菌叢を解析した。対象は CKDstage5 の 28 名と健常者の 21 名で、16S メタゲノム解析を次世代シーケンサーにより行った。両群で年齢、男女比、最近に影響があると知られている制酸薬などには違いがない対象者



である。
CKD の内訳として慢性糸球体腎炎(32.1%)、DM(28.6%)、高血圧(10.7%)の順であった。QIIME2 で細菌叢の構成を解析すると CKDstage5 では対象者に比べ Cho1-index による評価で 多様性が有意に低下していた。多様性も NMDS 法で有意に異なっていることが示された。菌叢解析では

Veillonella と Prevotella 属が減少していることが特徴的であった。一方便検体ではこれらの差が見られず、便では便秘や内服薬などの様々な影響を受けやすいことが示唆され、十二指腸は細菌叢の違いが分かりやすいといえた。

尿毒素に関連するチロシン代謝とトリプトファン代謝にかかわる細菌が CKD 患者では著明に増加していた。有意な差があるものはすべて CKD 群で増加していた(図 2)。このことから十二指腸で産生される尿毒素が CKD の stage と関連していることが示された。この差も便では見られなかった。産生された尿毒素やアミノ酸は十二指腸や小腸で吸収されるため、これまでの一般的に研究されてきた便による差よりも十二指腸での差は個体に影響があると予想される。これらの内容は文献 2 にまとめ報告した。

我々の報告の後に IgA 腎症では細菌叢の異常により IgA の糖鎖修飾が変化し IgA 蓄積が多いことが報告された。我々の検討では細菌叢の機能予測解析でスクロース分解やガラクトシダーゼ分解が低下しペプチドグリカン代謝が上昇する変化順であり、糖の修飾は十二指腸細菌叢でも何等か関連があるのかもしれない。

腎移植患者と CKD 患者における消化性潰瘍

また本研究に付随して上部消化管内視鏡検査を見直すと腎移植レシピエントで消化性潰瘍が多いことに気づいた。そのため過去の検査を後方視的に見直すと、腎移植レシピエントでは 6.5% 程度と CKD 患者では 2.1% と高頻度に胃十二指腸潰瘍を発症していることが分かった。CKD 患者も一般的な通院患者に比べると消化性潰瘍が多いことが言える。潰瘍を有する腎移植レシピエントは CKD 患者に比べ若年で、萎縮性炎や HP 感染などの通常のリスクは低く、制酸薬も内服しているにもかかわらず発症しており通常と異なるリスクが考えられた。また通常の治療では難治性であることが示された。肝移植レシピエントも併せて解析を行い移植レシピエントでは胃十二指腸潰瘍が多いことが明らかとなった。リスク因子について多変量解析でも NSAIDs やピロリ菌と同程度のリスクとしてミコフェノール酸モフェチルが候補として考えられた。これらも免疫抑制により細菌や CMV などの感染の影響を受けやすくなったのか薬剤の直接粘膜障害であるかなど検討が必要である。これらの内容は文献 3, 4 にまとめ報告した。

文献

1. Nagasue T, Hirano A, Torisu T*, Umeno J, Shibata H, Moriyama T, Kawasaki K, Fujioka S, Fuyuno Y, Matsuno Y, Esaki M, Kitazono T. The Compositional Structure of the Small Intestinal Microbial Community via Balloon-Assisted Enteroscopy. *Digestion*. 2022;103(4):308-318.
2. Kondo M, Torisu T*, Nagasue T, Shibata H, Umeno J, Kawasaki K, Fujioka S, Matsuno Y, Moriyama T, Kitazono T. Duodenal microbiome in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2023 Dec 14
3. Kondo M, Torisu T, Ihara Y, Kawasaki K, Umeno J, Kawatoko S, Tsuchimoto A, Nakano T, Okabe Y, Kitazono T. Clinical Features of Gastroduodenal Ulcers in Kidney Transplant Patients. *Intern Med*. 2023 Dec 1;62(23):3437-3443.
4. Kakizoe K, Torisu T*, Ihara Y, Harada N, Yoshizumi T, Fujioka S, Kondo M, Kitazono T. Gastroduodenal ulcers in liver transplant recipients under immunosuppressive therapy. *Dig Dis*. 2023 2023;41(4):565-571.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kondo Masahiro, Torisu Takehiro, Nagasue Tomohiro, Shibata Hiroki, Umeno Junji, Kawasaki Keisuke, Fujioka Shin, Matsuno Yuichi, Moriyama Tomohiko, Kitazono Takanari	4. 巻 28
2. 論文標題 Duodenal microbiome in chronic kidney disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 263 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-023-02434-x	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 Nagasue Tomohiro, Hirano Atsushi, Torisu Takehiro, Umeno Junji, Shibata Hiroki, Moriyama Tomohiko, Kawasaki Keisuke, Fujioka Shin, Fuyuno Yuta, Matsuno Yuichi, Esaki Motohiro, Kitazono Takanari	4. 巻 103
2. 論文標題 The Compositional Structure of the Small Intestinal Microbial Community via Balloon-Assisted Enteroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000524023	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 Kondo Masahiro, Torisu Takehiro, Ihara Yutaro, Kawasaki Keisuke, Umeno Junji, Kawatoko Shinichiro, Tsuchimoto Akihiro, Nakano Toshiaki, Okabe Yasuhiro, Kitazono Takanari	4. 巻 62
2. 論文標題 Clinical Features of Gastroduodenal Ulcers in Kidney Transplant Patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3437 ~ 3443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1508-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kakizoe Kozue, Torisu Takehiro, Ihara Yutaro, Harada Noboru, Yoshizumi Tomoharu, Fujioka Shin, Kondo Masahiro, Kitazono Takanari	4. 巻 41
2. 論文標題 Gastroduodenal Ulcers in Liver Transplant Recipients under Immunosuppressive Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Digestive Diseases	6. 最初と最後の頁 565 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000530472	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤 雅浩, 鳥巢 剛弘, 柿添 梢, 井原 勇太郎, 土本 晃裕, 岡部 安博, 北園 孝成
2. 発表標題 当院における腎移植後患者に対する胃十二指腸潰瘍の臨床的検討
3. 学会等名 118回日本消化器病学会 九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥巢 剛弘, 井原 勇太郎, 近藤 雅浩
2. 発表標題 臓器移植レシピエントにおける消化性潰瘍
3. 学会等名 第65回日本消化器病大会JDDW 2023
4. 発表年 2023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	鳥巢 久美子 (Torisu Kumiko) (20448434)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	梅野 淳嗣 (Umeno Junji) (70621704)	九州大学・大学病院・助教 (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
---------	---------