

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16178

研究課題名（和文）糖尿病性腎臓病における腸腎連関の解明と新規DKDバイオマーカーの確立

研究課題名（英文）The clinical application of a novel biomarker of DKD and the clarification of gut-microbiota axis in DKD

研究代表者

菊地 晃一（Kikuchi, Koichi）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10845259

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎臓病（DKD）の新規マーカーとしてフェニル硫酸（PS）に着目し臨床的有用性を複数の糖尿病患者コホートで示した。第一に血中PS濃度とDKD患者のアルブミン尿（ACR）増悪が示されているUCAREコホート（Nat. Commun. 2019）で、重回帰分析で尿中PS・Cr補正値はACRと有意に相関し微量アルブミン尿期の患者群では尿中PS・Cr補正値は2年後のACRの増悪と有意に相関した。次にThe 2nd Joslin Kidney Studyで2型糖尿病患者の腎症の発症・進展の危険因子を探索した。腎症の進行が遅い群と腎不全発症群の2群を比較しPSは腎不全発症群で有意に高いことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎臓病（DKD）は末期腎不全に至る最も多い原疾患だが、アルブミン尿（ACR）やeGFRといった既存の指標だけでは、どの糖尿病患者がDKDを発症し腎不全に至るリスクが高いかを予測するには不十分である。我々はDKDの新規マーカーとして腸内細菌由来の尿毒素であるフェニル硫酸（PS）に着目し先行研究で血清PSは糖尿病患者のACR増悪を予測することを示しているが、今回の研究で尿中PSもACRの増悪を予測する因子であることを明らかにした。更に別の糖尿病患者コホートでの解析で血中PSが早期にeGFRが低下群で有意に高いことを示した。これらの成果はPSの新規DKDマーカーとしての有用性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：We focused on phenyl sulfate (PS) as a novel marker of diabetic kidney disease (DKD) and demonstrated its clinical utility in two diabetic cohorts.

First, in the UCARE cohort (Nat. Commun. 2019), where blood PS levels and albuminuria (ACR) exacerbation in DKD patients have been shown, multiple regression analysis showed that urinary PS and Cr corrected values significantly correlated with ACR, and in the group of patients in the microalbuminuria phase, urinary PS and Cr corrected values significantly correlated with ACR exacerbation after 2 years. The urinary PS and Cr corrected values were significantly correlated with worsening of ACR at 2 years in patients with trace albuminuria. Next, the 2nd Joslin Kidney Study explored risk factors for the onset and progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. Comparing two groups, one with slow progression of nephropathy and the other with onset of renal failure, PS was significantly higher in the group with onset of renal failure.

研究分野：腎臓

キーワード：糖尿病性腎臓病 尿毒素 腸腎連関 フェニル硫酸 UCARE study 腸内細菌 バイマーカー

1. 研究開始当初の背景

DKDは末期腎不全に至る最多の原疾患で33万人を超える維持透析患者の約4割を占める。したがってどの糖尿病患者がDKDを発症し末期腎不全に進展しやすいかを早期に見極め、積極的かつ効率的な介入を行うことが重要である。しかしアルブミン尿や血清クレアチニン等の既存の評価マーカーだけでは測定時点での病期は判定できても予後の予測は困難で、既存のバイオマーカーとは独立した新たなバイオマーカーが求められている。国は糖尿病性腎症重症化予防プログラムを立ち上げ糖尿病性腎臓病患者の掘り起こしと病院への紹介や栄養指導を進めているが厳密な血糖管理やRAS系阻害剤を中心とした血压管理等のいわば糖尿病一般の治療以外にDKDに有効かつ特異的な治療はないことが研究課題である。

糖尿病患者では発症早期から正常とは異なる体内や腸管内での代謝物動態が起き病態を修飾しており、それらの代謝物の中にDKDの発症や進展に関わる代謝物が存在する可能性がある。申請者はヒト腎臓特異的な不要代謝物の排泄トランスポーター(SLCO4C1)をラットの腎臓に強制発現させたトランスジェニックラット(Mikkaichi T. et al. *PNAS*2004, Toyohara T. et al. *JASN*2009)を作製し糖尿病誘発下での表現型を解析したところ、トランスジェニックラットはコントロール群と比較して蛋白尿が有意に減少し糸球体基底膜肥厚やポドサイトの消失などDKDに特徴的な病理所見が著明に改善していた。そこで申請者は網羅的メタボローム解析法を用いた血中代謝物の比較解析からDKDのマーカーかつ原因候補物質としてフェニル硫酸(PS)を同定した(Kikuchi K. et al. *Nat. Commun.* 2019)。

申請者は糖尿病マウスにPSを経口投与するとPSの血中濃度は有意に上昇するとともに糸球体基底膜肥厚やポドサイト障害を惹起しアルブミン尿を増加させることを示した(図1)。

次に申請者は岡山大学との共同研究で糖尿病患者を対象としたコホート(U-CARE study, n=362)を用いたPSと臨床データとの解析から、血中PS濃度はアルブミン尿と有意に相関し、かつ積極的治療介入が重要とされる微量アルブミン尿期の患者ではPSとが2年後のアルブミン尿増悪と有意に相関する唯一の因子であることを示した(図2)。

これはPSがDKD発症の原因物質かつ、臨床的予後予測マーカーになり得る可能性を示している。

図1 フェニル硫酸(PS)はDKDを悪化させる

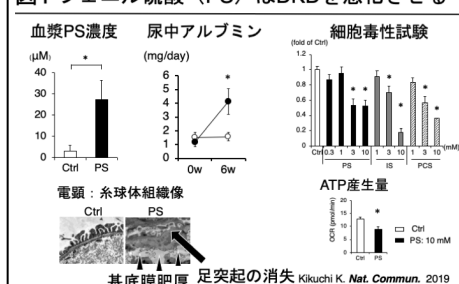
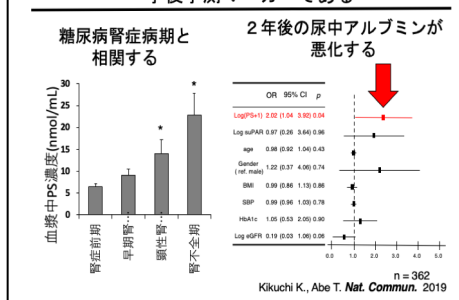


図2 フェニル硫酸は糖尿病性腎症の予後予測マーカーである



2. 研究の目的

本研究の目的は腸内細菌由来物質PSの新規DKD予後予測バイオマーカーとしての有用性の確立である。PSの新規DKDマーカーとして有用性確立のためには先行研究で解析した岡山大学の糖尿病患者コホート(U-CARE)とは別のコホートを用いて再現性を確認する必要がある。また臨床で汎用性の高いバイオマーカーの条件として生体サンプルの採取方法は尿検体等、可能な限り非侵襲的であることが求められる。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病患者コホート(U-CARE)での長期予後解析と尿検体を用いた検討

申請者は既に予検討で血液と尿中のPS濃度が相関することを確認しており、UCARE studyの尿検体中のPS濃度の測定し尿中PS値でもアルブミン尿増悪の予測因子となり得るかを検証する。先行研究は2年間の短期間での解析であったが、本研究では解析起点から5年後の臨床データとPSの相関を解析し長期間でのPSの予後予測マーカーとしての有用性確立する。

(2) ハーバード大学2型糖尿病コホートを用いた解析

申請者らの共同研究先であるハーバード大学Krolewski教授らはI型糖尿病患者が腎不全に至る因子としてPSを含む9因子を報告している。申請者は腸内細菌由来尿毒素とハーバード9因子の合計14種の代謝物を一斉に測定する安定同位体を用いた精密定量的測定系を確立した(図9)。本研究ではUCAREコホートとは別のハーバード大学が保有する2型糖尿病コホートThe 2nd Joslin Kidney Study(*Kidney Int.* 93: 1198, 2018)の718名の血液検体を用いて14種の因子を測定し臨床情報と統合的解析を行い腎症の発症や進展との相関を検証する。

4. 研究成果

(1) 糖尿病患者コホート (U-CARE) での長期予後解析と尿検体を用いた検討について
UCARE コホート (n=362) のベースラインの年度に採集された尿サンプル中の PS 濃度を LCMS/MS で測定し、血中 PS 濃度と同様に臨床パラメータとの相関を解析した。尿中 PS 値には尿の濃縮度による濃度差を是正するため尿中クレアチニン (Cr) 濃度で補正した値を用いた。まず、尿中 PS・Cr 補正値は血中 PS 濃度と強い相関を示した ($p<2.2e^{-16}$)。尿中 PS・Cr 補正値とベースラインの臨床パラメータとのスピアマンの単相関解析では、尿中アルブミン量の他、年齢、糖尿病罹病期間、BMI と有意な相関を示した。また尿中アルブミン量を目的変数とし尿中 PS・Cr 補正値および糖尿病性腎症の進展に寄与すると報告されている臨床パラメータを用いた重回帰分析では、尿中 PS・Cr 補正値、性別、eGFR が尿中アルブミンと有意な相関を示した。さらに腎不全への進行を防ぐために適切な治療介入が重要とされる微量アルブミン尿期の患者群 (n=85) で2年後の尿中アルブミン量の増悪の有無についてロジスティック回帰分析を行ったところ、尿中 PS・Cr 補正値は尿中アルブミン量の増悪と有意な相関を示した。以上の結果は、血中 PS 濃度を用いた解析結果に一致する。尿サンプルは血液サンプルよりも非侵襲的に採取することが可能であり、PS が糖尿病性腎臓病の汎用性の高い尿中アルブミン量増悪予測マーカーとなる可能性を示すものである。次に5年間の長期観察期間で血中 PS 濃度および尿中 PS・Cr 補正値と腎予後 (尿中アルブミン量増悪、eGFR 低下) との相関の有無についてロジスティック回帰分析を用いて解析した。尿中アルブミン量の増悪については、5年間追跡可能であった 155 例について解析を行ったが、血中・尿中 PS 値ともに5年後の尿中アルブミン量増悪との相関は得られなかった。eGFR の低下との相関については微量アルブミン尿群の患者 (n=35) に尿中 PS・Cr 補正値が eGFR 低下と一対一の単体比較では有意な相関を示した。

(2) ハーバード大学 2 型糖尿病コホートを用いた解析

ハーバード大学ジョスリン糖尿病センターの 2 型糖尿病患者コホート (The 2nd Joslin Kidney Study n=718) を用いて 2 型糖尿病における腎症の発症・進展の危険因子の探索を行った。腸内細菌由来の尿毒素 4 種類 (インドキシル硫酸、パラクレシル硫酸、フェニル硫酸、TMAO)、急性期の細胞障害マーカーである 1-メチルアデノシン (JASN 2018) に加え、ハーバード大学の Krolewski 教授が 1032 人の 1 型糖尿病患者の 11 年の追跡調査から腎不全に至る危険因子として報告している 9 種類 (N-acetylalanine、N-acetylserine、N-acetylthreonine、N6-acetyllysine、N6-carbamoylthreonyl adenosine、C-glycosyltryptophan、pseudouridine、O-sulfotyrosine、phenol sulfate : フェニル硫酸の別名) (*Diabetes Care* 2017) の代謝物と腎予後との相関について解析を行った。718 例の 2 型糖尿病患者を 10 年間の観察期間の中で腎症の進行が遅い群 (n=636, eGFR 低下: -2.8 mL/min/year) と腎症の進行が早い腎不全発症群 (n=82, eGFR 低下: -9.8 mL/min/year) に分けて解析を行ったところ、血中の 1-メチルアデノシンとフェニル硫酸は腎不全発症群で有意に高く、2 型糖尿病患者において末期腎不全発症を予測する血中バイオマーカーになりうることを、治療標的になり得ることを明らかにした。また、本結果は UCARE とは人種や臨床的プロフィールの異なる糖尿病患者コホートでもフェニル硫酸が糖尿病性腎症進行の予測因子であることが示され新規バイオマーカーとしての有用性を確立するものである。

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 0件）

1. 著者名 Ho HJ, Kikuchi K, Oikawa D, Watanabe S, Kanemitsu Y, Saigusa D, Kujirai R, Ikeda-Ohtsubo W, Ichijo M, Akiyama Y, Aoki Y, Mishima E, Ogata Y, Oikawa Y, Matsuhashi T, Toyohara T, Suzuki C, Suzuki T, Mano N, Kagawa Y, Owada Y, Katayama T, Nakayama T, Tomioka Y, Abe T.	4. 巻 9
2. 論文標題 SGLT 1 specific inhibition ameliorates renal failure and alters the gut microbial community in mice with adenine induced renal failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15092	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 9.Oribe S, Toyohara T, Mishima E, Suzuki T, Kikuchi K, Watanabe S, Morita Y, Ota H, Seiji K, Miyazaki M, Takase K, Abe T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Fibromuscular dysplasia with recurrence after "long-term" following percutaneous transcatheter renal angioplasty: two case reports with a review of 26 patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-021-02342-w.	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 11.Akiyama Y, Kikuchi K, Toyohara T, Mishima E, Suzuki C, Suzuki T, Nakayama M, Tomioka Y, Soga T, Abe T.	4. 巻 13
2. 論文標題 CE-MS-Based Identification of Uremic Solutes Specific to Hemodialysis Patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins (Basel).	6. 最初と最後の頁 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13050324.	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 16.Oikawa D, Yamashita S, Takahashi S, Waki T, Kikuchi K, Abe T, Katayama T, Nakayama T.	4. 巻 590
2. 論文標題 (+)-Sesamin, a sesame lignan, is a potent inhibitor of gut bacterial tryptophan indole-lyase that is a key enzyme in chronic kidney disease pathogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 158-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.088.	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 2件）

1. 発表者名 Koichi Kikuchi, Takaaki Abe.
2. 発表標題 he gut microbiome-derived phenyl sulfate is a novel predictive marker and cause of albuminuria in diabetic kidney disease.
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koichi Kikuchi, Ryota Kujirai, Yotaro Matsumoto, Koki Mise, Tomohiro Nakamura, Jun Wada, Yoshihisa Tomioka and Takaaki Abe
2. 発表標題 12. Urinary phenyl sulfate predict the 2-year ACR deterioration in a DKD cohort.
3. 学会等名 The 11th Scientific Meeting of the Chronic Kidney Disease Frontier. (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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