

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860688

研究課題名(和文)慢性腎臓病における腸管内環境の変化とその病態に及ぼす影響

研究課題名(英文)intestinal environment in CKD and its influence on the disease

研究代表者

吉藤 歩 (YOSHIFUJI, AYUMI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70573286

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)：近年、腸内細菌は様々な病気と関連があるといわれております。私たちは慢性腎臓病が腸内細菌を変化させるのか、またその変化が腸内の環境にどのような影響を与えるのかについて慢性腎臓病モデルを用いて、研究を行ってきました。そして、我々は慢性腎臓病では腸内細菌のうち、ラクトバチルスと呼ばれる菌が低下していることを確認しました。そして球形吸着炭およびラクトバチルスを補充することで慢性腎臓病によって引き起こされる腸管環境の悪化を改善させること、体全体に及ぼす炎症を低下させる作用があること、腎臓病のひとつの指標である蛋白尿を減少させることを発見し、国際学会で発表および国際学会誌に報告しました。

研究成果の概要(英文)：Microbiota is said to be related with various diseases recently. Therefore, we performed experiments to clarify if chronic kidney disease could change microbiota using chronic kidney disease rats. And we examined how the changed microbiota could influence on the intestinal environment. We found that Lactobacillus was decreased in CKD. So carbon adsorbent administration or Lactobacillus supplementation were performed and we reported that they improved the intestinal environment, systemic inflammation and pretein uria in CKD rats. These results were presented in the international conferences and some of them are accepted in international journal.

研究分野：慢性腎臓病

キーワード：慢性腎臓病 腸内細菌叢 タイトジャンクション 慢性炎症 腸管透過性 尿毒性物質 球形吸着炭  
ラクトバチルス

### 1. 研究開始当初の背景

CKD 患者は増加し続け、そのエンドポイントである末期腎不全に伴う透析導入、心血管イベントは、**国民の健康に重大な影響**を及ぼしている。また、CKD の罹患率は高く現在 CKD の適切な治療介入が急務となっている。その対策として日本腎臓学会では、食事療法・運動療法に加え、降圧・糖尿病の血糖コントロール・脂質のコントロールなど包括的治療が重要であると述べている。その治療のひとつとして **CKD により蓄積するといわれる尿毒素に対する治療**が掲げられている。尿毒素の代表的なものとしては、**インドキシル硫酸**が知られている。インドキシル硫酸は体内に蓄積すると腎臓をはじめ、血管などに主に酸化ストレスの亢進を介し障害を与える。食事で摂取される食物中のトリプトファンが大腸菌などの腸内細菌によってインドールに変換された後、肝臓にて硫酸抱合を受けインドキシル硫酸が合成される。インドキシル硫酸は腎機能が正常であれば、腎臓から排泄されるが腎機能障害が進行すると排泄が十分に行えず血液中に貯留する。**球形吸着炭**を経口投与すると、腸管内で産生されたインドールを吸着し糞便中に排泄し、インドールの肝臓への移行を減少させ、インドキシル硫酸の産生量を減少させる。つまり、球形吸着炭は、インドキシル硫酸の合成前駆物質インドールを除去する事により、**尿中及び血清中インドキシル硫酸の濃度の上昇を抑え、CKD の進行を抑制する。**

このように CKD と腸管内環境と間には密接な関係があるにもかかわらず、いまだその研究は十分にされていない。近年、**腎不全と腸管の関係が注目され「kidney-gut axis」(腸-腎連関)**(Ritz E., et al. Blood Purif. 2011)という概念が提唱されている。

物実験において、5/6 腎摘ラットでは bacteria translocation が増加し、腸管組織の障害が認められた報告(de Almeida Duarte JB, et al. Urol Res. 2004) や 5/6 腎摘ラットに prebiotics を投与することで寿命延長、BUN の低下を認めた報告(Ranganathan N et al. ASAIO J. 2006)がある。一方、ヒトでも同様の報告が認められる。例えば、24 人の ESRD 患者と 12 人のコントロールとの比較で Actinobacteria, Gammaproteobacteria は腎不全患者で多く Clostridia, Bacteroidetes, Betaproteobacteria は少ないと報告されている(Nosratola DV et al., 2011 ASN abstract)。このようにいままでも注目されてこなかった腸と腎臓の臓器連関、すなわち「**腸腎連関**」という新たな概念を探求することは、CKD の新しい治療法の開発につながると考えられ、**現在活発に研究が行われつつある。**

### 2. 研究の目的

CKD における腸内細菌叢をはじめとする腸

**管内環境の変化を明らかにし、CKD の病態における意義を解明する。そして、球形吸着炭投与や Probiotics による腸内環境の変化について検討し、治療効果との関連を検討する。**

### 3. 研究の方法

球形吸着炭を用いた研究

6 週齢の自然高血圧ラット (SHR) に 5/6 腎摘を行い、慢性腎不全モデルを作成した。慢性腎不全モデルに対し球形吸着炭 (AST) を投与した。ラットを SHR (SHR)・5/6 腎摘 (Nx)・5/6 腎摘+ (Nx+AST) の 3 群に割り付け、AST は 4g/kg/日の投与を混餌にて行った。12 週後、各群で生化学項目・血中 IL-6・糞便の尿毒性物質の濃度 (Indole, p-cresol, phenol)・腸管の分子学的な変化 (TLR2 発現および tight junction の発現) について比較検討した。また、腸内細菌叢の変化について、T-RFLP および RT-PCR にて検討した。

Lactobacillus を用いた研究

自然発症高血圧ラット (SHR) を 6 週齢で 5/6 腎摘を行い、12 週間飼育し、腎不全ラットを作成した。まず sham 手術群 (SHR 群) と腎不全ラット (Nx 群) の腸内細菌の分布の変化を検討した。次にこの検討で明らかとなった *Lact* の低下に対し、飼育中に *Lact* を  $1 \times 10^{10}$  CFU/kg/day 投与し (Nx + *Lact* 群)、腎不全の進行抑制効果について検討した。SHR 群、Nx 群、Nx+*Lact* 群の 3 群について、血液生化学指標、尿タンパク量、血中尿毒性物質 (血中インドキシル硫酸 (IS)、血中 p-クレシル硫酸 (PCS))、炎症性マーカー (Lipopolysaccharide (LPS)、CRP、IL-6)、腎組織、腸内細菌叢、便中尿毒性物質 (indole・p-cresol・phenol)、腸管の tight junction (TJ; claudin-1、ZO-1、Occludin)、Toll like receptor 2 (TLR2) の発現を比較した。腸内細菌叢については Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法、RT-PCR 法にて解析を行った。また、SHR に 6 週齢で 5/6 腎摘を行い、4 種の抗菌薬 (Anti; Ampicillin、Neomycin、Vancomycin、Metronidazole) を経管投与し、「腸管内無菌状態」を作成し、8 週間飼育し、SHR 群、Nx 群、SHR + Anti 群、Nx+Anti 群、Nx+Anti + *Lact* 群の 5 群に先程と同様の検討を行なった。

細胞実験を用いた研究

ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞に尿毒素前駆物質である indole を投与するとともに、*Lact* および Toll-like receptor (TLR) 阻害剤 (OxPAPC) を前投与し、腸管 TJ の発現について検討した。腸管透過性については FD-4 (Fluorescein isothiocyanate dextran-4) を用いて検討した。

### 4. 研究成果

球形吸着炭を用いた研究

腸内細菌叢の分析では、Nx 群において *Lact* の減少をみとめ、この変化は Nx+AST 群で改善していた。糞便中の尿毒性物質である

indole, p-cresol, phenol は Nx 群では有意な差は認めなかったが、Nx+AST 群で有意に増加した。また、血中インドキシル硫酸および尿蛋白は Nx 群で有意に増加し、Nx+AST 群で改善していた。また、血中 IL-6 についても同様の变化を示した。さらに、TLR2 の発現は腎不全群で低下し、Nx+AST 群で改善をみとめた。また、tight junction 蛋白である Occludin, Zo-1, Claudin-1 は腎不全群で低下し、Nx+AST 群で改善をみとめた。以上の研究から、慢性腎不全において、腸管内の尿毒性物質が変化しなかったが、腎不全群では Lact が低下し、AST を補充することにより、Lact が有意に増加することがわかった。また、AST の腎保護作用の一端は Lact が TLR2 の経路を通じて、tight junction 蛋白の発現を改善させる重要な役割を担っていることがわかった。また、AST が慢性腎不全により増加した血中のインドキシル硫酸や IL-6 を低下させた。

AST は TLR2 を介して、Lact を増加させ、腸管内環境を改善し、腎不全進行抑制に寄与させるというメカニズムの一端を示すことが出来た。今後、Lact や AST による Probiotics 療法は慢性腎不全進行を遅延させる治療戦略として重要と考えられた。

#### Lactobacillus を用いた研究

腸内細菌叢の解析より Nx 群において Lact の減少を認めた。Lact 補充実験においては、予想通り、Lact の菌量は Nx+Lact 群で回復した。便中 indole, p-cresol, phenol は Nx 群では有意に上昇したが、Nx+Lact 群では有意な変化は認めなかった。IS、PCS、LPS、IL-6、CRP および尿タンパクは Nx 群で増加し、Nx+Lact 群で改善した。腸管では TJ の Occludin、ZO-1、さらに TLR2 は Nx 群で低下し、Nx+Lact 群で改善した。「腸管内無菌状態」の Nx+Anti 群でも Lact 投与により血中 IS、尿タンパクの改善効果を認めた。

#### 細胞を用いた研究

Caco-2 細胞において、indole は濃度依存的に TJ の発現を低下させ、Lact 投与によりその発現低下が改善した。Lact による改善効果は OxPAPC により消失した。indole 投与による細胞透過性の亢進も、Lact 投与により改善した。また、Lact により TLR2 は増加した。

と から得られた知見

Lact は TLR2 の経路を通じて、TJ の発現を改善させ、腸管透過性を回復させたと結論した。また、慢性腎不全では腸管内の尿毒性物質である indole や p-cresol が腸管透過性の亢進により体内へ侵入し、IS および PCS が上昇するが、Lact による腸管透過性の改善効果によりこれらが低下し、慢性腎不全の進行を抑制させると考えられた。また、慢性腎不全における腸管透過性の亢進により腸管内の血中 LPS が増加し、炎症性マーカーである CRP、IL-6 の上昇をきたし、Lact がこれらを低下させ、腎保護作用を認めたと考えられた。上記結果は Yoshifuji A, et al. Nephrol Dial

Transplant: 31 (3); 401-412, 2016 にて報告した。今後の展望

今回行ってきた研究では、*Lactobacillus* の菌種の同定や他菌種が腸内環境に与える影響など検討は行っておらず、さらなる研究を進めていきたい。また、TLR2 を介する Tight junction 発現メカニズムについても不明な点が多く、さらなるメカニズムの解析を行い、Probiotics や Prebiotics を超えた腸内環境治療の開発を進めていきたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1, Yoshifuji A, Wakino S, Irie J, Tajima T, Hasegawa K, Kanda T, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H. Gut *Lactobacillus* protects against the progression of renal damage by modulating the gut environment in rats. *Nephrol Dial Transplant*: 31 (3); 401-412, 2016 (査読あり)

2, 脇野 修, 田島 敬也, 吉藤 歩, 伊藤 裕. 【臓器連関】腸内細菌と生活習慣病. 腎・高血圧の最新治療. 5(1), 16-22, 2016 (査読無し)

〔学会発表〕(計 7 件)

1, Ayumi Yoshifuji, Shu Wakino, Junichiro Irie, Takaya Tajima, Kazuhiro Hasegawa, Hirobumi Tokuyama, Hiroshi Itoh. Gut Microbiota *Lactobacillus* Protects against the Progression of Renal Impairment Through the Modulation of TLR2-Mediated Gut Barrier Stability in Rats. American Society of Nephrology Annual meeting, Nov 2015, San Diego (USA)

2, 吉藤 歩・脇野 修・入江 潤一郎・田島 敬也・松井 歩・長谷川 一宏・徳山 博文・伊藤 裕: 慢性腎不全モデルラットにおける *Lactobacillus* による腸管内環境の改善および腎障害進展抑制効果, 第 51 回高血圧関連疾患モデル学会, 2015 年 10 月 30 日, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府吹田市)

3, 吉藤 歩・脇野 修・田島 敬也・入江 潤一郎・長谷川 一宏・徳山 博文・林 晃一・伊藤 裕: 慢性腎不全モデルラットにおける *Lactobacillus* の腸管内環境の改善および腎障害進展抑制効果, 第 58 回日本腎臓学会学術総会, 2015 年 6 月, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

4, Ayumi Yoshifuji, Shu Wakino, Junichiro Irie, Takaya Tajima, Kazuhiro Hasegawa, Hirobumi Tokuyama, Hiroshi Itoh. The Amelioration of gut environment by AST-120 protects against the progression of renal impairment through the activation of TLR2 in CKD rats. European Dialysis and Transplant Association Annual meeting, May 2015, London(UK)

5, Ayumi Yoshifuji, Shu Wakino, Junichiro Irie, Takaya Tajima, Kazuhiro Hasegawa, Hirobumi Tokuyama, Hiroshi Itoh. Gut microbiota *Lactobacillus* protects against the progression of

renal impairment through the modulation of gut environments in rats. European Dialysis and Transplant Association Annual meeting, May 2015, London (UK)

6, **吉藤 歩**・脇野 修・入江 潤一郎・長谷川 一宏・徳山 博文・林 晃一・伊藤 裕; 慢性腎不全モデルラットにおける球形吸着炭の腸管内環境の改善効果, 第 57 回日本腎臓学会学術総会, 2014 年 7 月 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

7, **Ayumi Yoshifuji**, Shu Wakino, Junichiro Irie, Hitoshi Minakuchi, Kazuhiro Hasegawa, Hirobumi Tokuyama, Koichi Hayashi, Hiroshi Itoh. AST-120 improves intestinal environment and microbiota in CKD rats. European Dialysis and Transplant Association Annual meeting, May 2014, Amsterdam, (Netherland)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉藤 歩 (Yoshifuji Ayumi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 70573286