

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19163

研究課題名(和文) 腸内細菌叢を介した尿毒症毒素の生成阻害機構の解明と新規腎不全進行抑制法の確立

研究課題名(英文) Novel therapeutic approaches for renal failure via modulation of the gut microbiota

研究代表者

福森 史郎 (Fukumori, Shiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・特命助教

研究者番号：10714842

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)：腸内細菌叢から産生される種々の尿毒症毒素が、腎不全の増悪や合併症発現に関与することが示唆されている。本研究では、腎不全モデルマウスを用いて、腸内細菌叢をターゲットとした腎不全進行の抑制効果を検証した。その結果、腎不全マウスにプロバイオティクスである *Lactobacillus casei* とプレバイオティクスであるガラクトオリゴ糖を併用投与した場合、尿素窒素の濃度に影響しなかったが、尿毒症毒素であるインドキシル硫酸濃度を低下させる効果が示唆された。本検討により、プロバイオティクスおよびプレバイオティクスの併用は、尿毒症毒素を減少させることにより、腎機能の悪化および合併症を予防できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Indoxyl sulfate (IS) is a protein-bound uremic toxin generated by the gut microbiota. Recently, it has been reported that IS may be associated with the progression of kidney disease and also cardiovascular disease. The aim of this study was to examine the separate and combined effect of probiotics and prebiotics on renal failure using an adenine-induced renal failure mouse model.

The monotherapy with the probiotic bacteria, *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus casei* (*L. casei*), and the prebiotic galacto-oligosaccharides (GOS) did not significantly reduce BUN and serum levels of IS. The combination therapy with *L. casei* and GOS reduce serum levels of IS in renal failure mice compared with the control group, though the difference was not statistically significant ($p = 0.07$).

This study suggested that the combination therapy of probiotics and oligosaccharides could ameliorate the accumulation of uremic toxins by improving the gut microbiota.

研究分野：臨床薬学

キーワード：腎不全 尿毒症毒素 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

腎臓の機能が低下した状態では本来、尿として排泄されるべき種々の毒素が適切に排泄されず、血中に蓄積する。この蓄積した毒素は、尿毒症毒素と呼ばれている。尿毒症毒素は、血液または組織濃度が腎不全患者で増加し、腎不全患者でみられる濃度でその毒性が実験動物や適当な *in vitro* の実験系で証明されているものと定義される。尿毒症毒素の代表的な物質であるインドキシル硫酸 (IS) は、フリーラジカルを産生して細胞を傷害し、腎不全の進行を促進し、さらに心血管疾患の進行など種々の合併症の発症にも関与している (Barreto FC et al., Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2009)。タンパク結合型である IS は、血中でアルブミンと約 90% 結合しており、透析で除去されにくい。そのため、腎不全患者において腎機能の低下を抑制し合併症を減らすためには、IS のようなタンパク結合型の尿毒症毒素を減らすことが重要である。

IS の生成・代謝経路は、腸管内においてトリプトファンが大腸菌等の腸内細菌が産生するトリプトファンゼによりインドールへと変換され、そのインドールが消化管から吸収され、肝臓において代謝され、IS が生成される。腎不全患者では IS の腎クリアランスが低下していることから、血中 IS 濃度が増加する。現在のところ、腎不全患者における尿毒症毒素の除去を目的とした治療は、本邦では腸管内で尿毒症毒素を吸着させる球形吸着炭しか承認されていない。球形吸着炭は慢性腎不全患者や 5/6 腎臓摘出 (5/6 腎摘) マウスにおいて血中 IS 濃度を低下させることが報告されており (Iida et al., Clin. Exp. Nephrol., 2006, Yamamoto et al., Nephrol. Dial. Transplant., 2011)、国内の臨床試験において、吸着炭投与群が従来治療群と比較して、糸球体過剰の減少が抑制され、経口吸着炭に腎保護作用があることが証明された (Akizawa et al., Am. J. Kidney Dis., 2009)。しかしながら、この薬は一度に大量の薬剤を服用する必要があるため服薬遵守が困難であり、併用薬も吸着する等の臨床上の問題も指摘されている。

そこで申請者は、腸内細菌に着目した。Nosratola らの報告では、末期腎不全患者と健常者を対象に採取された便サンプルに含まれる微生物の DNA を分析したところ、末期腎不全患者と健常者では、腸内細菌叢において約 190 種類の細菌の数に違いが見られることを示している (Nosratola et al., Kidney International, 2013)。この報告では、通常腎臓によって排出される尿毒症毒素が消化管に存在することによって、腸管内の pH 変化に関与し、細菌の成長や優位性に影響を与えたためと推察している。加えて、腎不全患者では大腸菌などのトリプトファンゼ産

生菌が増加し、*Bifidobacterium* などの有用菌が減少することが報告されている (Hida et al., Nephron, 1996)。腎不全により乱れた腸内細菌叢を改善することができれば、トリプトファンゼ活性が低下し、IS 等の尿毒症毒素の産生が減少すると考える。

腸内環境を整えるものとしてプロバイオティクスおよびプレバイオティクスがあげられる。プロバイオティクスとは、「宿主に有益に働く生きた細菌によって構成される添加物」と定義されており、代表的なプロバイオティクスとしては *Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属などが挙げられる。プレバイオティクスとは、「大腸の有用菌の増殖を選択的に促進し、宿主の健康を増進する難消化性食品」と定義され、代表的なプレバイオティクスとしてはガラクトオリゴ糖 (GOS) やアラビアゴムなどが挙げられる。培地にプレバイオティクスを混合することで、*Lactobacillus* 属が有意に増殖することが報告されている。プロバイオティクスおよびプレバイオティクスを摂取することで、*Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属などの有用菌が増殖し、トリプトファンゼを生産する大腸菌などの有害菌が減少すると考えられている。加えて、ペルペリンは、胆汁分泌作用を有し、この胆汁分泌作用は腸内細菌叢を正常な状態に保持し、腸管内におけるインドールの生成を抑制し、病原菌の増殖を抑えるものと考えられている。

Takayama らが、血液透析を行っている腎不全患者において耐酸性カプセルに封入した *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) を投与したところ、投与 5 週間後に IS の血清中濃度が投与前と比較して有意に低下することを報告している (Takayama et al., Am. J. Kidney Dis., 2003.)。しかしながら、この報告では、末期腎不全である透析患者の血清 IS 濃度推移しか評価されていない。そのため、耐酸性カプセル封入 *B. longum* が、腎不全患者の腎機能低下を抑制するか否か不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、腸内細菌叢を介した新規腎不全進行抑制法の検討を行うため、(1) IS の蓄積により腎不全が持続する慢性腎不全モデルを確立する。(2) 慢性腎不全モデルマウスを用いて、血漿中 IS 濃度の低下作用を有する腎不全進行抑制法を検討する。(3) プロバイオティクスおよびプレバイオティクス投与後の腸内環境に及ぼす影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) アデニン誘発腎不全マウスおよび 5/6 腎臓摘出マウスにおける BUN および血漿中 IS の濃度推移

12 時間明暗周期 (明期 : 7:00 - 19:00) 条

件下で1週間以上飼育した5週齢雄性ICRマウスを使用した。

アデニン誘発腎不全マウスは、ICRマウスにアデニンが0.2% w/wとなるよう混合した粉末飼料を6-8週間自由摂食させた。アデニン含有飼料を給餌終了から0, 2週目に尾採血を行い、腎機能の指標として尿素窒素(BUN)を、尿毒症毒素として血漿中IS濃度を測定した。

5/6腎摘マウスは、1週間馴化後、左腎を2/3摘出し、さらに1週間後に右腎を全摘出した。また、開腹し腎臓を手術野に露出ただけで再び元の位置に戻したものをSham群とした。腎摘出後4週目以降にBUNおよび血漿中IS濃度を測定した。

(2) 腎不全モデルマウスにおけるプロバイオティクス投与によるBUNおよび血漿中IS濃度への影響

アデニン誘発腎不全マウスに、有孢子性乳酸菌である *Lactobacillus sporogenes* (Spores) および耐酸性 *B. longum* を1日1回体重1 kgあたり 1×10^9 cfu となるように蒸留水で懸濁し経口投与し、*Lactobacillus casei* (*L. casei*) を1日1回体重1 kgあたり 5×10^9 cfu となるように蒸留水で懸濁し経口投与した。なお、Sporesは、0.2% w/w となるように粉末飼料に混合し、自由摂食させる投与法も検討した。アデニン含有飼料を給餌終了0, 2週目に尾採血を行い、プロバイオティクスのBUNおよび血漿中IS濃度に及ぼす影響を評価した。

(3) プロバイオティクス及びプレバイオティクス併用によるBUNおよび血漿中IS濃度に及ぼす影響

プロバイオティクスは上記(2)と同様に投与した。プレバイオティクスであるGOSは5% w/wとなるよう粉末飼料に混合し、自由摂食させた。ベルベリンは1日1回体重1 kgあたり200 mgとなるように蒸留水で懸濁し経口投与した。BUNおよび血漿中IS濃度を評価し、血漿中IS濃度を低下させる薬剤を探索した。

(4) プロバイオティクス及びプレバイオティクスのトリプトファナーゼ活性に及ぼす影響

トリプトファナーゼ活性は、一定量のL-トリプトファンを基質として一定量の糞便中のトリプトファナーゼを作用させ、反応生成物であるインドールを、吸光度計を用いて550 nmの吸光度を測定した。(Lee et al. J. Microbiol. Biotechnol; 2009)

なお、アデニン誘発腎不全マウスにおいて、腸内細菌叢が変動しても、腸内pHが大きく変動しないことが示されたことから、評価項目から除外した。(Mishima et al. J Am Soc Nephrol; 2015)

4. 研究成果

(1) 慢性腎不全モデルの構築

当初、アデニンの給餌期間を8週間としていたが、アデニン投与群のBUNおよび血漿中IS濃度がアデニン非投与群と比較して有意に上昇したものの、アデニン給餌終了後2週以内に死亡個体が認められたため、腎不全進行抑制効果を適切に評価できないと考えられた。そこでアデニン給餌終了後も死亡せずに腎不全が持続するモデルを作製するため、ICRマウスに0.2%アデニン含有飼料を6週間または7週間自由摂食させ、アデニンの適した給餌期間を評価した。アデニン給餌終了後から0, 2週目に尾採血を行い、BUNおよび血漿中IS濃度を測定した。アデニン6週間摂取群では、アデニン給餌終了後2週間経過してもBUNは低下せず、血漿中IS濃度も高値を推移した。アデニン7週間摂取群では、アデニン給餌終了後2週間以内に死亡個体が認められたことから、アデニンの投与期間を6週間に設定した。

アデニン誘発腎不全マウスと同様に5/6腎摘出マウスにおいてもBUNおよび血漿中IS濃度を評価した。その結果、BUNおよび血漿中IS濃度がSham群と比較して有意に上昇した。以上の結果から、進行性腎不全モデルであるアデニン誘発腎不全マウスと末期腎不全モデルである5/6腎摘マウスにおいて、ヒトと同様に血漿中IS濃度が上昇することが確認できた。以降の検討は、ヒトの慢性腎不全の病態像と類似している、アデニン誘発腎不全マウスを用いて検討した。

(2) 腎不全モデルマウスにおけるプロバイオティクスの腎不全に及ぼす影響

胃酸に強く生きてきたまま腸内に届く有孢子性乳酸菌 Spores をアデニン誘発腎不全マウスに投与し、BUNおよび血漿中IS濃度に及ぼす影響を評価した。Sporesをアデニン給餌開始と同時に食餌混合投与および連日経口投与し、BUNおよび血漿中IS濃度を評価した。アデニン給餌終了2週目において、Spores食餌混合投与群およびSpores経口投与群と非投与群において、BUNおよび血漿中IS濃度に有意な差は認められなかった。

次に、胃を通過し、生きてきたまま腸に到達させるために耐酸性マイクロカプセルに封入されている *B. longum* と、胃酸に耐性がある *L. casei* をアデニン誘発腎不全モデルに連日経口投与し、BUNおよび血漿IS濃度に及ぼす影響を評価した。BUNおよび血漿中IS濃度は、*B. longum* 投与群および *L. casei* 投与群と非投与群との間に有意な差異はみられなかった。これらの結果から、アデニン誘発腎不全マウスにおいて、プロバイオティクス単独ではISの生成に影響しなかったと考えられた。

(3) プレバイオティクスおよびプレバイオティクス併用の腎不全に及ぼす影響

アデニン誘発腎不全マウスを用いて、*B. longum* および *L. casei* と、GOS の併用投与を行い、BUN および血漿中 IS 濃度の変動を評価した。BUN および血漿中 IS 濃度は、*B. longum* 単剤投与群、GOS 単剤投与群および *B. longum*、GOS 併用群と、非投与群との間に有意な差異はみられなかった。一方、*L. casei* と GOS 併用群が非投与群と比較して有意な差がないものの、血漿中 IS 濃度に減少傾向が認められた（血漿中 IS 濃度の変化率（中央値）非投与群：-43%，*L. casei* + GOS 投与群：-72%， $p = 0.07$ ）。統計学的有意差が認められなかったのは、例数が各群 5 例と少ないことと評価機関が短かったためと考える。

次にプレバイオティクスを *L. casei* に絞り、ベルベリン併用投与の BUN および血漿中 IS 濃度に及ぼす影響を評価した。アデニン誘発腎不全マウスに *L. casei* とベルベリンおよび GOS を併用投与した結果、非投与群と BUN および血漿中 IS 濃度に有意差は認められなかった。

(4) *L. casei* 及び GOS のトリプトファナーゼ活性に及ぼす影響

アデニン誘発腎不全マウスにおいて、*L. casei* 及び GOS の投与終了直後に糞便を採取し、トリプトファナーゼ活性を評価した。その結果、非投与群と *L. casei* + GOS 投与群に有意な差は認められなかった。

以上のことから、アデニン誘発腎不全マウスにおいて、様々なプロバイオティクスおよびプレバイオティクスを投与したが、血中 BUN 濃度に影響を及ぼさなかった。しかしながら、*L. casei* と GOS の併用投与は尿毒症毒素を減少させる可能性がある。今後、*L. casei* と GOS の併用投与を基として例数を増やし、投与タイミングおよび投与期間を検討し、腎不全に対する新たな治療法として開発を進めていく。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ、寄稿等

1. 福森 史郎，辻 泰弘．抗菌薬内服療法における DDS . Drug Delivery System, 33 (1): 18-25, 2018. 査読無し
2. 福森 史郎，辻 泰弘，山本 喜裕．感染症領域における薬学的介入 ～感染症科と薬学部との連携～ . 医薬ジャーナル, 52 (5): 137-142, 2016. 査読無し

3. 福森 史郎．持続性心房細動の治療におけるカテーテルアブレーションとペプリジルの位置づけ . TDM 研究, 32 (3): 116-121, 2015. 査読無し

4. 福森 史郎，辻 泰弘．抗菌活性から見た感染症治療薬の相互作用 . 化学療法の領域, 31 (10), 1988-1994, 2015. 査読無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福森 史郎 (FUKUMORI, Shiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)

・特命助教

研究者番号：10714842