

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06800

研究課題名（和文）腸内細菌叢プロファイルおよび代謝産物解析を用いた非侵襲的腎疾患診断システムの開発

研究課題名（英文）Development of non-invasive diagnostic system for kidney disease using intestinal bacterial flora profile and metabolite analysis

研究代表者

田中 茂（Tanaka, Shigeru）

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：80596396

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：当該研究においては、経皮的腎生検で診断された糸球体腎炎患者の糞便を用いて、各組織診断に対して特異的な腸内細菌叢の構成属種パターン（エンテロタイプ）を明らかにする。さらに、同定した腸内細菌叢エンテロタイプと臨床病理学的情報を組み合わせることで、非侵襲的で精度の高い包括的な腎疾患の診断システムの開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the composition pattern of gut microflora specific to each histological diagnosis using feces of patients with glomerular disease diagnosed by percutaneous renal biopsy. Furthermore, we aim to develop a non-invasive and accurate comprehensive diagnostic system for renal disease.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腸内細菌 糸球体腎炎 腎生検 慢性腎臓病 定量的核酸同定検査 リスクモデル

1. 研究開始当初の背景

A. 慢性腎臓病 (CKD) の原疾患診断に必要な経皮的腎生検の患者侵襲性の問題

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。

B. 腸内細菌叢異常と腎疾患発症の関連性

近年、さまざまな炎症性疾患や生活習慣病と腸内細菌叢の間に免疫調整を介した密接な関わりが存在することが知られるようになった。腸管は全身免疫の 50% を担う生体最大の免疫臓器であり、免疫寛容の成立に重要な役割を果たす制御型 T 細胞 (Treg) は、腸管において最も盛んに分化誘導されている。一方、CKD の主要な原疾患である IgA 腎症において、扁桃細菌叢が病態進展に深く関与する事が知られており、さらに Treg の分化障害に伴う免疫寛容破綻は一部の腎炎の発症や疾患活動性に関わることも報告されている (Liu L. L. Clin Immunol 2011, Huang H. Int Urol Nephrol 2014)。Treg が腸管で盛んに分化誘導を受けている事実に着目すると、腸内細菌叢の構成異常が自然免疫の破綻を介し、腎炎の病態形成に対しても何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。しかしながら、糸球体腎炎患者における腸内細菌叢の詳細は不明であり、腸内細菌叢が腎炎の病態形成に果たす役割や意義については未だ検討がなされていない。

2. 研究の目的

当該研究においては、経皮的腎生検を受けた糸球体腎炎患者の糞便を用いて、腎炎の各組織診断毎の腸内細菌叢の構成属種パターン (エンテロタイプ) を明らかにし、臨床病理学重症度との関連性を検討する。さらに、同定したエンテロタイプの解析結果を臨床情報に組み合わせることで、非侵襲的で精度の高い包括的な腎疾患の診断システムの開発を目指す。本研究の具体的な目的は、以下の 3 点である。

各組織病型に特徴的な腸内細菌叢の構成属種パターン (エンテロタイプ) を同定し、疾患特異的な差異を明らかにする。

エンテロタイプと腎炎の組織学的重症度、疾患活動性の関連を検討する。
腸内細菌叢プロファイルおよび臨床病理学的指標を包括した非侵襲的腎疾患

診断モデルの開発

3. 研究の方法

1. 新規腎生検症例のコホート構築

当該年度は主に、新規に確定診断された慢性糸球体腎炎患者にインフォームドコンセントを行い、糞便、血液、腎組織サンプル検体の収集に努める。

(1) 対象

健常者 10 名と九州大学病院で組織生検を受ける初発腎炎患者 50 名を目標とする。

(2) 腎生検症例の前向きコホート

対象患者に対して、同意取得後に糞便、血液サンプルを採取し、12 ヶ月間経過をフォローし、腸内細菌叢のエンテロタイプと病理組織学的プロファイル、疾患予後との関連を検討する。

(3) 腎炎患者の糞便を用いた腸内細菌叢プロファイルの同定 (T-RFLP 解析)

T-RFLP 解析を用いて、健常人と腎炎患者の腸内細菌叢の集団構成パターンの比較を行う。T-RFLP 解析は、末端蛍光標識したプライマーセットで糞便中の鋳型 DNA を PCR 増幅した後、制限酵素で断片化し、切断されたフラグメントサイズの違いを利用して、検出ピークの数、出現位置、強度より優先菌種と存在量を推定する定性解析である。

(4) 統計解析

各クラスターと腎炎の組織診断 (IgA 腎症、膜性腎症、微小変化群、巣状糸球体硬化症) との関連について、主成分分析を用いて検討し、それぞれの腎炎に関連する特異的なエンテロタイプを同定する。さらに、IgA 腎症については、得られた細菌叢をクラスタリングして、個体ごとの臨床背景、オックスフォード分類の組織活動性との関連をより詳細に探索する。

4. 研究成果

研究期間中に 40 名の腎生検対象者を登録した。図 1 に原疾患の内訳を示した。IgA 腎症が 18 名 (45%) と最多を占め、次いで膜性腎症 5 名 (12%)、微小変化群 4 名 (10%) が続いた。TRFLP 法によって 10 種類の腸内細菌叢構成集団のピーク面積が算出された (図 2)。

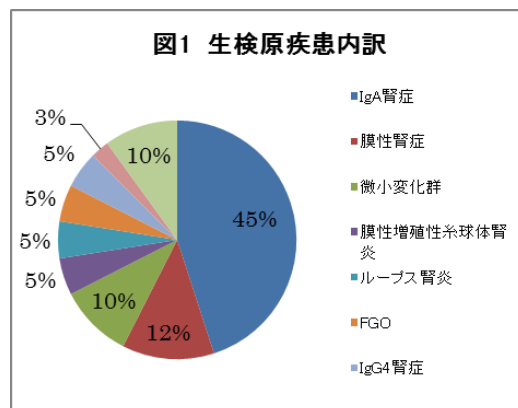
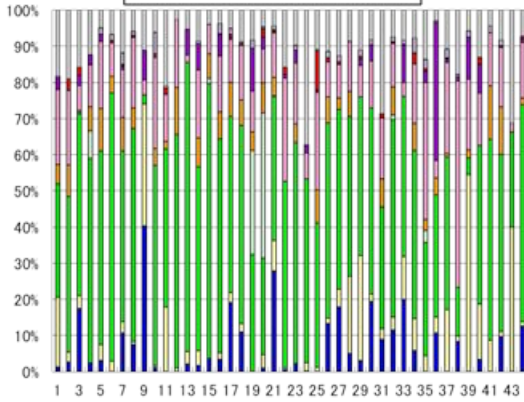


図2 T-RFLP法

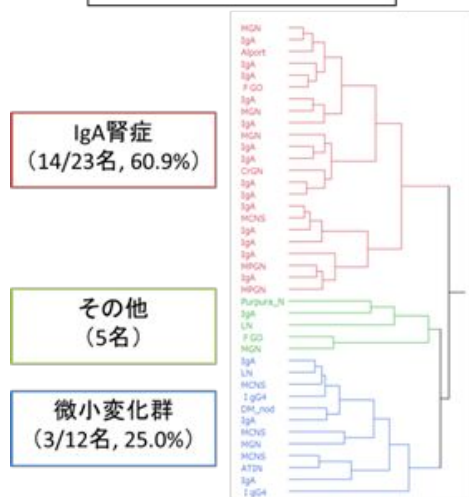


T-RFLP 法によって得られた腸内細菌プロファイルに関してその類似性に基づくクラスター解析を行ったところ、集団は3つのクラスター（IgA腎症型、微小変化群型、その他）に大別された（図3）。

さらに、主成分分析では、IgA腎症型クラスターにおいて Bacteroides が、微小変化群型クラスターでは Clostridium subcluster XIVa がそれぞれ最も代表的な優勢菌種であることが明らかとなった。

次に、IgA腎症例（18例）に限定して、オックスフォード分類の組織学的評価と腸内細菌叢プロファイルの関連を検討した。結果として、組織活動性の乏しい群において、Lactobacillales 目が優勢である一方、組織活動性の高い群においては、Bacteroides や Clostridium cluster が優勢菌種であることが明らかとなった（表1）。

図3 クラスター解析



ヒト腸内細菌叢の構成は、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門が95%を占める。炎症性腸疾患患者では健康人と比べ、嫌気性菌 Bacteroides 属や Clostridium 属の比率が減少し、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腎症クラスターでは Bacteroides 属が、微小変化群クラスターでは Clostridium 属がそれぞれ

表1 IgA腎症の組織学的活動性と優先菌種

	オックスフォード分類	
	M0	M1
最も代表的な菌種	Lactobacillales目	Clostridium cluster XI
	E0	E1
最も代表的な菌種	Lactobacillales目	Clostridium subcluster XIVa
	S0	S1
最も代表的な菌種	Lactobacillales目	Bacteroides
	T0	T1&T2
最も代表的な菌種	Bacteroides	Bacteroides
	C0	C1
最も代表的な菌種	Lactobacillales目	Bacteroides

クラスター内の優先菌種として検出された。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、健康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、メサンギウム増殖 (M1) 群と管内細胞増多 (E1) 群で Clostridium 属が、分節性硬化 (S1) 群と半月体形成 (C1) 群で Bacteroides 属がそれぞれクラスター内の優先菌種であることが明らかとなった。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。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。今後、本集団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関連性が明らかにすることができれば、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キ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

（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 10 件)

1. Tanaka S, Ninomiya T, Masutani K, Nagata M, Tsuchimoto A, Tsuruya K,

- Kitazono T. Prognostic impact of serum bilirubin level on long-term renal survival in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 19:1062-70, 2015. (査読あり)
2. Eriguchi M, Tsuruya K, Haruyama N, Yamada S, Tanaka S, Suehiro T, Noguchi H, Masutani K, Torisu K, Kitazono T. Renal denervation has blood pressure-independent protective effects on kidney and heart in a rat model of chronic kidney disease. *Kidney Int* 87:116-27, 2015. (査読あり)
 3. Yamada S, Tsuruya K, Tokumoto M, Yoshida H, Hasegawa S, Tanaka S, Eriguchi M, Nakano T, Masutani K, Ooboshi H, Kitazono T. Fibroblast growth factor 23, but not parathyroid hormone, is associated with urinary phosphate regulation in patients on peritoneal dialysis. *Ther Apher Dial* 19: 73-80, 2015. (査読あり)
 4. Sakoh T, Nakayama M, Tanaka S, Yoshitomi R, Ura Y, Nishimoto H, et al. Association of serum total bilirubin with renal outcome in Japanese patients with stages 3-5 chronic kidney disease. *Metabolism* 64: 1096-102, 2015. (査読あり)
 5. Ueki K, Matsukuma Y, Masutani K, Tsuchimoto A, Fujisaki K, Torisu K, Tanaka S, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis with predominant IgG2 and IgG3 deposition in a patient with IgG4-related disease. *BMC nephrol* 2015 Oct 26;16:173. (査読あり)
 6. Tanaka S, Ninomiya T, Katafuchi R, Masutani K, Nagata M, Tsuchimoto A, et al. The effect of renin-angiotensin system blockade on the incidence of end-stage renal disease in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2015, 2016 Oct;20(5):689-698. (査読あり)
 7. Eriguchi M, Yotsueda R, Torisu K, Kawai Y, Hasegawa S, Tanaka S, Noguchi H, Masutani K, Kitazono T, Tsuruya K. Assessment of urinary angiotensinogen as a marker of podocyte injury in proteinuric nephropathies. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016 15;310(4):F322-v33. (査読あり)
 8. Eriguchi M, Tsuruya K, Yoshida H, Haruyama N, Tanaka S, Tsuchimoto A, Fusisaki K, Torisu K, Masutani K, Kitazono T. Extended Swan-Neck Catheter With Upper Abdominal Exit-Site Reduces Peritoneal Dialysis-Related Infections. *Ther Apher Dial*. 2016 Apr;20(2):158-64. (査読あり)
 9. Tanaka S, Ninomiya T, Taniguchi T, Fujisaki K, Tokumoto M, Hirakata H, Ooboshi H, Kitazono T, Tsuruya K. Comparative effectiveness of oral versus intravenous vitamin D receptor activators on infection-related mortality in hemodialysis patients: the Q-Cohort Study. *Nephrol Dial Transplant* 2016 Jul;31(7):1152-60. (査読あり)
 10. Tanaka S, Ninomiya T, Fujisaki K, Yoshida H, Nagata M, Masutani K, Tokumoto M, Mitsui K, Hirakata H, Fujimi S, Kiyohara Y, Kitazono T, Tsuruya K. The Fukuoka Kidney disease Registry (FKR) study: design and methods. *Clin Exp Nephrol* 2016, in press. (査読あり)
- 〔学会発表〕(計 件)
1. 田中茂、血液透析患者における活性型ビタミンD受容体刺激剤と感染症死亡の関連：Qコホート研究、第60回日本透析医学会学術集会、2015年6月、横浜
 2. 田中茂、血液透析患者における治療抵抗性高血圧と心血管リスクの関連：Qコホート研究、第61回日本透析医学会学術集会、2016年6月、大阪
 3. 田中茂、血液透析患者における治療抵抗性高血圧と心血管リスクの関連：Qコホート研究、第61回日本透析医学会学術集会、2016年6月、大阪
 4. 田中茂、IgA腎症におけるレニン・アンジオテンシン系抑制薬の末期腎不全発症抑制効果、第58回日本腎臓学会学術総会、2016年6月、名古屋
 5. 田中茂、IgA腎症患者における末期腎不全発症とその危険因子の時代的推移、第59回日本腎臓学会学術総会、2016年6月、横浜
 6. Tanaka S, et al. The effect of renin-angiotensin system blockade on the incidence of end-stage renal disease in IgA nephropathy. *Kidney Week* 2015, November 2015, San Diego.
 7. Tanaka S, et al. Secular trends in the incidence of end-stage renal disease and its risk factors in IgA nephropathy. *Kidney Week* 2016, November 2016, Chicago.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 田中 茂 (TANAKA SHIGERU)
- 福岡歯科大学・口腔歯学部・助教
- 研究者番号：80596396