

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19450

研究課題名(和文)腸管免疫を介した腎・腸関連機序の解明

研究課題名(英文) Impact of a specific gut microbiota change on acute kidney injury mice

研究代表者

中出 祐介(Nakade, Yusuke)

金沢大学・附属病院・臨床検査技師

研究者番号：10749360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、腸内細菌叢と腎臓病の関連を解明し、その成果から腎臓病に対する新たなバイオマーカー候補を同定することである。近年、細菌叢と様々な疾患の関連が注目されている。腎臓病と細菌叢の関連についてもその解明が望まれている。

急性腎障害モデルマウスを作成し、細菌叢の変化を16S rRNA解析により解析し、腎臓害で変化する細菌群を同定した。上記研究成果は、新たな急性腎障害における腸内環境が変化することを示唆している指標として現在、菌の同定とその意義の詳細な検討をすすめている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to reveal the relationship between gut microbiota and kidney disease and to identify new biomarkers for kidney diseases. The contribution of gut microbiota to various disorders has been reported in recent years. However, the association of gut microbiota with kidney disease remains to be investigated. We revealed the alteration of gut bacteria in acute kidney injury mice with 16S rRNA analysis. This result raise the possibility that gut bacteria could be a new candidate of biomarkers for acute kidney injury. A patent has been applied for the biomarker of kidney injury according to our results.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：腸内細菌 腎臓病 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病やメタボリックシンドロームなどの生活習慣病患者の腸内細菌叢が健常者と異なっていることが報告されている^{引用文献}。さらに、正常な腸内細菌叢を腸炎の患者(腸内細菌叢が変化している患者)に移植することにより病態を改善できることも報告されている^{引用文献}。これらの事実から、正常な腸内細菌叢は生体の恒常性を維持する重要な要因の一つであり、さらに腸管保護作用を示すことが明らかとなってきている。しかし、遠隔臓器である腎臓と腸内細菌叢の連関、さらに腸内細菌叢の腎保護作用については未だ解明されていない。

2. 研究の目的

腸内細菌が急性腎障害に対して保護的に働くと仮説を立て、腸内細菌叢移植技術を用いて機序解明を目指す。この腎・腸連関の機序を解明することは、将来腸内細菌叢の変化を利用した新規の急性腎障害に対するバイオマーカーや治療法開発に展開できる可能性がある。

3. 研究の方法

腎・腸連関の証明のため、以下の方法によりモデルを作成し検証を進めた。腎障害に伴う腸内細菌叢の変化を検討するため、マウス腎障害モデルにおける、腸内細菌叢の 16S rRNA 解析を行った。さらに、腸内細菌叢の機能的な評価を行うため、無菌マウス(Gf B6)、Gf B6 に正常細菌叢を移植したマウス(Gf B6 + Trans.)を用いて、腎障害を評価した。

(1) 急性腎障害に伴う腸内細菌叢の変化を検討した(16S rRNA 解析)。

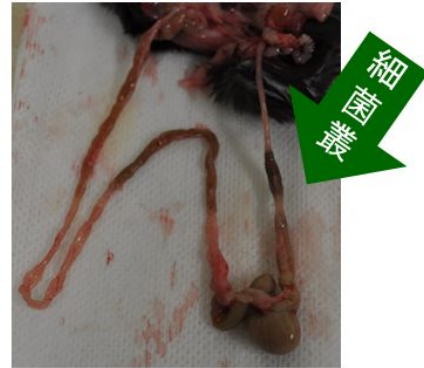
急性腎障害マウスは、腎動脈をクランプし作成した(以下 I/R マウス)。比較するコントロールマウスは、腎動脈をクランプする以外はすべて同じ処置をしたマウスを用いた(以下 sham マウス)(図 1)。

図 1



腸内細菌叢を採取する最適な箇所を基礎的検討により定めた。小腸、盲腸、大腸のうち大腸内容物で最も多く細菌を検出できたので、大腸内容物で I/R による細菌叢の変化を評価した(図 2)。

図 2



(2) 細菌叢が存在しない Gf B6 マウスを用い、急性腎障害処置を施行し、細菌叢が腎障害に及ぼす影響を検討した。

使用したマウスは通常の SPF マウスである B6 マウス、Gf B6 マウス、Gf B6 マウスに B6 マウスの正常な腸内細菌叢を移植し 3 か月飼育し腸内細菌叢を定着させた Gf B6 + Trans. マウスの 3 種類を用いた。

Gf マウスは無菌飼育室で飼育し、この飼育室の中で I/R を施行し、と殺まで無菌環境を維持した(図 3)。また、与える飼料、水、床敷き、飼育ゲージなど無菌飼育室に入れるものはすべてオートクレーブ処理し、無菌化して用いた。無菌飼育室の無菌状態の維持のため、定期的に餌、マウスの糞便、床敷きの培養検査を実施し、無菌状態を確認した。

図 3



4. 研究成果

腎・腸連関を、腎臓を障害することにより腸内細菌叢が変化すること、並びに腸管を無菌化することにより腎障害の程度が変化することから明らかにした。

(1) 急性腎障害誘発処置により、腸内細菌叢が変化することを明らかにした。

Sham マウスと I/R マウスを、I/R 前 (-1day)、I/R 後最も障害の強い 2 日目 (2day)、I/R 後障害が回復する 10 日目 (10day) で比較することにより、day2 と day10 で変化する細菌群を明らかにした。障害期から回復期に向けて、増加する菌と、減少する菌を同定した。

(2) Gf マウスでは通常のマウスより、腎障害が増悪することを明らかにした。さらに、この障害は、正常細菌叢を Gf マウスに移植することにより軽減することも確認した。

以上の研究成果から、腸内細菌が急性腎障害で変化し、さらにその効果として腎臓に対して保護的に働くことを示唆した。この腎・腸連関の機序解明は、将来腸内細菌叢の変化を利用した新規の急性腎障害に対するバイオマーカーや治療法開発に展開できる可能性がある。今後、細菌叢から産生される具体的な腎保護因子 (代謝産物) の同定もメタボローム解析により、進めていく予定である。さらに、臨床応用を目指し、ヒトを対象とした検討も計画している。

<引用文献>

中出祐介, 堀田宏, 和田隆志, 腸内細菌叢と生活習慣病, 臨床化学, 2013, 265-266.

van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG, Keller JJ, Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile, N Engl J Med, 2013, 407-415.

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 1 件)

Yusuke Nakade, Tadashi Toyama, Kengo Furuichi, Shinji Kitajima, Yoshiyasu Miyajima, Mihiro Fukamachi, Akihiro Sagara, Yasuyuki Shinozaki, Akinori Hara, Miho Shimizu, Yasunori Iwata, Hiroyasu Oe, Mikio Nagahara, Hiroshi Horita, Yoshio Sakai, Shuichi Kaneko, Takashi Wada, Impact of kidney function and urinary protein excretion on intima-media thickness in Japanese patients with type 2 diabetes, 査読あり, Clin Exp Nephrol, 2015, 909-917. DOI: 10.1007/s10157-015-1088-0

〔学会発表〕(計 6 件)

中出祐介, 和田隆志

「腎腸連関への新たな視点」

第 9 回 Kanazawa Fibrosis Conference

2017 年 2 月 6 日

金沢大学附属病院宝ホール(石川県、金沢市)

中出祐介, 和田隆志

「腎臓を軸とした生体ネットワーク機構解明への試み」

第 56 回日本臨床化学会

2016 年 12 月 2~4 日

くまもと県民交流館パレア(熊本県、熊本市)

Yusuke Nakade, Tadashi Toyama,

Kengo Furuichi, Yoshiyasu Miyajima,

Mihiro Fukamachi, Hiroyasu Oe,

Mikio Nagahara, Yoshio Sakai, Takashi Wada

「Vascular damage associated with CKD and laboratory medicine. ~ A decline in kidney function closely is associated with progression in atherosclerosis ~」

The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science (世界医学検査学会)

2016 年 8 月 31 日~9 月 4 日

神戸国際展示場(兵庫県、神戸市)

中出祐介, 遠山直志, 古市賢吾, 北島

信治, 宮島良康, 南部裕子, 大江宏康, 長原三輝雄, 酒井佳夫, 和田隆志

「eGFR 低下は頸動脈 IMT の肥厚およびその進行に関連する」

第 62 回日本臨床検査医学会学術集会

2015 年 11 月 19~22 日

長良川国際会議場(岐阜県、岐阜市)

Yusuke Nakade, Tadashi Toyama,

Kengo Furuichi, Shinji Kitajima,

Yasuyuki Shinozaki, Akihiro Sagara,

Akinori Hara, Miho Shimizu,

Yasunori Iwata, Norihiko Sakai,

Takashi Wada

「Impact of kidney function and urinary protein excretion on pulmonary function」
American Society of Nephrology (ASN)
KIDNEY WEEK 2015

2015 年 11 月 3~8 日

San Diego Convention Centre (San Diego, California, USA)

Yusuke Nakade, Tadashi Toyama,

Kengo Furuichi, Shinji Kitajima,

Yasuyuki Shinozaki, Akihiro Sagara,

Akinori Hara, Miho Shimizu,

Yasunori Iwata, Norihiko Sakai,

Takashi Wada

「Impact of kidney function on intima-media thickness in patients with type 2 diabetes」

American Society of Nephrology (ASN)
KIDNEY WEEK 2015

2015 年 11 月 3~8 日

San Diego Convention Centre (San Diego, California, USA)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：腎臓病の病態バイオマーカー
発明者：和田隆志、古市賢吾、坂井宣彦、
岩田恭宜、北島信治、浜瀬健司、三田真史、
中出祐介
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2016/067459
出願年月日：2016 年
国内外の別：国際

6．研究組織

研究代表者

中出 祐介（NAKADE, Yusuke）
金沢大学・附属病院・臨床検査技師
研究者番号：10749360