

平成30年 5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19474

研究課題名(和文)「腸-腎連関」から導く腎臓病の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Gut-renal axis: microbiota and chronic kidney disease

研究代表者

三島 英換 (Eikan, Mishima)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00706939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸管および腸内細菌叢は腎臓病の病態形成に関与しており近年この腸腎連関が注目されている。本研究では、腸内細菌叢を欠失した無菌の腎不全モデルマウスのメタボローム解析を行った結果、腎不全時に体内に蓄積する尿毒素の内、腸内細菌由来尿毒素群を同定した。さらに無菌マウスでは腸管での短鎖脂肪酸の産生消失および腸管でのアミノ酸利用率の低下を認めており、これが腎不全進行に負に寄与している可能性を示唆する結果を得た。従って腸内細菌叢は腎不全の病態に正負両面に寄与していることを明らかにした。さらに糖尿病治療薬であるカナグリフロジンは腸内細菌叢を変化させ、腸内細菌叢由来尿毒を減少させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Microbiota is involved in pathophysiology of renal disease such as accumulation of uremic solutes. We compared renal failure and control mice under germ-free or specific pathogen-free (SPF) conditions, examining the metabolite profiles using CE-TOFMS. We revealed that 11 solutes were considered microbiota-derived uremic solutes. Additionally, germ-free renal failure conditions resulted in the disappearance of colonic short-chain fatty acids, decreased utilization of intestinal amino acids, and more severe renal damage compared with SPF mice with renal failure. Thus, microbiota contributes to the production of harmful uremic solutes, but conversely, growth without microbiota has harmful effects on CKD progression. We examined the effect of canagliflozin, a SGLT inhibitor, on the accumulation of uremic toxins using renal failure mice. Canagliflozin treatment significantly reduced the plasma levels of p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate and altered the microbiota composition.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腸腎連関 慢性腎臓病 腸内細菌叢 メタボローム メタゲノム 尿毒素 短鎖脂肪酸 無菌マウス

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は糖尿病・高血圧などを原因として発症する進行性疾患であり成人の8人に1人が発症する国民病である。CKDが進行すると末期腎不全に陥るのみならず心血管病による死亡リスクも高めるため、進行を抑制することは国民の健康維持・医療財政の観点から重要な課題である。しかしCKDに対する有効な特異的治療薬は乏しく悪化要因の是正として血圧・血糖・貧血などの管理だけでは病状進行を完全に止めることはできない。そのためCKDの悪化において未だ明らかとなっていない側面から病態解明を行い新規治療薬を開発することが渴望されている。

近年、糖尿病・肥満・発がんなど様々な病態の一因として腸内細菌叢の関与が注目されており、CKDにおいても腸内細菌叢や腸内環境が変化していることが報告されている。腎機能低下時には本来腎臓により排泄されるべき「尿毒素物質」が体内に蓄積し、蓄積した尿毒素が腎機能をさらに悪化させるといった悪循環が存在するが、インドキシル硫酸・p-クレシル硫酸・トリメチルアミン-oxide (TMAO) などCKD増悪や血管合併症に強く関与する代表的な尿毒素は食事由来の成分を元にして腸内細菌によって産生される。そのため腸内環境や腸内細菌叢の変化はこれら尿毒素の産生量に影響を与える。またCKDでは尿毒素蓄積・高頻度に合併する便秘・組織虚血や浮腫による腸管障害・内服薬の影響など種々の影響で腸内細菌叢が変化し腸内環境が悪化していることが分かってきた。さらに腎不全時には腸管壁のバリア機能も障害されており腸管由来尿毒素および腸内細菌そのものが障害腸管から血中に移行していることがCKDにおける慢性炎症の一因にもなっている (Vaziri. Am J Nephrol. 36:438, 2012)。このようにCKD病態における腸管と腎臓の関わり「腸腎連関」が近年提唱されている。したがって腸腎連関の面からCKD病態の解明を行うことで腸管をターゲットとしたCKDの新たな治療法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

腎臓病の病態における腸管・腸内細菌叢の関わり「腸腎連関」についてメタゲノム解析、無菌マウスや便を含む生体サンプルのMS解析などのツールを用いつつ解明を行う。そして腸管という新しいアプローチからCKD及治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) CKD病態における腸内細菌叢の関与の同定。
無菌環境で飼育して腸内細菌叢を有さない

Germ Free (GF) マウスと通常飼育環境下で飼育した Specific pathogen free (SPF) マウスを用いてアデニン誘発性の腎不全モデルマウスを作成した。GFマウス、SPFマウス、GF腎不全マウス、SPF腎不全マウスの4群を作成し、各群の血液、尿、便サンプル内の代謝物を解析するとともに、腎機能の評価した。代謝物解析はCE-MSを用いたメタボローム解析を行い、尿毒素についてはLC-MSを用いた測定系も行った。

(2) カナグリフロジンの尿毒素減少効果の検討。

糖尿病治療であるSodium-Glucose transporter (SGLT) 阻害薬の内、カナグリフロジンは腎尿細管でのSGLT2阻害作用に加えて小腸上皮に発現するSGLT1の弱い阻害作用も有している。小腸でのグルコースの吸収抑制により大腸へのグルコースエスケープがもたらされると大腸内の腸内細菌叢に影響をあたえ、尿毒素産生量の変化を介してCKD病態に変化を及ぼす可能性がある。本研究では、アデニン誘発腎不全マウスへカナグリフロジン (10mg/kg) を2週間経口投与し、尿毒素、腸管内短鎖脂肪酸、腸内細菌叢等への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 無菌腎不全マウスとSPF腎不全マウスの血中、尿、便の代謝物をメタボローム解析した結果、183種の代謝物が血中から検出された。その内57種が腎不全時に血中濃度が蓄積する尿毒素物質であり、さらにこの内11種の代謝物は無菌腎不全マウスでは血中濃度が減少または消失していた。したがってこの11種の代謝物 (インドキシル硫酸, p-クレシル硫酸, フェニル硫酸, コール酸, 馬尿酸, ジメチルグリシン, グアニジノ酪酸, グルタル酸, ヒドロキシペンタン酸, TMAO, フェナセツル酸) は、その産生に腸内細菌叢が関与する「腸内細菌叢由来尿毒素物質」であることを同定した (図1)。

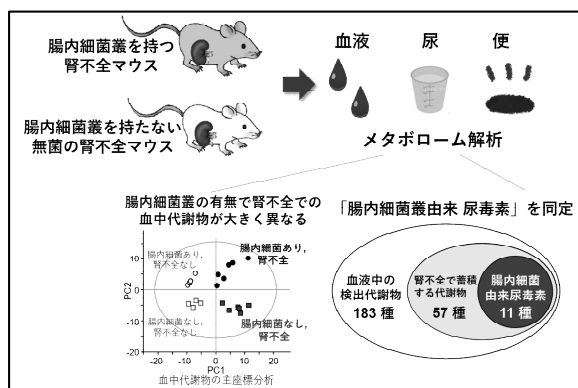


図1：腸内細菌叢由来尿毒素の同定

また、これらの 11 種の腸内細菌叢由来尿毒素は、100%腸内細菌叢に由来する物質、腸内細菌叢と宿主の代謝物の両方に由来する物質、腸内細菌叢代謝と食事成分の蓄積に由来する 3 パターンに分かれることがわかった (図 2)。

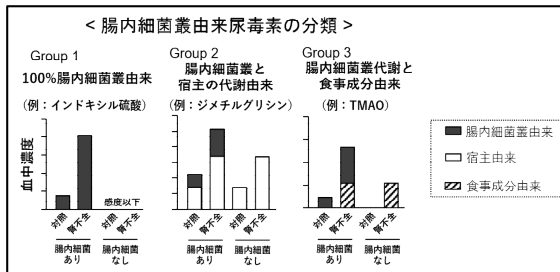


図 2：腸内細菌叢由来尿毒素の分類

このように腸内細菌叢がない無菌腎不全マウスでは腎臓病の進展や心血管障害の悪化に影響する尿毒素類が減少していたが意外にも、無菌マウスは腸内細菌叢を有する通常マウスよりも腎機能障害が悪化しやすいことがわかった。このことは腸内細菌叢は尿毒素産生という腎臓病にとって負の面のみならず、何らかの腎保護的な正の役割をも果たしていることを示唆する結果である。本研究では、腸内細菌叢は腎不全時における腸管内での短鎖脂肪酸産生やアミノ酸代謝に大きな影響を及ぼしていることが明らかにした。短鎖脂肪酸やアミノ酸は免疫制御や栄養シグナルを介して腎保護的な役割を担っていることが近年報告されており、腸内細菌叢は免疫や栄養面から腎保護的な役割を果たしていることが想定される (図 3)。

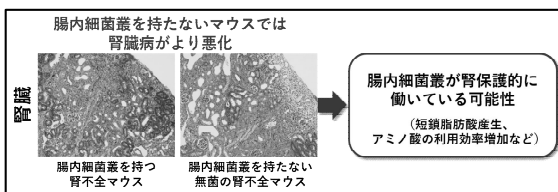


図 3：腸内細菌叢消失の腎障害への影響

以上から、腸内細菌叢は尿毒素に深く関わる一方、その欠如は腸内細菌が担う腎保護作用の欠落から腎障害を増悪させた。腸内細菌叢は CKD に正負両面から関与しうることを明らかにした (図 4) (Mishima. *Kidney Int.* 2017)。

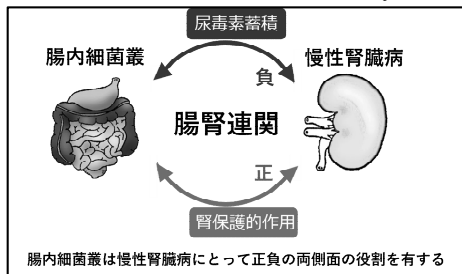


図 4：腸腎連関

(2) カナグリフロジンの腸管作用を介した尿毒素蓄積減少効果

腎不全マウスへのカナグリフロジン投与の影響を検討した結果、腸内細菌叢由来尿毒素であるインドキシル硫酸や p-クレシル硫酸の血中濃度を減少させるとともに、腸管内の短鎖脂肪酸を増加させる作用があることを見出した (図 5)。

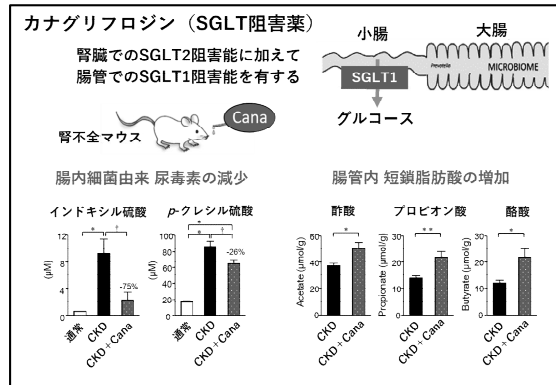


図 5 カナグリフロジンの腎不全マウスへの影響

またカナグリフロジンは腎不全マウスにおいて腸内細菌叢の有意な変化をもたらしたことから、この腸内環境変化が尿毒素蓄積や短鎖脂肪酸産生に影響を及ぼしている機序が考えられる (Mishima et al. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017)。

このように他疾患での既承認薬の腎保護効果を見出すことは CKD 治療薬へのドラッグリポジショニングが期待される。

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 18 件)

1. Mishima E (8 人中 1 番目). Low frequency of cervicocranial artery involvement in Japanese with renal artery fibromuscular dysplasia compared with that of Caucasians. *Clin Exp Nephrol.* 2018. doi: 10.1007/s10157-018-1575-1. [Epub ahead of print] 査読有
2. Mishima E (9 人中 1 番目). Renovascular hypertension associated with JAK2 V617F positive myeloproliferative neoplasms treated with angioplasty: 2 cases and literature review.

- J Clin Hypertens* (Greenwich). 2018;20:798. doi: 10.1111/jch.13257 査読有
3. Elkordy A, **Mishima E** (7人中2番目). Stress-induced tRNA cleavage and tRNA generation in rat neuronal PC12 cells. *J Neurochem*. 2018. doi: 10.1111/jnc.14321. [Epub ahead of print] 査読有
 4. Narumi K, **Mishima E**. (14人中2番目). Focal Segmental Glomerulosclerosis Associated with Chronic Progressive External Ophthalmoplegia and Mitochondrial DNA A3243G Mutation. *Nephron*. 2018;138(3):243-248. doi: 10.1159/000485109 査読有
 5. **Mishima E**. (20人中1番目). Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017. doi: 10.1152/ajprenal.00314.2017. [Epub ahead of print] 査読有
 6. Sato E, Saigusa D, **Mishima E** (18人中3番目). Impact of the Oral Adsorbent AST-120 on Organ-Specific Accumulation of Uremic Toxins: LC-MS/MS and MS Imaging Techniques. *Toxins (Basel)*. 2017;10. pii: E19. doi: 10.3390/toxins10010019. 査読有
 7. **Mishima E** (18人中1番目). Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney International*. 2017;92:634-645 doi: 10.1016/j.kint.2017.02.011 査読有 (*掲載号に Editorial Comment 付き。プレスリリースを行い新聞や各メディアに成果が掲載された)
 8. **Mishima E**. (8人中1番目). Selective embolization therapy for intrarenal artery stenosis causing renovascular hypertension: efficacy and follow-up renal imaging. *J Clin Hypertens*. 2017;19:1028-1031. doi: 10.1111/jch.13040 査読有
 9. **Mishima E**. (5人中1番目). 'Lead pipe'-like stiff aorta with grossly widened pulse pressure in burned-out Takayasu arteritis. *Eur Heart J Cardiovasc Imag* 2017;18:819 doi: 10.1093/ehjci/jex047 査読有
 10. **Mishima E**. (6人中1番目). Inherited, not acquired, Gitelman syndrome in a patient with Sjögren's syndrome *CEN case rep*. 2017;6:180-184. doi: 10.1007/s13730-017-0271-4 査読有
 11. **Mishima E**. (5人中1番目). Acute kidney injury from excessive potentiation of calcium-channel blocker via synergistic CYP3A4 inhibition by clarithromycin plus voriconazole. *Intern Med*. 2017;56:1687-1690 doi: 10.2169/internalmedicine.56.8313. 査読有
 12. Sato T, **Mishima E**, Mano N, Abe T, Yamaguchi H. Potential drug interactions mediated by renal organic anion transporter OATP4C1. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;362:271-277 doi: 10.1124/jpet.117.241703 査読有
 13. Matsuhashi T,.. **Mishima E** (41人中20番目) Mitochondrial acid 5 (MA-5) facilitates ATP synthase oligomerization and cell survival in mitochondrial diseases. *EBioMedicine*. 2017;20:27-38 doi: 10.1016/j.ebiom.2017.05.016. 査読有
 14. Shima H,.. **Mishima E** (25人中9番目) A novel indole compound MA-35 attenuates renal fibrosis by inhibiting both TNF- α and TGF- β 1 pathways. *Sci Rep*. 2017;7:1884 doi: 10.1038/s41598-017-01702-7. 査読有
 15. **三島英換** 阿部高明 見えてきた腸腎連関の存在 *日本内科学会誌* 2017;106:919-25 査読無

16. 三島英換 阿部高明 腸内細菌叢が腎臓病に与える影響 **日本腎臓学会誌** 2017;59:557-61 査読無

17. 三島英換 阿部高明 腸腎連関から導く腎臓病の病態解明 *Bio Clinica* 2017;32:82-7 査読無

18. Sato E,.. Mishima E (24人中3番目) Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. *Sci Rep.* 2016;6:36618. doi: 10.1038/srep36618. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. 三島英換 腸腎連関:慢性腎臓病における腸内細菌叢の関与と治療介入の可能性 第40回日本高血圧学会総会(ひめぎんホール、松山) 2017.10.21

2. 三島英換、他6名 腎動脈狭窄による腎虚血評価のための拡散強調MRIの有用性と臨床応用 第60回日本腎臓学会学術総会(国際センター、仙台) 2017.5.26-28

3. 三島英換、他4名 著明な脈圧増大を伴う鉛管状大動脈と多発動脈狭窄を呈する陳旧性高安動脈炎の1例 第6回臨床高血圧フォーラム(岡山コンベンションセンター、岡山) 2017.5.14

4. 三島英換 未来を創造する次世代の力「地域医療再構築プロジェクト」災害復興申請研究機構シンポジウム(東北大学マルチメディアホール、仙台) 2017.3.9

5. 三島英換、他3名 ウレミクトキシン蓄積における腸内細菌叢の関与の同定 第1回 Uremic Toxin 研究会学術集会(ベルサーール八重洲、東京) 2017.2.28 最優秀演題賞受賞

6. Eikan Mishima, 他4名. Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by CE-TOFMS-based metabolomics approach. The 6th Chronic

kidney disease frontier meeting (キャッスルプラザホテル, Nagoya) 2017.2.25

Investigator Award 受賞

7. 三島英換、他5名 たこつぼ心筋症の病態形成における発症前からの潜在的な心筋虚血の進行 第20回心血管内分泌代謝学会学術総会(東京コンベンションホール、東京) 2016.12.17

8. 三島英換、他6名 尿毒素蓄積とCKD病態における腸内細菌叢の関与と無菌腎不全マウスとCE-TOFMSを用いた解析 第7回腎不全研究会(灘尾ホール、東京) 2016.12.10 特別奨励賞受賞

9. Eikan Mishima, 他6名. Evaluation of the Impact of Gut Microbiota on Uremic Solute Accumulation by CE-TOFMS-Based Metabolomics Approach. ASN Kidney week 2016 (Chicago, US) 2016.11.18

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学病院腎高血圧内分泌科:

<http://www.int2.med.tohoku.ac.jp/index.html>

東北大学大学院医工学研究科 分子病態医工学分野:

<http://plaza.umin.ac.jp/~takaabe/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三島 英換 (Mishima, Eikan)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 00706939