

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08978

研究課題名（和文）唾液ならびに口腔内細菌叢解析に基づく腎臓病の病態評価とバイオマーカー開発

研究課題名（英文）Pathophysiology evaluation and biomarker development of kidney disease based on saliva and oral microbiota analysis

研究代表者

中出 祐介（nakade, yusuke）

金沢大学・附属病院・副臨床検査技師長

研究者番号：10749360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：腎臓病は依然増加し、併発する他臓器合併症により、生命予後、健康長寿の低下、医療費の増大をきたしている。本課題では、これら腎臓を中心とする全身恒常性の破たんを非侵襲的かつ早期に検出できるバイオマーカーの検索を目的とした。唾液（口腔内細菌）、便（腸内細菌）、血液、尿をサンプルとして細菌叢解析、キラルアミノ酸解析を行い、腎臓病に対する新しいバイオマーカー候補を同定した。今後、特許取得、論文・学会発表を行いバイオマーカーとしての性能を評価しながら臨床への還元を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

便や唾液に含まれる細菌叢が、健常者に比べ腎臓病患者で特有の変化を示すことを明らかにした。また、その代謝産物である可能性があるキラルアミノ酸も変化することも確認した。今後、腎臓病で変化する特徴的な細菌とキラルアミノ酸の関係を明らかにし、血液や尿に加え、便や唾液からも腎臓病を評価できるかどうか検証を重ねていく。将来、血液や尿に加え便や唾液を用いた検査法の開発に繋がられる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Currently, kidney disease continues to increase. Complications contribute to poor prognosis, poor health and longevity, and increased medical costs.

The purpose of this study is to identify new early-diagnosis biomarkers for kidney disease. Using saliva (oral bacteria), stool (intestinal bacteria), blood, and urine as samples, bacterial flora analysis and chiral amino acid analysis were performed. We have identified new biomarker candidates for kidney disease. In the future, we will confirm its usefulness by comparing it with existing biomarkers.

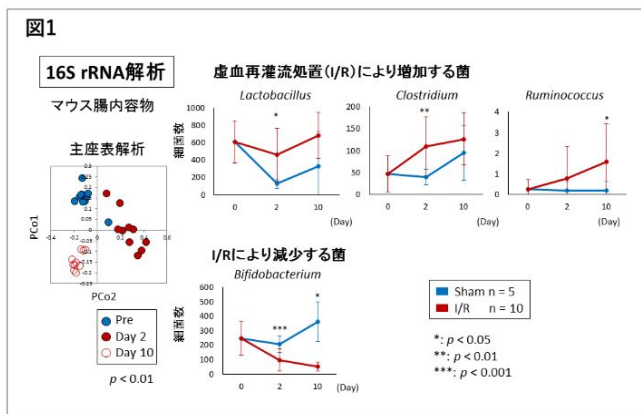
研究分野：臨床検査医学

キーワード：キラルアミノ酸 細菌叢 唾液 腎臓病 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病による腎不全患者は依然増加を続け、慢性透析患者は約 32 万人となっている。さらに、腎機能障害に伴い併発する、心臓病、脳血管障害などが患者の生命予後、健康寿命を低下させている。透析治療および併存疾患への医療費の問題も大きく、腎臓病対策は、医学的、医療経済的にも喫緊の課題であると考えられる。

申請者はこれまで、腎臓病と全身の恒常性維持機構の関連に着目し、腎臓と肺(Nakade, Clin Exp Nephrol 2014)、腎臓と血管(Nakade, Clin Exp Nephrol 2015)について臨床的に関連を示唆してきた。また、正常な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ることに以前から着目し、腎臓病に対するバイオマーカーとして腸内細菌叢の可能性についても検討を進めてきた。若手研究 B (研究課題名: 腸管免疫を介した腎・腸関連機序の解明、課題番号: 15K19450) では、マウス急性腎障害モデルを用い、腎障害と腸内細菌叢の関係を明らかにすることに取り組んだ。結果として、急性腎障害誘発処置 (I/R) により、腸内細菌叢が変化することを明らかにした (図 1)。本課題では、腎臓と細菌を繋ぐ因子の検索、並びに口腔内細菌叢との関係を新たに検討した。因子としては、細菌由来代謝産物が考えられ、我々はアミノ酸に着目して解析した。



2. 研究の目的

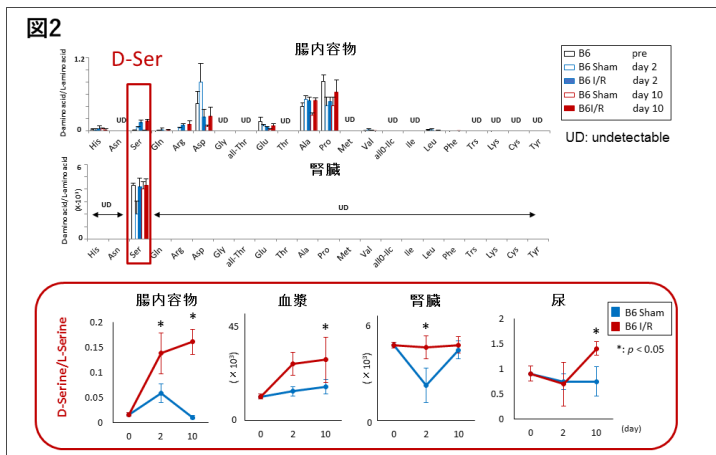
腎臓と共生細菌 (腸内・口腔内細菌叢) を繋ぐ新規ネットワーク因子の同定、並びに腎臓と口腔内細菌叢との関係の解明。

3. 研究の方法

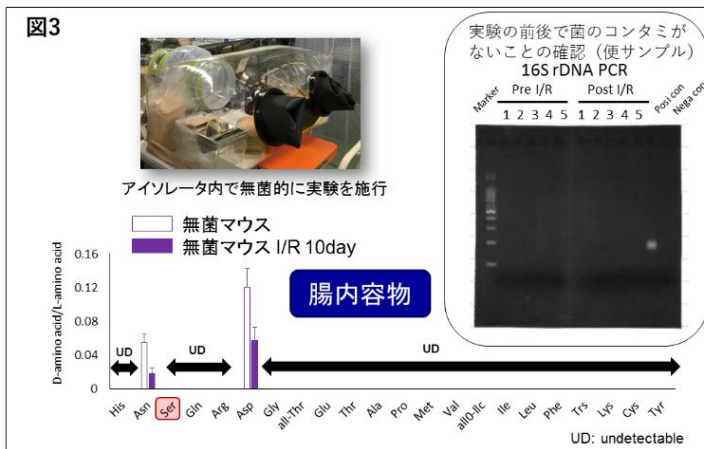
マウスとヒトを対象に検討した。マウスに I/R を施行し、その前後で、便、血液、尿を採取し細菌叢解析、アミノ酸解析を施行した。ヒトは、健常者と慢性腎臓病患者を対象とした。サンプルは、唾液、便、血液、尿を採取した。便と唾液は、細菌 (多くが嫌気性菌) が含まれるため採取後直ちに嫌気バックの中に入れ、冷蔵し出来るだけ早く研究室へ移送した。また、唾液は食事の影響も考慮し、朝食前に採取した。マウスの場合、便は採取後即座に液体窒素に入れ瞬間凍結した。細菌叢解析に用いるサンプルは、PBS でよく混濁し、その後グリセロールを添加し、混濁後 -80 で保存した。グリセロール添加により、細菌を生菌状態で保存でき、16S rRNA 解析後の菌の分離培養を可能にできる。また、アミノ酸解析用には、便と唾液は採取後即座に -80 保存した。血液と尿は、氷冷中で冷却後、冷却遠心し、上清を -80 保存した。16S rDNA は菌種間で配列が保存されている領域と、菌ごとに变化している領域 (variable region, V1-9) で構成されている。定常領域に設計したプライマーをもちい、可変領域を挟むように増幅することで、細菌の種類を同定することができる。16S アンプリコンが 3,000 リードあれば、菌叢を構成する菌種の内、98% を網羅でき、この条件で解析した。

対象者にはインホームドコンセントにより研究内容を説明し書面で同意を得た。抗生物質などの細菌叢に影響を及ぼす薬剤を服用している患者、感染症、下痢、ガン患者などを除外した。

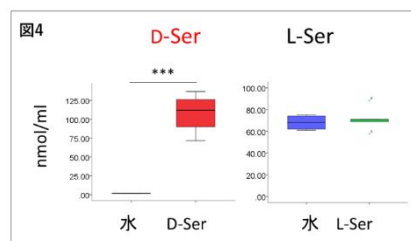
細菌叢解析は、16S rRNA 解析を行った。アミノ酸解析はキラルアミノ酸解析を用いることが特徴である。アミノ酸はその構造により L 体とその光学異性体である D 体に分類され、識別されたアミノ酸をキラルアミノ酸と呼ぶ。これまでの分析技術では L 体と D 体を分類することは困難であった。我々は、共同研究者が開発した分析技術を利用し、約 20 種類すべての生体に存在するキラルアミノ酸測定を試みた。本研究は金沢大学倫理委員会の承認を受け実施した (承認番号 1291)。



4 研究成果 マウスに I/R を施行すると、I/R 前後で腸内細菌叢が変化することを確認した (図 1)。細菌由来代謝産物を同定するために、I/R 前後で便、血液、腎臓、尿を採取し、キラルアミノ酸解析を施行した。Sham マウスに比し、I/R を施行したマウスで便、血液、腎臓、尿中の D-Ser が増加した (図 2)。細菌から D-Ser が産生されることを確認するために、生体に菌を持たない無菌マウスを用い、無菌環境であるアイソレータ内で I/R を施行し、I/R 前後で便中の D-Ser

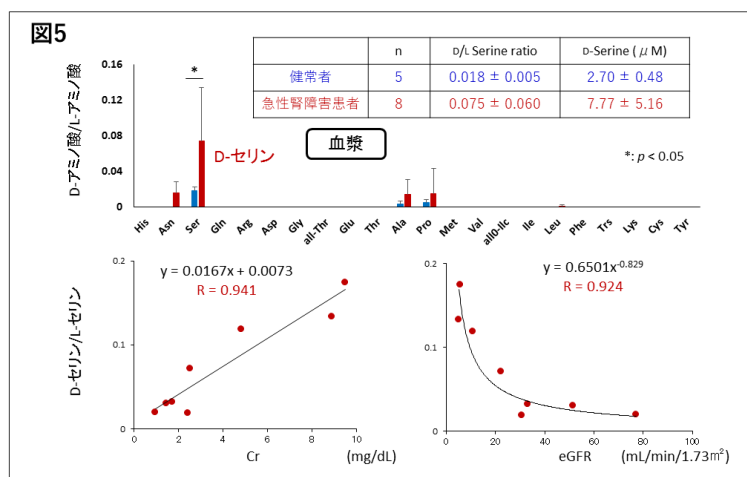


を測定した。実験の前後で、外界からの菌のコンタミがないことも確認した。興味深いことに、腸内容物から I/R 前後で D-Ser が検出されなかった (図 3)。したがって、D-Ser は細菌由来であり、I/R に伴って便中で増加することを確認した。次に、腸内から血中へ移行するか、Ser を飲水投与し、投与前後の血中濃度を測定した。D-Ser は、飲水投与後血中で増加したが、L-Ser は血中で増加しなかった。従って、細菌から産生された D-Ser は腸管から血中へ移行することが示唆された (図 4)。マウスの実験から、腎障害により腸内細菌が変化し、腸内、血中、腎臓内、尿中の D-Ser が増加することを確認した。この系がヒトでも再現できるか確認した。急性腎障害患者の血液中 D-Ser を健常者と比較した。健常者に比し、急性腎障害患者の血中 D-Ser は増加した (図 5)。以上から、腎臓病で腸内細菌叢が変化し、その代謝産物である D-Ser が変化することを明らかにした。これらの結果は、腸内細菌叢と D-アミノ酸が、進行性腎障害の臨床的指標になりうる可能性を示していた。一方で、採血や糞便採取は、医療者の針刺し事故や感染の危険、また、被検者の物理的、心理的苦痛を伴う。そこで我々は、糞便に比し採取が容易でかつ細菌叢が存在する唾液にも着目し検討を進めた。



対象として、健常者 12 名、腎臓病患者 54 名を登録した。対象者から、唾液、便、血液、尿、を採取した。唾液と便の 16S rRNA 解析を完了した。便をサンプルとした 16S rRNA 解析では、細菌叢全体が健常者と腎臓病患者で異なることを確認した。一方、唾液の 16S rRNA 解析の結果、腎臓病患者の口腔内細菌叢は健常者に比し特異的に変化する数種の菌の存在が示唆された。現在、解析を進め具体的な菌種の同定を行っている。また、キラルアミノ酸解析も唾液サンプルを含めた便、血液、尿サンプルを用い約 20 種類のアミノ酸測定を実施した。これらの結果を用い主座標解析で腎臓病患者と健常者を判別できることを確認した。現在、健常者と腎臓病患者を判別できる主要なアミノ酸とその由来サンプル (唾液、便、血液、尿) の同定を進めている。さらに、細菌叢解析とキラルアミノ酸解析の結果を検証するために 2 つの網羅解析を突合し、腎臓病で変化する細菌種とその細菌から産生される特異的 D-アミノ酸の同定を試みている。本課題期間中に得られた新たな知見

を利用し、唾液を用いた腎臓病バイオマーカーとして特許申請 (特願 2018-109730) を行った。今後、腎臓病で変化する特徴的な細菌とキラルアミノ酸の関係を明らかにし、血液や尿に加え、唾液でも腎臓病を評価可能か検証を重ねていく。本課題の成果は、唾液を用いた腎臓病バイオマーカー開発に繋がられる可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小林 拓, 中出 祐介, 岩田 恭宜, 和田 隆志	4. 巻 -
2. 論文標題 腎臓と他臓器連関を考える～CKDにおける包括的治療戦略を目指して～『腸腎連関の応用』	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床雑誌「内科」	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岩田恭宜, 中出祐介, 和田隆志	4. 巻 -
2. 論文標題 AKIバイオマーカーの現状と新たな展開『腸管由来D-serine』	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 急性血液浄化学会雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中出 祐介, 岩田 恭宜, 和田 隆志	4. 巻 8
2. 論文標題 細菌由来D-アミノ酸を介した新たな腎腸連関機序	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 D-アミノ酸学会誌	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中出祐介	4. 巻 128
2. 論文標題 D-セリンを介した腎腸連関機序の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 十全医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 38-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Nakade, Yasunori Iwata, Takashi Wada, et al.	4. 巻 18;3(20)
2. 論文標題 Gut microbiota-derived D-serine protects against acute kidney injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 pii: 97957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.97957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中出祐介, 岩田恭直, 和田隆志	4. 巻 7
2. 論文標題 透析療法における腸内細菌の関わり	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科	6. 最初と最後の頁 539-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nakade Yusuke, Iwata Yasunori, Wada Takashi
2. 発表標題 MECHANISM OF KIDNEY-GUT CROSSTALK VIA D-AMINO ACIDS DERIVED FROM MICROBIOTA
3. 学会等名 4th International Conference of D-Amino Acid Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中出祐介, 岩田恭直, 北島信治, 遠山直志, 原章規, 清水美保, 坂井宣彦, 古市賢吾, 和田隆志
2. 発表標題 腸内細菌由来D-セリンを介した腎腸関連機序の解明
3. 学会等名 第62日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Nakade, Yasunori Iwata, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Akinori Hara, Miho Shimizu,
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of kidney-gut crosstalk via the D-amino acid derived from microbiota
3. 学会等名 The 8th Chronic Kidney Disease Frontier meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中出祐介, 岩田恭宜, 和田隆志
2. 発表標題 D-アミノ酸がつなく腸内細菌叢と腎臓病
3. 学会等名 D-アミノ酸学会 第4回ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中出祐介, 岩田恭宜, 北島信治, 遠山直志, 原章規, 清水美保, 坂井宣彦, 古市賢吾, 和田隆志
2. 発表標題 腸内細菌由来D-Serの腎保護効果
3. 学会等名 第9回分子腎臓フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中出祐介, 岩田恭宜, 和田隆志
2. 発表標題 キラルアミノ酸の可能性
3. 学会等名 : 第61回日本腎臓学会学術集会(シンポジウム)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中出祐介、岩田恭宜、北島信治、遠山直志、原章規、清水美保、坂井宣彦、大江宏康、酒井佳夫、和田隆志
2. 発表標題 クリティカル期の腎障害評価を目指した新規バイオマーカー検索
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 分担執筆：中出祐介、岩田恭宜、和田隆志	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社シーエムシー出版	5. 総ページ数 325 (111-117)
3. 書名 ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患	

1. 著者名 分担執筆：岩田恭宜、中出祐介、和田隆志	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社NTS	5. 総ページ数 624 (361-366)
3. 書名 ヒトマイクロバイオーム	

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 クリティカル期の腎障害を反映するためのマーカー（血漿中D-Ser）	発明者 和田隆志, 岩田恭宜, 中出祐介, 三田真史, など	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、学内整理番号：特2018-0035	出願年 2018年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 腎臓病の病態バイオマーカー（唾液中D-アミノ酸）	発明者 和田隆志, 岩田恭宜, 中出祐介, 三田真史, など	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、出願番号特願：2018-109730	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------