

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09722

研究課題名(和文)慢性腎不全の腸内細菌叢と腸管バリア機能の解析と治療戦略のための基盤構築

研究課題名(英文)Analysis of intestinal microbiota and barrier function in chronic renal failure and therapeutic strategy

研究代表者

佐藤 稔 (Sato, Minoru)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70449891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：「慢性腎不全では腸内細菌叢の変化により、腸管バリア機能の低下を来す」との仮説を立て、腎不全モデルマウスを用い、腎不全進行に伴う腸内細菌叢と尿毒素物質産生、および腸管バリア機能の変化を解析した。腎不全による腸内細菌叢の悪化が炎症惹起物質の増加を来し、腸管バリア機能を傷害し、腸管内で増加した尿毒症物質の体内吸収を阻止できず、血中尿毒症濃度の上昇をしていることが判明した。腎不全による腸内細菌叢の悪化に生体内抗菌ペプチドであるディフェンシン低下が関与していることも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎不全の状態では腸管バリア機能が破綻し、尿毒素物質吸収が増加していることが明確にできた。また、腎不全でなぜ腸内細菌が悪化するかの原因として、ディフェンシン低下関与していることも判明した。ディフェンシンを増加させることで腸内細菌を改善し、腸管バリア機能を改善する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized, "Chronic kidney disease impaired the intestinal barrier function by a change of microbial flora". We analyzed using CKD model mice the change of the enterobacterial flora, urine toxin production, and intestinal tract barrier function accompanied with the renal failure progress. Our studies have revealed that aggravation of the enterobacterial flora caused the increase of the inflammatory cytokines, and significant disruption of intestinal barrier function in different models of CKD. The increased uremic toxin in intestinal tract made as invasion into blood. In addition, we cleared that uremic toxin-indoxyl sulfate decreases intestinal antimicrobial peptides defensins which induce gut microbiome alteration in CKD, which are contribute to the loss of intestinal barrier function in CKD.

研究分野：腎臓病

キーワード：慢性腎不全 腸内細菌 腸管バリア ディフェンシン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

<慢性腎臓病と腸内細菌叢> 日本の人口の12.9%が罹患している慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease: CKD) は心血管疾患 (Cardio-Vascular Disease: CVD) の独立した危険因子である。我々は、血管内皮機能低下がCKDとCVDの基盤病態であることを明らかとしてきた。しかし、CKDとCVDの連関に関する分子機序、特にCKD-CVDの共通病態として重要な酸化ストレス・炎症の誘発機序の解明は十分でなく、新規治療薬開発の余地がある。インドキシル硫酸を含む尿毒素物質は、腎機能の低下とともに体内に蓄積し、酸化ストレス・炎症など生体反応を惹起し、腎臓のみならず、他の臓器障害を促進すると考えられる。尿毒症物質の産生経路の解明、血中尿毒症物質濃度上昇の機序解明は、CKD進行抑制のみならずCVD発症抑制にも、新規治療薬開発への重要課題である。腸内細菌叢 (腸内フローラ) は生体内共生環境として個体の恒常性維持に重要な役割を果たす。健康状態での腸内細菌は、腸のpHの調整、腸運動の活性化、消化吸収の補助のみならず、免疫系の賦活、腐敗産物産生の抑制、病原菌の増殖抑制にも働いている。腸内細菌叢は加齢や生活環境により変動し、健康状態や疾病に関与することが明らかとなっている。慢性腎臓病患者における腸内細菌叢の変化は、栄養障害、全身性または局所性の炎症惹起の他、インドキシル硫酸など尿毒素産生の一因になり得る。近年の報告では、便秘薬による腸内環境の改善により、慢性腎臓病の進行が抑制されることが報告された。腎不全で悪化した腸内環境の改善が、慢性腎臓病の新規治療ターゲットとなる可能性がある。

<腸管粘膜バリア機能> 腸管には腸内細菌由来のエンドトキシン、食事由来抗原などの管腔内異物を体内に侵入させないバリア機能を有している。腸管バリア機能は、複数のバリア因子によって統合されている。このうち、上皮細胞間の物質通過を制御するタイトジャンクション (Tight Junction: TJ) は最も重要な因子で、上皮細胞同士を密接につなが合わせて低分子物質以外の物質の透過を物理的に阻害する。また、免疫系を抑制する制御性T細胞 (Treg細胞) も、マウス消化管粘膜に恒常的に多数存在し、炎症抑制性サイトカインIL-10等を産生し、IL17を産生するTh17細胞とのバランスを保つことによって、腸管バリア機能維持に役割を果たしている。また、腸管上皮細胞表面膜上を覆うグリコカリックス粘膜層も腸管バリア機能の一端を担っている。しかし、慢性腎不全病態での腸内細菌叢変化と腸管バリア機能の関連、バリア機能変化と尿毒症物質吸収・蓄積の関連の研究は十分でない。

<生体内抗菌ペプチド・ディフェンシンと腸内細菌叢> 生体は感染防御のため、自ら抗菌物質を産生している。ヒトにおける抗菌ペプチドはディフェンシンと総称され、細菌、真菌など広範囲にわたり抗菌活性を持つ。このうち粘膜上皮の感染防御に関与しているのが α -と β -ディフェンシンである。 α -ディフェンシンは腸内細菌の組成を制御することによって腸内環境の恒常性を保っていることが明らかになっている。腸内細菌叢変化にディフェンシンの発現変化が関与していることが推測されるが、慢性腎不全病態におけるディフェンシン発現変化を検討した報告はない。

2. 研究の目的

「慢性腎不全では、腸内細菌叢の変化により、腸管バリア機能の低下を来す」との仮説を立てた。腸内細菌叢の悪化が炎症惹起物質の増加を来し、腸管バリア機能を傷害し、腸管内で増加した尿毒症物質の体内吸収を阻止できず、血中尿毒症濃度の上昇を来すのではないかと考える。リン酸吸着薬は、この悪化した腸内環境を改善する可能性があると考えられる。具体的には、本研究は以下の項目を明らかにすることを目的に研究を行う。

1. 慢性腎不全モデル動物の腸内細菌叢変化の検討
2. 慢性腎不全モデル動物の糞便中および血中尿毒素物質変化の検討
3. 慢性腎不全モデル動物の腸管粘膜バリア機能変化の検討
4. 腸内細菌叢変化によるディフェンシン発現変化の検討

3. 研究の方法

1. 慢性腎不全モデル動物の作成と腸内細菌叢変化の検討
 - (1) 自然発症ネフローゼ ICGN マウスの実験プロトコール: 5週齢雄性 ICR マウス (対照群) および、自然発症ネフローゼ ICGN マウスを用いた。経時的に体重、血圧を測定しながら、生後15週に検体を採取し検討した。
 - (2) アデニン投与慢性腎不全モデルマウスの作成と実験プロトコール: 10週齢雄性 C57BL/6 マウスを用いた。1%アデニン食を連日投与 (severe CKD)、もしくは週4日投与 (Mild CKD) を行い腎不全作成した。経時的に体重、血圧、蛋白尿を測定しながら、投与4週後に検体採取した。
 - (3) 腸内細菌叢の検討: 検体採取日の24時間に排泄された糞便を回収し凍結した。腸内細菌叢は糞便よりDNAを精製し、T-RFLP (末端標識制限酵素断片多型分析) 解析で測定した (テクノスルガ・ラボに依頼)。検出された各腸内常在菌は便宜的分類単位の相対量で

表し、クラスター解析を行った。

2. 慢性腎不全モデル動物の糞便中および血中尿毒素物質変化の検討

糞便中に含まれる尿毒素物質のうち、フェノール類(パラクレゾール、フェノール)、インドールおよび、糞便中腐敗産物のスカトールを高速液体クロマトグラフにて定量分析した。血中尿毒素物質は、インドキシル硫酸、フェノール、パラクレシル硫酸を高速液体クロマトグラフにて定量分析した(伏見製薬所に依頼)。同時に血清クレアチニン、尿素窒素を測定し、腎機能低下と尿毒症物質蓄積、腸内細菌叢の変化と糞便中腐敗産物蓄積の関連を検討した。

3. 慢性腎不全モデルマウスの腸管粘膜バリア機能変化の検討

(1) 粘膜グライコカリックス層の検討: 粘膜側細胞膜から分泌された酸性のムコ多糖と糖タンパク質からなるグライコカリックス層は、低分子~高分子化合物の吸収に対する透過障壁となる。腸管組織のレクチン染色にて検出し、層の厚みを検討した。

(2) タイトジャンクション蛋白発現の検討: 腸管上皮細胞間にはタイトジャンクションと呼ばれる細胞間接着構造が形成されており、物理的バリアとして働く。タイトジャンクションを形成する Claudin-5 の発現を組織免疫染色とで解析を行った。

(3) 腸管粘膜透過性試験: 各種分子量の FITC-デキストランを用いた腸管粘膜透過性試験を行い、腸管粘膜バリア機能を総合的に評価した。

4. 慢性腎不全モデルマウスのディフェンシン発現変化の検討: 腎不全モデル作成後、腸管でのディフェンシンの経時的発現変化を、マイクロアレイ解析で網羅的解析を行った。

4. 研究成果

15 週令 ICGN マウスは腎不全を呈していた (Table1)。アデニン腎不全マウスもアデニン投与期間によって、中等度から高度の腎不全を呈していた (Table2)。

Table 1. Physiological and biochemical data

	15W ICR Control (n=8)	15W ICGN Renal Failure (n=8)
S-Cre, mg/dl	0.08 ± 0.01	0.24 ± 0.02*
BUN, mg/dl	24.8 ± 1.2	65.6 ± 4.8*
BW, g	44.0 ± 1.9	23.5 ± 2.8*

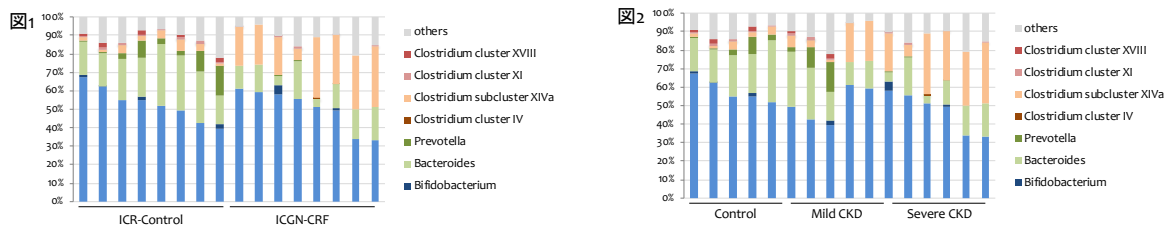
Values are expressed as mean ± SEM. * P<0.05 v.s. Control mice.

Table 2. Physiological and biochemical data

	Control (n=12)	Mild CKD (n=8)	Severe CKD (n=7)
S-Cre, mg/dl	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.03*	2.45 ± 0.3*†
BUN, mg/dl	27.1 ± 0.8	50.3 ± 7.7*	82.0 ± 12.3*
BW, g	25.6 ± 0.6	20.2 ± 0.9*	16.6 ± 0.7*†

Values are expressed as mean ± SEM. * P<0.05 v.s. Control. †P<0.05 v.s. Mild CKD.

ICGN マウスの腸内細菌では ICR マウスと比較して Bacteroides 群が有意に低下し、Clostridium 群が有意に増加していた (図 1)。アデニン腎不全マウスも同様に Bacteroides 群が有意に低下し、Clostridium 群が有意に増加していた (図 2)。



ICGN マウスの糞便中および血中尿毒素物質は有意に増加していた (Table 3)。

Table 3. Fecal decay products and serum uremic toxin

	15W ICR Control (n=6)	15W ICGN Renal Failure (n=6)
Feces Indole, µg/g feces	10.1 ± 0.7	9.2 ± 0.7
Feces Phenol, µg/g feces	3.01 ± 0.20	6.68 ± 0.25*
Feces p-Cresol, µg/g feces	0.054 ± 0.006	0.306 ± 0.048*
Serum Indoxyl sulfate, µg/mL	0.77 ± 0.08	5.89 ± 1.01*
Serum Phenol, µg/mL	0.15 ± 0.01	0.58 ± 0.07*
Serum p-Cresyl sulfate, µg/mL	0.39 ± 0.006	0.77 ± 0.007*

Values are expressed as mean ± SEM. * P<0.05 v.s. Control mice.

ICGN マウス腸管のグライコカリックス発現、Claudin 発現、粘膜バリア機能は ICR マウスに比較し低下していた。

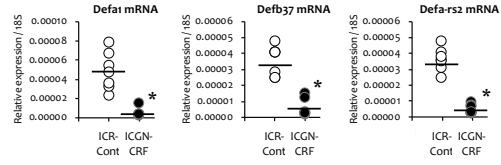
ICGN マウスではディフェンシン発現が有意に低下していた (Table 4, 図 3)。

Table 4. Barrier function associated molecule

Gene Symbol	ratio to ICR	Gene Name
Defensin		
Defa1	0.140 ± 0.015	defensin, alpha, 1
Defa2	0.146 ± 0.037	defensin, alpha, 2
Defa3	0.121 ± 0.014	defensin, alpha, 3
Defa23	0.141 ± 0.023	defensin, alpha, 23
Defb37	0.166 ± 0.037	defensin, beta, 37
Defb40	0.170 ± 0.009	defensin, beta, 40
Defa-rs2	0.111 ± 0.014	defensin, alpha, related sequence 2
Defa-rs4	0.101 ± 0.007	defensin, alpha, related sequence 4
C-type lectin		
Clec2h	0.020 ± 0.004	C-type lectin domain family 2, member h
Reg3b	0.049 ± 0.020	regenerating islet-derived 3 beta
Reg3g	0.093 ± 0.052	regenerating islet-derived 3 gamma
Tight junction		
Cldn5	0.693 ± 0.073	claudin 5
Cldn8	0.572 ± 0.049	claudin 8
Cldn10	0.456 ± 0.028	claudin 10
Ocln	0.825 ± 0.020	occludin
R-spondin		
Rspo1	0.592 ± 0.031	R-spondin homolog
Rspo3	0.660 ± 0.032	R-spondin 3 homolog

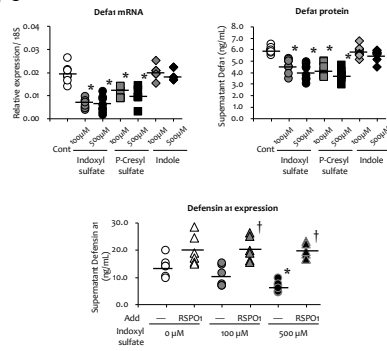
N=4. Values are expressed as mean ± SEM. * P<0.05 v.s. Control mice.

図 3



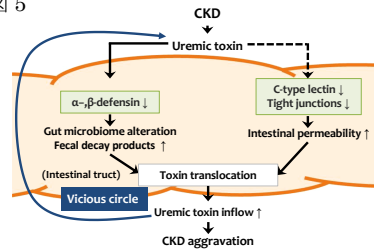
ディフェンシンの発現低下には尿毒症物質が関与していた (図 4)。

図 4



本研究の成果をまとめる (図 5)。

図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Minoru Satoh, Seiji Itano, Yuji Sogawa, Yoshisuke Haruna, Kengo kidokoro, Hajime Nagasu, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara
2. 発表標題 The association of microbiota alteration and intestinal barrier function in chronic renal failure mice.
3. 学会等名 ISN Frontiers Meetings 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minoru Satoh, Seiji Itano, Megumi Kondo, Yoshihisa Wada, Hiroyuki Kadoya, Tamaki Sasaki, Naoki Kashihara.
2. 発表標題 Uremic toxin decreases intestinal defense peptides and barrier functions in chronic renal failure mice.
3. 学会等名 ASN KIDNEY WEEK 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	長洲 一 (Nagasu Hajime) (40412176)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	