

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15784

研究課題名(和文)世界初となるIgA腎症における腸内細菌叢の解析を基に『腸腎関連』の解明にせまる

研究課題名(英文)The world's first analysis of the intestinal microbiota in IgA nephropathy and an attempt to elucidate the 'intestinal-renal relationship'

研究代表者

井下 博之 (INOSHITA, Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：80646117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症は最も頻度の高い糸球体腎炎で、腎生検後20年で約20-40%の症例が末期腎不全に陥る予後不良の疾患であり、可及的速やかな病態解明が必要であるが、その全容は未だ明らかではない。今回我々は、IgA腎症の病態解明のため、『腸腎関連』に着目して研究を計画した。IgA腎症の多くは慢性腎臓病へと移行するため、まずは慢性腎臓病患者を対象に腸内細菌叢解析を施行し、その細菌叢の分布を明らかにした。さらに慢性腎臓病患者を対象に腸内細菌叢と関連のある血清サイトカインを測定し、現在解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管粘膜にはおよそ100兆個もの腸内細菌が極めて高密度で生息し、腸内細菌叢を形成している。腸内細菌叢は、粘膜関連リンパ組織(MALT)を成熟させ、分泌型IgA抗体産生を促す他、免疫司令塔であるT細胞を制御するなど、免疫システムの構築に貢献している。腸内細菌叢はIgANを含めた慢性腎臓病の発症・進展に深い関わりを持っていると推察されるが、慢性腎臓病患者の腸内細菌叢を解析した報告は、我々の知る限りなされていない。我々の研究は慢性腎臓病患者の腸内細菌叢を16S rRNA遺伝子解析により明らかにした上で免疫学的な解析を加えたのち、発症・進展の機序に迫るものである。

研究成果の概要(英文)：IgA nephropathy (IgAN) is the most common glomerulonephritis, and about 20-40% of the patients were developing end-stage kidney disease at 20 years after kidney biopsy. The pathogenesis of the disease is still unclear, although the full extent of the disease needs to be clarified as soon as possible. In the present study, we designed a study focusing on the 'intestinal-renal association' to elucidate the pathogenesis of IgAN. Since most cases of IgAN progress to chronic kidney disease, we first analyzed the intestinal microbiota of patients with chronic kidney disease to determine its distribution. In addition, serum cytokines associated with the intestinal microbiota have been measured in patients with chronic kidney disease and are currently being analyzed.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腸内細菌叢 慢性腎臓病 IgA腎症 粘膜免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

病態解明の必要性

IgAN は最も頻度の高い糸球体腎炎で、腎生検後 20 年で約 20-40%の症例が末期腎不全に陥る予後不良の疾患であり、可及的速やかな病態解明が必要であるが、その全容は未だ明らかではない。

現在までの研究から IgAN の発症・進展機序として、何らかの原因によって引き起こされた T 細胞バランスの制御異常によって糖鎖異常 IgA が増産され、腎炎が惹起されるという学説が有力である(J Am Soc Nephrol 2011;22:1795-803)。この糖鎖異常 IgA の産生源として口蓋扁桃に着目がおかれ、本邦では IgAN の治療の一つとして、口蓋扁桃摘出術(扁桃摘)が広く行われており、一定の効果をあげている。しかしながら欧米においてこの扁桃摘は、IgAN の腎障害進展を抑制しないとの見解が多く、否定論も未だ根強い。ほかに、ステロイドパルス + 扁桃摘後も腎炎が遷延する IgAN 症例の報告もある。よって、口蓋扁桃以外にも、糖鎖異常 IgA の産生源がある可能性を考えなければならない。そこで我々は糖鎖異常 IgA の産生源および治療ターゲットとして、腸管粘膜及び腸内細菌叢を検討することとした。

これまでの研究から示唆されること

我々のグループは、過去から現在に至るまで、IgAN における「腸腎関連」の研究を進めてきた。近年では腸管粘膜免疫と T 細胞制御異常に注目し、Dr. Emancipator らとの共同研究により、Smad4 を T 細胞特異的にノックアウトすることにより制御性 T 細胞(Treg)への分化を抑制し、Th2 優位に偏位させた遺伝子改変マウスを作成。その表現型は、絨毛構造の消失を伴う腸管炎症及び IgAN に非常に類似した病態(メサンギウム領域への IgA 沈着、多量体 IgA の増加、血清中糖鎖異常 IgA の上昇などを呈することを世界に先駆けて報告した(Inoshita H et al. PloS One 2013;8:e78736)。その他にも、GATA 3 を遺伝子導入させることで Th2 優位に偏位させたマウスに、経口による抗原感作をすると IgAN 様の病態を誘導し、血清中の糖鎖異常 IgA が上昇することを明らかにした(Immunobiology 2016;221:577)。また、Th2 サイトカインである IL-4 が Core1 (1,3galactosyl transferase)とその分子シャペロン Cosmc の活性を低下させることにより、B 細胞からの糖鎖異常 IgA1 の産生を増加させることも報告している(Nephrol Dial Transplant 2010;25:3890-7)。

また、ゲノムワイド関連解析で新たに同定された IgAN の感受性座位は、炎症性腸疾患や腸管粘膜の免疫応答と関連が認められている(Nat Genet 2014;46:1187)。また、グラム陰性菌の表面に特に多く存在する lipopolysaccharide(LPS)は、Toll-like receptor (TLR)4 を介して B 細胞からの糖鎖異常 IgA 産生を増加させ(Nephrol Dial Transplant 2008;23:1608)、B-cell activating factor of the TNF family (BAFF)を過剰発現させたマウスは、IgAN 様の病態を呈し、その機序には腸内細菌叢が関連しているとの報告がなされている(J Clin Invest 2011;121:3991)。以上、我々のグループと国内外の研究により、腸内細菌叢が IgAN の発症・進展機序に深く関わっていると推定されるが、ヒト IgAN 患者を対象にした、腸内細菌叢をメタゲノム解析し、免疫学的な検討を加えた報告は未だなされていない。

2. 研究の目的

(1) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

我々や他の研究者の報告も含めた一連の結果より、IgAN の発症・進展のメカニズムとして次の仮説が構築される。

1) Pathobiont(いわゆる悪玉菌)や LPS を抗原提示細胞が認識することで、2) B 細胞にシグナル伝達が行われる。3) そこに T 細胞の制御異常(おそらくは Th2 偏位)が加わることにより 4) 糖鎖異常 IgA が産生され、5) IgAN が発症・進展する。

この仮説に基づき、我々は研究期間内に

- IgAN 患者から糞便を採取し、16S rRNA 遺伝子を網羅的に解析することにより、腸内細菌叢の構成を明らかにする。
- IgAN 患者の血清中のサイトカインを解析し、T 細胞制御異常の有無を明らかにする。
- IgAN 患者の血清中の IgA を糖鎖解析することにより、糖鎖異常 IgA の定量化をする。
- 上記で明らかとなった T 細胞バランスおよび糖鎖異常 IgA と腸内細菌叢構成を比較し関連を解析する。また、IgAN の病理所見パターンと腸内細菌叢構成を比較することにより、病期分類と細菌叢との関連を解析する。

(2) 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

消化管粘膜にはおよそ 100 兆個もの腸内細菌が極めて高密度で生息し、腸内細菌叢を形成している。腸内細菌叢は、粘膜関連リンパ組織(MALT)を成熟させ、分泌型 IgA 抗体産生を促す他、免疫司令塔である T 細胞を制御するなど、免疫システムの構築に貢献している。よって前述のように、腸内細菌叢は IgAN の発症・進展に深い関わりを持っていると推察されるが、IgAN 患者の腸内細菌叢を解析した報告は、我々の知る限りなされていない。

本研究の独創的特色は多数の IgAN 患者の腸内細菌叢を 16S rRNA 遺伝子解析により明らかにした上で免疫学的な解析を加えたのち、発症・進展の機序に迫るものである。もしこれが実現すれば、世界で初めての報告であり、学界に与えるインパクトは大きい、と我々は確信している。また本研究が成功すれば、次のような波及効果が期待できる。

A 腸管粘膜免疫と IgAN の関連について研究が飛躍的に進歩する

B 腸内細菌叢をターゲットとした副作用の少ない、新しい創薬(内服ワクチンなど)の可能性

C IgAN 発症・進展予防による医療費の削減

IgAN に関して、豊富な基礎・臨床実績をもつ我々は、今回の研究を通して、多くの IgA 腎症患者の診療に貢献できるものと考えている。

3. 研究の方法

【平成 29 年度】 目標: IgA 腎症患者の腸内細菌叢の構成を明らかにする

(1) 患者エントリー: 平成 29 年度以降、順天堂大学医学部順天堂医院および附属練馬病院で腎生検を施行され、新規に IgAN と診断された患者を対象とする。過去の実績から、少なくとも年間約 70 名程度の新規患者を想定している。一般的な病歴聴取(下痢や腹痛などの消化器症状で肉眼的血尿が出現したか否かも含める)やバイタル、Body mass index の他、患者背景の主要検査項目として、BUN・Cre・eGFR・Na/K/Cl・CRP・IgA・C3・AST/ALT・UA・尿蛋白(定性/定量)・尿潜血などを集計する。

(2) 腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子解析: 対象の糞便を回収する。その後、腸内細菌の 16S rRNA 遺伝子を網羅的に解析することにより、腸内細菌叢の構成を明らかにする。構成については以下の点に着目して研究を進める。

A) Firmicutes 門と Bacteroidetes 門の比率: 免疫不全マウスを用いた研究により、Firmicutes 門と Bacteroidetes 門の比率が、T 細胞・B 細胞を中心とした免疫系を維持する上で非常に重要であることが明らかとなっている(Immunity 2014;41:152-165)。

B) 多様性(Diversity): 炎症性腸疾患においては腸内細菌叢の多様性が失われていることが明らかとなっている(Mosca A et al. Front Microbiol 2016;7:455)。上記 Firmicutes 門、Bacteroidetes 門の他、Actinobacteria 門、Proteobacteria 門、Fusobacteria 門、Synergistetes 門などの比率を明確にする。

C) 腸内の主要細菌割合: 慢性腎臓病患者の腸内細菌叢は健常人と比較して、Clostridium perfringens (ウェルシュ菌)といった“Pathobiont、悪玉菌”が増加傾向に、また

Bifidobacteria(ビフィズス菌)、Lactobacillus (乳酸桿菌)などの“Commensal、善玉菌”が減少傾向にあることが報告されている(Ramezani A, et al. J Am Soc Nephrol 2014;25:657-670)。よって本研究では ビフィズス菌、乳酸菌、酪酸菌、エクオール菌などの善玉菌の他、ウェルシュ菌、大腸菌といった悪玉菌の割合を調査する。

*ピットフォール

IgA 腎症患者は年間約 70 名程度を想定しているが、規定数に達しない可能性が出てきた場合は、他の附属病院と連携して症例を集める。また、その際の糞便の保存方法であるが、-80 凍結保存が困難である場合は、グアニジン・チオシアン酸塩溶液を用いた室温保存を検討する。同保存方法は、冷凍保存と同レベルの解析結果が得られることが実証されている(Nishimoto Y et al. Gut 2016;65:1574-1575)。

□ 腸内細菌叢の解釈については、虎の門病院消化器内科と討議する。

【平成 30 年度】 目標:腸内細菌叢をターゲットとした治療にむけて

(1)human cytokine assay(Bio-Plex®)を用いて、血清中の T 細胞系サイトカイン(IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、GM-CSF、IFN-、TNF-)を定量化する。また、human regulatory T cell Whole Blood Staining Kit(eBioscience®)を用いて、末梢血中の制御性 T 細胞数を計測することにより、T 細胞バランスを解析する。

(2) 血清中の糖鎖異常 IgA を定量化する。この測定は、我々のグループと協和発酵キリン株式会社®が共同開発した、糖鎖異常部位を特異的に認識する抗体を用いた ELISA 測定のため、従来のレクチンを用いた測定法より精度が高く、信頼性がある(Nephrol Dial Transplant 2015;30:1315-21)。

(3) 以上の測定から得たデータを統計学的手法を用いて解析をした後、腸内細菌叢構成が IgAN の発症・進展機序に関わっていることが明らかとなれば、臨床的介入試験(食事内容改善・整腸剤投与・排便コントロールなど)を検討していく。腸内環境をターゲットとした、より低侵襲で、より効果的な IgAN の加療を確立することが本研究の将来的なゴールである。

*ピットフォール

□ 腸内細菌叢構成と IgAN 発症・進展機序が明らかとならない場合でも、IgAN における腸内細菌叢を、16SRNA 遺伝子解析を用いて調査した研究は世界初めてとなるため、その結果だけでも十分に発表する価値はあり、また今後の研究の礎となると考える。

研究体制と研究協力者

本研究は、研究代表者が所属する順天堂大学医学部腎臓内科学講座の「腎炎グループ」が、虎の門病院消化器内科「胃腸グループ」の菊池大輔医師と連携を取りながら行う。

石坂助教、中野助教は免疫学的な解析や糖鎖異常 IgA 測定を実施する。井尾准教授、日高准教授には臨床からの視点で、結果に対する評価を頂く。また、鈴木祐介教授には IgA 腎症の基礎・臨床に渡って幅広く助言を頂く。さらに、消化管分野に関して浩瀚な業績のある菊池医師に、腸内細菌叢解析に関する技術指南の他、データの解釈や腸管免疫に関する助言を頂く。

別に行う研究がある場合

本研究の他、「IgAN の口蓋扁桃を対象とした研究」及び「遺伝性血管性浮腫患者の血清を用いて浮腫のメカニズムを解明する臨床研究」に研究分担者として参画している。役割は結果に関する助言や実験指導が中心であり、実験を専門的に実施する予定はない。よってこの研究は、「IgAN の腸内細菌叢を対象とした」本研究とは一線を画すものである。

4. 研究成果

IgAN は糸球体腎炎の中で最も慢性腎臓病に至る疾患である。そこでまず慢性腎臓病患者 5 例を対象に腸内細菌叢の解析を施行した。

	Ave	1	2	3	4	5
Actinobacteria	6.30%	0.10%	6.00%	15.40%	4.50%	5.80%
Bacteroidetes	18.60%	20.80%	17.70%	16.70%	17.50%	20.20%
Firmicutes	72.20%	76.10%	71.90%	66.20%	75.30%	71.40%
Proteobacteria	2.60%	3.10%	4.10%	1.20%	2.60%	2.30%
Spirochaetes	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Verrucomicrobia	0.30%	0.00%	0.30%	0.50%	0.20%	0.30%

全体として Firmicutes 門の平均比率は 72.2%、次いで Bacteroides 門が 18.6%、Actinobacteria 門が 6.3%とこの 3 つの門が大多数を占め、残りは Proteobacteria 門の 2.6%、Verrucomicrobia 門 0.3%という結果であった。

また、慢性腎臓病患者 44 名を対象に腸内細菌叢と深い関連をもつ血清中のサイトカインである TGF- β 、IL-10、IL-17、IL-22 を測定した。

TGF- β の平均は 22599.86 pg/mL、IL-10 の平均は 3.88 pg/mL、IL-17 の平均は 0.26 pg/mL、IL-22 pg/mL の平均は 25.74 であった。IL-10 (pg/mL) は検出限界以下から 61.68 まで、IL-17 (pg/mL) は検出限界以下から 1.846 まで、IL-22 (pg/mL) は検出限界以下から 129.5 まで、TGF- β (pg/mL) は 8143 から 50835 までの範囲で検出された。

また、IL-10 が 4 以上の症例は排便回数や排便に関する不満が、統計学的有意差はないものの、少ない傾向にあった。現在これらのデータを基にさらなる解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----