

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15971

研究課題名（和文）腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸の腎保護メカニズムの解明と新たなCKD治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a CKD treatment with short-chain fatty acids

研究代表者

三上 大輔 (Daisuke, Mikami)

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・助教

研究者番号：90464586

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）：腸内細菌叢が産生するプロピオン酸添加水をアデニン負荷マウスに投与した。その結果、濃度依存性に血清BUN、Cr値が改善し、腎組織も改善することが確認出来た。また、プロピオン酸の受容体である、GPR41、GPR43のノックアウトマウスでは、プロピオン酸添加による腎機能の改善効果が、正常マウスより減弱された。よって、短鎖脂肪酸、GPR41、GPR43の連関を示された。また、腎組織において、炎症性サイトカインの改善が有意にみられ、GPR41、GPR43は炎症に関与することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢の改善が、腎保護効果につながる可能性を示すことが出来た。今後、慢性腎臓病（CKD）の治療の対象に腸内環境の調整、あるいは短鎖脂肪酸の投与が新たな治療法の一つになる可能性を考えた。

研究成果の概要（英文）：Propionic acid produced by intestinal microflora was administered to adenine-loaded mice. As a result, serum BUN and Cr levels were improved in a dose-dependent manner, and renal tissue was also improved. In addition, the effect of propionate on renal function was weaker in knockout mice with GPR41 and GPR43 receptors than in normal mice. Thus, the linkage between short-chain fatty acids, GPR41 and GPR43 was demonstrated. In addition, in the kidney tissue, inflammatory cytokines were significantly improved, indicating that GPR41 and GPR43 are involved in inflammation.

研究分野：腎臓内科

キーワード：短鎖脂肪酸 プロピオン酸 GPR41 GPR43

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、糖尿病性腎症を代表とするCKDからの透析導入は年々増加している。尿毒素吸着薬やアンジオテンシンII受容体拮抗薬などの降圧剤を中心とした集学的治療による末期腎不全への進行抑制が試みられてきたが、その効果は決して十分なものとは言えない。このため、新たなCKDの新規治療法の開発と確立は急務である。

短鎖脂肪酸とは、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの炭素数6以下の脂肪酸であり、中鎖脂肪酸や長鎖脂肪酸が食事からの摂取や体内での合成によるのに対して、短鎖脂肪酸は難消化性成分である多糖類から腸内細菌による分解・発酵で生じる。短鎖脂肪酸は腸管上皮細胞のエネルギー源として利用され、また食後血中で増加し肝臓で脂質合成や糖新生に利用されて宿主のエネルギー源となるなど、栄養素としての作用が知られていた。しかし近年、7回膜貫通型G蛋白共役型受容体であるGPR41、GPR43がこれらの受容体であることが見出され、リガンドとしての生理的意義・機能に注目が集まっていた。

GPR41、GPR43の腎臓における発現についてはこれまで検討されていなかったが、研究代表者は、ヒト正常腎での受容体の発現の有無及び発現部位を免疫染色法で検討し、ヒト正常腎ではGPR41、GPR43ともに遠位尿細管と集合管を中心に発現することを世界で初めて確認した。また、ヒト腎尿細管上皮細胞を用いたin vitroの実験で、TNF- α 誘導性MCP-1の産生を主要な短鎖脂肪酸である酢酸、プロピオン酸、酪酸が抑制することを合わせて報告した。さらに、その分子機序がTNF- α 誘導性JNK、p38のリン酸化抑制によること、この抑制がGPR41/43、その下流のG β を介することを阻害剤やsiRNAを用いた実験で見出し、腎臓におけるGPR41/43を介する短鎖脂肪酸の抗炎症作用とその分子機序を報告した。

2. 研究の目的

ヒト腎尿細管上皮細胞を用いたin vitroの実験系で短鎖脂肪酸によるGPR41/43を介した抗炎症作用の分子機序を解明した。今後はヒトへの臨床応用を目標に、in vivoの実験系でのGPR41/43経路による抗炎症作用の検討および腸腎連関の解明を本研究の目的とする。近年、CKDの病態に、腸内細菌叢を含む腸内環境が関わっており、腸管由来尿毒素の増加、短鎖脂肪酸の低下により、腎の線維化、炎症の増悪を惹起するという「腸腎連関」の存在が明らかになりつつある。

本研究により生体内での短鎖脂肪酸の抗炎症効果を証明できれば、腎臓病の新たな治療標的として腸内細菌叢を提示すると同時に、腸腎連関の基礎データを発信することにもなる。本研究は腎疾患への新規治療法開発に繋がる可能性があると考えた。

3. 研究の方法

(1) アデニン負荷慢性腎不全モデルマウスでの短鎖脂肪酸による腎保護効果の検証。

7週齢のC57BL/6マウスに0.2%アデニン負荷食を摂食させ、そのマウスを0.5%または1.0%プロピオン酸添加水を与える短鎖脂肪酸投与群と無添加水を与える群、更に普通食に無添加水を与えるコントロール群の4群に分け、6週間後、採血で血清Cr、BUN値の変化、腎病理組織を解析する。

(2) アデニン負荷GPRsノックアウトマウスでの短鎖脂肪酸による腎保護効果の検証。

短鎖脂肪酸の作用がGPR41、GPR43を介する事を明確にするために、GPR41、GPR43ノックアウトマウスに(1)と同様にアデニン負荷食とそれに対する0.5%または1.0%プロピオン酸添加水投与で、6週間後の血清Cr、BUN値、腎臓組織の病理学的変化を検討する。

(3) アデニン負荷マウスでの短鎖脂肪酸による腎保護効果の分子機構の解明。

上記(1)、(2)で得られた腎組織からcDNAを作成し、同時にタンパク質も抽出する。cDNAを用いて、炎症、線維化に関わるMCP-1、IL-6、IL-1 β 、RANTES、TNF- α 、TGF- β 、PAI-1、VEGF-C、VEGF-AのmRNA発現をTaq-Man[®] probeを用いたreal-time PCRで解析する。

4. 研究成果

(1) アデニン負荷慢性腎不全モデルマウスでの短鎖脂肪酸による腎保護効果の検証。

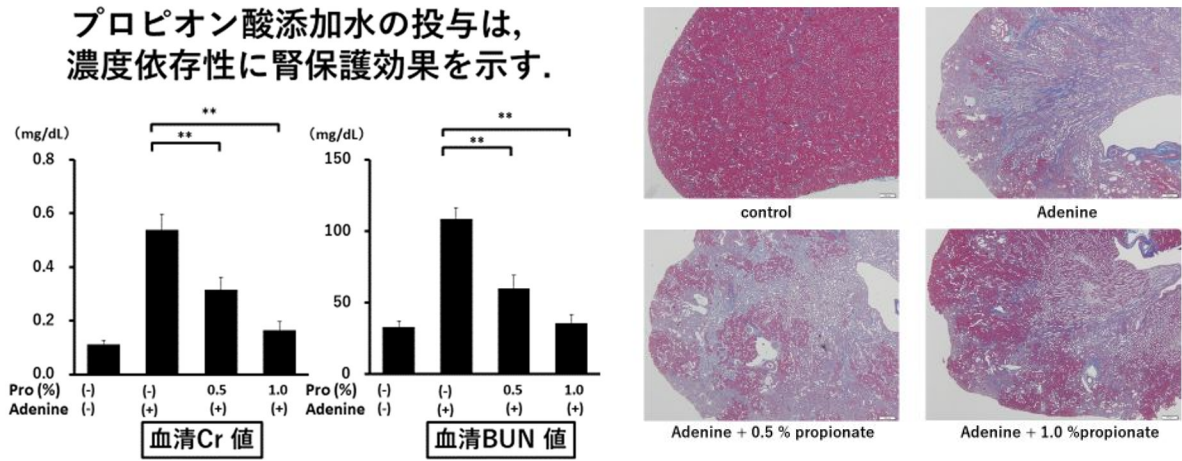


図1 慢性腎不全モデルマウスにおけるプロピオン酸添加水投与による血清Cr, BUNの変化

図2 慢性腎不全モデルマウスにおけるプロピオン酸添加水投与による腎病理組織の変化

アデニン負荷マウスにプロピオン酸添加水を与えた所、濃度依存性に血清Cr, BUN (図1) 及び病理組織 (図2) の改善を確認した。

(2) アデニン負荷 GPRs ノックアウトマウスでの短鎖脂肪酸による腎保護効果の検証。

次に、短鎖脂肪酸の作用が GPR41, GPR43 を介する事を明確にするために、GPR41, GPR43 ノックアウトマウスに (1) と同様にアデニン負荷食とそれに対する 0.5% または 1.0% プロピオン酸添加水投与で、6 週間後の血清Cr, BUN 値を検証したところ、GPR41/GPR43 ノックアウトマウスでは、プロピオン酸添加の効果は有意に抑制されており (図3)、短鎖脂肪酸と腎臓の GPR41/43 の連関が示されたと考えた。

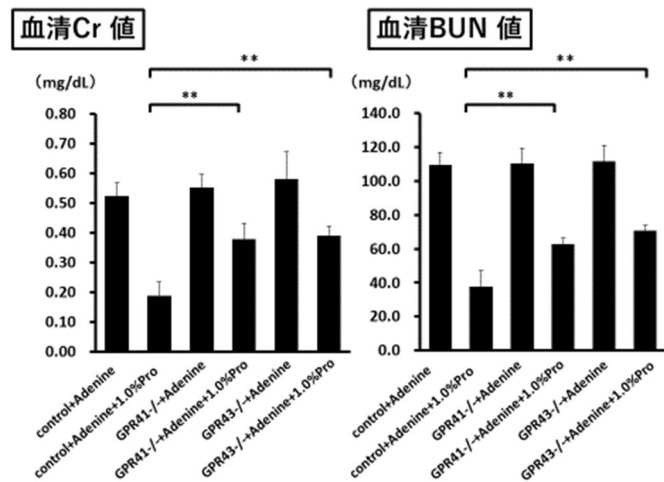


図3 アデニン負荷 GPRs ノックアウトマウスにおけるプロピオン酸添加水投与による血清Cr, BUNの変化

(3) アデニン負荷マウスでの短鎖脂肪酸による腎保護効果の分子機構の解明

得られた腎組織から、炎症性サイトカイン、線維化関連サイトカインの mRNA の発現を確認したが、TNF- α , IL-1, IL-6 をはじめとする炎症性サイトカインの関連が有意に見られた。GPR41/43 と短鎖脂肪酸は炎症抑制で腎保護に作用している可能性を考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Daisuke Mikami, Mamiko Kobayashi, Junsuke Uwada, Takashi Yazawa, Kazuko Kamiyama, Kazuhisa Nishimori, Yudai Nishikawa, Sho Nishikawa, Seiji Yokoi, Hideki Kimura, Ikuo Kimura, Takanobu Taniguchi, Masayuki Iwano	4. 巻 1865(6)
2. 論文標題 Short-chain fatty acid mitigates adenine-induced chronic kidney disease via FFA2 and FFA3 pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 158666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2020.158666.	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三上大輔
2. 発表標題 慢性腎不全モデルマウスにおける短鎖脂肪酸の腎保護効果と分子機序の解明
3. 学会等名 日本腎臓学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------