

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08287

研究課題名（和文）腸管免疫に影響を与える腸内細菌叢に着目した微小変化型ネフローゼ症候群の病因解明

研究課題名（英文）Etiology of minimal change nephrotic syndrome focusing on the gut microbiota affecting gut immunity.

研究代表者

辻 章志（TSUJI, Shoji）

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00360256

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：MCNSの初発や再発においては、腸内細菌叢の異常が病因として重要な役割を果たしているという仮説を証明することを目的として研究を進めた。4種類の抗菌薬内服により腸管内をほぼ無菌状態にした時のPAN投与とラットの尿タンパク量について評価をした。当初、尿タンパク量は対照と比較して高値となることを予測していた。結果は逆に尿タンパク量が低値となっていた。この原因として4種類の抗菌薬の投与により酸化ストレスと関連する腸内細菌が殺菌される結果、PANラットの尿タンパクが減少したと考えた。そこで酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdGを測定した結果、4種類抗菌薬内服前後では8-OHdGが有意に低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児ネフローゼ症候群の第一選択薬は副腎皮質ステロイド薬である。副腎皮質ステロイド薬の投与により約90%が寛解となる。しかし、約60～70%が再発をきたし、再び副腎皮質ステロイド薬の投与を必要とする。副腎皮質ステロイド薬の副作用は多岐にわたるが、特に小児で問題となる低身長は治療終了後も改善しない。そのため、副腎皮質ステロイド薬の総投与量をできる限り減少することを目的として様々な治療法が考案されている。今回の報告者らの結果により抗菌薬投与がネフローゼの一つの治療法として確立すれば副腎皮質ステロイド薬の総投与量減少が期待され社会的貢献は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：This study was designed to prove the hypothesis that abnormalities in the gut microbiota play an important role in the etiology of first onset or relapse of MCNS. Initially, we expected that the urinary protein level would be higher than that of the control rats. The results showed that, on the contrary, the urinary protein levels were lower. We hypothesized that the administration of the four antimicrobial agents decreased urinary protein in PAN rats as a result of sterilization of gut bacteria associated with oxidative stress. Therefore, we measured urinary 8-OHdG, a marker of oxidative stress, and found that 8-OHdG was significantly decreased before and after administration of the four antimicrobial agents.

研究分野：小児科学

キーワード：微小変化型ネフローゼ症候群 puromycin 8-OHdG 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

小児期に比較的多い腎疾患である「微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS)」の病因は未だに不明であるが、Tリンパ球の機能異常と、それに起因する血管透過性亢進因子の過剰産生が示唆されている。またステロイドの有効性が高い(約80%の症例で寛解に入る)ことが臨床的特徴である。報告者らは、長年MCNSの病因について研究してきた。まず、活性酸素(ROS)や一酸化窒素(NO)といったレドックス制御を担うエフェクター分子の産生亢進がMCNSの病態に関与していることを明らかにした^{(1) (2, 3)}。次にレドックス制御異常の背景には、制御性T細胞(Treg)の質的・量的異常が存在することをつきとめた^(4, 5)。さらにMCNS患者ではTregの関与が示唆されるアレルギー疾患の合併率が高いこと、Tregの分化・誘導には腸内細菌叢が重要な役割を担うこと、などを根拠として『腸内細菌叢の異常によるTregの分化・誘導の低下がMCNSの発症や再発に関与している』という大胆な仮説を立て⁽⁶⁾、それを裏付ける研究成果を相次いで発表してきた。すなわち、(1)再発の多いMCNS患者では腸内細菌叢の異常をきたす帝王切開分娩出生率が高いこと⁽⁷⁾、(2)MCNS患者では明らかな腸内細菌叢の異常が存在すること⁽⁸⁾、(3)MCNS患者の腸内細菌叢ではTregへの分化・誘導を担う酪酸産生菌の構成比率が有意に低く、便中酪酸量やTreg数も少ないこと^(8, 9)などである。

2. 研究の目的

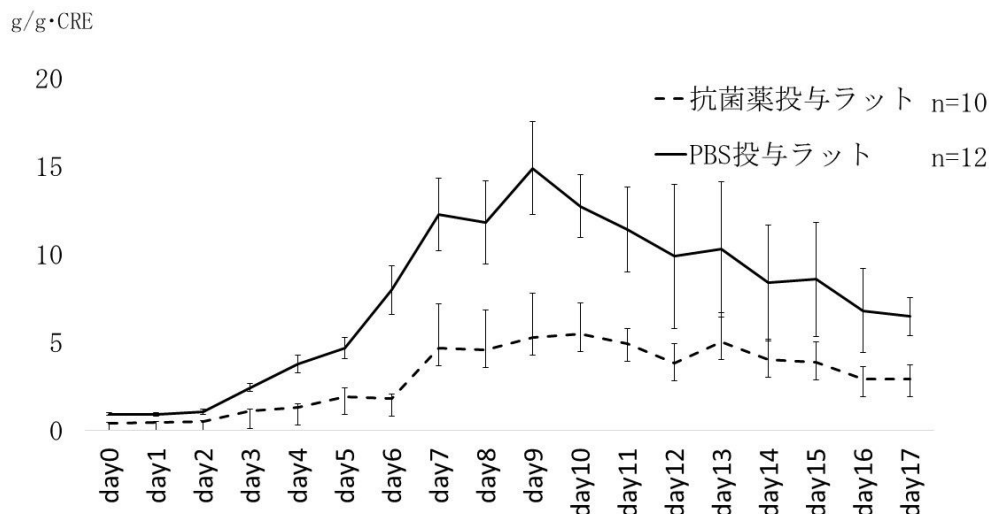
背景で述べた結果に基づいて、「MCNSの初発や再発においては、腸内細菌叢の異常が病因として重要な役割を果たしている」という仮説をMCNSのモデル動物を用いた基礎実験で証明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

- (1) 4種類の抗菌薬(amoxicillin、cefotaxime、vancomycin、metronidazole)投与によって腸内細菌叢を無菌化したラットにおいて、MCNS病変を惹起するpuromycin aminonucleoside(PAN)を投与した場合にMCNS病変が重症化するか否かを尿タンパク定量・電子顕微鏡のpodocyte足突起癒合を評価した。この実験によってMCNSの病因としての腸内細菌叢の異常とそれによる腸管免疫の異常の関係を確認した。
- (2) 腸内細菌叢を無菌化した結果、PAN投与後のラット尿タンパクの変化した場合の原因検索のために酸化ストレスマーカーである尿中8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)の測定をした。

4. 研究成果

4種類の抗菌薬内服により腸管内をほぼ無菌状態にした時のPAN投与ラットの尿タンパク量について評価をした。腸管内を無菌状態にした時には酪酸産生菌は壊滅状態となるためTregも低値となり、尿タンパク量は対照と比較して高値となることを予測していた。しかし、結果は逆に尿タンパク量が低値となっていた。(図)



図：抗菌薬投与群ラットと非投与群ラットとの比較（尿タンパク/尿クレアチニン比）

当初の予想と反する結果になったが、尿タンパク減少の理由として抗菌薬によるエンドトキシン産生菌などの殺菌が関与していると想定し、ラット血中のエンドトキシンを測定したが、4種類抗菌薬投与群と対照群ともエンドトキシンは測定感度以下であり両群に有意差を認めなかった。次に4種類の抗菌薬の投与により酸化ストレスと関連する腸内細菌が殺菌される結果、PANラットの尿タンパクが減少したと考えた。PANラットがネフローゼ状態となる機序として酸化ストレスとの関連が示唆されているためである。そこで酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdGを測定した結果、対照群ではPBS投与前後で尿中8-OHdGの有意な変化はなかったが（前：92.4、後：72.9 ng/mgCr, $p=0.1$ ）、4種類抗菌薬内服前後では有意に低下した（前：110.6、後：40.6 ng/mgCr, $p=0.03$ ）。以上の結果から4種類の抗菌薬投与によるPANラットの尿タンパク量減少は酸化ストレスの軽減が関与していることが示唆された。今後は腸内細菌叢と酸化ストレスとの関係性についてさらに追求していく予定である。

引用文献：

- [1] Kaneko K, Kimata T, Tsuji S, Shimo T, Takahashi M, Tanaka S. Serum albumin level accurately reflects antioxidant potentials in idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol*. 2012; **16**: 411-4.
- [2] Kaneko K, Kimata T, Takahashi M, Shimo T, Tanaka S, Tsuji S. Change in urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2012; **27**: 155-6; author reply 7.
- [3] Iharada A, Kaneko K, Tsuji S, Hasui M, Kanda S, Nishiyama T. Increased nitric oxide production by T- and B-cells in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009; **24**: 1033-8.
- [4] Kimata T, Tsuji S, Kino J, Kitao T, Yamanouchi S, Kaneko K. Close association between proteinuria and regulatory T cells in patients with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2013; **28**: 667-9.
- [5] Tsuji S, Kimata T, Yamanouchi S et al. Regulatory T cells and CTLA-4 in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Int*. 2017; **59**: 643-6.
- [6] Kaneko K, Tsuji S, Kimata T. Role of gut microbiota in idiopathic nephrotic syndrome in children. *Med Hypotheses*. 2017; **108**: 35-7.
- [7] Kimata T, Kino J, Yamanouchi S, Suruda C, Tsuji S, Kaneko K. Effect of cesarean section on relapse of childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Int*. 2017; **59**: 1109-11.

- [8] Tsuji S, Suruda C, Hashiyada M et al. Gut Microbiota Dysbiosis in Children with Relapsing Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Am J Nephrol*. 2018; **47**: 164-70.
- [9] Tsuji S, Akagawa S, Akagawa Y et al. Idiopathic nephrotic syndrome in children: role of regulatory T cells and gut microbiota. *Pediatr Res*. 2021; **89**: 1185-91.

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 0件）

1. 発表者名 Myagmankhuu Saikhanchimeg、辻 章志、赤川翔平、赤川友布子、加藤正吾、山内壮作、木全貴久、金子一成
2. 発表標題 抗菌薬による抗タンパク尿効果：ネフローゼ症候群モデルラットを用いた検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Myagmankhuu Saikhanchimeg、辻 章志、赤川翔平、赤川友布子、加藤正吾、山内壮作、木全貴久、金子一成
2. 発表標題 抗菌薬による抗タンパク尿効果：ネフローゼ症候群モデルラットを用いた検討
3. 学会等名 第57回 日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2022年～2023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
研究協力者	金子 一成 (KANEKO Kazunari)		
研究協力者	木全 貴久 (KIMATA Takahisa)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	赤川 友布子 (AKAGAWA Yuko)		

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