

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18124

研究課題名（和文）日本人生体腎移植レシピエントにおける腸内細菌叢と移植免疫の関連解析

研究課題名（英文）Investigation of the relationship between gut microbiota and transplant immunity in Japanese living-donor kidney transplant recipients

研究代表者

堀 俊太 (Hori, Shunta)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30623681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：腎移植では長期にわたる免疫抑制剤の内服が必要となるが、これにより腎機能や筋量などへ悪影響が与えられる可能性があり、これを腸内細菌叢と関連して解析した。カルシニューリン阻害剤では上皮間葉転換という機序を介して腎機能障害を生じる可能性が示唆された。また、プレドニンやカルシニューリン阻害剤で筋量の著大な低下が確認された。そして、各種免疫抑制剤内服で特徴的な腸内細菌叢が構成されることが確認され、腎機能と筋量などとの関連について検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制剤の改良により腎移植の短期成績は大きく向上した。今後の課題として長期の成績向上があげられるが、今回の検討から免疫抑制剤の長期内服により腎機能障害や筋障害が生じることが再確認できた。腸内細菌叢は免疫機構や薬物の吸収・代謝に大きく関与していることが指摘されており、今回の調査で判明した特徴的な腸内細菌叢の構築と腎機能障害や筋障害の関連が示せれば、今までにない新たなアプローチ（腸内環境を整える治療）で腎移植の長期成績向上に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Long-term oral administration of immunosuppressive drugs is required for renal transplantation, which may adversely affect renal function and muscle mass. In this study, we investigated between these mechanism and the intestinal flora. It was suggested that calcineurin inhibitors caused renal dysfunction through the mechanism of epithelial-mesenchymal transition. A marked decrease in muscle mass was also confirmed with prednisolone and calcineurin inhibitors. Furthermore, it has been confirmed that the characteristic intestinal flora is composed by oral administration of various immunosuppressive agents, and the relationship between renal function and muscle mass is under investigation.

研究分野：腎移植

キーワード：腎移植 腸内細菌叢 上皮間葉転換 サルコペニア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎移植における免疫抑制剤及び治療レジメンの改良による治療成績の向上によって、長期的なフォローの重要性が増してきた。そこで、長期的な免疫抑制剤の使用とレシピエント及び移植腎との関連について着目することは重要となる。その中で、レシピエントの予後が栄養状態や炎症状態、筋量に影響を受けることが近年注目されている。一方で、人体には1000種を超える腸内細菌叢が知られており、腸内細菌叢は人体の血清分子のおよそ20%の形成に関与していることが指摘されている。さらに、腸管内には2000億個にも及ぶ免疫関連細胞が存在し腸管は人体最大級のリンパ器官とされ、免疫寛容にも大きく関与している。腸内細菌はレシピエントにおける栄養状態や炎症状態、筋量、免疫状態に関与している可能性が示唆されている。これまでのところ、腎移植レシピエントに対して使用される免疫抑制剤が持つ腸内細菌叢を介した栄養状態、炎症状態、筋および免疫状態への潜在性について体系的に検討した研究は限られており、日常的に行っている免疫抑制剤がどの程度腸内細菌叢に対する分子学的影響を有しているかを検討する。

(2) 我々は、腎移植レシピエントおよびドナーを対象とした臨床研究において術後栄養状態、筋量、脂肪量が患者予後に関連することを報告した。こうした実績及び成果を進展させ、腎移植レシピエントにおける、腸内細菌叢と栄養・炎症・筋量の関連、さらには免疫抑制剤内服による腸内細菌叢への影響を検討し、腎移植レシピエントのQOLや予後の改善、免疫抑制剤使用の最適化(ステロイド中止等)の可能性を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、腎移植レシピエントに対して行われる免疫抑制療法が腸内細菌叢に与える影響及び誘導される分子学的メカニズムを明らかにし、それに基づく栄養指導・運動療法・免疫抑制剤使用方法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

以下のような計画を立て検討を進めた。

(1) 免疫抑制剤治療によって生じる腸内細菌叢の再構築を分析

各種免疫抑制剤を投与されたC57BL/6マウスの腸内細菌叢を16S rRNA PCRを用いた細菌叢網羅的解析・組織学的に分析し、腸内細菌叢の構築の変化を評価する。また、体重・筋量の変化を継続的に評価する。

(2) 栄養障害・筋障害・腎障害のメカニズムを分子学的に解析

上記で抽出された各種免疫抑制剤による特徴的な腸内細菌叢と栄養障害・筋障害・腎障害の関連を検討する。組織の検討は免疫組織学的検討を行った。また、CTでマウス腸腰筋面積を測定した。

(3) 上述解析結果にもとづく薬剤をはじめとした予防法を探索

候補遺伝子に関わる自然抽出物、化合物、中和抗体あるいはsiRNA大量静注投与をマテリアルとして準備し以下の検証実験を準備する。

(4) ヒト腎細胞株およびマウスを用いた検証実験(in vitro および in vivo 実験)

見出された予防法が免疫抑制剤による種々の障害を抑制するかを検討する。

(5) ヒト検体を用いた検証実験

生体腎移植レシピエントの腸内細菌叢の経時的な変化を観察し、16S rRNA PCRを用いた細菌叢網羅的解析を行う。同時に、上記で抽出された栄養障害・筋障害等のマーカーの変動を評価する。

4. 研究成果

(1) 免疫抑制剤として、タクロリムス高容量群(TAC 5mg)・タクロリムス低容量群(TAC 0.1mg)・シクロスポリン群(CsA)・エベロリムス群(EVR)・ミコフェノール酸モフェチル群(MMF)・プレドニン群(PSL)を使用し、コントロール群を設定した。各種免疫抑制剤を1か月間強制経口投与し、マウスを安楽殺し血液や糞便、各種組織を採取した。糞便の16SrRNA PCR解析では各種免

免疫抑制剤毎に特徴的な細菌叢が同定された(図1)。また、体重変化については、1か月目でTAC 5mg群とPSL群で著大な体重減少を認めた(図2)。さらに、腎組織の検討ではTAC 5mgとCsA群で空胞変化を認め、免疫組織学的検討で上皮間葉転換を示唆する所見であった。さらに腸腰筋面積はTAC 5mg群とPSL群で著大な減少を認めた(図3)。これは腸腰筋のHE染色でも筋繊維の狭小化が確認された。

(2) 上記結果から、栄養状態および筋量はTAC 5mg群およびPSL群で障害されやすく、また、腎障害は上皮間葉転換によってTAC 5mg群とCsA群で最終的に線維化に向かう、と仮説を立てた。本検討では免疫抑制剤内服期間が1か月であったが、これを延長することで線維化までの自然史が判明すると考え、現在長期的な免疫抑制剤内服を開始している。また、筋についてはミトコンドリア機能とフレイル分子に着目し免疫組織学的検討を行い、現在も検討中である。

(3) 上記の結果とこれまで当教室の研究成果および文献的考察から、アミノレブリン酸に着目し、腸内細菌の変化と栄養状態・筋量・腎障害について検討することとし、現在マウスの治療を行っている。

(4) 腎組織の免疫組織学検討で上皮間葉転換による変化が認められた近位尿細管に着目することとし、ヒト近位尿細管細胞株を準備した。アミノレブリン酸による治療を行い、細胞遊走能や増殖能に関する検討を現在行っている。

(5) ヒトにおける検証実験を準備していたが、コロナ禍のため移植医療が一時停止しており同意取得後の検体採取がかなり遅れていた。今年に入りほぼ例年通りの腎移植が行われるようになり、糞便や血液を含めたサンプル採取が終了した。糞便の16SrRNA PCR解析は委託業者から返答があり、検討中である。また、1時間生検による腎組織は今後、上皮間葉転換マーカーを含めた免疫組織学的検討を行うこととしている。さらに、栄養状態のアンケートや体組成分析結果、CTによる腸腰筋体積や脂肪量など現在情報の整理と検討を行っている。

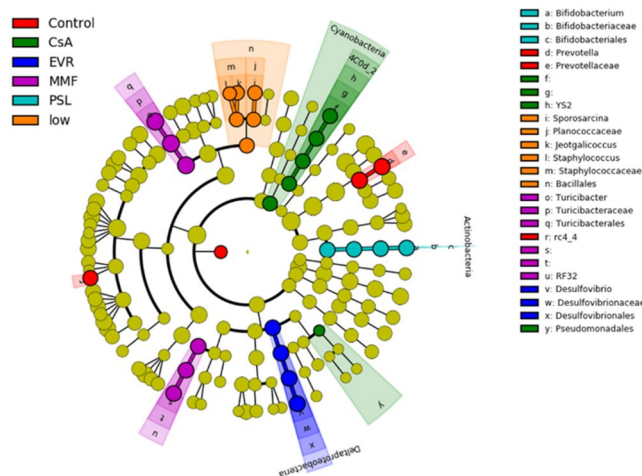


図1

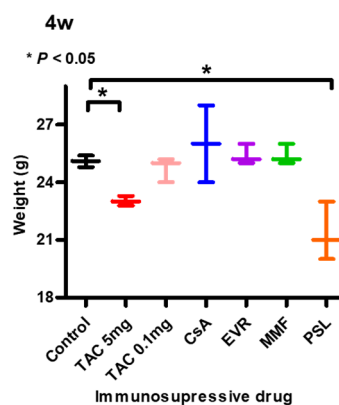


図2

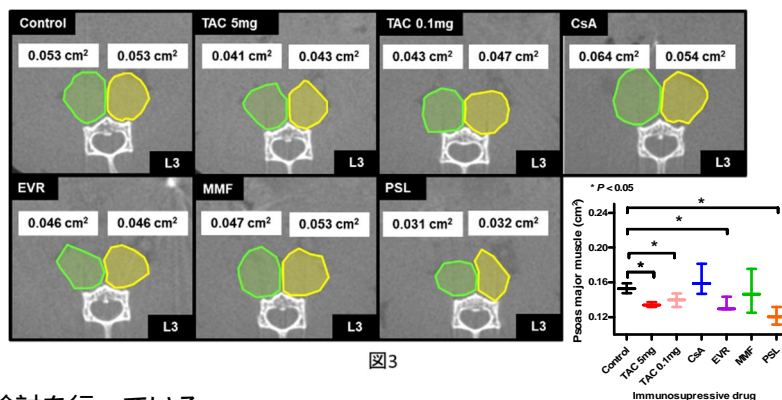


図3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 富澤 満
2. 発表標題 免疫抑制剤による腎障害および筋量への影響
3. 学会等名 第58回日本移植学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------