

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08224

研究課題名（和文）腸管免疫の破綻を基とした糖尿病性腎症進行の病態解明

研究課題名（英文）Gut kidney axis in diabetic kidney disease

研究代表者

岩田 恭宜（Yasunori, Iwata）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：90432137

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）：近年、腸内細菌叢とその代謝産物が、生体の恒常性維持に関連し、細菌叢の破綻が種々疾患の発症・進展に関与していることが明らかとなっている。腎疾患においても、腸管環境は病態に深く関与していることが示されている。我々は、腸内細菌の菌体が、糖尿病関連腎臓病の進展機序に関与することを明らかとした。糖尿病関連腎臓病モデルマウスでは腸管上皮細胞の脆弱化を基に、腸内細菌が体内移入し、炎症が遷延することを示した。糖尿病関連腎臓病において、腸管上皮が新たな治療標的となりうる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の慢性腎臓病患者は、約1330万人と推定されており、新たな国民病とも考えられている。治療手段はいまだ限られており、新規の病態解明や治療薬の開発が求められている。本研究課題で得られた知見は、糖尿病関連腎臓病の新たな病態と治療標的の可能性を示しており、将来的な臨床応用の基盤となる結果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has become clear that the gut microbiota and its metabolites are involved in maintaining homeostasis in the body, and that dysbiosis of gut microbiota is involved in the onset and progression of various diseases. It has also been shown that the intestinal environment is deeply involved in the pathophysiology of kidney disease. We have clarified that intestinal bacterial cells are involved in the progression mechanism of diabetic kidney disease. In a mouse model of diabetic kidney disease, we showed that intestinal bacteria are translocated into the body due to leaky gut, resulting in chronic inflammation. This suggests that the intestinal epithelium may be a new therapeutic target for diabetic kidney disease.

研究分野：腎臓内科学

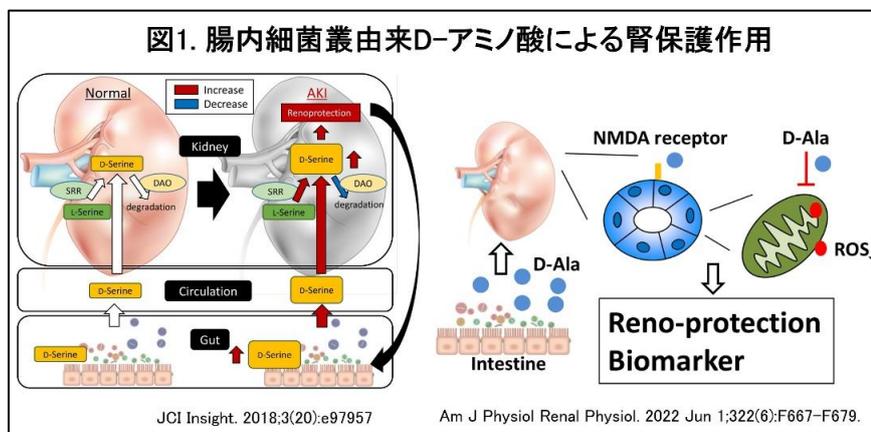
キーワード：糖尿病関連腎臓病 腸管環境

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者は本邦に約 1330 万人程度存在すると推定されている。腎臓病が進行した末期腎不全患者、約 33 万人が慢性透析をうけ、さらに年間約 4 万人が新たに慢性透析に導入されている。一方で、いまだに進行性腎障害に対する治療薬は少なく、その開発は喫緊の課題である。

近年、腸内細菌叢が、末梢臓器の恒常性や障害時の病態に関与することが明らかとなり、あらたな病態の解明や、新規治療標的候補の創出などにつながっている。腎疾患においても、腸内細菌叢の病態への関与、すなわち腎腸連関が報告され、新規機序の理解が進んでいる。我々は、これまで、急性腎障害と腸内細菌叢由来 D-アミノ酸の病態における意義を検討してきた。マウス急性腎障害(AKI)モデルにおけるキラルアミノ酸の網羅解析により、腸内細菌叢の dysbiosis とともに、便中、血中、尿中 D-セリン (Ser) と D-アラニン(Ala) の L 体に対する濃度比が上昇することが明らかとなった。D-Ser の機能を検討する目的で、AKI モデルマウスに D-Ser を投与したところ、腎障害が軽減した。培養尿細管上皮細胞において、D-Ser は低酸素障害を軽減し、障害後増殖能を亢進させたことより、尿細管上皮細胞の保護作用を介して腎障害を軽減することが示唆された。また、同様に D-Ala も尿細管障害を軽減させた。培養尿細管上皮において、D-Ala は低酸素刺激に伴うミトコンドリアからの活性酸素種(ROS)の産生を抑制した。これらの検討より、D-Ala は、尿細管上皮細胞のミトコンドリア活性化を抑制することにより、尿細管保護作用を示すことが示された(図1)。

ほか、短鎖脂肪酸や尿毒症性物質など、腸内細菌の代謝産物が、生体に取り込まれ、種々の生理活性を持つことが報告されている。一方で、腸内細菌自体が体内移入し、疾患の病態に関与していることが、肝硬変や、1 型糖尿病などで報告されている。疾患を持たない、正常コントロールにおいても、細菌遺伝子が血中より同定されることが報告されているが、慢性腎臓病では、その組成が異なることが判明している。これらの変化は、腎臓病の病態に何らかの影響を及ぼしていることが推測されるが、その詳細は明らかではなかった。



## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、慢性腎臓病において、腸内細菌の体内移入の評価と、病態への関与を検討することを目的とした。腸内細菌の侵入門戸である、腸管上皮機能を検討し、新たな治療標的の可能性を探索した。

## 3. 研究の方法

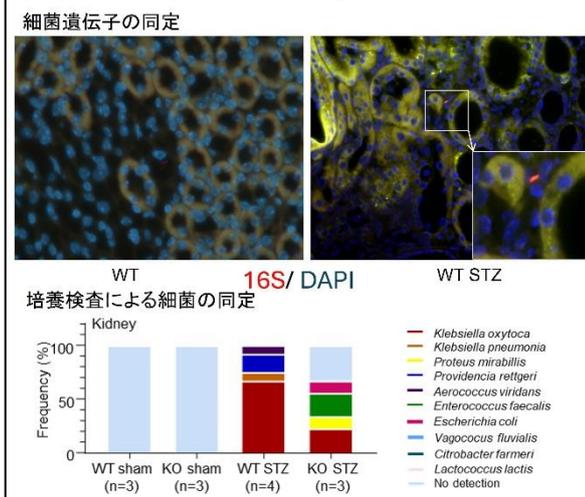
腸管上皮脆弱性モデルとしてすでに報告のある、Mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS) 欠損(K/O)マウスを用いた。野生型(WT)マウスと MAVS K/O マウスに片腎摘を試行し、その後 streptozotocin (STZ)を腹腔内投与した。これらにより、1 型糖尿病による加速型糖尿病関連腎臓病モデルを作成した。また、培養細胞として、ヒト尿細管上皮細胞(HK-II)細胞を用いた。

## 4. 研究成果

1 型糖尿病腎障害加速型モデルを作成後、18 週に sacrifice し、腎、腸管などを評価

した。血糖、体重など、基礎値に変化は認められなかった。腎において細菌由来遺伝子である 16sRNA を FISH 法で評価したところ、間質に陽性所見を認めた。血液培養や、腎組織培養において腸内細菌が培養された。菌種を同定したところ、比較的多くの個体から、*K. Oxytoca* が同定された(図2)。また、腎病理所見では、尿細管障害を示す KIM-1 染色において、WT マウスに比較し、MAVS K/O マウスで尿細管障害の増悪を認めた。糸球体面積、尿中アルブミン排泄量も MAVS K/O マウスで増悪した。マクロファージなどの免疫担当細胞の浸潤も MAVS K/O マウスで増加した。各種炎症性サイトカイン・ケモカインの腎内発現も同様の傾向であった。

図2. 糖尿病関連腎臓病の腎内に、遺伝子検査と培養検査で細菌を同定した

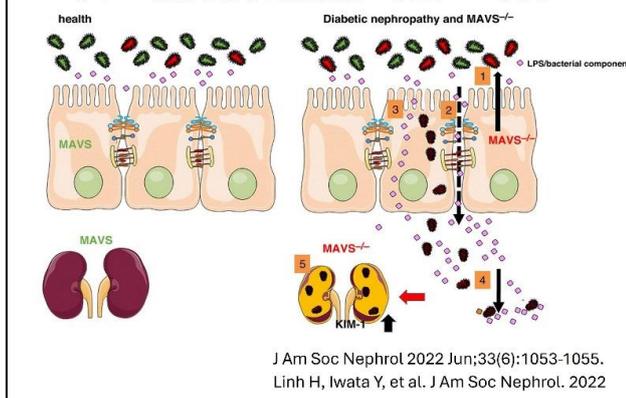


1 型糖尿病による腎障害加速型モデルでは、腸内細菌の体内移入が認められたため、その侵入門戸と考えられる、腸管上皮について検討を行った。その結果、免疫蛍光染色により、腸管上皮細胞の細胞間接着に寄与する、タイトジャンクションタンパク質 Zonula occludens (ZO) -1 は、特に MAVS KO マウスで、腸管上皮の発現が有意に減少した。また、上皮機能を検討する目的で、FITC にて追跡可能なデキストランを経口投与し、腸管から、体内への移入を評価した。その結果、コントロール糖尿病マウスと比較して、糖尿病 MAVS K/O マウスの血清および尿でより高い FITC 強度が検出された。さらに、腸管上皮の IL-17 陽性細胞数やバイエル板での IL-17 mRNA 発現も、MAVS KO マウスで上昇を認めた。また、血清 IL-17 値も WT マウスに比較し、MAVS KO マウスで高値であった。

*K. Oxytoca* の体内移入による高 IL-17 血症と、菌体移入そのものによる、腎固有細胞の影響を評価するため、培養尿細管細胞を IL-17 により刺激した。ERK, STAT などの細胞内シグナル伝達系のリン酸化の亢進とともに、炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現が亢進した。また、同様に、*K. Oxytoca* の培養上清により同細胞を刺激しても、同様の結果であった。これらの結果は、腸管より体内移入した *K. Oxytoca* が直接的に腎固有細胞を障害する可能性、さらに、高 IL-17 血症が腎障害を助長する可能性を示していた。

さらに、高 IL-17 血症が治療標的となるか、検討する目的で、抗 IL-17 抗体を 1 型糖尿病腎障害加速型モデルに注射投与し、腎病理所見を評価した。抗 IL-17 抗体投与マウスは、コントロール IgG 投与マウスに比較し、尿細管障害、間質マクロファージ浸潤、糸球体拡大などが抑制され、高 IL-17 血症が、マウス生体内で腎障害を誘発し、治療標的となることが示された。さらに、腸内細菌の移入の影響を評価するため、*K. Oxytoca* の細胞壁の構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) を同モデルに持続投与した。腎障害、間質マクロファージ浸潤等は増悪した。

図3. 腸管上皮脆弱性を基とした腸内細菌の体内移入と糖尿病関連腎臓病の病態への関与



これらのことより、糖尿病関連腎臓病の発症に伴い、腸管上皮が脆弱化すること、それに伴い、腸内細菌が体内移入し、菌体による直接的、また慢性炎症による間接的な機序により腎障害の増悪につながる事が明らかとなった(図3)。糖尿病関連腎症において、腸管上皮は新規治療標的となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Oiwata Y*, Nakade Y, Kinoshita M, Sabit H, Nakajima R, Furuichi K, Mita M, Nakane M, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Miyagawa T, Hara A, Shimizu M, Sato K, Oshima M, Nakagawa S, Yamamura Y, Ogura H, Koshino Y, Nakada M, Wada T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Intra-brain and plasma levels of L-Serine are associated with cognitive status in patients with CKD. Kid Dis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Kidney Dis (Basel) .	6. 最初と最後の頁 118-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000527798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oiwata Y*, Nakade Y, Kitajima S, Yoneda-Nakagawa S, Oshima M, Sakai N, Ogura H, Sato K, Toyama T, Yamamura Y, Miyagawa T, Yamazaki H, Hara A, Shimizu M, Furuichi K, Mita M, Hamase K, Tanaka T, Nishida M, Muramatsu W, Yamamoto H, Shichino S, Ueha S, Matsushima K, Wada T	4. 巻 322
2. 論文標題 Protective effect of d-alanine against acute kidney injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol.	6. 最初と最後の頁 F667-F679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00198.2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 OLinh HT, Iwata Y*, Senda Y, Sakai-Takemori Y, Nakade Y, Oshima M, Nakagawa-Yoneda S, Ogura H, Sato K, Minami T, Kitajima S, Toyama T, Yamamura Y, Miyagawa T, Hara A, Shimizu M, Furuichi K, Sakai N, Yamada H, Asanuma K, Matsushima K, Wada T	4. 巻 33
2. 論文標題 Intestinal Bacterial Translocation Contributes to Diabetic Kidney Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Am Soc Nephrol.	6. 最初と最後の頁 :1105-1119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2021060843.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakade Y, Iwata Y*, Sakai N, Mita M, Nakane M, Hamase K, Suda W, Toyama T, Kitajima S, Hara A, Shimizu M, Ogushi C, Furuichi K, Koshino Y, Morita H, Hattori M, Wada T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Increased levels of oral Streptococcus-derived D-alanine in patients with chronic kidney disease and diabetes mellitus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 21773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-26175-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shichino S, Ueha S, Hashimoto S, Ogawa T, Aoki H, Wu B, Chen CY, Kitabatake M, Ouji-Sageshima N, Sawabata N, Kawaguchi T, Okayama T, Sugihara E, Hontsu S, Ito T, Iwata Y, Wada T, Ikeo K, Sato TA, Matsushima K.	4. 巻 5
2. 論文標題 TAS-Seq is a robust and sensitive amplification method for bead-based scRNAseq	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03536-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takemori-Sakai Y, Satou K, Senda Y, Nakamura Y, Otani H, Maekawa A, Oe H, Oshima M, YonedaNakagawa S, Miyagawa T, Sato K, Ogura H, Mori M, Wada T, Sakai Y, Yutani M, Matsumura T, Fujinaga Y, Gabata T, Wada T, Iwata Y*.	4. 巻 28
2. 論文標題 Rare toxin A-negative and toxin B-positive strain of Clostridioides difficile from Japan lacking a complete tcdA gene.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 651-656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2022.01.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oshima M, Iwata Y*, Toyama T, Kitajima S, Hara A, Sakai N, Shimizu M, Furuichi K, Haneda M, Babazono T, Yokoyama H, Iseki K, Araki S, Ninomiya T, Hara S, Suzuki Y, Iwano M, Kusano E, Moriya T, Satoh H, Nakamura H, Makino H, Wada T	4. 巻 15
2. 論文標題 Sex differences in risk factors for end stage kidney disease and death in type 2 diabetes: A retrospective cohort study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Diabetes	6. 最初と最後の頁 246-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1753-0407.13367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Linh Hoang, Iwata Yasunori, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Intestinal Bacterial Translocation Contributes to Diabetic Kidney Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2021060843	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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩田恭宜、中出祐介、和田隆志
2. 発表標題 Crosstalk between gut microenvironment and kidney
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩田恭宜	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 121
3. 書名 腎臓内科 腎臓と免疫update	

〔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
---------	---------