

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15341

研究課題名（和文）慢性腎臓病時の腸管免疫および心臓への単球浸潤を介した腎-腸-心連関機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of renal-gut-cardiac interaction via intestinal immunity and monocyte infiltration into the heart during chronic kidney disease.

研究代表者

吉田 優哉 (Yuya, Yoshida)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90907536

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病（CKD）時の合併症のうち、特に心血管系疾患の発症は生命予後と深く関連している。我々はビタミンAがCKDマウスで生じる免疫グロブリンA（IgA）分泌異常および尿毒症物質蓄積に関連することを発見した。そこで腸管IgA産生細胞を対象とした解析を行った結果、CKDマウスではパイエル板における樹状細胞のレチノイン酸分泌が亢進し、IgA産生細胞への分化反応である胚中心反応が促進されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における一連の解析によって、CKD病態における腸内細菌治療の意義と新たな治療標的が示された。本研究のさらなる解析が腸内細菌由来尿毒症物質の蓄積抑制を目的とした新規治療薬の開発に繋がることが期待される。

また、上流の原因物質であることを見出したビタミンAは、現状の人工血液透析法では血中からの除去が困難であるため、血液透析の技術発展が望まれる。また、得られた病態関連分子を標的とした新たなCKD治療法が開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Among the complications of chronic kidney disease (CKD), the development of cardiovascular disease in particular is closely related to life expectancy. We found that vitamin A is associated with abnormal immunoglobulin A (IgA) secretion and accumulation of uremic substances in CKD mice. We analyzed intestinal IgA-producing cells and found that retinoic acid secretion by dendritic cells in Peyer's patches is enhanced in CKD mice, which promotes the germinal center response, a differentiation response to IgA-producing cells.

研究分野：生命科学、時間生物学

キーワード：慢性腎臓病 ビタミンA 体内時計 腸管免疫 マクロファージ 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) に合併する心血管系疾患は CKD 患者の死因の殆どを占めているため、その増悪機構解明ならびに治療法開発が急務である。CKD 時の心血管障害を増悪させる尿毒症物質として近年、インドキシル硫酸を始めとした腸内細菌が産生する物質の関与が指摘されている [1]。これら尿毒症物質は通常の血液透析による除去率が極めて低く、新たな治療アプローチが求められている。しかし、これら腸内細菌由来尿毒症物質がなぜ腎障害時に高度に蓄積するかは十分な解析がなされていないのが現状である。我々は過去にこの産生増加にビタミン A (VA) の蓄積が関与することを発見した [2]。しかしながら、腸内産生がなぜ増加するのか詳細な機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では VA の免疫を成熟させる栄養素としての側面に着目し、腸内細菌由来物質の産生増加機構について解析を実施した。

3. 研究の方法

CKD モデルマウス (5/6Nephrectomy : 5/6Nx) の作成

ICR 雄性マウスについて、7 週齢時に左腎 2/3 摘出、8 週齢時に右腎全摘出を行い、その後 8 週間飼育した 16 週齢マウスを CKD モデルマウス (5/6Nx マウス) として使用した。ビタミン A の不含給餌は右腎摘出後 8 週経過したマウスに対してビタミン A 非含有 AIN-93G を自由摂食させることで 6 週間実施した。

5/6Nx マウスに対する薬物投与

腸管から吸収されず広域な抗菌スペクトルを有する抗菌薬バンコマイシン (VCM) を飲料水に混合し (0.5 g/mL)、右腎摘出後 8 週経過したマウスに対して自由飲水投与を 6 週間実施した。DEAB の投与は右腎摘出後 4 週経過したマウスに対して週 3 回腹腔内投与 (25mg/kg) を 4 週間実施した。

パイエル板由来細胞の単離・細胞解析

5/6Nx マウスからパイエル板を摘出し、細胞消化・フィルター濾過を行った後、IgA、CD11b、CD11c、CD19、CD45 に対する抗体により染色を行い、フローサイトメーターを用いて単離・解析した。

組織化学染色

5/6Nx マウスから心臓を摘出し、マッソントリクローム染色を実施した後、キーエンス蛍光顕微鏡で撮影した。

タンパク質・mRNA・血中因子の定量

血中因子の測定は LC-MS/MS を用い、mRNA および蛋白発現量はそれぞれリアルタイム RT-PCR 法、ウェスタンブロット法により測定した。

統計解析

ANOVA、Tukey-Kramer test、Dunnett's test、Unpaired t-test を用い、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

5/6Nx マウスにおける IgA 産生増加機構の解析

過去の研究から 5/6Nx マウスで生じる心線維化は、ビタミン A を含まない給餌を行うことで抑制できることが明らかになっている [2]。このマウスの腸内細菌由来尿毒症物質に着目した解析を行った結果、ビタミン A の不含給餌は腸内細菌を変容させ、ほとんどの腸内細菌由来尿毒症物質の血中濃度および腸内産生量を抑制させることが明らかとなった。さらに、腸内細菌を制御する主な免疫分子である IgA は 5/6Nx マウスで有意に増加しており、ビタミン A 不含給餌で有意に減少していた。そこで腸管免疫機能についてより詳細な解析を行った結果、5/6Nx マウスの小腸リンパ組織において、CD11b-low で特徴づけられるサブタイプの IgA 産生細胞集団が有意に増加していた。さらに、この IgA 産生細胞集団は IgA 産生細胞への分化反応である胚中心反応に関連することが報告されていることから [3]、胚中心マーカーを測定したところ、5/6Nx マウスのこの細胞集団で胚中心マーカーが上昇していることが明らかになった。

胚中心反応の亢進に及ぼすレチノイン酸シグナルの影響解析

前述の IgA 産生細胞集団は生体内因子によって増殖することが報告されている [4]。そこでこの細胞集団に対して、トランスクリプトーム解析および Gene Ontology 解析を実施した結果、"Response to chemical" (GO:0042221) に該当する経路として、"Response to retinoic acid" が該当した。そこでレチノイン酸シグナルに着目した検討を行ったところ、5/6Nx マウスの小腸リンパ組織ではビタミン A の活性代謝物であるレチノイン酸濃度が増加しており、これが IgA 産生細胞への分化反応である胚中心反応の亢進、およびそれに伴う IgA 産生増加の原因であることが明らかになった。次に、免疫細胞における主なレチノイン酸産生細胞は樹状細胞であること

から、樹状細胞に着目した検討を行った。その結果、5/6Nx マウスの樹状細胞ではレチノイン酸合成関連酵素 X (酵素 X) の発現が増加していることを発見した。また、この酵素 X の発現増加が顕著である樹状細胞サブタイプを同定した。

上記より樹状細胞のレチノイン酸産生亢進が腸内細菌由来尿毒症物質の蓄積を引き起こす原因であることが示唆された。そこでレチノイン酸を合成する最終酵素である ALDH の阻害剤を 5/6Nx マウスに腹腔内投与することで病態への影響を評価した。その結果、阻害剤の投与は腸管における IgA 産生を抑制し、腸内細菌由来尿毒症物質の蓄積を改善した。さらに、これに伴い心臓の線維症にも緩和効果が認められた。

結論

5/6Nx マウスでは樹状細胞によるレチノイン酸分泌が亢進しており、これが胚中心反応の進行を促進することが示唆された。また、これによって分泌の増加した IgA は腸内細菌叢の活性変容、およびそれに伴う尿毒症物質の蓄積を引き起こすことで心臓病態を増悪させることが明らかになった (図 1)。これら一連の解析によって、CKD 病態における腸内細菌治療の意義と新たな治療標的が示された。本研究のさらなる解析が腸内細菌由来尿毒症物質の蓄積抑制を目的とした新規治療薬の開発に繋がることが期待される。

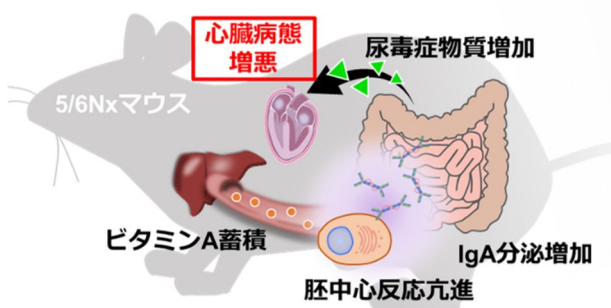


図1 慢性腎臓病における腸管免疫を介した尿毒症物質蓄積に起因する心臓病態増悪機構

参考文献

1. Fukuoka K, et al., *Biochem Biophys Res Commun* 675:92-98, 2023.
2. Yoshida Y, et al., *Nat Commun* 12:2783, 2021.
3. Gao P, et al., *Int Immunol* 34:249-262, 2022.
4. Kunisawa J, et al., *Nat Commun* 4:1710-1772, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshida Yuya, et al	4. 巻 269
2. 論文標題 Inhibition of G protein-coupled receptor 68 using homoharringtonine attenuates chronic kidney disease-associated cardiac impairment	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Translational Research	6. 最初と最後の頁 31 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trsl.2024.02.004	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 Yoshida Yuya, Fukuda Taiki, Tanihara Tomohito, Nishikawa Naoki, Iwasa Serina, Adachi Satoka, Zaitso Orion, Terada Yuma, Tsukamoto Ryotaro, Shimoshikiryo Hideki, Fukuoka Kohei, Tsurusaki Fumiaki, Hamamura Kengo, Oyama Kosuke, Tsuruta Akito, Koyanagi Satoru, Matsunaga Naoya, Ohdo Shigehiro	4. 巻 708
2. 論文標題 Circadian rhythms in CYP2A5 expression underlie the time-dependent effect of tegafur on breast cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149813 ~ 149813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149813	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 Yoshida Yuya, Fukuda Taiki, Fukuoka Kohei, Nagayama Toshitaka, Tanihara Tomohito, Nishikawa Naoki, Otsuki Kaita, Terada Yuma, Hamamura Kengo, Oyama Kosuke, Tsuruta Akito, Mayanagi Kota, Koyanagi Satoru, Matsunaga Naoya, Ohdo Shigehiro	4. 巻 388
2. 論文標題 Time-Dependent Differences in Vancomycin Sensitivity of Macrophages Underlie Vancomycin-Induced Acute Kidney Injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 218 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.123.001864	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 Fukuoka Kohei, Yoshida Yuya, Sotono Kurumi, Nishikawa Naoki, Hamamura Kengo, Oyama Kosuke, Tsuruta Akito, Mayanagi Kota, Koyanagi Satoru, Matsunaga Naoya, Ohdo Shigehiro	4. 巻 675
2. 論文標題 Oral administration of vancomycin alleviates heart failure triggered by chronic kidney disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 92 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.07.015	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田優哉、佐久川未有、福岡航平、外野来海、谷原智仁、西川直希、鶴田朗人、小山浩輔、濱村賢吾、小柳悟、松永直哉、大戸茂弘
2. 発表標題 GPR68を標的とした慢性腎臓病誘発性の心炎症・線維化抑制化合物の探索
3. 学会等名 第44回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田優哉
2. 発表標題 概日時計機構の変容を介した慢性腎臓病時の臓器連関による心臓病態悪化メカニズムの解析
3. 学会等名 第30回 日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐久川未有、吉田優哉、福岡航平、鶴崎文彬、西拓海、小山浩輔、濱村賢吾、大戸茂弘、松永直哉
2. 発表標題 GPR68を標的とした慢性腎臓病誘発性の心炎症・線維化抑制化合物の探索
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田大輝、吉田優哉、谷原智仁、西川直希、福岡航平、小山浩輔、濱村賢吾、大戸茂弘、松永直哉
2. 発表標題 マクロファージおよび概日時計機構に着目したバンコマイシン性腎障害の発症機構解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田 優哉, 福岡 航平, 濱村 賢吾, 小柳 悟, 松永 直哉, 大戸 茂弘
2. 発表標題 CKD病態時の小腸リンパ組織におけるCKD関連物質の蓄積がALDH高発現樹状細胞に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 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

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