

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461210

研究課題名(和文)慢性腎臓病と異常腸内細菌叢による悪循環「腸腎連関」の病態生理の解明

研究課題名(英文)The analysis of the pathophysiology of the Kidney- Gut interaction, the vicious cycle in Chronic kidney disease and dysbiosis.

研究代表者

大瀬 貴元 (Ohse, Takamoto)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：10568447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎臓病(CKD)モデルラットを用いて腸内環境の変化の評価を行った。CKD惹起1ヶ月では、腸内のクロストリジウム群の一種で菌数の増加が認められ、また腸管粘膜の形態的な変化を認めた。さらに血清インドキシル硫酸の上昇と腸管内インドール濃度の上昇を認め、また軽度の腎障害でもこれら尿毒素が上昇することが明らかとなった。腸内細菌叢の変化を抑制する目的でprebioticsであるガラクトオリゴ糖(GOS)を投与したところ、CKDモデルで見られたクロストリジウム群の増加が抑制され、血中の尿毒素濃度も低下しており、GOSによる腸内環境と尿毒症状態の改善が認められることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the intestinal environmental change using chronic kidney disease(CKD) rat. One month after the induction of CKD, intestinal Chrostridiaceae was increased, and the intestinal epithelial cells were morphologically changed and the concentration of serum indoxyl sulphate and intestinal indole were elevated. These results indicated that even with the slight kidney damage, these uremic toxins were elevated. Administration of galacto-oligosaccharide(GOS) suppressed the increase of chrostridiaceae and serum uremic toxin, thus it was shown that GOS have the beneficial effect on the improvement of the intestinal flora and uremic condition in CKD.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 腸内細菌 インドキシル硫酸 尿毒素

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD)は、国民の10%が罹患し、心血管病変の危険因子でもあるため新たな生活習慣病として新規治療法の開発が急務となっている。CKDでは早期から尿毒素が蓄積することが知られ、さらに尿毒素自体が腎機能を悪化させることが報告されている。これまでは主に腎機能の低下による蓄積が尿毒素蓄積の機序として考えられていたが、我々は尿毒素前駆物質が作られる腸内環境の変化に着目し、CKDにおいて腸内細菌叢に変化が生じ、尿毒素前駆体の産生亢進が引き起こされている可能性を疑った。

近年の研究により代謝性疾患などでも腸管粘膜に慢性炎症が引き起こされることが示されているが、CKDラットでもこれまでの予備実験で腸管粘膜における炎症細胞浸潤を認めており、これはCKDにおいて腸管粘膜の慢性炎症が持続していることを強く示唆している。

本研究では尿毒素蓄積の機序として従来から言われていた排泄低下による蓄積のみならず、尿毒素やその前駆体が産生される腸内の環境に着目し、CKDにおける腸内環境の変化が尿毒素の産生亢進、そしてさらなる腎障害の進展を引き起こす、という仮説のもとに「**尿毒症における腸腎連関**」という概念を提唱し、病態の解析、さらに治療法の開発を目的とする。腸腎連関という概念に基づいた研究は海外を含めてもまだほとんど行われておらず、新規性が高い一方で評価方法などが確立していないことからくる困難さがあるものと予想されるが、これらは研究分担者らの知見などもあわせて協力しながら解決しつつ進めていきたい。

腎不全による尿毒症への治療としては活性炭を用いた尿毒素吸着が腎機能末期には行われていたが、近年本邦で行われた大規模臨床研究で活性炭が腎機能障害を改善する効果は認められなかった。さらに活性炭であるため必ずしも内服がしやすいわけではなく、非常に服薬アドヒアランスの維持が困難であった。このため現在は活性炭も投与量の変更などで効果が探られているところであるが、腸内細菌叢への介入および尿毒素の低下を引き起こす別の方法による腸内環境の改善・続いて尿毒素の低下が模索されている。腸内環境への改善には probiotics、prebiotics、synbiotics などを使用方法が一般的に知られ、これまでも複数の薬剤や菌群がCKD患者・モデル動物での効果が検証されている。このなかでもっとも頻繁に使用されている probiotics は、細菌であるため均質の品質のものを継続的に、必要なときに必要な量を確保することが容易ではなく、品質の確保と入手容易性などを基準に検討した結果、安定して品質管理が出来るガラクトオリゴ糖 (galacto-oligosaccharide, GOS)を利用することで一定条件のもと腸内環境への介入を図ることとした。

2. 研究の目的

慢性腎障害では初期変化により腸内環境に変化が生じ、この結果腸内細菌叢の変化、腸管粘膜の慢性炎症を来し、粘膜上皮細胞の透過性が亢進することでさらに炎症が悪化し、尿毒素産生が亢進されるという悪循環が引き起こされることを仮説として立て、「腸腎連関」という概念のもとにこの機序を解明していく。さらに、この病態に prebiotics を投与する方法で介入し、尿毒症の改善や腎不全の進行を抑制する新規治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

CKDモデルラットとしてSDラットを用いた腎動脈結紮による5/6腎摘モデルを採用した。疾患惹起1ヶ月における腸管粘膜障害の組織学的な評価を行う。評価の方法としてはHE染色、PAS染色、マッソンとリクローム染色を予定し、腸管粘膜細胞の形態的变化、細胞浸潤、線維化を偽手術群と比較して記述する。さらに好中球やマクロファージに対して特異的な免疫組織学的染色を行い、浸潤細胞の厚生も評価する。また腸内細菌叢の変化を各菌群に特異的な16SRNAに対する定量PCR法で評価し、CKDによる腸内細菌叢の変化を解析する。さらに必要な場合はこれらの検体について、pyrosequence法による評価でさらに細かい単位での評価を行うことを予定している。腸管粘膜に炎症が認められればほかの代謝性疾患などで報告されているような腸管上皮細胞のバリア機能の低下、血中へのエンドキシンの移行の可能性について評価を行う。また免疫染色やPCRにてタイトジャンクション蛋白の発現について発現量の変化、発現部位の変化などについて評価を行う。

続いて尿毒素による腸管粘膜への影響の評価を行い、またCKDモデルラットに対して prebiotics であるガラクトオリゴ糖 (GOS)を餌に混合して投与することで腸内細菌叢に変化を促すことができるか評価を行う。さらに血中・腸管内の尿毒素の濃度の変化について評価を行う。

4. 研究成果

腎障害と尿毒素、腸内環境の変化について研究を行うにあたり、慢性腎臓病 (CKD)モデルを用いて腸内環境の変化の評価を行った。疾患惹起1ヶ月モデルを用いて腸内環境の変化を評価した。ラットをCKD惹起群と偽手術群、さらにそれぞれをGOS投与群と非投与群の4群に分けた。CKD惹起2週間は4群に通常食を与え、2週目から4週目まではGOS群にはGOSを混合した餌を投与した。評価時において4群の間に体重の変化などの生理的なパラメータの違いは認められなかった。CKD惹起4週後の評価では腸管内のインドール濃度はGOS投与群で有意に低下し、血清のインドキ

シル硫酸濃度は GOS 投与した CKD ラットは通常食の CKD ラットと比較して有意に低下していた。また PAS 染色による腎組織障害の評価でも GOS 投与 CKD ラットは通常食 CKD ラットと比較して腎機能障害の指標となるとされる尿細管間質領域の障害が有意に軽減していた。さらにマクロファージ浸潤、ER ストレス (GRP78, CHOP を用いて評価)、アポトーシス (TUNEL 染色、活性化 Caspase3 の組織染色と Western blot により評価) についても同様に GOS 投与により統計的に有意な改善を認め、CKD によって惹起される炎症反応と ER ストレス、アポトーシスが GOS 投与によって改善することが明らかとなった。

pyrosequence 法を用いた腸内細菌叢の解析では CKD ラットモデルで Clostridiaceae が増加していたが GOS 投与によって大幅に増加が抑制されていた。ほかにも 5 つの菌群で CKD ラットで増加し、GOS 投与によって減少しているものが認められた。一方で Bifidobacteriaceae をはじめとする 3 群が GOS 投与によって増加していることが明らかとなった。また短鎖脂肪酸 (Succinic acid) も GOS 投与によって増加していることが明らかとなった。これらの結果により CKD モデルラットにおいて腸内細菌叢が変化し、尿毒素が上昇するものの、prebiotics である GOS を投与することで腸内細菌叢の改善と尿毒症状態の改善が認められることを示しており、GOS の CKD に対する治療薬としての校歌を期待させるものである。この結果をまとめ、我々は 2013 年から 2014 年にかけて腎臓・透析分野と尿毒素の学会で発表を行い、2014 年に論文での発表を行った。

続いて腎不全における尿毒素の上昇には腸内細菌叢の変化による尿毒素の産生亢進や腸管粘膜障害による透過性亢進も寄与している可能性を疑い、まず腎障害モデルにおける腸管粘膜障害の評価方法の確立を目指した。HE 染色、PAS 染色による細胞浸潤の評価、またタイトジャンクション蛋白である claudin-1 の染色による評価方法を行うこととし、これらの評価方法の確立は完了した。今後は CKD モデルラットにおける腸管粘膜の透過性亢進の機能的評価を行うこと、また尿毒素物質そのものによる腸管粘膜の障害を引き起こす可能性の評価を引き続き行っていく予定である。

最終年度にはこれらの成果を国際シンポジウムで発表する機会を得、海外からの研究者とも交流しながら、他臓器疾患における腸内細菌叢の変化の研究についての情報を得、今後の研究の展開を検討する機会とすることが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Unuma Furuse S, Ohse T, Jo-Watanabe A, Shigehisa A, Kawakami K, Matsuki T, Chonan O, Nangaku M. Galacto-Oligosaccharides attenuate renal injury with microbiota modification. *Physiological Reports*. 査読あり, 2, 2014, e12029. Doi: 10.14814/phy2.12029

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 大瀬貴元. 腸腎連関：腸内環境と腎不全の相互作用. 第 24 回腸内フローラシンポジウム(招待講演), 2015/10/30 ヤクルトホール(東京).
2. 鶴沼智、大瀬貴元、城愛理、重久晃、川上幸治、松木隆広、長南治、南学正臣. ガラクトオリゴ糖は腸内細菌叢を変化させ、腎組織障害を改善する. 第 59 回日本透析医学会, 2014/6/13 神戸コンベンションセンター(兵庫県、神戸市).
3. Unuma Furuse S, Ohse T, Jo-Watanabe A, Shigehisa A, Kawakami K, Matsuki T, Chonan O, Nangaku M. Galacto-Oligosaccharides modified Gut microbiota and attenuated renal injury. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology. 2014/5/23, Shinagawa Prince Hotel (Tokyo).
4. Unuma S, Ohse T, Jo A, Shigehisa A, Kawakami K, Matsuki T, Chonan O, Nangaku M. Galacto-Oligosaccharides modified Gut microbiota and attenuated renal injury. International congress on uremia research and toxicity. 2014/3/13. Okinawa Convention Center(Okinawa).
5. Unuma S, Ohse T, Jo A, Shigehisa A, Kawakami K, Matsuki T, Chonan O, Nangaku M. Galacto-Oligosaccharides modified Gut microbiota and attenuated renal injury. Annual meeting of American Society of Nephrology. 2013/11/8. Atlanta(USA).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大瀬 貴元 (Ohse, Takamoto)
東京大学・医学部附属病院 登録診療員
研究者番号：10568447

(2) 研究分担者

平田 喜裕 (Hirata, Yoshihiro)
東京大学・医学部附属病院 助教
研究者番号：10529192

稲城 玲子 (Inagi, Reiko)
東京大学・医学部附属病院 特任准教授
研究者番号：50232509

南学 正臣 (Nangaku, Masaomi)
東京大学・医学部附属病院 教授
研究者番号：90311620

和田 健彦 (Wada, Takehiko)
東海大学・医学部 准教授
研究者番号：90447409

(4) 研究協力者

鵜沼 智 (Unuma, Satoshi)
城 愛理 (Jo, Airi)