

論文の内容の要旨

論文題目 Galacto-oligosaccharides modify gut microbiota and attenuate renal injury
(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)

氏名 古瀬 智

【緒言】

慢性腎臓病(CKD: chronic kidney disease)は日本では成人の 13%，約 1300 万人が罹患している。CKD は末期腎不全のみならず，心血管疾患の独立したリスクファクターでもあり，公衆衛生上も医療経済上も重要な問題となっている。

CKD の原疾患には，慢性糸球体腎炎，糖尿病性腎症，高血圧性腎硬化症，多発性嚢胞腎などがあるが，近年，腎障害はある時点を過ぎると原疾患によらず，尿細管間質障害という共通の経路をたどり末期腎不全に至るという **final common pathway** の考え方が広く受け入れられており，尿細管間質障害のコントロールが腎障害進展抑制において重要である。

進行した CKD では健常状態であれば腎から排泄される有機物が蓄積して尿毒症という状態になる。近年，代表的尿毒素のひとつであるインドキシル硫酸は，腎不全で蓄積するのみならず，それ自体が腎障害をもたらすことが報告されており，**vicious cycle** を形成していると考えられている。**Palm** らはインドキシル硫酸がラット尿細管細胞において酸素消費量を増大させ酸化ストレスから腎障害をもたらすことを，また，**Kawakami** らはインドキシル硫酸が腎不全モデルラットの尿細管細胞の小胞体ストレスを通じて腎障害をもたらすことを報告しており，インドキシル硫酸が尿細管間質障害を通して CKD 進展に重要な役目を果たしていることが示唆されている。

インドキシル硫酸の前駆体であるインドールは，食物中のトリプトファンから腸内細菌によって合成され，肝臓での硫酸抱合によりインドキシル硫酸となる。インドキシル硫酸はその後，体循環に入り細胞障害や組織障害をもたらす。臨床では，腸管内での尿毒素吸

着目的に AST-120(クレメジン®)の投与が行われている。AST-120 によって血清インドキシル硫酸濃度の低下が報告され、CAP-KD(Carbonaceous Adsorbent's Effectiveness Against Progression of Chronic Kidney Disease)スタディでは、クレアチニンクリアランス低下速度の抑制が示されている。また動物実験レベルでは糸球体硬化の改善が報告されている。

私は、インドキシル硫酸の前駆体を産生する腸内細菌に注目した。

近年、糖尿病や炎症性腸疾患では腸内細菌叢の変化が報告されており、腎臓病の領域でも Vaziri らが 5/6 腎摘ラットや CKD 患者で腸内細菌の多様性が減少していることを報告している。私は、腎疾患では腸内細菌の構成が変化しており、変化した細菌叢を改善させることでインドール産生を抑制、インドキシル硫酸濃度を低下させ腎障害を改善させるという仮説を立てた。

腸内細菌叢の評価には、これまで行われてきた分離・培養法に代わり、近年、パイロシークエンス法が広く用いられるようになってきている。これは細菌叢から抽出した DNA (或いは RNA)を増幅させて次世代シーケンサーで配列を決定、データベースと照合することで菌の所属を網羅的に解析する方法である。今回、細菌叢の分析にはこのパイロシークエンス法を用いた。

腸内細菌叢を変化させるには、有益な細菌であるプロバイオティクスを投与する方法と、有益な細菌の栄養源となるプレバイオティクスを投与する方法がある。私は、乳糖にβ-ガラクトシダーゼを作用して生成されるオリゴ糖で、ビフィズス菌の増殖効果が報告されているガラクトオリゴ糖(GOS)の使用を考えた。

腎疾患モデルには 5/6 腎摘ラットを用い、通常の飼料で飼育した群と GOS 含有飼料を投与した群とで、腸内細菌叢の構成や腸内インドール濃度、血清インドキシル硫酸濃度、腎障害の程度を比較した。

更に、インドキシル硫酸が腎障害をもたらす経路として尿細管細胞の小胞体ストレスに注目した。

小胞体は蛋白の合成や折りたたみ、分解などを司るが、折りたたまれていない蛋白や正しく折りたたまれていない蛋白が蓄積すると小胞体への負荷となり小胞体ストレスを引き起こす。小胞体ストレスが感知されると、蛋白の折りたたみ能を増すために ER シャペロン (GRP78, GRP94, ORP150 など)の発現が増加する。更に、新たな蛋白の合成が抑制され、正しく折りたたまれていない蛋白の分解が促進される。

しかし、細胞への負荷があまりに大きいときには、細胞はアポトーシスに向かう。小胞体ストレスからアポトーシスへ至る経路には CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)を介するもの、c-Jun N-terminal kinase (JNK)を介するもの、caspase-12 を介するものが知られている。

小胞体ストレスは尿細管間質障害で上昇し、CKD 進展に寄与することが報告されている。私は、インドキシル硫酸がもたらす小胞体ストレスが、GOS 投与によって変化して尿細管間質障害を改善するかを評価した。

【方法】

市販のラット用飼料 AIN-93G[®]は 10%のスクロースを含む。このコントロール飼料(Con)とスクロースの半分をガラクトオリゴ糖で置換した GOS 飼料(GOS)を用意した。

8 週齢オスの SD ラットを準備し、5/6 腎摘(Nx)群には、右腎摘出の 1 週間後に 3 本の左腎動脈分枝のうち 2 本を結紮して 5/6 腎摘モデルを作成した。対照として偽手術 (Sham)群をおき、こちらは開腹のみを 1 週間あけて 2 回行った。

疾患惹起後 2 週間でコントロール飼料群と GOS 飼料群に群分けを行った。各群の匹数は Con Sham: 4, GOS Sham: 3, Con Nx: 7, GOS Nx: 6 である。

群分けから 2 週間飼育したのち(疾患惹起後 4 週目)屠殺、腎臓を摘出した。ラットにおける最大の発酵器官である盲腸の内容物を回収した。

盲腸内容物はパイロシーケンス法により菌群の構成割合を網羅的に解析した。また、小腸で吸収されなかった炭水化物から腸内細菌叢によって生成される短鎖脂肪酸の濃度と、インドキシル硫酸前駆体のインドールの濃度を測定し、血清中のインドキシル硫酸濃度を計測した。腎障害評価のために腎臓の薄切切片に対し PAS 染色を行い、免疫組織染色でマクロファージ(ED-1)数を計測した。小胞体ストレスの評価のために、小胞体ストレスマーカーである CHOP の mRNA 発現を調べ、次に GRP78 と CHOP の免疫組織染色、GRP78 のウェスタンブロットを行った。アポトーシスの評価は TUNEL 染色と cleaved caspase-3 の免疫組織染色、ウェスタンブロットでの発現で行った。

【結果】

Con Sham 群と GOS Sham 群, Con Nx 群と GOS Nx 群それぞれの間には血圧、体重、飼料消費量で有意な差は認めなかった。

盲腸内容物のパイロシーケンス法による網羅的解析では、検出された 38 の科のうち、‘Clostridiaceae’の構成割合が Con Sham 群に比べ Con Nx 群で有意に増加し、Con Nx 群に比べ GOS Nx 群で有意に減少した。Nx 群への GOS 投与により、‘Bifidobacteriaceae’、‘Clostridiales; Incertae Sedis XIV’、‘Porphyromonadaceae’の構成割合が有意に増加し、‘Clostridiaceae’以外に‘Ruminococcaceae’、‘Peptostreptococcaceae’、‘Streptococcaceae’、‘Veillonellaceae’、‘Clostridiales; Incertae Sedis XIII’の構成割合が有意に低下した。盲腸内短鎖脂肪酸は、Con Nx 群に比べ GOS Nx 群で、コハク酸濃度が有意に上昇し、有意差はつかない。

いが酢酸濃度が上昇する傾向にあった。

盲腸内インドール濃度は、Sham 群、Nx 群ともに GOS 投与で有意に低下した。血清インドキシル硫酸濃度も Con Nx 群では Con Sham 群に比べ有意に増加し、GOS 投与で有意に低下した。

薄切切片の PAS 染色での尿細管間質障害をスコアリングして半定量的に評価した。Con Nx 群は Con Sham 群より有意に障害が増悪し、GOS 投与で有意に改善した。尿細管間質領域の浸潤マクロファージの個数も Con Nx 群では Con Sham 群より有意に増加し、GOS 投与で有意に減少した。

小胞体ストレスの指標である CHOP, GRP78 の発現は Con Nx 群で Con Sham 群より有意に増加し、GOS 投与により有意に抑制された。

アポトーシスの指標である TUNEL 陽性細胞も Con Nx 群で Con Sham 群より有意に増加し GOS 投与により有意に減少した。cleaved caspase-3 の発現も、Con Nx 群で Con Sham 群より有意に増加し、GOS 投与により有意に抑制された。

【考察】

本研究では、まず 5/6 腎摘群で‘Clostridiaceae’が増加していることを示した。これは腎疾患で腸内細菌叢が変化しているという過去の報告に合致し、GOS による減少を踏まえると、‘Clostridiaceae’は腎疾患での腸内細菌叢で重要な役目を果たしている可能性がある。その上で、GOS 投与により腸内細菌叢と短鎖脂肪酸産生が変化したことで腸内環境が変化したことを示した。そして GOS 投与により腸内インドール濃度、血清インドキシル硫酸濃度が低下し、腎障害が改善した。尿細管での小胞体ストレスとアポトーシスも改善した。

しかし、本研究は因果関係にまで踏み込んだものではなく、腸内細菌叢の変化とインドール産生の直接的な関係は不明である。またインドール産生性も一部の菌においてしか分かっていない。5/6 腎摘群で増加した‘Clostridiaceae’の役割も不明である。今後、これらを解明するための実験が必要である。

本研究は、5/6 腎摘ラットへの GOS 投与による腸内細菌叢の変化をパイロシーケンス法で評価し、インドール・インドキシル硫酸の低下に加え腎組織障害の改善を初めて報告したものである。ガラクトオリゴ糖は腎障害進展抑制の新たな治療薬となりうる。