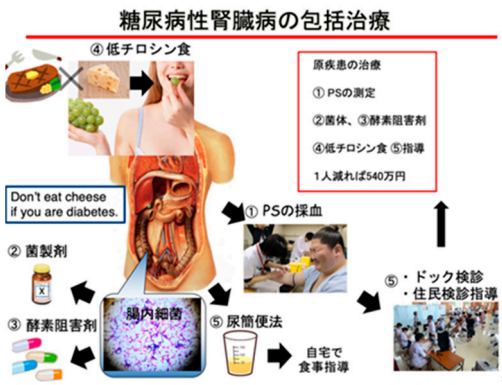
218　腸内細菌を介した糖尿病性腎症の治療	阿部　高明

【目的】本邦における透析患者の最多原疾患は糖尿病性腎臓病（diabetic kidney disease：DKD）であり全体の約 4 割を占める。透析導入患者数の抑制のためには糖尿病患者の中で末期腎不全に進展するリスクが高い患者を早期に見極め、積極的に治療することが重要である。これまでに報告者は①腸内細菌が産生に関わるフェノールの代謝物であるフェニル硫酸が DKD の原因物質の 1 つであること、②糖尿病患者を対象にしたヒトの臨床研究の結果からフェニル硫酸は DKD 増悪の予測因子であること、③フェニル硫酸産生を抑えるとアルブミン尿と腎機能が改善することからフェニル硫酸を低下させることが DKD の新たな治療法開発のターゲットとなり得ることを報告してきた。従ってこの是正が新しい DKD の治療法となりうると考えられた。

【方法】ヒト糖尿病患者糞便中のフェノール産生菌の単離とその酵素の精製、それを用いた酵素発現系を用いてヒトにおけるフェノール産生メカニズムの解明と阻害薬の探索を行い、糖尿病性腎症の発症予防と治療法の探索を行った。併せて便のショットガンメタゲノム解析を行い糖尿病患者に特有な菌叢、代謝経路解析とヒトゲノム解析法の開発を行った。

【結果】ヒトでフェノール産生菌 7 種についてフェノールの産生とゲノムからフェノール産生酵素（tyrosine phenol-lyase：TPL）の遺伝子を増幅し、すべての組換え大腸菌でフェノールの遊離を同定した。またフェノール産生阻害剤を検索し、植物に含まれている数種類の化合物群に強い非競合阻害的 TPL 阻害活性を同定し特許申請を行った（特願 2021-033128 出願日 2021/03/03）。同様にトリプトファンからインドールを産生するトリプトファンインドールリアーゼ（TIL）の酵素阻害活性を抑制する 4 つの化合物がインドールの産生を抑制することも明らかとなった（特許申請準備中）。一方、大正製薬が開発した SGLT1 阻害薬剤の一つである SGL5213 に、フェニル硫酸と動脈効果の原因物質であるトリメチルアミン-*N*-オキシドの血中濃度の低下作用と腎機能改善効果を見いだした。糖尿病性腎症患者のメタゲノム解析と糖尿病患者 362 人の血中メタボローム解析から尿毒症物質と腸内細菌の有意な相関を認め、そのうち正の相関を示したものは 14 種、負の相関を示したものは 7 種が同定された。またヒトの菌叢解析から血中フェニル硫酸濃度と相関する菌種 1 種類、また同じく腸管由来の尿毒素である *p*-クレシル硫酸濃度と正の相関を示す菌種 2 種類、負の相関を示す菌種 2 種類が同定された（特許申請準備中）。患者糞便のショットガンメタゲノム解析から、フェノール産生経路に属する遺伝子系路を検索したところ、糖尿病になると腸内環境で X 遺伝子の存在量が増大する傾向があり、今後検体数を増やして検討する予定である。さらに糞便中の DNA のヒトゲノムマップ率を検討した結果、糞便中の DNA は血液検体と比べて 1／200 のリード数であったが 6 割弱はヒト由来であった。これらのデータから宿主ミトコンドリア情報を解析する手法を開発した。フェニル硫酸は食事中に含まれるチロシンから腸内細菌によって作られる代謝物であり、血液中のフェニル硫酸濃度は 2 年後の糖尿病性腎臓病の悪化を予測する因子である。さらにフェニル硫酸はそれ自身が毒性を持つ悪化要因である。従ってその血中濃度を測り、その値が高いヒトはチロシンを中心とした低アミノ酸に着目した栄養指導、プレバイオティクス・プロバイオティクスを用いて複合的に介入を行うことで腎不全への進展が抑えられる可能性が示唆された。

フェノール産生抑制による包括的糖尿病性腎症の診断と治療（PS=フェニル硫酸）



218. 腸内細菌を介した糖尿病性腎症の治療

阿部　高明

東北大学 大学院医工学研究科／医学系研究科

Key words：糖尿病性腎臓病，フェノール，フェニル硫酸，TPL，腸内細菌

緒　言

本邦における透析患者の最多原疾患は糖尿病性腎臓病（diabetic kidney disease：DKD）であり全体の約 4 割を占める。DKD による透析導入患者数の抑制のためには、糖尿病患者の中で DKD を発症し、末期腎不全に進展するリスクが高い患者を早期に見極め、積極的に治療することが重要である［1］。これまでに報告者は①腸内細菌が産生に関わるフェノールの代謝物であるフェニル硫酸が DKD の原因物質の 1 つであること、②糖尿病患者を対象にしたヒトの臨床研究の結果からフェニル硫酸は DKD 増悪の予測因子であること、③ フェニル硫酸産生を抑えるとアルブミン尿と腎機能が改善することから、フェニル硫酸を低下させることが DKD の新たな治療法開発のターゲットとなり得ることを見いだした。さらに糖尿病患者の臨床コホートの解析から、血中の PS 濃度が高い患者では尿中アルブミンが増悪し予後が悪いことを示した。そしてフェニル硫酸が 100%腸内細菌由来であることに着目して、腸内細菌叢をターゲットとした介入によって血中フェニル硫酸濃度を下げると尿中アルブミンが減少し腎機能が改善するというこれまでにない DKD の治療概念を明らかにした［2］。フェニル硫酸は食事のアミノ酸から腸内細菌が 100%作る代謝物である。その産生酵素はヒトにはなく腸内細菌しか持っておらず、糖尿病モデル動物にフェニル硫酸の産生を抑える酵素阻害剤を投与するとアルブミン尿は著明に減少する。さらに腎不全マウスにこの薬剤を投与するとフェニル硫酸の低下だけでなく腎機能の保護効果も認められる。

そこで本研究ではヒト糖尿病患者糞便中のフェノール産生菌の単離とフェノール産生酵素の精製行い、さらにフェノール産生酵素発現系を用いてヒトにおけるフェニル硫酸産生メカニズム特異的活性阻害剤の開発を行う。また腸内細菌叢の解析から糖尿、慢性腎臓病（chronic kidney disease：CKD）、加齢に関する菌叢の解明と尿毒素産生と菌叢の解析を行う。糞便のショットガン解析から年齢、性別、糖尿病、慢性腎臓病に特異的な菌種同定を行う。さらにヒトの末梢血の全ゲノム解析を同様に行い、ミトコンドリアゲノム及びミトコンドリア構成蛋白をコードする遺伝子の遺伝子変異の組合わせを分類し、その分布を調べる方法を確立することで疾患との関連を明らかにすることを目的とした。

方　法

東北大学病院腎高血圧内分泌科の高血圧外来に通院する患者 101 名の血清中の腸内細菌由来尿毒症物質（indoxyl sulfate：IS、phenyl sulfate ：PS、p-Cresyl sulfate：PCS、trimethylamine *N*-oxide：TMAO）を、質量分析計を用いて測定した。また便中腸内細菌叢を 16S リボゾーマル RNA 解析し、尿毒症物質と各菌種との相関係数を求めた。さらに 20%以上の患者が保持している比較的頻度の高い腸内細菌について尿毒症物質を目的変数に菌の構成割合と eGFR を説明変数とする重回帰分析を行い有意差のある症例を抽出しこの重回帰分析から腎機能による交絡を除いて尿毒素と腸内細菌の関係を解析し尿毒素の産生または抑制する可能性のある腸内細菌の同定を行った。またショットガンメタゲノム解析から 100 万を超える遺伝子ファミリーと代謝系路について解析した。またヒトの口腔および腸内に生息するフェノール産生酵素を有する細菌 7 種についてチロシン含有培地で培養した後、上清中のフェノールを LC-MS で定量した。またそれらフェノール産生菌からチロシンフェノールリアーゼ（tyrosine phenol lyase：TPL）及びトリプトファンインドールリアーゼ（tryptophan indole lyase：TIL）遺伝子を単離して大腸菌に組込み蛋白質を

精製して酵素活性と基質認識性を検討した。また TPL 阻害剤および TIL 阻害活性の高い化合物を探索した。さらに糞便 DNA からの宿主ミトコンドリア DNA を解析する手法の開発を行った。

結果および考察

1. ヒトフェノール産生菌とその責任遺伝子の単離・解析

ヒトで糞便メタゲノムデータベース（EBI metagenomics）を対象にして TPL ホモログを検索し、*Citrobacter freundii*、*Citrobacter koseri*、*Porphyromonas endodontalis*、*Fusobacterium nucleatum*、*Fusobacterium periodonticum*、*Morganella morganii*、*Kluyvera intermedia*、*Treponema denticola* が TPL 保有細菌であることが判明した。それら細菌 7 種についてチロシン含有培地で培養した後、菌体を回収し上清中のフェノールを LC-MS で定量したところ、すべての菌でフェノールの遊離が観察された。

次にそれら菌のゲノムより *tpl* 遺伝子を PCR で増幅し、発現ベクターに組込みトリプトファナーゼ欠損大腸菌に導入した。続いて同様に培養液中のフェノール産生能を分析した。その結果、すべての組換え大腸菌でフェノールの遊離が観察された。即ちこれら *tpl* 遺伝子保有菌はチロシンからフェノールへの産生に関わっていることが明らかとなった。

次に TPL 阻害に基づくフェノール低下による慢性腎臓病、糖尿病性腎症の治療・予防を目的として，食経験のある植物特化代謝産物ライブラリーから TPL 酵素阻害剤を検索した。その結果、植物に含まれている数種類の化合物群に強い非競合阻害的 TPL 酵素阻害活性を同定した（図 1）。またそれぞれの阻害定数を決定し特許申請を行った（特願 2021-033128 出願日 2021/03/03）。また、一部の酵素については X 線結晶構造解析を行い、1.3Åの分解能で構造決定を行った。

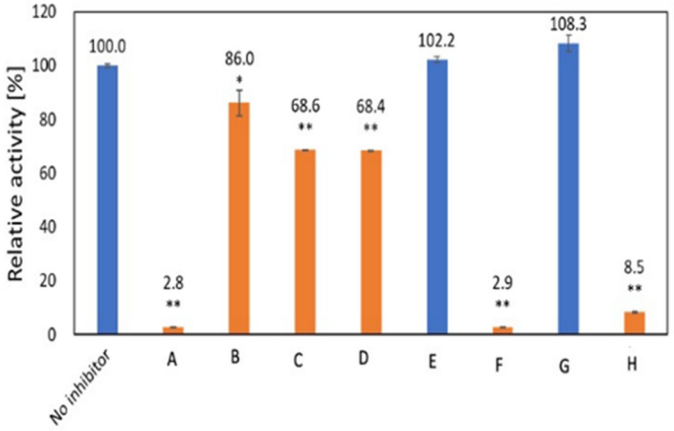


図 1. 化合物の TPL 阻害効果の検証
フェノール産生を指標に各種化合物をスクリーニングしたところ、
化合物 A、F、H に強いフェノール産生抑制作用が認められた。

2. インドール産生抑制代謝物の同定

同様にトリプトファンからインドールを精製する TIL を有し、インドールを産生する菌種も同定し、食経験のある植物特化代謝産物ライブライーを同様に用いてスクリーニングを行い、酵素活性を抑制する 4 つの化合物がインドールの産生を抑制することが明らかとなった（特許申請準備中）（図 2）。

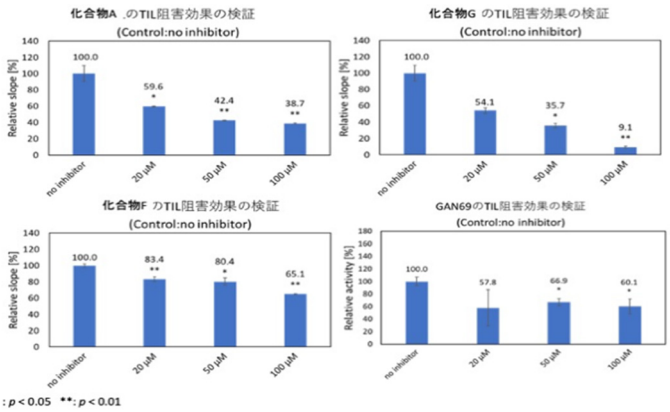


図 2. TIL の阻害試験

インドール産生を指標に各種化合物をスクリーニングしたところ、化合物 A、G、F、GAN69（化合物の名称）に強いインドール産生抑制作用が認められた。

3. 腸管の SGLT1 を阻害するとフェノール産生が抑制され腎機能が改善する

フェニル硫酸は食事のアミノ酸から腸内細菌が 100%作る代謝物でその産生酵素は腸内細菌しか持っていない。近年、DKD と診断された患者と健常者で糞便のメタゲノム解析による腸内細菌叢の比較を行ったところ、Prevotella 属などに明確な差異があることが報告されており、腸内細菌叢の乱れがその病態に関与すると考えられるようになってきた［3, 4］。また我々は SGLT2 阻害薬の一種カナグリフロジンは腸内細菌を変化させることを明らかにした［5］。そこで我々は大正製薬が開発した SGLT1 阻害薬剤の一つである SGL5213 を腎不全マウスに経口投与したところ、腎不全時に上昇する腸内細菌由来の尿毒素であるフェニル硫酸と動脈硬化の原因物質であるトリメチルアミン-*N*-オキシドの血中濃度が低下し、さらに腎機能（BUN、クレアチニン）が改善することを見いだした。また腸内細菌叢の解析からは肥満などで増加するファーミキューテス菌とバクテロイデス菌の比率（F／B 比）が腎不全で高くなり、SGL5213 で低下することを明らかにした。フェニル硫酸は食事中のチロシンが腸内細菌によってフェノールに変換されて産生される。従って糖尿病患者は食事中の肉やチーズに含まれるチロシンを減らすことでフェニル硫酸の産生を抑制することが可能と考えられるが、チロシンだけを料理や加工で食事から除くことはかなり難しく現実的ではない。従って DKD 患者はチロシンを中心としたアミノ酸に着目した栄養指導とともに SGL5213 のような腸管での SGLT1 阻害を行うことで糖尿病性腎症から腎不全への進展が抑えられる可能性が示唆された［6］。

4. 腸内細菌と尿毒素連関の解明

次に糖尿病性腎症患者のメタゲノム解析と糖尿病患者 362 人の血中の腸管由来尿毒素濃度の検討を行った。患者便検体より 585 種類の属レベルの菌種を同定し、腸内細菌由来尿毒症物質 4 種類との 2,340 通りの組合わせについて相関を解析した。その結果、重回帰分析では 21 通りの組合わせで尿毒症物質と腸内細菌の有意な相関を認め、そのうち正の相関を示したものは 14 種、負の相関を示したものは 7 種が同定された。中でも血中フェニル硫酸濃度と相関する菌種が 1 種類同定された。また同じく腸管由来の尿毒素である PCS 濃度と正の相関を示す菌種 2 種類、負の相関を示す菌種 2 種類が同定された（特許申請準備中）。

また患者糞便のショットガンメタゲノム解析からフェノール産生経路に属する遺伝子を検索したところ、糖尿病になると腸内環境で X 遺伝子の存在量が増大する傾向あり、今後検体数を増やして検討する。また性別、年齢層、慢性腎臓病の罹患状況、糖尿病の罹患状況などで層別化して、群間で存在頻度に差が見られる遺伝子ファミリーを同定した（図 3）。その結果、慢性腎臓病になると A 遺伝子の存在量が増大し・糖尿病になると B ドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子群の存在量が減少するなど、疾患との関連が示唆された（特許申請準備中）。

さらにヒトゲノムマップ率を検討した。糞便中 DNA は血液検体と比べて 1／200 のリード数であったが、キャプチャーされた DNA の 6 割弱はヒト DNA 由来であり、検出が可能であることが確認できた。このデータをもとに宿主ミトコンドリア情報をシーケンスする解析手法を開発した（特許申請準備中）。

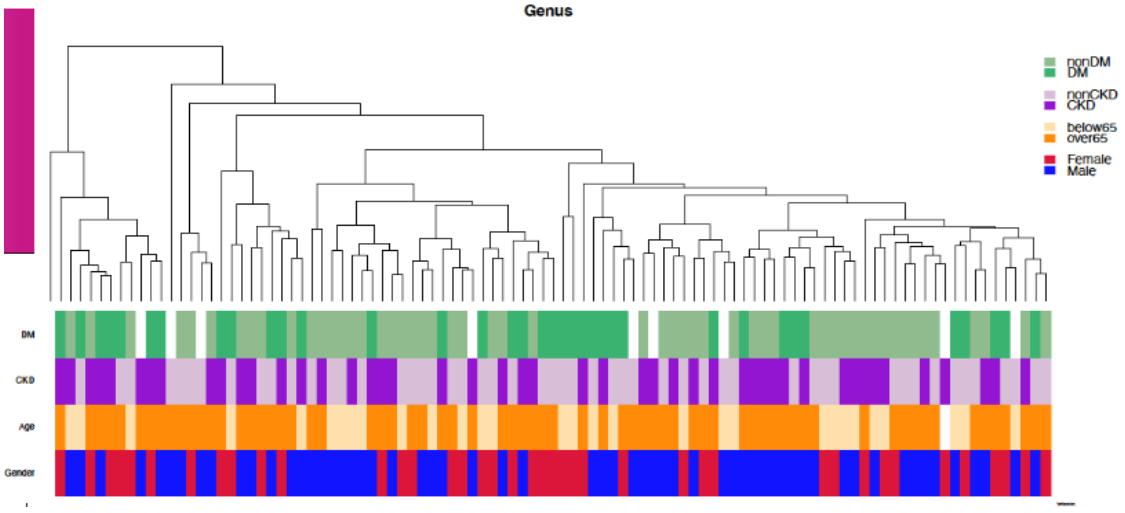


図 3. 糖尿病性腎症患者の糞便メタゲノム解析と疾患の関連

101 名の菌叢解析から糖尿病（DM）、慢性腎臓病（CKD）、年齢（Age）、性別（gender）に関与する菌叢を示す。

5. 考察

DKD は本邦で 1,000 万人を超える糖尿病患者の約 20～30%が発症し、慢性透析患者で DKD を原疾患とする患者は 4 割にのぼる。したがってどの糖尿病患者が DKD を発症・重症化するリスクが高いかを早期から見極め、積極的に介入することは、ESKD を減らすためはもちろん医療の効率化の面からも非常に重要である［1］。アルブミン尿や eGFR が DKD をフォローする上での標準的な指標であるが、DKD は、腎硬化症などの緩やかに eGFR が低下していく経過と比較して、ある一定の時期までは腎機能が比較的保たれアルブミン尿もそれほど多く出ないが、ある時期を越えると加速度的に eGFR が低下しアルブミン尿が増えるといった経過をとる例が多いとされる。また反対にアルブミン尿はほとんど出ないままで eGFR が下がっていくような非典型的な症例も少なくないことが近年わかってきた。それ故アルブミン尿や eGFR といった既存の指標とは独立した新たな DKD のマーカーが求められている。現在国は糖尿病性腎症重症化予防プログラムを立ち上げ、糖尿病性腎臓病患者の掘り起こしと病院への紹介や栄養指導を進めているが、医療機関の側では患者を紹介されても DKD に特異的な治療法があるわけではなく、厳密な血糖管理や RAS 系阻害剤を中心とした血圧の管理といったいわば糖尿病患者一般を対象とした場合と同じ治療以外にはなかなか有効な策がない。

本研究は尿毒症物質を産生または抑制する可能性のある腸内細菌を同定することができた。今後はそれらの菌に着目して特異的にその機能を低下する方法（薬剤、エンドトキシンなど）の開発が DKD の治療法として考えられた［1］。食経験のある植物由来物質がフェノールの産生を抑制することは糖尿病患者における新たな、かつより安全な食品、薬剤の開発に繋がることが考えられた。また本研究は、糖尿病性腎症の発症機序が解明されその治療法を創出するツールとなり得る。腎臓病の新薬の開発と治験には多くの患者と長期間の治験期間が必要なため莫大な費用がかかり、大企業である製薬会社ですらその参入を躊躇する分野である。しかし本研究から DKD の治験を行う際に糖尿病で微量アルブミン尿があり、かつフェニル硫酸が高値の患者を選別して治験を行うことにより人数、期間、費用を大幅に削減することが出来ると考えられ、新たなマーカーとしてのみならず治験の効率を上昇させる指標となりうる。今後血中濃度が高い患者、特に微量アルブミン尿を呈している DKD 患者はチロシンを中心としたアミノ酸に着目した栄養指導、プレバイオティクス・プロバイオティクス、下剤、腸内細菌酵素阻害薬等の介入を行うことで DKD への進展が抑えられる可能性があり、新たな医療の開発に結びつくと考えられる。また糞便を用いた遺伝子機能測定法も糖尿病性腎臓病の新たな切り口になる可能性が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究は、順天堂大学大学院医学研究科難病の診断と治療研究センターの岡崎康司センター長ならびに東北大学工学研究科の中山亨教授との共同研究である。

文　献

1) Hans-Joachim Anders HS., Huber TB , Isermann B. and Mario Schiffer M. CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. Nat Rev Nephrol 2018 Jun;14(6):361-377. doi: 10.1038/s41581-018-0001-y.

2) Kikuchi K.. Saigusa D., Kanemitsu Y., Matsumoto Y., Thanai P. Suzuki N., Mise K. Yamaguchi H., Nakamura T., Asaji K., Mukawa C., Tsukamoto H., Sato T., Oikawa Y., Iwasaki T., Oe Y., Tsukimi T., Noriko N. Fukuda NN., HO H-J., Nanto-Hara F. Jiro Ogura J., Saito R., Nagao S., Yusuke Ohsaki Y., Shimada S., Takehiro Suzuki T., Toyohara T., Mishima E., Shima S., Akiyama Y., Yukako Akiyama Y., Ichijo M., Matsuhashi T., Matsuo A., Yoshiaki Ogata Y., Ching-Chin Yang C-C., Chitose Suzuki C., Breeggemann MC., Heymann J. Shimizu M., Ogawa S., Takahashi N., Takashi Suzuki T., Owada Y., Shigeo Kure S., Yamamoto M., Nariyasu Mano N., Soga T., Takashi Wada T., Jeffery Kopp J., Shinji Fukuda S., Atsushi Hozawa A., Jun Wada J., Sadayoshi Ito S., Tomioka Y. and Abe T. Gut microbiome-derived phenyl sulfate is a cause and predictor of albuminuria in diabetic kidney disease.　Nature Commun. 10: 1835, 2-019. doi: 10.1038/s41467-019-09735-4.

3) Mishima E, Abe T. Role of the microbiota in hypertension and antihypertensive drug metabolism. Hypertens Res. 2022 Feb;45(2):246-253. doi: 10.1038/s41440-021-00804-0. Epub 2021 Dec 9. doi: 10.1038/s41440-021-00804-0.

4) Akiyama Y., Kikuchi K., Toyohara T., Mishima E., Suzuki C., Suzuki T., Nakayama M., Tomioka Y., Soga T. and Abe T. CE-MS-Based Identification of Uremic Solutes Specific to Hemodialysis Patients. Toxins (Basel). 13: 324, 2021. doi: 10.3390/toxins13050324.

5) Mishima E., Fukuda S., Kanemitsu Y., Saigusa D., Mukawa C., Asaji K., Matsumoto Y., Tsukamoto H., Tachikawa T., Tsukimi T., Fukuda N.N., Ho, H-J, Kikuchi K, Suzuki C., Nanto F., Suzuki T., Ito S., Soga T., Tomioka Y. and Abe T.
Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model. Am J Physiol Renal Physiol 2018 Oct 1;315(4):F824-F833. doi: 10.1152/ajprenal.00314.2017.

6) Ho, Hsin-Jung ; Kikuchi, Koichi; Oikawa, Daiki ; Watanabe, Shun ; Kanemitsu, Yoshitomi ; Saigusa, Daisuke ; Kujirai, Ryota ; Ohtsubo, Wakako; Ichijo, Mariko ; Akiyama, Yukako ; Aoki, Yuichi ; Mishima, Eikan ; Ogata, Yoshiaki ; Oikawa, Yoshitsugu ; Matsuhashi, Tetsuro ; Toyohara, Takafumi ; Suzuki, Chitose ; Suzuki, Takehiro ; Mano, Nariyasu ; Katayama, Takane ; Ohwada, Yuji ; Kagawa, Yoshiteru ; Nakayama, Toru ; Tomioka, Yoshihisa ; Abe, Takaaki. SGLT-1-specific inhibition ameliorates renal failure and alters the gut microbial community in mice with adenine-induced renal failure. Physiological Reports. doi: 10.14814/phy2.15092