

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 腎不全患者治療コホートを用いた腸内細菌および代謝物解析による新規腎不全治療に関する研究開発

Research and development of novel remedies for renal failure based on gut bacteria and metabolite analysis using a treatment cohort of patients with renal failure.

研究開発実施期間： 令和2年6月1日から令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：阿部 高明
Takaaki Abe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東北大学・大学院医工学研究科・教授

National University Corporation, Tohoku University, Graduate School of Biomedical Engineering. Professor.

II 研究開発の概要

慢性腎臓病（CKD）の患者は1400万人を超えなお増加している。現在34万人いる透析患者の医療費は年間1兆5000億円を越え医療財政を圧迫しているが治療薬はない。腎不全時には種々の尿毒症物質の血中での蓄積が腎不全症状をもたらす死亡率を上昇させるが、透析による低分子以外の尿毒症物質の除去は困難であり、尿毒症物質の蓄積を阻止する新たな薬剤の開発が必要である。研究代表者はマウス腎不全モデルに慢性便秘症治療薬ルビプロストンを投与すると腎不全時の腸内環境が改善し、体内の尿毒症物質蓄積を抑制し腎保護作用を示すことを明らかにし国内外で特許化した（特許第6090723号：腎機能障害の予防又は改善剤ルビプロストン、図1）。そこで開発企業であるスキャンポファーマ社から日本では未承認の低用量製剤（8 μ g）の提供を受け、AMEDの橋渡し事業支援のもとeGFR25-45ml/min/1.73m²の患者140症例をプラセボ群（40症例）、8 μ g群（40症例）、16 μ g群（60症例）の3群に割付け、東北大学をはじめ8つの実施地で120名の被験者がエントリーされ2020年春に治験が終了した。

本治験は下剤の尿毒症物質低下及び腎機能低下抑制効果を検討する無作為化、二重盲検、プラセボ対照、多施設共同治験であり、その糞便（特に有効症例の）を用いてどのような患者が腎機能、尿毒症物質が低下するかどうかを検討し新たな菌体あるいはその成分を用いた腎不全治療法の開発をすることができる。そこで本研究では腎障害患者にルビプロストンを投与した臨床治験のサンプルを用いて、腎障害への腸内細菌の関与の検証と腎機能改善に有効な腸内細菌保菌患者の菌叢解析を行う。即ち倫理委員会承認のもとすでに2019年度で終了したルビプロストンの前向き臨床治験で得られた患者120人のなかで特に症状の改善のあ

るグループと無いグループの血液、尿、糞便の 1) 血液メタボローム解析、尿毒素解析、2) 尿メタボローム解析、尿毒素解析、3) 糞便 16S 菌叢解析、4) ショットガンメタゲノム、5) トランスクリプトーム解析を行い、治験の臨床データを組み合わせたマルチオミックス解析を通して腎不全に対する腸内環境の影響を網羅的に解析し、腎不全の創薬ターゲットとなる菌を同定することを目的とした。

我々はルビプロストン投与により腎機能の改善のあるグループ（有効な腸内細菌保菌患者）とそうでないグループに着目して、血液・尿・糞便メタボローム、メタゲノム(系統解析・機能解析)データの多重比較解析を行った。ルビプロストン投与により腎機能の改善のあるグループに特徴的な変化を抽出するため、プラセボ群やルビプロストンを投与しても腎機能が改善しなかった患者群では変化がなく、腎機能が改善した群でのみ変化した代謝物、菌種、機能遺伝子を抽出した。網羅的 Metabolome 解析から腎機能改善群で血漿中の A の上昇、尿中の B、C、便中の D 代謝物の上昇を有意に認めた。一方血漿中の E、F、G、H、I、J、K 代謝物は減少していた。減少した物質は腎不全時に蓄積が知られる物質であり、eGFR の改善度で群分けした交絡と考えられた。16SrRNA アンプリコンシーケンスでは腎機能改善群で菌 A の増加のみ見られ、ショットガンメタゲノムシーケンスによる系統解析では菌 B をはじめとする 8 種の菌の増加と菌 C の減少を認めた。増加した菌群は善玉菌として知られている菌であり、ルビプロストンが腸管内のディスバイオーシスの是正に働いている可能性が示唆された。さらにショットガンメタゲノムシーケンスによる機能解析では代謝物 X の生合成にかかわる 23 の酵素遺伝子の増加と 3 種の酵素遺伝子の低下を認めた。

上記を元に代謝物 X をアデニン食により腎不全を誘導したマウスに経口投与し、腎機能改善効果を確認した。その結果、代謝物 X の投与でクレアチニンの有意な低下が認められ、代謝物 X による腎機能改善効果が示された。

分担研究大坪は腎不全マーカーであるフェニル硫酸の前駆体フェノールを産生するヒト腸内細菌の性状解明することを目的とし、フェノール産生能を有するヒト腸内細菌のスクリーニングとチロシンからフェノールを合成する酵素チロシン-フェノールリアーゼ (TPL) を保有するヒト腸内細菌の探索を実施した。その結果、ヒト腸管由来の主要なフェノール産生菌は主にタンパク質消化物やペプチドからフェノールを産生する TPL 保有細菌であること、TPL 阻害剤はフェノール産生菌に対してチロシンの取り込みや代謝プロファイルを変化させることを明らかにした。また、ヒト腸管における主要な TPL 保有菌は健常者の腸管内にユニバーサルに常在する特定の細菌 A であることを明らかにし、当該細菌が腎不全治療において重要な制御ターゲットとなる可能性を示した。

分担研究者中山は尿毒症物質前駆体（フェノールやインドール）の生成活性を示す腸内細菌種とそれらの活性レベルを検索した。次に、それらの微生物による尿毒症物質前駆体生成の原因酵素（チロシンフェノールリアーゼ (TPL) およびトリプトファンインドールリアーゼ (TIL)）の阻害剤を検索した。合成化合物 GAN69 ならびにゴマリグナン類とイソフラボン類に、両酵素の良好な阻害能が認められた。ゴマリグナン類のなかでも、セサミノール、セサミン、セサモールに特に強い阻害が認められ、TPL に対しては混合型阻害剤として、TIL に対しては競合阻害剤として作用した。これらの阻害剤と TIL の構造のドッキングシミュレーションを検討し、それら阻害作用を構造の上から検証した。本研究開発の過程で、糞便中のフェノール生成が TPL に非依存的に起こる可能性も浮上したため、この TPL 非依存的フェノール生成経路の阻害剤も探索し、いくつかの候補化合物を選抜し特許申請を行った。

分担研究者片山高嶺は腸内細菌由来チロシンフェノールリアーゼの活性を阻害するリグニン由来化合物を投与したマウスでは非投与群のそれと比較して糞便中フェノール濃度が低下していることを明らかにした。そこで糞

便 16S メタゲノム解析を行ったところ両群の腸内細菌叢には大きな変化は見られなかった。すなわち、当該リグニン由来化合物は腸内細菌叢を攪乱することなく、腸内におけるチロシンからのフェノール産生を抑制する効果があることが強く示唆された。また、チロシンフェノールリアーゼ以外で腸内フェノール産生に関わる芳香族ヒドロキシカルボン酸脱炭酸活性を有する腸内細菌を数種同定した。それらの菌株を用いて芳香族ヒドロキシカルボン酸脱炭酸活性の阻害剤スクリーニングを行った結果、ある種の天然化合物に強いフェノール産生抑制効果を見出した。今後関連化合物を使用して再スクリーニングを行ってさらに効果のある関連物質の探索を行うとともに臨床への応用について検討して行く。

Chronic kidney disease (CKD) affects more than 14 million people and its prevalence is increasing, but there is no cure. In this study, using samples from clinical trials in which lubiprostone was given to patients with kidney failure, we performed a multi-omics analysis combining clinical data from these trials to comprehensively analyse the impact of the gut environment on kidney failure and identify bacteria that could be targeted for drug discovery in kidney failure. The principal investigator found that lubiprostone, a drug used to treat chronic constipation, has renoprotective effects. With the support of the AMED Bridge Programme, 140 patients were divided into three groups (placebo, 8 µg and 16 µg groups) and investigator-led clinical trials were conducted at eight sites. The results of the comprehensive metabolomic analysis showed a significant increase in A-metabolites in plasma, B and C-metabolites in urine and D-metabolites in feces in the group with improved renal function. In contrast, plasma metabolites of E, F, G, H, I, J and K were reduced. 16SrRNA amplicon sequencing showed only an increase in Bacteria A in the improved renal function group.

In contrast, phylogenetic analysis by shotgun metagenomic sequencing showed an increase in eight bacteria, including B, and a decrease in C. The increased bacteria are known to be beneficial bacteria, suggesting that lubiprostone may act to correct intestinal dysbiosis. In addition, functional analysis by shotgun metagenomic sequencing showed an increase in 23 enzyme genes involved in the biosynthesis of metabolite X and a decrease in three enzyme genes. Based on the above, Metabolite X was orally administered to mice with renal failure induced by an adenine diet and the improvement in renal function was confirmed. The results showed that administration of Metabolite X significantly reduced creatinine levels, indicating that it improved renal function.

In addition, to identify human gut bacteria that produce uremic precursors (phenol and indole), we searched for human gut bacteria that possess tyrosine-phenol lyase (TPL).

We screened compounds that inhibit the activity of tryptophan indole lyase (TIL), which produces indole along with TPL. The synthetic compound GAN69 and the sesamol, sesaminol and sesamin, which belong to the gomarignan class, and the isoflavone class, were found to have good inhibitory activity against both enzymes. Docking simulations of the structures of these inhibitors and TILs were examined to verify their inhibitory effects from a structural point of view. We found that the major phenol-producing bacteria from the human intestinal tract are specific Bacteria A, which are TPL-harboring bacteria, and that TPL inhibitors alter the tyrosine uptake and metabolic profiles of phenol-producing bacteria. In addition, the possibility that fecal phenol formation may occur in a TPL-independent manner has been raised; therefore, inhibitors of this TPL-independent pathway were also screened and several candidate compounds were selected.

The fecal phenol concentration in mice treated with lignin-derived compounds that inhibit TPL activity was lower than in the untreated group; therefore, 16S metagenomic analysis of feces was performed. However, no significant changes in the gut microbiota were observed in either group. This result strongly suggests that lignin-derived compounds effectively inhibit phenol production from tyrosine in the gut without affecting the gut microbiota. In addition, we identified several species of intestinal bacteria with aromatic hydroxycarboxylic acid decarboxylation activity involved in intestinal phenol production in addition to TPL. We screened these strains for inhibitors of aromatic hydroxycarboxylic acid decarboxylation activity and found that certain natural compounds significantly inhibited phenol production.