

令和元年6月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09617

研究課題名(和文)腎疾患に対する超音波療法の有効性に関する研究

研究課題名(英文)Low-Intensity Pulsed Ultrasound Ameliorates Experimental Renal Fibrosis

研究代表者

中島 歩 (Nakashima, Ayumu)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・共同研究講座教授

研究者番号：40448262

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)：片腎+Angiotensin II負荷によるマウス高血圧性腎症モデルに対して、超音波照射の連日4週間施行は、炎症細胞の浸潤および腎線維化の進展を抑制した。さらに、右腎摘出術を施行したdb/dbマウスにおいて、非照射マウス(Control群)と比較して、超音波照射開始6週間後より、超音波照射(PUS)群において蛋白尿の有意な低下が認められた。また、 α -SMAの免疫染色およびTGF- β 1の蛍光染色においても、Control群と比較して、PUS群において発現が有意に減少していた。以上の結果より、超音波療法は慢性腎臓病患者における腎線維化を抑制する新規の治療法になりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の慢性腎臓病患者数は約1,300万人、透析患者は約33.5万人であり、新規に透析導入になる患者数は1年間に約4万人である。本研究によって、超音波照射療法は、高血圧および肥満2型糖尿病における腎障害に対して有効であることが示唆された。超音波照射は簡易で副作用もほとんどないと考えられるため、早期に臨床への応用が期待され、発展性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we assessed the effect of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) therapy on experimental hypertensive nephropathy and diabetic nephropathy. Unilateral nephrectomy and subcutaneous infusion of angiotensin II via osmotic mini-pumps produced hypertension in mice. LIPUS therapy significantly decreased systolic blood pressure after 21 days compared with control. In addition, immunohistochemistry revealed that renal fibrosis and infiltration of inflammatory cells were more significantly ameliorated by LIPUS therapy. Next, db/db mice with unilateral nephrectomy produced proteinuria, and LIPUS therapy ameliorated proteinuria after 42 days. Immunohistochemistry revealed renal fibrosis was significantly ameliorated by LIPUS therapy. These findings imply that LIPUS therapy for CKD patients has the potential to be a useful therapy for preventing the progression of renal fibrosis.

研究分野：腎臓内科

キーワード：超音波療法 線維化 抗炎症作用 腎硬化症 糖尿病性腎症 高血圧

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超音波療法による血管新生の促進効果が報告されており、我々も大腿動脈結紮によるマウス閉塞性動脈硬化モデルにおいて、超音波照射は血管新生を促進させ、虚血肢の血流量を改善させることを明らかにした。我々が施行したマウス閉塞性動脈硬化モデルに対する超音波療法において、非照射群と比較して、超音波照射群では虚血肢の筋組織への炎症細胞浸潤の抑制が認められた。超音波1回の前照射によって、マウス腎虚血再灌流後の炎症細胞浸潤が抑制されることが報告されており (Gigliotti JC et al. J Am Soc Nephrol. 24: 1451-60, 2013; J Am Soc Nephrol. 26: 2470-81, 2015)、超音波療法は炎症細胞の浸潤を抑制することで腎線維化を抑制しうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

超音波療法による血管新生の促進効果が示されており、我々もマウス大腿動脈結紮後の血管新生に有効であることを明らかにした。さらに、超音波照射群では、大腿動脈結紮後の筋組織への炎症細胞の浸潤が抑制していたことから、超音波療法は炎症細胞の浸潤を抑制することで腎線維化を抑制できるのではないかと考えた。そこで、片腎 + Angiotensin II 負荷によるマウス高血圧性腎症モデルを作製し、腎臓への超音波照射を連日4週間施行したところ、炎症細胞の浸潤および腎線維化が著明に改善していた。本研究では、超音波照射が炎症細胞の浸潤および線維化を抑制する機序を明らかにする。また、肥満2型糖尿病の腎障害においても超音波療法が有効であるかを db/db マウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

高血圧性の腎障害に対する効果

右腎摘出術および浸透圧ポンプ (Angiotensin II 1 μ g/kg/min, 4 weeks) の埋込み術を施行後に生理食塩水の飲水を行う高血圧性腎症モデルを作製し、エスカイン吸入麻酔下で、周波数・パルス繰り返し周波数を設定した面積 1.68 cm² の超音波照射器 (Nippon sigma 社) を、左腎へ経皮的に20分間/日、4週間連日で施行した。非照射群は超音波が出ない条件 (0 MHz) で同様に施行した。

肥満2型糖尿病による腎障害に対する効果

肥満2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスに右腎摘出術を行い、8週齢から超音波照射を8週間連日で施行した。照射群と非照射群において、尿中アルブミン量を測定するとともに、採取した腎組織の比較を行った。

マクロファージに対する影響

THP-1 monocyte 培養系に超音波の照射を行い、Pro-inflammatory phenotype (M1) マクロファージから、Immune-regulatory phenotype (M2) (CD163 陽性) に変化する割合を FACS 解析で検討した。

線維化を直接的に抑制する作用

Angiotensin II 添加後の human kidney 2 (HK-2) 細胞に超音波照射を行い、非照射群と比較して照射群では、TGF- β 1、pSMAD2、 α -SMA などの発現が抑制されるかを検討した。

脾摘による影響の評価

右腎および脾臓の摘出術および浸透圧ポンプ (Angiotensin II 1 μ g/kg/min, 4 weeks) の埋込み術を施行後に生理食塩水の飲水を行う高血圧性腎症モデルを作製し、エスカイン吸入麻酔下で、周波数・パルス繰り返し周波数を設定した面積 1.68 cm² の超音波照射器 (Nippon sigma 社) を、左腎へ経皮的に 20 分間/日、4 週間連日で施行した。非照射群は超音波が出ない条件 (0 MHz) で同様に施行した。

4. 研究成果

右腎摘出術および浸透圧ポンプ (Angiotensin II 1 μ g/kg/min, 4 weeks) の埋込み術を施行後に生理食塩水の飲水を行う高血圧性腎症モデルにおいて、4 週間の超音波照射は、0 MHz (非照射群) と比較して、炎症細胞浸潤 (F4/80 および CD68) 線維化 (TGF- β 1、 α -SMA) を抑制した。

肥満 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスに右腎摘出術を行い、8 週齢から超音波照射を 8 週間連日で施行したところ、非照射群と比較して、照射群では有意に尿蛋白/Cre 値が低下していた。さらに、照射群では炎症細胞浸潤 (F4/80 および CD68) および線維化 (TGF- β 1、 α -SMA) が抑制していた。

THP-1 monocyte 培養系に超音波の照射を行い、Pro-inflammatory phenotype (M1) マクロファージから、Immune-regulatory phenotype (M2) (CD163 陽性) に変化する割合を FACS 解析で検討したが、CD163 陽性細胞の割合は変わらなかった。

Angiotensin II 添加後の human kidney 2 (HK-2) 細胞に超音波照射を行ったところ、非照射群と比較して照射群では、TGF- β 1、pSMAD2、 α -SMA の発現が有意に抑制していた。

右腎および脾臓の摘出術および浸透圧ポンプ (Angiotensin II 1 μ g/kg/min, 4 weeks) の

埋込み術を施行後に生理食塩水の飲水を行う高血圧性腎症モデルに対して、超音波照射は、脾摘していないモデルと同様に、マクロファージの浸潤および線維化（TGF- β 1、 α -SMA）を抑制した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Aibara Y, Nakashima A, Higashi Y. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Ameliorates Experimental Renal Fibrosis. The 2nd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science (国際学会, 2018)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：慢性腎障害を処置する装置

発明者：東幸仁、中島歩、相原良樹

権利者：東幸仁、中島歩、相原良樹

種類：特許

番号：特願 2018-235405

出願年月日：2018 年 12 月 17 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：東 幸仁

ローマ字氏名：HIGASHI Yukihiro

所属研究機関名：広島大学

部局名：原爆放射線医科学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：40346490

研究分担者氏名：正木 崇生

ローマ字氏名：MASAKI Takao

所属研究機関名：広島大学

部局名：病院(医)

職名：教授

研究者番号(8桁)：30397913

研究分担者氏名：野間 玄督

ローマ字氏名：NOMA Kensuke

所属研究機関名：広島大学

部局名：原爆放射線医科学研究所

職名：助教

研究者番号(8桁)：00379893

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：相原 良樹

ローマ字氏名：AIBARA Yoshiki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。