

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08258

研究課題名(和文) 腹膜透析における除水不全、腹膜機能障害の病態解明と新たな治療戦略

研究課題名(英文) New strategy to improve net ultrafiltration in PD and pathophysiology of peritoneal membrane dysfunction

研究代表者

伊藤 恭彦 (Ito, Yasuhiko)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60402632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜透析は、腹膜という生体膜を透析膜として用いる血液浄化法である。腹膜透過性亢進が予後を決定する重要因子であることが知られている。その機序は血管数増加とされてきたが、矛盾する所見が明らかとなってきた。今回、我々は腹膜の毛細血管のグリコカリックス異常、ヘパラン硫酸とUEA-Iレクチン結合糖鎖の減少が透過性亢進と関与することを明らかにした。また、食塩過剰摂取から、Naが軟部組織等に沈着しTonEBPを活性化し、MCP-1発現からマクロファージの浸潤からIL-6上昇、炎症を惹起し、血管新生、そして血管透過性の亢進に繋がるということを明らかにした。今後治療ターゲットとなることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜透析は、腹膜という生体膜を透析膜として用いる血液浄化法で近年循環動態への影響が少ないことから高齢者に適しているといわれている。腹膜透過性亢進が予後を決定する重要因子であることが明らかとされているが、その機序は不明なところが多い。今回、腹膜の毛細血管のglycocalyx異常、食塩摂取過剰から炎症が惹起され血管新生・透過性亢進の機序を明らかとした。治療ターゲットとなり、治療の質向上および除水不全の改善から離脱がへることが期待される。このことは、腹膜透析患者にとって朗報となりまた医療費削減にもつながると考える。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal dialysis is a blood purification method that uses a biological membrane called peritoneum as a dialysis membrane. Peritoneal permeability is known to be an important factor in determining prognosis. Although the mechanism has been attributed to an increase in the number of blood vessels, contradictory findings have become apparent. In this study we found that abnormalities in the glycocalyx of peritoneal capillaries and a decrease in heparan sulfate and UEA-I lectin-binding sugar chains are associated with increased permeability. In addition, we found that excessive salt intake causes sodium accumulation in soft tissues and activates TonEBP, which in turn induces MCP-1 expression, macrophage infiltration, IL-6 upregulation, inflammation and angiogenesis, leading to increase of vascular permeability. It is expected to become a therapeutic target in the future.

研究分野：腎臓内科学

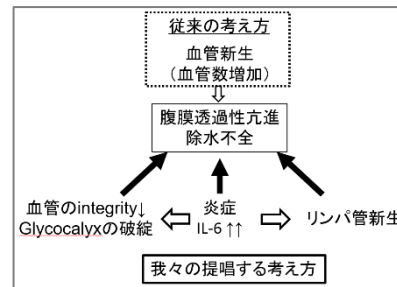
キーワード：腎不全 腹膜透析 腹膜機能 glycocalyx 塩

### 1. 研究開始当初の背景

腹膜透析は、腹膜という生体膜を透析膜として用いる血液浄化法で近年循環動態への影響が少ないことから高齢者に適しているといわれている。しかしながら、腹膜透過性を含めた腹膜機能の状態は様々である。今日まで腹膜透過性亢進に関わる最も重要な病理学的因子は、血管数増加といわれてきた。しかしながらヒト腹膜病理の解析で矛盾する所見が明らかとなってきた。また、腹膜透析開始時の腹膜透過性は血管数よりマクロファージ浸潤、IL-6 陽性細胞と最も相関することを我々は報告してきた (Sawai A, Ito Y. et al., Nephrol Dial Transplant. 2011)。また、リンパ管新生が腹膜透析とともに進み、除水量と大きくかかわってくることも我々は報告した (Kinashi H, Ito Y et al., J Am Soc Nephrol 2013, Terabayashi T, Ito Y et al., Lab Invest 2015)。これらより我々は、血管新生と共に 1) リンパ管新生、2) 血管の状態、具体的には血管内皮細胞の Glycocalyx の減少、3) 炎症が腹膜機能不全および除水能に関わる重要な因子であると考えた。

血管内皮細胞の表面はプロテオグリカンやグリコプロテイン、糖鎖などからなる構造で覆われており Glycocalyx と呼ばれている。Glycocalyx は、血管内腔の血液凝固を抑制しているだけではなく、血管透過性の調節や炎症細胞の接着制御など多彩な機能が明らかにされ注目されている。しかしながら腹膜透過性における役割は未だ不明な点が多い。現在本邦で使用されている中性液は腹膜透過性の亢進が経時的にみられないの対し、

また、我々は腎不全に加え塩分負荷があると皮膚軟部組織中心に Na が蓄積し、マクロファージが浸潤し炎症が惹起されることも報告した (Sakata F, Ito Y et al., Lab Invest 2017)。よって 3) の炎症は、腎不全マウスモデルに塩を負荷した時にみられる慢性炎症からの腹膜透過性亢進を検討することとした。



図：今回の検討はGlycocalyxと炎症に着目している

### 2. 研究の目的

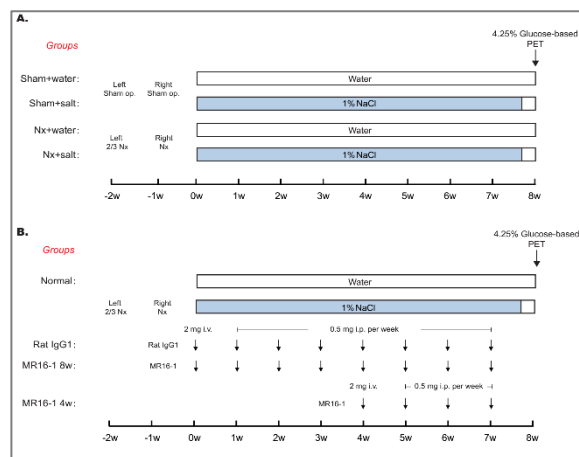
本研究では、1) 腎不全状態に食塩過剰摂取が炎症を惹起し腹膜透過性を決定する因子であるか、2) 血管内皮細胞 Glycocalyx の減弱・破綻は腹膜透過性に関与するかを検討することにある。

### 3. 研究の方法

1) 5/6 腎臓摘出した腎不全マウスモデルを作成。コントロール群はシャム手術マウスとし、それぞれ水群と塩水群をとし 8 週後に腹膜透過性、病理学的解析を行った (右図 A)。

本腎不全・塩負荷マウスに IL-6 受容体中和抗体を投与群、コントロール抗体投与群と比較検討した。

腹膜透過性試験、lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE)-1, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, CD31 and CD68 等免疫染色、IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 等の real time PCR を施行した。培養中皮細胞に高張 NaCl で刺激し TonEBP siRNA による抑制実験を行い IL-6, MCP-1, VEGF-A, VEGF-C 等の発現を検討した。



図：5/6腎臓摘出した腎不全マウスモデル実験  
A. 腎不全(Nx)塩負荷の評価  
B. 腎不全(Nx)塩負荷にみられる炎症に対する抗IL-6受容体抗体(MR16-1)の効果

2) ヒト腹膜透析実施後の腹膜組織を用いて、腹膜透過性亢進している状態では glycocalyx の変化がみられるか、従来の酸性溶液で治療した患者 11 名 (酸性群) および低 GDP、pH 中性溶液で治療した患者 11 名 (中性群) の腹膜組織を調べた。対照組織は、腎臓移植を受けた健康なドナー 5 名から採取した (対照群)。血管数は CD31, 血管内径と内腔径の比 (血管狭窄率、L/V 比) は血管障害としてそれぞれ評価した。ヘパラン硫酸 (HS) ドメインと Ulex europaeus agglutinin-1 (UEA-1) 結合の免疫染色をヘパラン硫酸の異なった部位を認識する 3 種類の抗体を用い、硫酸化グリコサミノグリカンと糖衣のフコース含有糖鎖の評価を行った。また、腹膜線維化、腹膜炎症をマクロファージ浸潤数で検討した。

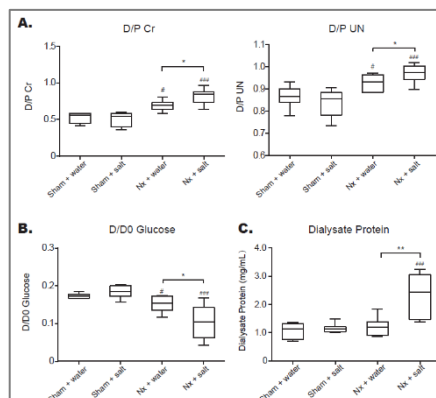
### 4. 研究成果

1) 腎不全モデルマウスが食塩摂取過剰になると炎症を伴い、腹膜透過性が亢進することを見出した。

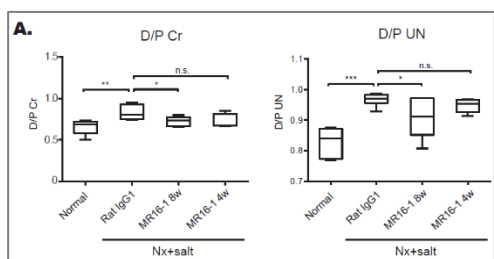
食塩負荷群 (Nx+salt 群)にて D/P Cr、D/P UN の上昇がみられ、ブドウ糖の吸収亢進 (D/D0 Glucose)に伴い蛋白の漏出増強がみとめられた。

本病態に IL-6 が強くかかわっていることが示唆されたので、IL-6 受容体抗体を用いて抑制実験を行った。食塩負荷群 (Nx+salt 群)で腹膜透過性の亢進としてみられていた D/P Cr、D/P UN の上昇、蛋白の漏出増強は IL-6 受容体抗体にて改善した。

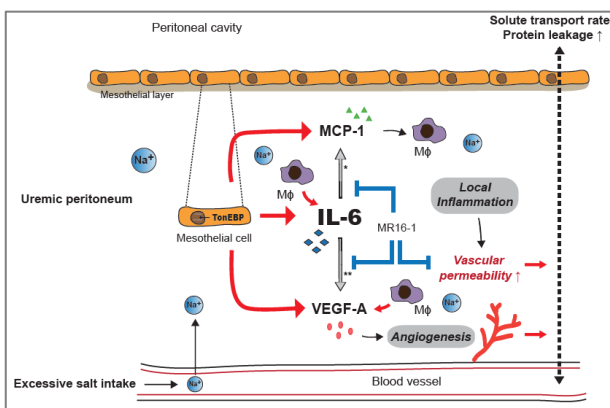
食塩が循環系・体液量への影響のみならず、Na が軟部組織等に沈着し TonEBP を活性化し、MCP-1 発現からマクロファージの浸潤・炎症を惹起、血管新生、そして血管透過性の亢進に繋がるということを示した。さらに、この現象は IL-6 を介しておりそれを抑制することで、この悪循環を断ち切り改善させるということを見出し Nephrol Dial Transplant. 2019 ;34:2031-2042. に報告した。腎不全に伴う炎症は生命予後、心血管死に関連し、余地因子としても広く知られている。その原因の一つを明らかにし、治療ターゲットを見出すことができた。将来的に本研究で見いだされたことが、腎不全患者、透析患者の予後改善につながると思われる。



図：正常および腎不全マウスにおける食塩負荷の有無による腹膜透過性の差



図：腎不全(Nx)塩負荷にみられる炎症に対する抗IL-6受容体抗体(MR16-1)の効果

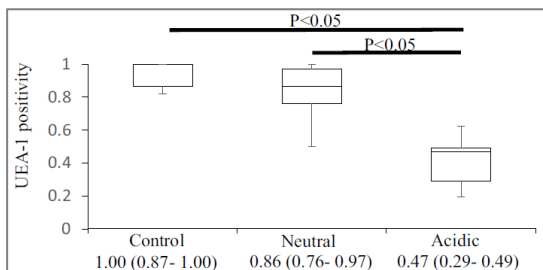


図：腎機能障害下での過剰な食塩摂取が腹膜透過性を亢進させる可能性のあるメカニズム。

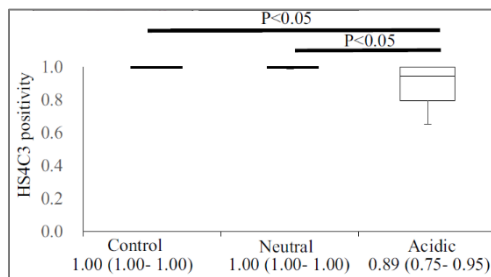
2) 血管内皮細胞 Glycocalyx の減弱・破綻は腹膜透過性に関与する。

酸性群に比べ、中性群では CD31 による腹腔内血管新生が抑制されていた。L/V 比は中性群で有意に高く、血管障害の進行が抑制されていることが示唆された。HS の発現と UEA-1 との結合は、中性群で高かったが、酸性群では HS の発現は UEA-1 との結合よりも有意に保たれていた。L/V 比が低い血管 (酸性群のみ) では、HS の発現と UEA-1 結合が減少しており、糖鎖の消失が示唆された。

低 GDP、pH 中性溶液で治療された患者では、腹膜毛細血管内皮細胞の Glycocalyx がより保存されていた。低 GDP、pH 中性溶液の使用は、腹膜血管の構造と機能の保護に役立つと思われる、より生体適合性が優れていると判断した。酸性液群では Glycocalyx の障害が進むことによって腹膜透過性の亢進が進むことが推察され以下に報告した。Clin Exp Nephrol. 2021; 25: 1035-1046.。



図：ヒト腹膜組織における UEA-1 結合率の比較



図：ヒト腹膜組織におけるヘパラン硫酸の発現

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tawada M, Ito Y, Banshodani M, Yamashita M, Shintaku S, Sun T, Suzuki Y, Kinashi H, Kubo Y, Ando M, Yamaguchi M, Katsuno T, Mizuno M, Kawanishi H.	4. 巻 36
2. 論文標題 Vasculopathy plays an important role during the development and relapse of encapsulating peritoneal sclerosis with conventional peritoneal dialysis solutions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nephrol Dial Transplant	6. 最初と最後の頁 1519-1526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ndt/gfaa073.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sun T, Sakata F, Ishii T, Tawada M, Suzuki Y, Kinashi H, Katsuno T, Takei Y, Maruyama S, Mizuno M, Ito Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 Excessive salt intake increases peritoneal solute transport rate via local tonicity-responsive enhancer binding protein in subtotal nephrectomized mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrol Dial Transplant	6. 最初と最後の頁 2031-2042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ndt/gfz045.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama N, Tawada M, Sun T, Suzuki Y, Kinashi H, Yamaguchi M, Katsuno T, Aten J, Vlahu CA, van Kuppevelt TH, Takei Y, Ishimoto T, Maruyama S, Mizuno M, Ito Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Low-GDP, pH-neutral solutions preserve peritoneal endothelial glycocalyx during long-term peritoneal dialysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol	6. 最初と最後の頁 1035-1046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-021-02078-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yasuhiko Ito
2. 発表標題 Peritoneal pathological differences in conventional and pH-Neutral Low-GDP solution
3. 学会等名 ISPD 2021 International Society for Peritoneal Dialysis（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiko Ito
2. 発表標題 How to Enhance Use of Peritoneal Dialysis Among Elderly Patients
3. 学会等名 Kidney Week 2020 American Society of Nephrology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ting Sun
2. 発表標題 Excessive salt intake increases peritoneal local production of interleukin-6 and baseline peritoneal solute transport rate in subtotal nephrectomized mice
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ting Sun
2. 発表標題 Excessive salt intake increases baseline peritoneal solute transport rate via local TonEBP induction in subtotal nephrectomized mice
3. 学会等名 The 9th Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiko Ito
2. 発表標題 Excessive Salt Intake Increases Peritoneal Local Production of Interleukin-6 and Baseline Peritoneal Solute Transport Rate in Subtotal Nephrectomized Mice
3. 学会等名 Kidney Week 2020 American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiko Ito
2. 発表標題 Investigation of cytoprotection for peritoneal membrane ~For a More Splendid Future of Peritoneal Dialysis~
3. 学会等名 The 9th Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ting Sun
2. 発表標題 High Salt Intake Increases Baseline Peritoneal Transport Rate Through TonEBP activation in Subtotal Nephrectomized Mice
3. 学会等名 米国腎臓学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ting Sun
2. 発表標題 High salt intake under increases baseline peritoneal solute transport rate via local hypertonicity-induced TonEBP activation in nephrectomized mice
3. 学会等名 International Society for Peritoneal Dialysis (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水野 正司  (Mizuno Masashi)  (20303638)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授    (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	勝野 敬之  (Katsuno Takayuki)  (60642337)	愛知医科大学・医学部・准教授    (33920)	
研究分担者	武井 佳史  (Takei Yoshifumi)  (70362233)	愛知学院大学・薬学部・教授    (33902)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	アーテン ヤン  (Aten Jan)		アムステルダム大学

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オランダ	アムステルダム大学		