

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590165

研究課題名（和文） 腹膜透析時における腹膜障害の早期診断・治療法の開発

研究課題名（英文） Development of early diagnosis and therapeutic methods for peritoneal damage during peritoneal dialysis

研究代表者

麓 伸太郎（FUMOTO SHINTARO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70380988

研究成果の概要（和文）：

長期腹膜透析施行時において問題となる腹膜の障害に対して、早期診断法として分子量の異なる二つのマーカー物質を投与する方法を考案し、腹膜障害モデル動物において透析液の除水能と物質交換能を分離評価することに成功した。さらに、治療法として遺伝子治療について検討し、炭酸カルシウムをプラスミド DNA に併用することで、腹腔内臓器全体に対し、簡便、効率的かつ安全に遺伝子導入を行うことに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed an early diagnosis method for peritoneal damage during peritoneal dialysis. Using two marker substances having different molecular weight, we succeeded in evaluating both water-removing and substance-exchanging abilities of dialysis fluids simultaneously. Moreover, we successfully developed a gene transfer method to whole peritoneal organs using plasmid DNA and calcium carbonate particles. This method was simple, effective and safe in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬剤学

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎不全患者は増加の一途をたどっており、それに伴い透析療法、腎移植といった腎代替療法を余儀なくされる患者は毎年増加傾向にある。透析療法の一つである腹

膜透析は、腹腔内に透析液を注入し、一定時間貯留している間に腹膜を介して血液を浄化する方法であり、透析患者全体の約4%に対し行われている。腹膜透析は、血液透析と比較し、時間的拘束が少なく透析中も自由に

活動できること、体調が大きく変動しないため心負荷が少ないこと等の利点を有し、更に残存腎機能の維持にも優れている (Lameire N. H., *Nephron*, 77, 13-28 (1997))。一方、腹膜透析の長期継続により、腹膜の線維化並びに硬化、腹膜中皮細胞の脱落、新生血管の出現、血管壁の線維化等の形態学的変化をもたらすことで、除水能の低下など腹膜機能障害が問題となり、腹膜透析の継続が困難になる (Honda K., et al., *Nephron*, 72, 171-176 (1996); Plum J., et al., *Kidney Int.*, 59, S42-S47 (2001); Rodríguez-Carmona A., et al., *Am. J. Kidney Dis.*, 44, 132-145 (2004))。さらに腹膜の劣化が進行すると、被嚢性腹膜硬化症 (Encapsulating Peritoneal Sclerosis: EPS) という重篤で予後の不良な合併症が引き起こされる (Okada K., et al., *Nephron*, 92, 481-483 (2002); Kawanishi H., et al., *Am. J. Kidney Dis.*, 44, 729-737 (2004))。現在のところ、EPS を完治させる有効な治療法は確立されておらず、EPS を発症する前に、早期に診断を確定し腹膜透析を中止することが腹膜透析療法における重要課題となっている。従来の腹膜障害評価法では、患者の腹膜を生検で採取し直接観察しており、患者への負担が大きい。従って、より簡便な方法の開発は急務であるが、未だそのような方法は報告されていないのが現状である。

腹膜透析の長期施行によって腹膜機能障害を引き起こす因子の一つとして、透析液中に存在するグルコースおよび糖分解産物 (Glucose Degradation Products: GDPs) がある。グルコースは透析液の浸透圧物質であり、GDPs は自然分解あるいは透析液の加熱滅菌により、グルコースから生成される。高濃度のグルコースおよび GDPs は共に、腹膜中皮細胞に対し障害作用を持っていることが知られており (Gotloib L., et al., *Nephron*, 82, 164-173 (1999); Witowski J., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11, 729-739 (2000))、また、GDPs は、腹膜透析施行患者における腹膜肥厚、間質の繊維化および血管硬化との関連性が指摘されている糖化最終産物の形成を引き起こす (Honda K., et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 14, 1541-1549 (1999))。GDPs の一つである methylglyoxal (MGO) は透析液中に存在することが確認されており、MGO を用いて作製した腹膜障害モデル (Nakayama M., et al., *Am. J. Nephrol.*, 23, 390-394 (2003)) は、実際に臨床で確認される腹膜障害に近い病態ではないかと考えられる。一方、腹膜障害時においては、腹膜の透過性が亢進し、透析液中のグルコースの吸収が促進されていることが報告されている (Wang T., et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 13, 1242-1249 (1998))。そこで MGO 処理により作製した腹膜障害モデルラットに、マーカー物質として phenolsulfonylphthalein (PSP) を腹腔内投与し、その透過性

を測定することで、腹膜障害との相関を評価するという着想に至った。我々は既にこの方法によって、MGO 処理ラットにおいて透過性が亢進していることを簡便に評価可能であることを報告しているが (Fumoto S., et al., *Pharm. Res.*, 24, 1891-1896 (2007))、腹膜障害との相関や透過性亢進に対する分子量の影響など不明な点も残されており、腹膜障害の診断法を確立するためには更に研究を進める必要がある。

一方、MGO が血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の生成を促進し (Inagi R., et al., *FEBS Lett.*, 463, 260-264 (1999))、細胞間の密着結合に障害を与えること (Leung J. C. K., et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 20, 1336-1349 (2005)) が報告されており、また、血液及び透析液中の VEGF 濃度は溶質輸送が亢進している患者において高値を示すことが明らかとなっている (Pecoits-Filho R., et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, 17, 1480-1486 (2002); Szeto C. C., et al., *Perit. Dial. Int.*, 22, 265-267 (2002))。このことから、VEGF の生成、もしくは作用を抑えることが、治療戦略として考えられる。

我々は腹腔内各臓器へ plasmid DNA を表面投与することにより、効率的な遺伝子導入が可能であることを明らかにしている。これを腹膜全体に応用し、腹膜透析時における腹膜障害の治療法としての確立を試みる。VEGF の生成を抑える方法として、VEGF の siRNA、また、VEGF の作用を抑える方法として血管新生抑制作用をもつ HGF アンタゴニスト NK4 の plasmid DNA が候補である。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、腹膜透析時における腹膜障害の治療法を確立することである。そのためには、腹膜障害の早期診断法も確立する必要がある。これまでに、PSP によって腹膜の透過性の亢進が評価可能であることが明らかになっている。しかしながら、PSP は低分子であり、腹膜障害を受けていないラットでもある程度吸収を受けてしまうこと、実際の透析液では透析中に容量が変わり PSP の濃度が変わることにより診断が難しいという問題がある。より高分子の診断薬であれば、腹膜障害時のみに腹腔内から吸収される可能性がある。また、腹膜障害時においても吸収されない分子量が明らかとなれば、容量のマーカーとして利用できる。そこで、MGO 処理ラットにおける透過性亢進の分子量依存性を明らかにする。また、腹膜の肥厚など腹膜障害時におこる事象の程度と透過性亢進の程度との相関が不明なのでそれを明らかにする。

一方、治療法として遺伝子導入法を考えて

おり、我々の見出した plasmid DNA を用いる遺伝子導入法が、腹膜障害に対しても有効かどうかを検討する。

3. 研究の方法

腹膜障害の早期診断法を開発する。初めに MGO により腹膜障害モデルラットを作製し、腹膜の組織切片を観察することにより、腹膜障害が起こっていることを確認する。作製した腹膜障害モデルラットに対し PSP または各種分子量の蛍光標識 dextran を腹腔内投与し、その吸収を速度論的に解析することで、透過性亢進に与える分子量の影響に関する知見を得る。また、より臨床に近いと考えられる実際の透析液を用いた場合においても同様に研究を行う。

腹膜障害の治療法として報告されている薬物に関し、開発した早期診断法が有効かどうかを評価する。

また、治療法として遺伝子治療を応用する。plasmid DNA の腹膜への導入に関して、定量的、定性的に評価する。

(1) 腹膜障害モデルの作製

実験動物として Wistar 系雄性ラットを用い、ether 麻酔下、saline に溶解した 20 mM MGO を、1 日 20 mL ずつ 5 日間あるいはそれ以上の期間連日腹腔内投与する。また control として saline のみを同様に投与する。

(2) 組織切片の観察

MGO 処理により作製した腹膜障害モデルラットの腹壁より 10 × 10 mm の腹膜標本を採取後、ホルマリンにより固定し、そのサンプルをパラフィンで包埋し、5 μm の厚さの切片とする。得られた切片を hematoxylin-eosin で染色し、顕微鏡で観察する。

(3) 診断薬の体内動態に関する検討

PSP、BSP、各種分子量の FITC-dextran を phosphate buffer (pH 7.4) に溶解し、MGO 処理ラット及び健常ラットに腹腔内投与する。腹腔内投与では腹壁を露出し、注射針の付いたシリンジを用いて、薬液を剣状突起から 3 cm 下の部位に投与する。その後、シリンジを抜き取り、注射部位からの薬液の漏れを防ぐため、投与部位を外科用アロンアルファで接着する。腹腔内投与後、腹腔内に残存する薬液をシリンジにより回収し、さらに腹腔内を saline で洗浄し全量回収することで腹腔内残存量を定量する。

(4) 二つのマーカー物質の併用

分子量の異なる FITC-dextran および RITC-dextran をラットに腹腔内投与後、腹腔内残存液を回収し、そのままそれぞれの dextran の濃度を定量することで、水分の移動と腹膜透過性の亢進を同時に評価する。

(5) MGO 処理期間の影響

MGO の処理期間を変えることで、腹膜障

害の程度を変え、透過性亢進との相関の有無を調べる。これにより、どの程度早期に腹膜障害が診断可能であるか判断する。

(6) 透析液における検討

実際の臨床では、用途に応じて、異なるグルコース濃度の透析液が用いられている。浸透圧によってマーカー物質の透過性が変わることも考えられるので、各種透析液を用いて同様に検討を行う。また、水分量の変動をモニタリングするために、高分子マーカー物質の使用も考慮する。

(7) 遺伝子導入の定量的、定性的解析

遺伝子導入効率の定量的解析ではホタルルシフェラーゼをコードした plasmid DNA を腹腔内に投与し、各組織中のルシフェラーゼ活性を測定する。遺伝子導入効率の定性的解析では、蛍光タンパク質をコードした plasmid DNA を用い、実体蛍光顕微鏡で観察することで遺伝子発現細胞の分布や細胞数を評価する。

4. 研究成果

腹膜透析時における腹膜障害の早期診断法として、PSP (分子量 354) の腹膜透過性亢進を指標とすることは、以下の点で問題がある。1. 水分の移動を考慮できないため、腹腔内残存量を定量するためには残存液を全量回収する必要がある、2. 腹膜障害の起こっていない健常ラットにおいても PSP はよく吸収されるため、診断のカットオフ値を設定しにくい。そこで、より分子量の高いマーカー物質の探索を行った。

分子量 838 の BSP、分子量 1 万から 200 万までの FITC-dextran を用いて、腹腔内残存量を定量することで、腹膜障害モデルラットと健常ラットにおける腹膜透過性の差は、分子量 1 万の時最大となり、腹膜透過性を評価するにあたり、最適分子量が 1 万であることが示唆された。一方、分子量 200 万の FITC-dextran を用いることで、水分の移動が評価できることが示唆された。そこで次に 2 種類の蛍光標識 dextran を利用し、分子量 200 万の FITC-dextran (FD-2000) により水分の移動を補正することで、腹膜透過性の亢進を分子量 1 万の RITC-dextran (RD-10) の濃度から評価可能かどうか検討したところ、両者の濃度比 RD-10/FD-2000 が、健常ラットでは 1 に近く、腹膜障害モデルラットでは 0.6 程度と顕著に腹膜透過性の亢進が起こっていることが、腹腔内残存量を定量することなく、濃度から評価することができた。さらに、実際に用いられる腹膜透析液でも、同様に評価可能であった。

次に、腹膜透析に伴う腹膜障害を予防可能であると報告されているサリドマイド (Mondello, S., et al., Shock, 32, 332-339

(2009)) を用いて、サリドマイドによる予防効果を、本研究で開発した早期診断法が評価可能であるかを検討した。結果、サリドマイド処理群においても、腹膜透過性の亢進は防げていなかった。一方、除水能は回復していることが評価でき、サリドマイド処理群においては、腹膜肥厚や除水能は改善されるが、依然として腹膜透過性は亢進していることが評価可能であることが示唆された。今後、腹膜透過性の亢進まで治療可能な方法の確立が望まれる。

そこで腹膜透過性の亢進まで治療可能な方法として、遺伝子治療の可能性を考え、腹膜に対する遺伝子導入法の導入効率改善に取り組んだ。これまでに、臓器表面の中皮細胞に対し plasmid DNA 単体により遺伝子導入可能であることを報告してきたが、さらなる遺伝子導入効率の改善を目指し、まず遺伝子導入機構の解明を試みた。胃漿膜表面の中皮細胞における plasmid DNA の細胞取り込み機構として、Rac が関与するマクロピノサイトーシスが重要であることを明らかにした (Mol. Pharmaceutics, 6, 1170-1179 (2009))。そこで、マクロピノサイトーシスの促進剤を併用することで、遺伝子導入効率を改善できるのではないかと考え、種々の促進剤を検討したところ、plasmid DNA 投与の24時間前に表皮成長因子により処理することで、遺伝子導入効率ならびに遺伝子発現陽性細胞数を改善することに成功した。一方で、plasmid DNA の腹腔内投与では遺伝子導入効率は低い。このメカニズムとして、腹壁を切開する開腹操作に遺伝子導入効率を改善する効果があることが明らかとなり、腹膜障害の治療法として遺伝子治療を行う際に開腹することは非現実的であり、問題点が明らかとなった。

同時に、臓器表面に適用可能な遺伝子製剤の開発にも取り組み、臓器表面に塗布する軟膏剤に関して検討した。カルボキシメチルセルロースナトリウムを用いた plasmid DNA 含有軟膏を胃漿膜表面に塗布することで、胃選択的に遺伝子導入効率を顕著に改善した。メカニズムとして、臓器表面を擦る操作自体に遺伝子導入効率改善効果があることを見出した。そこで、摩擦の効果を再現可能な製剤として、炭酸カルシウムを併用することを考案した。実際に、炭酸カルシウムを plasmid DNA 溶液に懸濁させ腹腔内投与したところ、plasmid DNA 単体を腹腔内投与した場合に比べ、腹腔内臓器全体において数百倍高い遺伝子導入効率を示した。さらに、LDH 活性を指標としたときに安全性に問題がないことも示された。今後、腹膜透析に伴う腹膜障害の治療法確立を目的に、種々の遺伝子をコードした plasmid DNA、あるいは種々の遺伝子に対する siRNA によるノックダウンを検討したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- (1) Fumoto S, Nishi J, Ishii H, Wang X, Miyamoto H, Yoshikawa N, Nakashima M, Nakamura J, Nishida K.
Rac-mediated macropinocytosis is a critical route for naked plasmid DNA transfer in mice. *Molecular Pharmaceutics*, 6, 1170-1179 (2009) 査読有り.
- (2) Fumoto S, Tsuchimochi M, Nishi J, Ishii H, Kodama Y, Nakashima M, Sasaki H, Nakamura J, Nishida K.
Liver- and lobe-specific gene transfer following the continuous microinstillation of Plasmid DNA onto the liver surface in mice: effect of instillation speed. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32, 1298-1302 (2009) 査読有り.
- (3) Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida K, Yamamoto K, Nakagawa H, Kodama Y, Higuchi N, Nakamura T, Sasaki H.
Chondroitin sulfate capsule system for efficient and secure gene delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13, 351-361 (2010) 査読有り.
- (4) Fumoto S, Furukawa H, Nakamura J, Nishida K.
Safety of liver surface instillation of plasmid DNA in normal and carbon tetrachloride-induced hepatitis mice. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 14, 274-282 (2011) 査読有り.
- (5) Mine T, Ishii H, Nakajima S, Yoshikawa N, Miyamoto H, Nakashima M, Nakamura J, Fumoto S, Nishida K.
Rubbing gastric serosal surface enhances naked plasmid DNA transfer in rats and mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34, 1514-1517 (2011) 査読有り.
- (6) Yoshikawa N, Sakamoto K, Mizuno S, Sakaguchi J, Miyamoto H, Mine T, Sasaki H, Fumoto S, Nishida K.
Multiple components in serum contribute to hepatic transgene expression by lipoplex in mice. *Journal of Gene Medicine*, 13, 632-643 (2011) 査読有り.
- (7) Kurosaki T, Kitahara T, Nakamura T, Nishida K, Fumoto S, Kodama Y, Nakagawa H, Higuchi N, Sasaki H.
Development of effective cancer vaccine using targeting system of antigen protein to APCs. *Pharmaceutical Research*, 29, 483-489 (2012) 査読有り.

〔学会発表〕(計11件)

- (1) 麓 伸太郎, 馬場 澄絵, 中島 さゆり, 坂元 景子, 西 順也, 中村 純三, 西田 孝洋:
内因性マクロピノサイトーシス促進成分を用いたプラスミド DNA の遺伝子導入効率改善
第25回日本 DDS 学会、2009年7月、東京
- (2) 古川智也, 西 順也, 麓 伸太郎, 西田孝洋:
プラスミド DNA による胃漿膜表面への遺伝子導入における細胞内シグナル伝達系の関与
遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム、2009年7月、大阪
- (3) 王 旋, 麓 伸太郎, 西田孝洋:
Efficiency and site selectivity evaluation of in vivo naked plasmid DNA transfer to the liver in mice: a comparison with gene carriers
遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム、2009年7月、大阪
- (4) 麓伸太郎, 西 順也, 馬場澄絵, 中島さゆり, 王 旋, 西田孝洋:
マウス胃中皮細胞への pDNA による遺伝子導入のメカニズムを基盤とした改善
第3回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2009年11月、福岡
- (5) 吉川 直樹, 水野 幸代, 佐々木 均, 麓 伸太郎, 西田 孝洋:
リポプレックスの動的構造変化を引き起こす血清成分の分析
第26回日本 DDS 学会、2010年6月、大阪
- (6) Shintaro Fumoto, Naoki Yoshikawa, Sachiyo Mizuno, Junzo Nakamura, Koyo Nishida:
Interaction with Serum Modulates Structure of Lipoplex and In Vivo Transfection Efficiency in Mice
PSWC2010, 2010年11月、ニューオリンズ(アメリカ)
- (7) 麓 伸太郎, 吉川 直樹, 坂元 景子, 佐々木 均, 西田 孝洋:
リポプレックスによるマウス肝臓への遺伝子導入に寄与する血清成分の同定
日本薬学会第131年会、2011年3月、静岡
- (8) 吉川 直樹, 坂元 景子, 佐々木 均, 麓 伸太郎, 西田 孝洋:
マウスの肺及び肝臓への効率的な in vivo リポフェクションに寄与する複数の血清成分
日本薬剤学会第26年会、2011年5月、東京
- (9) 吉川 直樹, 坂元 景子, 佐々木 均, 麓 伸太郎, 西田 孝洋:
血清成分との相互作用によるリポプレックスの構造および遺伝子発現の変化
第27回日本 DDS 学会学術集会、2011年6月、東京
- (10) 麓 伸太郎, 西田 孝洋: 腹膜を標的とした新規遺伝子導入剤の開発
第5回薬学研究フォーラム in 東京、2011年11月、東京

- (11) 麓 伸太郎, 中島さゆり, 嶺 豊春, 佐々木 均, 宮元敬天, 西田孝洋:
炭酸カルシウムマイクロフラワーによるマウス腹腔内への効率的な遺伝子導入
日本薬学会第132年会、2012年3月、札幌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 研磨剤を含有する核酸導入剤

発明者: 麓 伸太郎, 西田 孝洋

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願第2011-194260号

出願年月日: 2011年9月6日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麓 伸太郎 (FUMOTO SHINTARO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

准教授

研究者番号: 70380988

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

嶺 豊春 (MINE TOYOHARU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

大学院生

中島 さゆり (NAKAJIMA SAYURI)

長崎大学・薬学部・学部学生

平田 春奈 (HIRATA HARUNA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

大学院生