

## 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 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591055

研究課題名（和文）

抗酸化ストレス及びアポトーシス抑制効果を有する希少糖を用いた新規腹膜透析液の開発

研究課題名（英文）

The development for new peritoneal dialysate to reduce oxidative stress and apoptosis using rare sugar.

研究代表者

清元 秀泰（KIYOMOTO HIDEYASU）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：00304585

研究成果の概要（和文）：

本邦における末期腎不全に対する腹膜透析療法の更なる普及と長期安全性の確立のために、酸化ストレス軽減作用や抗アポトーシス効果を有する新規希少糖含有腹膜透析液を開発し、腹膜硬化モデルにおける希少糖含有腹膜透析液の有効性を検討した。初代培養の腹膜中皮を用いて、83mMのD-グルコース、83mMの10%（8.3mM）を希少糖に置換した希少糖配合溶液（74.7mM D-グルコース+8.3mM希少糖）、5.6mM D-グルコース溶液の各3群間で、酸化ストレスの発生とNADPHオキシダーゼp22phoxの遺伝子発現等を検討した。D-プシコースに濃度依存性（2～10%）の有意な酸化ストレス抑制効果を認め、最大抑制反応は10%含有溶液であったことより、クロロヘキシジンモデルで有効性の検討を行ったが、有意な結果が得られていない。以上より、新たな動物実験モデルの作成による希少糖含有腹膜透析液の有効性に関する検証に鋭意取り組んでいる。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the protective fluid in peritoneal dialysis (PD), we investigated the effects of psicose, one of rare sugars, on peritoneal mesothelial cells (PMCs) injury induced by D-glucose. ROS production was significantly increased in PMCs treated with 83mM D-glucose containing medium. Both D- and L-psicose prevented the D-glucose induced ROS production via suppression of p22 phox, a NADPH oxidase membrane component. These results suggested that decrease of ROS production was possible mechanisms that psicose suppressed peritoneal deterioration. Then, we are focus the medical relevance in vivo animal models. We conclude that psicose containing dialysate may be beneficial effect on PMCs survival in PD therapy; however it will be necessary to proof the concept in vivo animals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腹膜中皮細胞、希少糖、D-プシコース、酸化ストレス、慢性腎不全、腹膜透析、NADPH オキシターゼ、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の末期腎不全による維持透析患者数は年々増加し、その傾向には歯止めがかからず、現在本邦での維持透析患者数は30万人を超えていると推定されている。この右肩上がりの増加は2040年まで漸増し、50万人を突破するであろうと推測されている。この末期腎不全患者数の増加は、本邦や欧米諸国のみならず急速な産業構造や食生活環境の変化する発展途上国にも認められる特徴であり、世紀と世界をまたぐ加速度的な糖尿病の増加によって、本邦でも糖尿病性腎症による腎不全患者が全体の約50%を占めるようになってきた。また、近年では急激な高齢化社会の到来より、基礎疾患として糖尿病や高血圧疾患を有する透析患者が増大し、その血管系合併症に対しての多くの医療資本の注入にも関わらず、大きな予後改善も認めていない。特に、糖尿病による腎不全では、透析療法導入後も耐糖能異常が持続するため、動脈硬化に基づく循環器合併症が著しく、生命予後は極めて不良であり、5年生存率も約40%程度と低い。

慢性腎臓病が進行し末期腎不全になれば腎不全の原因がいずれであっても腎代替療法として、腹膜透析、血液透析、腎移植を適切に行わなければ生命を維持することは不可能である。腹膜透析療法は在宅で出来る透析医療としてすでに30年以上の歴史があり、欧米では多くの腎不全患者の社会復帰に役立てられている。単に医療コストが安いだけでなく、医学的見地からも急激な除水からショックや血圧低下をきたしやすい病院での短時間血液透析療法とは異なり、体液管理の

変動少なく、循環動態に大きな影響を与えることが少ない。それゆえ、高齢者や自律神経障害を伴う糖尿病合併腎不全に対しては推奨されるケースもある。

実際、我々も臨床現場において血液透析と腹膜透析療法を患者血清中の酸化ストレスから比較すると、短時間での血液透析療法では腹膜透析に比して血液中の酸化ストレスが有意に増加していることを報告した(Dialysis&Transplantation33(4);p197-202, 2004)。

しかし、腹膜透析による除水には原理的に浸透圧勾配を用いているために、腹膜透析液には非生理的濃度のD-グルコース(1.5~4.25%; W/V)が浸透圧物質として含まれている。前述のように糖尿病合併腎不全患者では更なる耐糖能障害が惹起され、その管理が困難になる場合も多く、腹膜透析を長期に行うと腹膜機能低下が避けられず除水不良が進行すると、更に高糖濃度透析液が必要となるという悪循環に陥りやすい。また、腹膜透析を5年以上継続すると致死率の高い被嚢性腹膜硬化症の発生も懸念される。現時点ではこれらの合併症に対する有効な対処法が確立していないため、ガイドラインにおいて腹膜透析療法は最長でも8年で中止し、血液透析や腎移植療法など医療コストの大きな治療法に切り替えることが勧告されている。そのため、本邦では透析療法の96%は血液透析であり、欧米に比して医療経済全体における透析療法の占める割合が増加し、大きな社会問題になっている。

このような社会的背景から、腹膜劣化の進行を抑制し長期腹膜透析が可能な新しい透

析液の開発が望まれている。近年、生体内で代謝されにくいポリグルコースであるイコデキストリン製剤を含む透析液が欧州で実用化され、除水不良を伴う腹膜機能劣化症例に汎用されている。しかし、このイコデキストリン製剤はその代謝物であるマルトースや同定されていない中間代謝物が体内蓄積するため、臨床的問題点として、1) 簡易血糖装置では正確な血糖値が測れず低血糖発作を診断できない、2) 血清アミラーゼ測定を阻害するため膵炎診断が不能になる、3) マルターゼ欠損糖原病性腎不全患者には禁忌である、など多くの問題点も指摘されており、現状ではその安全性の観点から1日1回までの使用しか認められていない。前述の腹膜透析療法の諸問題を解決するために、我々は腹膜透析時における中皮細胞障害に関する基礎研究を行ってきた。仮説として中皮細胞障害の原因は非生理的濃度の高糖暴露が原因ではないかと考え、糖毒性やレプチンの関与 (Nephrology 9(5); p256-61, 2004) を検討してきた。それらの研究では糖負荷によって腹膜中皮細胞に酸化ストレスが誘導され、形質転換やアポトーシスを引き起こすことが解ってきた。それゆえに、D-グルコースやイコデキストリンよりも腹膜中皮細胞障害のない安全な浸透圧性物質の開発は重要な懸案となった。

腹膜透析液に含まれる D-グルコース ( $C_6H_{12}O_6$ ) は分子量約 180 の単糖類に分類される炭水化物である。同じ分子量でありながらその類似体 (光学異性体) は 34 種類が知られており、哺乳類などが利用できる単糖は D-グルコース、D-マンノース、D-フルクトース、D-ガラクトースの 4 種類のみで、それ以外の 30 種類はすべて希少糖としてエネルギー利用に寄与しない。以前より、希少糖の存在は知られていたが工業的な合成は困難

であった。しかし、香川大学農学部の何森名誉教授らの長年の研究 (Izumoring の発見) により、近年、すべての希少糖が大量合成可能となり、香川大学内に希少糖研究センターが設立され、希少糖の基礎研究、臨床応用促進のために、学内外の研究者に提供できる体制ができた。これまでの研究成果として、D-プシコースの抗糖尿病効果 (Life Sci. 81; 592-9, 2007)、D-アロースの高血圧血管障害時の酸化ストレス産生抑制効果 (J Hypertension 23; 1887-94, 2005) など希少糖の有用性が報告されている。

そこで、今回の研究においては希少糖の腹膜透析液への臨床応用を前提に、希少糖含有腹膜透析液の腹膜中皮細胞保護効果の詳細なメカニズムの検討と臨床応用を目指した腹膜硬化動物モデルに対する有効性の検証を行うことを主眼とする。

## 2. 研究の目的

本邦における末期腎不全に対する腹膜透析療法の更なる普及と長期安全性の確立のために、酸化ストレス軽減作用や抗アポトーシス効果を有する新規希少糖含有腹膜透析液を開発し、腹膜中皮細胞障害の軽減効果を確認し臨床応用を目指す。そのために、ラット腹膜硬化モデルにおける動物実験を行い、この希少糖含有腹膜透析液の安全性と有効性を多角的に検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 腹膜中皮細胞の初期培養の確立

ペントバルビタール麻酔下の腹腔にコラゲナーゼを注入しラット腹膜中皮細胞を分離し、初代培養の後、HBME-1 (抗腹膜中皮細胞表面抗原) を発現する細胞群を選択した。

### (2) *in vitro* における希少糖による抗酸化ストレス効果の検証

無血清培地にて静止状態にしたサブコンフルエントの腹膜中皮細胞に 83mM の D-グルコース、83mM の 10% (8.3mM) を希少糖に置換した希少糖配合溶液 (74.7mM D-グルコース+8.3mM 希少糖)、5.6mM D-グルコース溶液の各 3 群間で実験を遂行した。評価項目は DHE 染色による酸化ストレス発生量の定量、RT-PCR 法による NADPH オキシダーゼの膜型構成コンポーネント

(p22phox, Nox-1, Nox-4) の遺伝子発現、溶液中のカスパーゼ 3 の活性測定(ELISA 法)、細胞の TUNEL 染色によるアポトーシス誘導について検討した。

(3)ラット腹膜硬化モデル動物への希少糖含有透析液の効果の検討

ペントバルビタール麻酔下に腹腔内に腹膜炎惹起物質 (0.1% chlorhexidine gluconate/15%ethanol)を連日 14 日間投与した肥厚性腹膜硬化症モデルを作成し、希少糖含有腹膜透析液の抗酸化ストレス作用について、通常濃度の D-グルコース含有透析液で比較検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1)培養腹膜中皮細胞における希少糖溶液の酸化ストレスに対する抑制効果の検討

各種希少糖のさまざまな濃度 (1~20%) で酸化ストレスを指標に有効性を検討したところ、2~10%D-ブシコースに濃度依存性の有意な酸化ストレス抑制効果を認め、最大抑制反応は10%含有の溶液であった。

(2)ラット腹膜硬化モデル動物への希少糖含有透析液の線維化抑制作用の検討

上述のような *in vitro* スクリーニングで最適化した希少糖配合腹膜透析液 (74.7mM D-グルコース+8.3mMD-ブシコース)をラット腹膜硬化モデル (*in vivo*) で検証した。結果として、このモデルでの腹膜線維化に対する

抑制効果を認めることはできなかった。検証モデルを変更した希少糖透析液の更なる有効性の検討が必要であるが、先の大震災によって施設の一部が復旧できずに研究行程が遅延し、現状では本溶液の有効な抑制効果を未だ確認できていない。今後、メチルグリオキサールなどを腹腔に慢性投与するモデルで新たな検証を計画している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Sofue T, Kiyomoto H, Kobori H, Urushihara M, Nishijima Y, Kaifu K, Hara T, Matsumoto S, Ichimura A, Ohsaki H, Hitomi H, Kawachi H, Hayden MR, Whaley-Connell A, Sowers JR, Ito S, Kohno M, Nishiyama A. Early treatment with olmesartan prevents juxtamedullary glomerular podocyte injury and the onset of microalbuminuria in type 2 diabetic rats. *Am J Hypertens.* 25(5):604-11, 2012. 査読あり
2. Miyata T, Kikuchi K, Kiyomoto H, van Ypersele de Strihou C. New era for drug discovery and development in renal disease. *Nature Review Nephrology* 7:469-477 2011 査読あり
3. Hitomi H, Kaifu K, Fujita Y, Sofue T, Nakano D, Moriwaki K, Hara T, Kiyomoto H, Kohno M, Kobori H, Nishiyama A. Angiotensin II shifts insulin signaling into vascular remodeling from glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens.* 24(10):1149-55, 2011. 査読あり
4. Kiyomoto H, Moriwaki K. Chronic block-ade of the (pro)renin receptor ameliorates the kidney damages in non-clipped kidney of Goldblatt hypertension. *Hypertens Res.*34:289-291,2011. 査読あり
5. 清元秀泰, 森脇久美子. 急性腎障害 (AKI) の診療. 保存的治療 (薬物療法などを含む). *Modern Physician* 31:p95-99 2010. 査読なし
6. Ihara G, Kiyomoto H, Kobori H, Nagai Y, Ohashi N, Hitomi H, Nakano D, Pelisch N, Hara T, Mori T, Ito S, Kohno M, Nishiyama A. Regression of superficial glomerular podocyte

injury in type 2 diabetic rats with overt albuminuria: effect of angiotensin II blockade. J Hypertens 28:2289-98 2010. 査読あり

7. Kaifu K, Kiyomoto H, Hitomi H, Matsubara K, Hara T, Moriwaki K, Ihara G, Fujita Y, Sugasawa S, Nagata D, Nishiyama A, Kohno M. Insulin attenuates apoptosis induced by high glucose via the PI<sub>3</sub>-kinase/Akt pathway in rat peritoneal mesothelial cells. Nephrol Dial Transplant 24(3):809-815, 2010. 査読あり
8. Liu G, Miyata K, Hitomi H, Yao L, Sun GP, Suzaki Y, Hosomi N, Kiyomoto H, Nakano D, Tamaki T, Yoshizumi M, Nishiyama A. Involvement of mineralocorticoid receptor in high glucose-induced big mitogen-activated protein kinase 1 activation and mesangial cell proliferation. J Hypertens. 28(3):536-42, 2010. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. Kiyomoto H, et.al. The remedial effect of strict diet treatment and exercise therapy using information technology (IT) on metabolic syndrome. 43<sup>rd</sup> Annual meeting of American Society of Nephrology, Renal Week. 2010,10.23 Denver, CO, USA
2. Kiyomoto H, 他. Psicose containing solution suppresses glucose-induced reactive oxygen species (ROS) dependent epithelial to mesenchymal transition (EMT) in cultured rat peritoneal mesothelial cells. American Society of Nephrology (アメリカ腎臓学会). 2009年11月3日. サンディエゴ国際コンベンションセンター (アメリカ)
3. Kiyomoto H, 他. The inhibitory effect of rare sugars on epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by high concentration of D-glucose in cultured rat peritoneal mesothelial cells. World Congress of Nephrology (国際腎臓会議). 2009年6月2日. ミラノ国際コンベンションセンター (イタリア)

[図書] (計 1 件)

1. Kiyomoto H, Kobori H, Nishiyama A. Renin angiotensin system in the kidney and oxidative stress -Local Renin Angiotensin Aldosterone System (RAAS) and NAD(P)H

oxidase-dependent oxidative stress in the kidney-. Oxidative Stress in Basic Research and Clinical Practice: Renal Disorders (Miyata T, Eckardt KU, Nangaku M ed., Series Ed.: Armstrong D), Springer, Humana Press, Swiss. 71-91,2010.

[産業財産権]

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清元 秀泰 (KIYOMOTO HIDEYASU)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号 : 00304585

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし