

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08267

研究課題名(和文) 腹膜透析におけるガス状伝達物質を用いた新たな腹膜劣化予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of prevention and treatment methods for peritoneal deterioration using gaseous transmitters in peritoneal dialysis

研究代表者

神谷 圭介 (Kamiya, Keisuke)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：50763900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜透析(Peritoneal Dialysis: PD)は、腎不全患者への腎代替療法の一つである。長期間のPD治療では、腹膜の劣化に伴い、生命予後に大きく関わりとされる腹膜透過性の亢進が起きることから、長期間のPD治療が課題となっている。内因性に産生されるガス状伝達物質は、分裂促進因子活性化プロテインキナーゼなどを介して、抗細胞増殖作用、抗炎症性作用を発現するガス分子として知られている。本研究は、ガス状伝達物質を投与することで腹膜の線維化、血管新生、リンパ管新生、炎症を抑え、PDによる腹膜劣化の予防・治療法を新たに確立することを目的とし、腎代替医療への貢献を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎代替療法の一つである腹膜透析(PD)の患者数は、本邦では9,445人おり、増加傾向を辿っている(2018年末時点)。PDの利点は、在宅医療が可能で通院回数も少なく、QOLが保たれ、また連続して透析を行えることから、生体腎の働きに最も近く、残腎機能が長期に保たれる点にある。一方で、PDの欠点として、自らの腹膜を透析膜として利用することから、長期間のPD治療では、腹膜劣化に伴う腹膜透過性の亢進が、PD離脱の原因となり、生命予後に大きく関わりとすることが報告されている。PDを長期間続けるには腹膜透過性の亢進を抑制させることが重要であり、腹膜劣化の予防に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal dialysis (PD) is one of the renal replacement therapies for patients with end-stage renal failure. The decline in ultrafiltration capacity associated with high peritoneal transport seen after long-term peritoneal dialysis (PD) is a major cause of PD discontinuation.

Endogenously produced gaseous transmitters are known to exert anti-proliferative and anti-inflammatory effects via mitogen-activated protein kinases and other pathways.

This study aims to establish a new method for preventing and treating peritoneal deterioration caused by PD by administering gaseous transmitters to suppress peritoneal fibrosis, angiogenesis, lymphangiogenesis, and inflammation, and to contribute to renal replacement medicine.

研究分野：腎臓内科

キーワード：腹膜透析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腎不全患者に対する腎代替療法の一つである腹膜透析(PD)の患者数は、本邦では9,445人おり、増加傾向を辿っている(2018年末時点)。PDの利点は、在宅医療が可能で通院回数も少なく、QOLが保たれ、また連続して透析を行えることから、生体腎の働きに最も近く、残腎機能が長期に保たれる点にある。一方で、PDの欠点として、自らの腹膜を透析膜として利用することから、長期間のPD治療では、腹膜劣化に伴う腹膜透過性の亢進が、PD離脱の原因となり、生命予後に大きく関わることが報告されている。

申請者らは、これまでPDによる腹膜透過性の亢進について、腹膜の線維化と共に発生するTGF- $\beta$ -VEGF-C pathwayを介したリンパ管新生(J Am Soc Nephrol 2013; IF=9.3)、TGF- $\beta$ -VEGF-A pathwayを介した血管新生(Am J Physiol Renal Physiol 2018; IF=3.2)が関わることを解明してきた。また、透析前の腹膜における浸潤マクロファージ、IL-6の発現が腹膜透過性に相関することを報告し(Nephrol Dial Transplant 2011; IF=4.1)、後にLambieらによって腹膜透析中のIL-6の発現が腹膜透過性と相関することも報告されている(J Am Soc Nephrol 2013)。患者への身体的・社会的負担が少ないPDを長期間続けるには、腹膜の線維化、血管新生、リンパ管新生、炎症(IL-6)を抑え、腹膜透過性の亢進を抑制させることが重要であり、腹膜劣化の予防に繋がる。

ガス状伝達物質は、生体内で産生されるガス状分子であり、一酸化炭素(CO)、一酸化窒素(NO)、硫化水素(H<sub>2</sub>S)がある。これらのガスは、人体に有毒なガスとして知られる一方で、様々な生理活性を有しており、細胞内の情報伝達系に作用し、抗細胞増殖作用、抗炎症作用を発現することがわかっている。なかでもCOは、VEGFR-2の活性化を阻害することにより抗血管新生を示し(Ahmad et al. Thromb Haemost. 2015)、敗血症、熱傷モデルマウスにおいて、IL-6の産生、白血球の浸潤を抑制することで、全身性炎症反応を低下させることが知られている。

ウルトラファインバブル(UFB)は、直径が1 $\mu$ m未満のバブルであり、本邦が世界に先んじて開発した技術である。直径1 $\mu$ m以上のバブルと異なり浮力が小さく、ブラウン運動により水中安定性を有しガス供与体を使用せずガスのみで供給できる。また、血球よりも小さいため、末梢血管を介し、身体の隅々まで拡散することが可能である。ガス状伝達物質をガスとして投与を試みると、その毒性から取り扱いが難しい。しかし、ガス状伝達物質をUFBとして投与すると、液相に封入できることから安全に取り扱える。UFBは、気体を送達するためのキャリアとして働き、ガス状伝達物質の細胞保護効果を標的部位へ直接的に与えることが期待される。

### 2. 研究の目的

酸素を封入したUFBは、植物や魚において成長促進する効果があることが報告され、ガス運搬体としての役割が立証されている。一方で、国内外において、UFBを予防・治療のための方法として応用された報告はない。申請者らが、これまで培ってきたガス状伝達物質の効果に関する知識と医療用UFBを開発してきた技術・経験をもとに、ガス状伝達物質UFBを腹膜劣化の予防・治療法として応用することを目的としている。本研究は、2つの点において大きな意義(創造性)があると考えている。

(1) 腹膜傷害の予防・治療法において、ガス状伝達物質を用いた報告はこれまでになく、腹腔という閉じられた空間にガスを投与することは大きな効果が期待される。本研究により、腹膜傷害の予防・治療法の一つを開発するものがある。

(2) ガス状伝達物質の有益性は立証されてきたが、ガスの毒性から取り扱いが難しく、使用が限られていた。UFBによるガス送達技術は、ガス状伝達物質の安全な利用方法と医療応用への新たな展開を開拓するものである。

### 3. 研究の方法

本研究では、医療用消毒液クロルヘキシジングルコン酸塩(CG)を投与することで腹膜傷害を誘発するマウスモデルを用いる。CG(0.3ml)を隔日でマウスに腹腔投与し、15日目に評価を行う(Nephrol Dial Transplant 2019)。

#### (1) CO-UFBの腹膜炎モデルに対する効果の検証

生理食塩水(生食)を溶媒として、CO-UFBを作成する。投与量、投与回数、投与時期は、これまでの論文を参考にCG投与から2時間後に各UFBを1.0ml腹腔投与し、経過を観察する。UFBを含まない生食群を対照群として実験を行う。評価として腹膜平衡試験による除水量を測定する。また腹膜平衡試験による腹膜機能評価を行う。4.25%グルコースPD液(Dianeal PD-4.25) 2.0 mlを腹腔投与し、2時間後に腹腔内のPD液をすべて採取し、除水量を測定する。さらに、採取したPD液および血液(血清)から、グルコース濃度を測定し、D<sub>2</sub>/D<sub>0</sub> Glucoseを算出して腹膜透過性を評価する。形態評価としては、腹膜を機能評価後に採取してHE染色を行い、病理学的観察を

行う。分子生物学的な評価として、腹膜や横隔膜の免疫組織化学染色 (VEGF-A:血管、Lyve-1:リンパ管、CD31:細胞接着因子、CD68:マクロファージ)を用いて、陽性エリアを評価する。

(2) 腹膜障害の誘発後、腹腔内の炎症が惹起されるタイムコースを検証  
クロルヘキシジングルコン酸塩(CG)をマウスに腹腔内投与した。投与前および投与後(1、3、6、12、24時間後)に腹腔内に生理食塩水2mlを注入し、3分後に回収した(各群3匹ずつ)。回収した生理食塩水中の白血球数(腹水WBC)を、血球測定器(Celtac)にて計測した。

(3) COの投与が全身性および腹腔内の炎症の治療に及ぼす影響を調査  
腹膜障害を誘発するため、クロルヘキシジングルコン酸塩(CG)をマウスに腹腔内投与した。CG投与の2時間後に、生理食塩水(Saline: n=4) COを生理食塩水に溶解させたもの(Dissolve: n=4)と、ウルトラファインバブルとして生理食塩水に封入したもの(UFB: n=6)を1ml投与した。コントロール群は、無処置のものを使用した(normal: n=4)。CG投与から24時間後、腹腔内に生理食塩水2mlを注入し、3分後に回収した。回収した生理食塩水中の白血球数(腹水WBC)を、血球測定器(Celtac)にて計測した。加えて採血を行い、炎症の指標の1つである血中ALTを測定した。

(4) COの投与が全身性および腹腔内の炎症の予防に及ぼす影響を調査  
腹膜障害を誘発するため、クロルヘキシジングルコン酸塩(CG)をマウスに腹腔内投与した。CG投与の1時間前に、障害発生の予防として生理食塩水(Saline: n=5) COを生理食塩水に溶解させたもの(Dissolve: n=6)と、ウルトラファインバブルとして生理食塩水に封入したもの(UFB: n=6)を1ml投与した。コントロール群は、無処置のものを使用した(normal: n=5)。CG投与から24時間後、腹腔内に生理食塩水2mlを注入し、3分後に回収した。回収した生理食塩水中の白血球数(腹水WBC)を、血球測定器(Celtac)にて計測した。加えて採血を行い、炎症の指標の1つである血中ALTを測定した。

#### 4. 研究成果

(1) CO・UFBの腹膜炎モデルに対する効果の検証  
これまでのガス状伝達物質の研究において、炎症を抑制させる効果のあった一酸化炭素(CO)・UFBを用い、CG腹膜傷害マウスモデルにて、その効果を検証した。CG+CO・UFB群では、CG群と比較して有意に除水量の改善が見られた。一方で、小分子であるグルコースの透過性は改善しなかった。免疫組織化学染色では、腹膜のCD31と横隔膜のLyve-1で、CO・UFB治療群において陽性エリアが有意に減少していた。<図1>

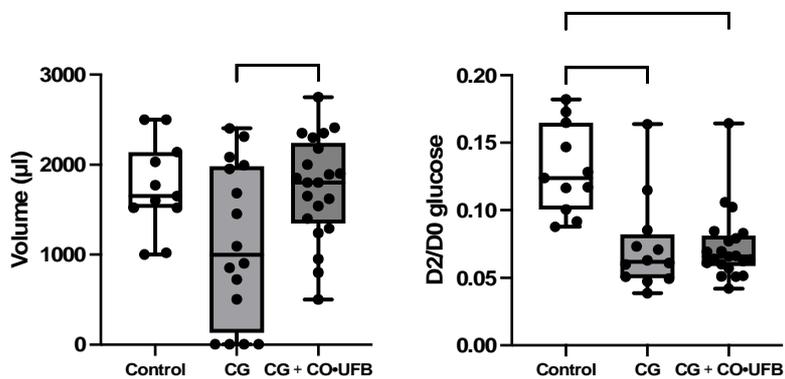
(2) 腹膜障害の誘発後、腹腔内の炎症が惹起されるタイムコースを検証  
炎症の程度を表す腹水WBCは経時的に増加し、CGの投与後24時間で最大値を示した。<図2>

(3) COの投与が全身性および腹腔内の炎症の治療に及ぼす影響を調査  
CGの投与によって腹水WBCおよび血中ALTは増加する傾向が示された。UFB群はそれぞれの項目でCG+Saline群よりも低値を示した(図2)。このことから、治療薬としてCO・UFBを投与することで、全身性および腹腔内の炎症の程度が緩和される可能性が示された。<図3>

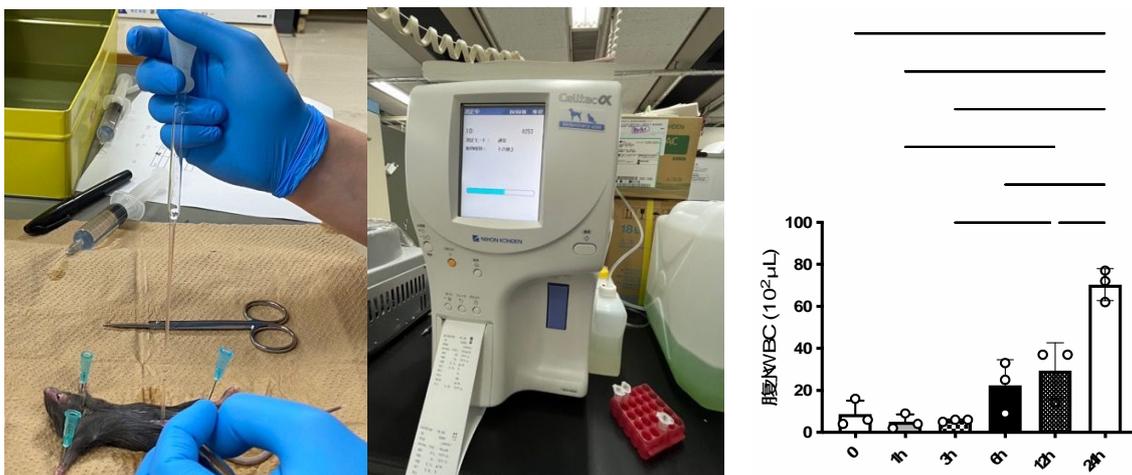
(4) COの投与が全身性および腹腔内の炎症の予防に及ぼす影響を調査  
CGの投与によって腹水WBCおよび血中ALTは増加する傾向が示された。UFBを事前に投与した群は、それぞれの項目でCG+Saline群よりも低値を示した(図3)。このことから、CO・UFBを投与することで、全身性および腹腔内の炎症が予防される可能性が示された。<図4>

#### 【今後の課題と展望】

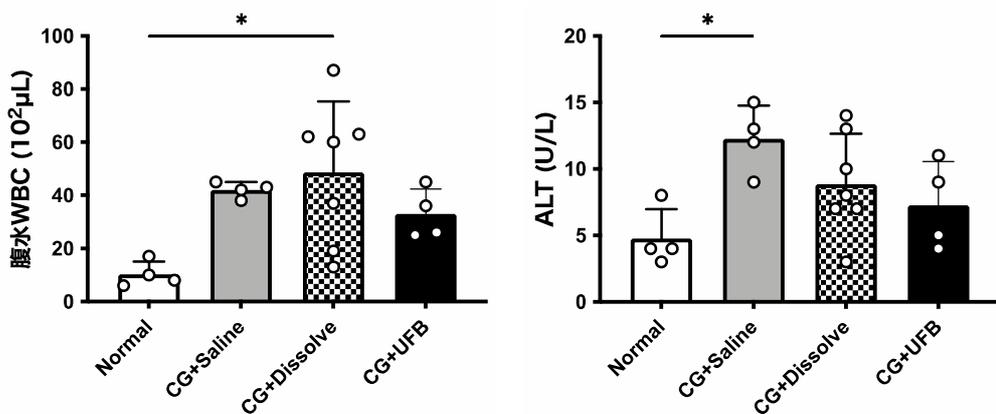
COの予防的および治療的な投与によって、CGにより誘発される腹膜障害の程度が緩和することが示された。今後は腹腔内の白血球の種類の違いをギムザ染色によって検証することや、腹水中のサイトカインの分泌などをPCRなどの遺伝子解析によって明らかにすることを予定している。



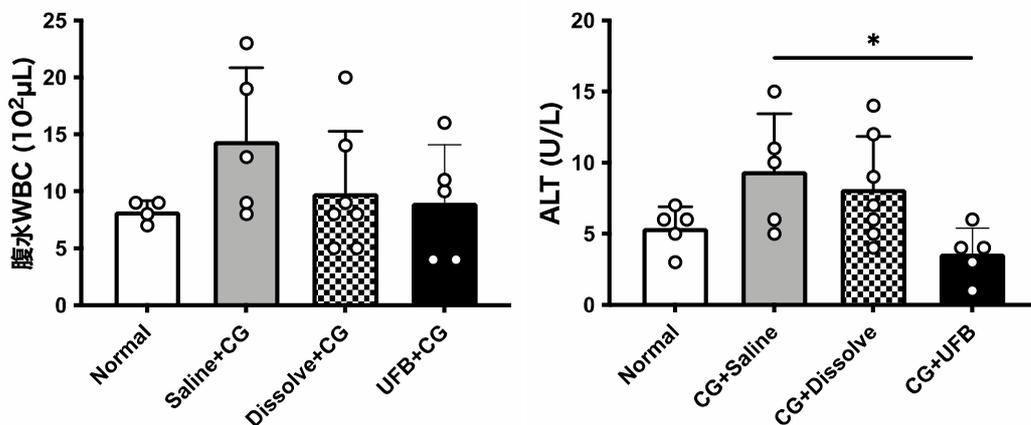
< 図 1 > CO-UFB の腹膜炎モデルに対する効果 (除水量、D2/D0 glucose)



< 図 2 > 腹膜水の取得風景と腹水 WBC の測定結果



< 図 3 > 腹水 WBC と血中 ALT (治療)



< 図 4 > 腹水 WBC と血中 ALT (予防)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	大塚 俊  (Otsuka Shun)  (00879504)	愛知医科大学・医学部・講師   (33920)	
研究分担者	福重 香  (Fukushige Kaori)  (30805023)	愛知医科大学・医学部・講師   (33920)	
研究分担者	伊藤 恭彦  (Yasuhiko Ito)  (60402632)	愛知医科大学・医学部・特命教授   (33920)	
研究分担者	鬼無 洋  (Kinashi Hiroshi)  (70805275)	愛知医科大学・医学部・准教授   (33920)	
研究分担者	畑山 直之  (Hatayama Naoyuki)  (80534792)	愛知医科大学・医学部・准教授   (33920)	

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
---------	---------