

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12103

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591224

研究課題名(和文) 生体適合性を高め長期腹膜透析を可能とする機能性レドックスナノ粒子の開発

研究課題名(英文) Development of functional redox nanoparticle for long-term peritoneal dialysis

研究代表者

平山 暁 (Aki, HIRAYAMA)

筑波技術大学・保健科学部・教授

研究者番号：20323298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜透析は在宅治療が可能であり、生活の質(QOL)の高い血液浄化療法であるが、被嚢性腹膜硬化症(EPS)や腹膜劣化により長期治療が困難となっている。この問題の解決のため、腹膜透析液中に含有可能であり、腹膜における炎症局所で抗酸化作用を発揮するとともに、老廃物を吸着することにより透析効率を高める、シリカ含有レドックスナノ粒子(SiRNP)を開発した。

研究成果の概要(英文)：Encapsulating peritoneal sclerosis (EPS) is a major cause that prevent long-term peritoneal dialysis leading to a loss of quality of life in patients. In this study, we developed bionanoparticle which prevented peritoneal inflammation by its internal antioxidant and enhanced absorption of low molecular-weight uremic toxins by its contained silica. The developed nanoparticle: silica-contained redox nanoparticle (SiRNP), effectively suppressed the peritoneal thickness in EPS model when it was contained to peritoneal dialysate. In addition, SiRNP decreased blood urea nitrogen and serum creatinine levels in renal failure model.

研究分野：腎臓内科学，人工透析学，酸化ストレス医学

キーワード：ナノメディシン 酸化ストレス 腹膜透析 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

末期腎不全患者における透析療法は血液透析(HD)と腹膜透析(PD)がある。PDは在宅治療であり患者の社会生活への影響が少ないためHDに比べて社会復帰へのハードルが低く、かつ心負荷や残腎機能保持において有利であるが、長期にわたる治療により腹膜劣化や予後不良な被嚢性腹膜硬化症(EPS)を併発するという大きな問題のため普及していない。EPSは「びまん性に肥厚した腹膜の癒着によりイレウス症状を呈する症候群」であり、長期PDに合併し透析液による腹膜劣化が主原因である。劣化腹膜はフィブリン皮膜に覆われ腸管蠕動を障害し腸閉塞を呈するため、患者は透析効率が低下するとともに、摂食が障害され著しい低栄養状態に陥る。EPSはいったん発症すると治療に難渋するため予防が重要であり、低糖濃度液や生体適合性の高い透析液の使用、腹腔洗浄、薬剤投与が試みられているが、効果的な対策は少ない。結果として長期PDはほぼ不可能であり、現実には5年程度でHDに移行する例が多い。

EPSへ至る共通経路に腹膜での慢性炎症がある。浸透圧物質として含有される糖(特に糖高濃度透析液)がこの一要因ではあるが、慢性炎症全体のプロセスは急性炎症と比べ多様であり免疫学的機序の多くは不明である。このため炎症における普遍的なプロセスである酸化ストレスの制御による治療戦略が重要となる。一般的な低分子抗酸化剤による治療では腹膜を通して体内に取り込まれるためその毒性や正常のエネルギー代謝が阻害され有効性は低い。EPSに対し抗酸化剤治療を行うためには、透析液内で安定であり、かつ炎症・酸化ストレス亢進部位で特異的に抗酸化能を発揮する部位特異的抗酸化機能が必要である。

ナノ粒子は薬物体内分布を制御し、薬理効果を上げ副作用を低減させる治療法として、分子標的治療を上回り得る。研究代表者はナノ粒子の特性を「抗酸化」に利用することを発案し、触媒的に活性酸素を消去するニトロキシドラジカルをナノ粒子内に封入することにより、正常の生理反応を阻害せず、過剰に発生する活性酸素だけを消去するナノ粒子の設計を進め、炎症や腫瘍部のpHの低下に着目し低pHで粒子外殻が崩壊し封入したニトロキシドラジカル抗酸化剤が発現するナノ粒子(Redox Nano-particle: RNP)を開発し、急性腎障害等の治療において優れた保護効果を示すことを報告してきた。本研究ではこのRNPを基盤とした技術を腹膜透析に応用した。

2. 研究の目的

本研究では抗酸化能を有する腹膜透析用ナノ粒子を開発し、腹膜における炎症を低減するだけでなく、サイズ効果により腹膜透過を遮蔽し全身反応の惹起を抑制することを目的とした。さらにナノ粒子内にシリカを

有させることにより吸着能を創り込み、透析液交換回数を減ずることを可能とする腹膜透析用ナノ粒子(Silica-containing RNP: SiRNP)の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) SiRNPの合成およびIn vitroにおける特性評価

これまでの報告(Bioconjugate Chem. 20, 1792-1798, 2009)に基づき、ニトロキシドラジカル TEMPO (1-0 xyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine)を含有するRNPを合成した。このRNPに疎水性コア中でゾルゲル法によりシリカを含有させ、SiRNPを作成した。

(2) In vivoにおける生体内安定性評価

SiRNPをラット腹膜内に投与し、腹腔内での安定性および血中への移行を検討した。SiRNP水溶液(polymer concentration = 20 mg/mL, TEMPO L含有量 42.6 mM ニトロキシドラジカル相当)および同量のニトロキシドラジカル相当の非粒子化 TEMPO Lを腹腔内投与し、血中におけるニトロキシドラジカル濃度変化を電子スピン共鳴法(ESR)により測定した。

(3) 腹膜炎モデルにおける腹膜保護効果・抗酸化ストレス効果の評価

Bozkurtらの報告(Perit Dial Int 2009;29:S202-S205)に従い、クロルヘキシジン(CH)投与によりラットEPSモデルを作製した。このEPSモデルラットに、TEMPO 42.6mM相当のSiRNPもしくは非粒子化TEMPOを生理食塩水に溶解し、1日1回計7日間にわたり腹腔内投与した。試験後腹膜を摘出し組織学的評価を行った。またMPECを用いた化学発光法により、腹膜からのスーパーオキシド産生能を評価した。

(4) 腎不全モデルにおける評価

マウス虚血再還流腎不全モデルを用い、SiRNPを4.25%グルコースPD液に溶解し腹腔内投与した。投与後6-9時間において血清BUN、クレアチニン値の変動を評価した。

4. 研究成果

(1) SiRNPの合成およびIn vitroにおける特性評価

動的光散乱法による計測では、得られたSiRNPは平均粒径40nm(湿重量約5%のシリカ含有)であった。これは既報のシリカ非含有RNP(平均粒径22nm)に比べ若干サイズが増大していた。また、シリカ含有量の増加に伴い、平均粒径は増大した。SiRNPの透過電子顕微鏡像を図1に示す。

(2) In vivoにおける生体内安定性評価

SiRNP溶液は完全に透明であり、PD液への添加により変質を来すものではなかった。

SiRNP 含有 PD 液を腹腔内投与したところ、

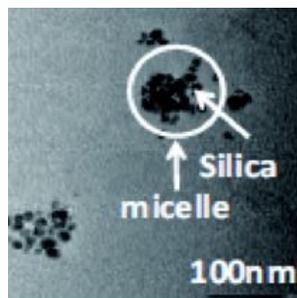


図1 SiRNP の透過電子顕微鏡像
RNP 内にシリカが含有されていることが確認できる。

投与後 60 分に至るまで血中移行は認められなかった。一方非粒子化 TEMPO の腹腔内投与では、投与後 10 分をピークとし 30 分以上持続する血液中への移行が観察された。SiRNP 投与による毒性は認められなかった。

(3) 腹膜炎モデルにおける腹膜保護効果・抗酸化ストレス効果の評価

図2にクロールヘキシジンにより誘発された腹膜炎モデルラットにおける SiRNP の腹膜抑制効果を示す。SiRNP の腹腔内投与は腹膜肥厚を有意に抑制するとともに、腹膜からのスーパーオキシド産生を CH 非投与群と同等レベルまで抑制した。非粒子化 TEMPO にも改善効果がみられたが、SiRNP と比べ有意に弱いものであった。

(4) 腎不全モデルにおける評価

虚血再還流腎不全モデルにおいて SiRNP を腹腔内投与した。SiRNP は、PD 液単独およびシリカ非含有 RNP に比べ、虚血後 9 時間後において有意に血中尿素窒素およびクレアチニン値を低下させた。

(5) まとめ・考察・今後の課題

本研究によりシリカ含有レドックスナノ粒子 SiRNP を開発した。この SiRNP は、部位特異的抗酸化作用により腹膜酸化ストレスの効果的なコントロールを介し腹膜肥厚の抑制・腹膜保護効果を示すとともに、既存の PD 液よりも効率的に血中小分子量物質を低下させることを示した。

現在多くの疾患において酸化ストレスがその病態に関わることが示されている。その一方で、抗酸化剤による病態改善を目指した大規模臨床試験の成功例は少なく、その効果に強い疑問が投げかけられている(Bjelakovic G, et al. PloS one. 2013;8(9):e74558.)。酸化ストレスに関する還元反応はそもそも生体各所で持続的に進行しているものであり、抗

酸化剤全身投与は不必要な抗酸化作用によ

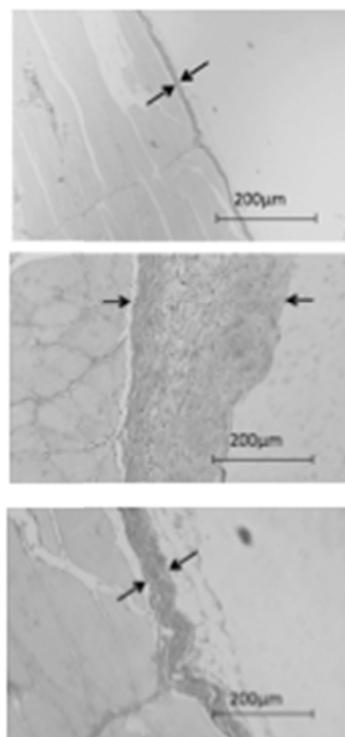


図2 SiRNP の腹膜保護効果

クロールヘキシジン EPS モデル腹腔内に投与。上：コントロール(生理食塩水)、中：クロールヘキシジン投与、下：クロールヘキシジン + SiRNP。マッソントリクローム染色。SiRNP 投与により腹膜肥厚が抑制されていることがわかる。

り悪影響を及ぼすことは想像に難しくなく、酸化ストレス亢進部位に特異的な抗酸化療法が必須である。我々はこのような考えの基、レドックスナノ粒子 RNP を開発し、その有用性を報告してきた。本研究でも、腹腔内で選択的に抗酸化作用を示す SiRNP の有用性が示された。SiRNP は PEG により構成されるため生体適合性が高く、PD 液中に容易に溶解しかつ安定なため、PD において EPS の発生予防と透析効率改善を期待できる。

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2件)

1. Nagasaki Y, Yaguchi T, Matsumura T, Yoshitomi T, Ikeda Y, Ueda A, Hirayama A. Design and use of silica-containing redox nanoparticles, siRNPs, for high-performance peritoneal dialysis. Biomater. Sci., 2: 522-529, 2014. DOI:

- 10.1039/C3BM60236B 査読有り
2. Pua ML, Yoshitomi T, Chonpathompikunlert P, Hirayama A, Nagasaki Y. Redox-active Injectable Gel Using Thermo-responsive Nanoscale Polyion Complex Flower Micelle for Noninvasive Treatment of Local Inflammation. Journal of Controlled Release 172:3:914-920 DOI:10.1016/j.jconrel.2013.10.09 PMID: 24157475 査読有り

〔学会発表〕(計6件)

1. Matsumura T, Yaguchi T, Yoshitomi T, Ikeda Y, Ueda A, Hirayama A, Nagasaki Y. Design of redox polymer-silica nanohybrid materials for effective treatment of renal failure. SPSJ International Polymer Conferences 2014 . 2014.12.2-5 Epocal Tsukuba (Tsukuba, Ibaraki)
2. Nagasaki Y, Yaguchi T, Matsumura T, Yoshitomi T, Ikeda Y, Ueda A, Hirayama A. Nano-kidney possessing oxidative stress suppression character. ASN Kidney Week 2014, 2014 Annual Meeting of the American Society of Nephrology.2014.11.13-16,Philadelphia, PA (USA)
3. Nagasaki Y, Yoshitomi T, Toh K, Marushima A, Tsurushima H, Suzuki K, Matsumura A, Hirayama A, Sanada S, Yoshida A, Kitakaze M. Design of Nanoparticle therapeutics for ischemia reperfusion injuries. 2nd International Meeting on Ischemia Reperfusion Injury in Transplantation. 2014.4.24-25. Poitiers (France)
4. Nagasaki Y. Novel redox polymer therapeutics for antioxidative injuries. 17th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (SFRRRI 2014). 2014.3.26. Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)
5. 松村卓馬, 矢口達也, 池田豊, 吉富徹, 平山 暁, 植田敦志, 長崎幸夫. 高性能な腹膜透析液の開発を目指したシリカ含有レドックスナノ粒子の作製と評価 第23回日本MRS年次大会 2013.11.10 横浜開港記念館他(横浜, 神奈川)
6. Matsumura T, Yaguchi T, Amraon Md, Ikeda Y, Yoshitomi T, Hirayama A, Ueda A, Nagasaki Y. Preparation and evaluation of silica- containing redox nanoparticle for peritoneal dialysis which aimed at the medical treatment of chronic renal failure. 2013.8.29 Tsukuba International Congress Center (Tsukuba, Ibaraki)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)
名称: ORGANIC-INORGANIC HYBRID COMPLEX OF HIGH-MOLECULAR-WEIGHT NITROXIDE COMPOUND AND INORGANIC PARTICLE (高分子環状ニトロキシドラジカル化合物とシリカの有機-無機ハイブリッド複合体)
発明者: Nagasaki Y, Ikeda Y, Yoshitomi T, Yaguchi T, Yamashita M, Md. Amaran Hossain, Yoshinari T, Ueda A, Hirayama A.
権利者: University of Tsukuba, Tsukuba University of Technology
種類: 特許
番号: PCT/JP2013/052769 ,特願 2013-557553 , WO2013/118783
出願年月日: 平成 25 年 2 月 6 日
国内外の別: 国内および国外

〔その他〕

ホームページ等
https://www.researchgate.net/publication/266858164_Design_and_use_of_silica-containing_redox_nanoparticles_siRNPs_for_high-performance_peritoneal_dialysis

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 暁 (HIRAYAMA, Aki)
筑波技術大学・保健科学部・教授
研究者番号: 20323298

(2)研究分担者

吉富 徹 (YOSHITOMI, Toru)
筑波大学・数理物質科学研究科(系)・研究員
研究者番号: 20585799
(平成24年度まで研究分担者)

長崎 幸夫 (NAGASAKI, Yukio)
筑波大学・数理物質科学研究科(系)・教授
研究者番号: 90198309
(平成25年度より研究分担者)