

令和元年5月25日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09287

研究課題名(和文)腎疾患領域におけるリンパ管新生の観点からの病態解明とその治療戦略

研究課題名(英文) Establishment of new strategy targeting lymphangiogenesis in the patients with renal diseases

研究代表者

伊藤 恭彦 (Yasuhiko, Ito)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：最適な体液バランスの維持は、腹膜透析(PD)における除水不全に関与する。PD患者の腹膜障害の特徴は線維化、炎症、血管新生であるが、その機序は不明な点が多い。本研究では、ヒト検体、培養細胞、動物モデルを用いて、1) PDにおけるリンパ管新生の意義、2) 腹膜線維化と血管新生の関連、3) 食塩過剰摂取の腹膜への影響につき検討した。リンパ管新生は、可溶性VEGFR-3によって抑制され除水量の改善が期待できる。腹膜線維化に伴う血管新生は、TGF- β 1-VEGF-A pathwayによっており線維化が腹膜機能改善のターゲットになること、また過剰食塩摂取が腹膜透過性に関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜透析(PD)における除水不全の機序、対策が明らかになることによって、PD治療が長期に可能となり、PD患者負担が軽減する。ひいては医療経済にも好影響を与える。

研究成果の概要(英文)：Appropriate fluid balance is important for good outcomes in patients on peritoneal dialysis. The characteristic features of peritoneal injury with PD are fibrosis, inflammation and neoangiogenesis; however, these precise mechanisms remain unclear. We investigated the 1) roles and pathophysiology of lymphangiogenesis in PD, 2) relationship between peritoneal fibrosis and angiogenesis, and 3) roles of high salt intake in PD. We conducted the studies using animal models, in vitro studies with mesothelial cells, fibroblasts, and macrophages, and human materials including peritoneal biopsy samples and PD effluent. In animal models Adeno-soluble VEGFR-3 effectively improve the drained volume by suppression of lymphangiogenesis, suggesting that VEGFR-3 could be the new target to improve UF. Neoangiogenesis is associated with fibrosis by TGF- β 1-VEGF-A pathway in mesothelial cells and fibroblasts. High salt intake induces the inflammation leading to the increase of peritoneal transport rates.

研究分野：腹膜透析

キーワード：腹膜透析 腹膜機能不全 リンパ管新生 血管新生 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最適な体液バランスの維持は、腹膜透析におけるクリニカルアウトカムと生命予後において重要であり、除水機能不全は腹膜透析中止の主な原因の一つである。腹膜透析患者の腹膜障害の病理学的特徴は線維化や細胞外基質の沈着、血管新生である。我々はすでに腹膜障害におけるリンパ管新生に着目し、リンパ管新生およびリンパ管成長因子の一つ vascular endothelial growth factor (VEGF)-C の発現が腹膜線維化と関連していることをヒト腹膜組織、腹膜透析排液、排液由来細胞、グルコン酸クロルヘキシジン惹起性腹膜傷害動物(CG)モデルを用いた検討により明らかにしてきた。その中、vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) transforming growth factor (TGF- β) が線維化に伴いリンパ管新生が進む主要な経路と発表した。本 pathway が、別のモデルでの検証はなかった。さらにもう一つのリンパ管新生の成長因子 VEGF-D がどこまでかわかるか不明でもあった。そこで、今回メチルグリオキサール誘導腹膜障害(MGO)モデルを作成。VEGF-C/-D の受容体でありリンパ管内皮に発現する分子 vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3)が、腹膜透析における除水機能不全に対する新たな治療標的となりうる可能性を検証した。VEGF-D deficient mice において VEGF-D の役割を検討した。

腹膜線維症と血管新生の関係も明らかではない。今回、ヒト腹膜組織検体、腹膜透析排液、培養腹膜中皮細胞、線維芽細胞、macrophage、さらに CG モデルラットを用いてこれらにつき検討し、血管新生か腹膜線維化どちらが治療ターゲットになるかを検討した。

食塩負荷が、腎不全の病態、腹膜への影響があるか今日まで不明であった。近年食塩の新たな役割が報告された。食塩は、皮下軟部組織に蓄積しリンパ管新生を惹起し、血圧コントロールに関与する、透析患者で塩分摂取が過剰であると下腿の皮膚や筋肉に Na⁺が蓄積する、高塩分摂取は自己免疫疾患を誘導するなどがある。今回、腎不全状態に塩分摂取過剰がくわわると炎症がおきるか、さらに腹膜機能への影響は起きるかを検討した。

『慢性腎臓病』ではリンパ管新生が腎間質の炎症細胞をドレナージし、浮腫を改善。結果として間質線維化の抑制から腎機能保護に働く事を慢性腎臓病モデル(遺伝子改変動物、遺伝子治療を用い)により検討した。

2. 研究の目的

今回、1)メチルグリオキサール誘導腹膜障害(MGO)モデルを作成。VEGF-C/-D の受容体でありリンパ管内皮に発現する分子 vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3)が、腹膜透析における除水機能不全に対する新たな治療標的となりうる可能性を検証した。

2) ヒト腹膜組織検体、腹膜透析排液、培養腹膜中皮細胞、線維芽細胞、macrophage、さらに CG モデルラットを用いてこれらにつき検討し、血管新生か腹膜線維化どちらが治療ターゲットになるかを検討した。

3) 腎不全状態に塩分摂取過剰がくわわると炎症がおきるか、さらに腹膜機能への影響は起きるかを検討した。

慢性腎臓病ではリンパ管新生が腎間質の炎症細胞をドレナージし、浮腫を改善。結果として間質線維化の抑制から腎機能保護に働く事を慢性腎臓病モデル(遺伝子改変動物、遺伝子治療を用い)により検討した。

3. 研究の方法

動物実験:

MGO モデルマウス、10 週齢マウス (C57BL/6J) に対し、メチルグリオキサール含有腹膜透析液の腹腔内投与により腹膜傷害を惹起し、Day22 における横隔膜および壁側腹膜の病理学的変化につき検討した。リンパ管マーカー lymphatic endothelial vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1)、VEGFR-3 の発現および成長因子である VEGF-C/-D の発現レベルを real-time PCR 法を用い評価した。マウス MGO モデルに対してアデノウイルスベクター s-VEGFR3-Ig(血中の VEGF-C/-D を Trap し受容体 VEGF-R-3 への結合を阻害する)の投与によるリンパ管新生の抑制を行った。またコントロールベクターとしてアデノウイルスベクター LacZ の投与を行った。これらマウスに対して腹膜機能検査(従来法)を行い、除水機能などの腹膜機能の変化を検討した。さらに新たなリンパ管機能評価方法の探索を目的として、イコデキストリンを用いた腹膜機能試験も行い同様の検討を行った。

クロルヘキシジン (CG) モデルラット

ラット腹膜線維症モデルを用い、腹膜線維症と VEGF-A 発現の調節機構について検討を行う。ラットに 14 日間、連日で TGF- β 1 inhibitor を腹腔内投与(CG+Treatment)し、対照には生理的食塩水を投与する(Control、または、CG+Non-treatment)。隔日で合計 7 回、0.04%グルコン酸クロルヘキシジン液を腹腔内投与した。16 日目に血液、組織および腹腔洗浄液を採取した。腹膜組織は光学顕微鏡所見(肥厚、血管数、中皮細胞の剥離、フィブリン沈着、被膜の形成)、さらに免疫組織学的所見(CD31、ED-1、SMA、VEGF-A、HBME-1、pimonidazole)を評価した。また、腹腔洗浄液は VEGF-A 濃度、TGF- β 1 濃度を測定する。腹膜組織での VEGF-A 発現を検討するために、免疫組織化学的手法を用いた。

腎不全食塩負荷モデル

腎不全マウスを作製し、1%食塩水を使用する群(腎不全/塩群)と水道水の群(腎不全/水群)

で群分けを行い、4週間後に腹膜、心臓、大動脈周囲組織を解析した。さらに4週塩負荷後、負荷を取った群・負荷継続群にわけた検討、フロセミド投与群・非投与群における検討を行った。

ヒト検体の解析：

腹膜透析を行っている患者から得た腹膜透析排液を用いて、排液中の VEGF-A 濃度、TGF- β 1 濃度を ELISA 法にて測定し、腹膜機能の指標である D/P Cr との関係を検討した。

腹膜透析カテーテル留置時および腹膜透析終了時のカテーテル抜去時に採取した腹膜組織を用いて、組織での VEGF-A mRNA 発現を Real-time PCR 法により測定する。さらに、腹膜組織を光学顕微鏡所見(肥厚、血管数)、さらに免疫組織学的所見(CD31、CD68、Cytokeratin、SMA)を評価する。これら組織 mRNA、組織所見との関連について検討を行った。

培養細胞実験：

腹膜における VEGF-A 発現の調節機構を調べるため、中皮細胞、線維芽細胞、マクロファージの培養細胞を用い、TGF- β 1 刺激による VEGF-A 発現を Real-time PCR 法、ELISA 法にて測定した。中皮細胞にはヒト中皮細胞(MeT-5A)、および、ヒト腹膜中皮細胞(human peritoneal mesothelial cell: HPMC)を用いた。HPMC は患者から得た腹膜透析排液から採取、培養を行う。中皮細胞以外では、ラット線維芽細胞(NRK-49F)、マウスマクロファージ(RAW264.7)を用いた。細胞は培養液に TGF- β 1 を加え、一定時間後、細胞および培養液を回収した。細胞から mRNA を抽出し Real-time PCR に用いた、培養液は ELISA 法でタンパク濃度を測定する。TGF- β 1 型受容体阻害薬(TGF- β R-I inhibitor)を培養液に加え、各細胞における VEGF-A 発現を測定した。

4. 研究成果

検討 1. 腹膜線維化にともないリンパ管新生は進行し、除水不全と関わるか。

MGO モデル実験において CG モデル同様に、横隔膜において LYVE-1 陽性リンパ管の増生を認めた。一方壁側腹膜には明らかなリンパ管新生は認めなかった。横隔膜と壁側腹膜の双方において VEGF-D の発現亢進を認めたが、VEGF-C は横隔膜では有意な上昇を認めず、壁側腹膜でのみ上昇を認めた。MGO モデルに対し、アデノウイルスベクター-sVEGFR3-Ig を用いたリンパ管新生の抑制実験を行ったところ Day22 においてリンパ管新生の抑制を認めた。またそのリンパ管新生抑制効果は、腹腔内の炎症細胞浸潤が改善した Day50 においても持続していることを確認した。これらのマウスに対し腹膜平衡機能試験(PET)を実施し、排液量を計測して除水機能の変化につき検討した。その結果、従来法であるグルコース PET では Day22、Day50 の双方において、アデノウイルスベクター-sVEGFR3-Ig 投与群、アデノウイルスベクター-LacZ 群の間に有意な除水機能変化を認めなかった。Day50 で、新規法であるイコデキストリン PET においては、Day22、Day50 のどちらにおいてもアデノウイルスベクター-sVEGFR3-Ig 投与群はアデノウイルスベクター-LacZ 群に比べ、有意な除水機能の改善を認めた。腹膜透過性を示すパラメータ(D/P クレアチニン、D/DO グルコース)、血管新生、線維化や炎症細胞浸潤において sVEGFR3-Ig による有意な影響は認められなかった。本研究より、腹膜に炎症が伴った病態(例：腹膜炎)において、横隔膜中心にリンパ管新生が起き、除水低下の原因になることが明らかになり、抑制することで除水が改善することが判明した。VEGF-C と VEGF-D の両方の関与が同程度のものであるか、遺伝子改変動物を用いて現在検討中である。

検討 2. 腹膜線維症と血管新生は関与するか？治療ターゲットはどちらか？

ヒト検体の血管：腹膜透析排液は腹膜平衡試験(peritoneal equilibration test: PET)時の4時間貯留検体を38例、夜間貯留検体を87例行った。何れにおいても VEGF-A 濃度と D/P Cr 値は相関した。また、VEGF-A 濃度は TGF- β 1 濃度と相関した(4時間: $R=0.445$, $P<0.01$; 夜間貯留: $R=0.742$, $P<0.0001$)。ヒト腹膜組織は66例を解析した。腹膜透析カテーテル留置時およびカテーテル抜去時に比べ、組織中 VEGF-A mRNA 発現は除水不全例において有意に亢進していた。また、組織中 VEGF-A mRNA 発現と血管数($R=0.465$, $P<0.01$)、腹膜壁肥厚($R=0.503$, $P<0.001$)が相関した。

以上の結果より、腹膜透析患者の腹膜において血管新生は線維化と関連し、VEGF-A 発現は TGF- β 1 と関係していることが示された。

細胞実験の結果：中皮細胞(MeT-5A)は TGF- β 1 によって VEGF-A 発現が mRNA レベル、タンパクレベル共に誘導された。TGF- β R-I inhibitor を培養液に加えたところ、用量依存性に VEGF-A 発現は抑制された。

ヒト腹膜中皮細胞(human peritoneal mesothelial cell: HPMC)は30例得られた。TGF- β 1 によって HPMC における VEGF-A 発現は有意に亢進した。TGF- β 1 による VEGF-A mRNA 発現を、TGF- β 1 刺激のない場合の VEGF-A mRNA 発現と比較した“増幅率”で評価した。

発現ピークは24例で12時間後、6例で24時間後であった。VEGF-A mRNA 発現の増幅率と D/P Cr 値は相関した(12時間後: $R=0.440$, $P<0.05$; 24時間後: $R=0.374$, $P<0.05$)。

D/P Cr 値の高い群では透析液中の TGF- β 1 は高値となっていたことから、透析液中のより高い TGF- β 1 によって更に VEGF-A 発現が亢進すると考えられた。TGF- β 1 に対する VEGF-A 発現を調整する因子については不明である。我々は TGF- β 1 型受容体の発現を測定したが、腹膜機能による差は認められなかった。

線維芽細胞(NRK-49F)も同様に TGF- β 1 によって VEGF-A 発現が mRNA レベル、タンパクレベル共

に誘導され、TGF R-I inhibitor は用量依存性に VEGF-A 発現を抑制した。マクロファージ(RAW264.7)では TGF- β 1 によって VEGF-A 発現が誘導されなかった。低酸素や炎症性サイトカインが TGF- β と相乗的にマクロファージでの VEGF-A 発現を誘導することが報告されており、マクロファージと VEGF-A 発現について更に検討を行う。

動物実験の結果：ラット腹膜線維症モデル(クロルヘキシジン (CG) モデルラット)について検討を行った。対照群(Control)に比べ、グルコン酸クロルヘキシジン投与群(CG+Non-treatment)では腹膜壁がより肥厚し、ED-1 陽性マクロファージの浸潤、SMA 陽性線維芽細胞、VEGF-A 陽性細胞、CD-31 陽性血管数の何れもが増加した。TGF R-I inhibitor を投与された群(CG+Treatment)では腹膜壁肥厚は低下、マクロファージ、線維芽細胞、VEGF-A 陽性細胞、血管数の何れも減少した。腹腔洗浄液中の VEGF-A を ELISA 法で測定したところ、CG+Non-treatment にくらべ TGF R-I inhibitor 投与群(CG+Treatment)では VEGF-A 発現が抑制された。

腹膜透析の腹膜線維症に伴う血管新生には、TGF- β と VEGF-A の直接的な関係が関与していることが示された。腹膜線維症はこの観点から腹膜機能の低下に対する治療ターゲットとなることが明らかとなった。

検討 3. 食塩負荷が腹膜への影響がみとめられるか？

腎不全マウスを作製し、1%食塩水を使用する群(腎不全/塩群)と水道水の群(腎不全/水群)で群分けを行い、4週間後に解析した。血圧、腎機能、血清 IL-6 は正常腎機能群と比較して増加しているものの、両群に有意な差は認めなかった。しかし腎不全/塩群では、心臓、腹壁や大動脈周囲に有意なマクロファージ浸潤を伴い、IL-6、MCP-1、TonEBP mRNA も有意に増加していた。この反応は、塩負荷をやめる、フロセミド投与によって解除されることが明らかになった。機序として、腎不全における高食塩摂取は、高浸透圧(high-tonicity)下で誘導される TonEBP を介して局所のマクロファージ浸潤・炎症を誘導する TonEBP-MCP-1 pathway の関与を明らかにした。さらに PET を行ったところ腹膜透過性が亢進し、IL-6 が関わっている可能性を明らかにした。

『慢性腎臓病』ではリンパ管新生が腎間質の炎症細胞をドレナージし、浮腫を改善。結果として間質線維化の抑制から腎機能保護に働く事を慢性腎障害モデル(遺伝子改変動物、遺伝子治療を用い)により検討中であるが、結論に至っていない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. TGF- β 1-VEGF-A pathway induces neoangiogenesis with peritoneal fibrosis in patients undergoing peritoneal dialysis. Kariya T, Mizuno M, Suzuki Y, Ito Y (11 名中 11 番目). Am J Physiol Renal Physiol 2018;314:F167-F180
2. Anti-C5a complementary peptide mitigates zymosan-induced severe peritonitis with fibrotic encapsulation in rats pretreated with methylglyoxal. Iguchi D, Mizuno M, Suzuki Y, Sakata F, Maruyama S, Okada A, Okada H, Ito Y (8 名中 8 番目). Am J Physiol Renal Physiol. 2018;315:F1732-F1746.
3. Sodium chloride promotes tissue inflammation via osmotic stimuli in subtotal-nephrectomized mice. Sakata F, Ito Y (16 名中 2 番目), Suzuki Y, Mizuno M, Maruyama S, Soga T, Matsuo S, Imai E, Takei Y. Lab Invest. 97:432-446,2017
4. High Levels of Soluble C5b-9 Complex in Dialysis Fluid May Predict Poor Prognosis in Peritonitis in Peritoneal Dialysis Patients. Mizuno M, Suzuki Y, Ito Y (11 名中 11 番目). PLoS One. 2017 Jan 3;12(1):e0169111
5. Vascular Endothelial Cell Injury Is an Important Factor in the Development of Encapsulating Peritoneal Sclerosis in Long-Term Peritoneal Dialysis Patients, Tawada M, Ito Y (13 名中 2 番目), Suzuki Y, Mizuno M, Takei Y PLoS One. 11:e0154644, 2016
6. Rat Models of Acute and/or Chronic Peritoneal Injuries Including Peritoneal Fibrosis and Peritoneal Dialysis Complications. Mizuno M, Ito Y (2 名中 2 番目). Methods Mol Biol. 2016;1397:35-43
7. Vascular endothelial growth factor receptor-3 is a novel target to improve net ultrafiltration in methylglyoxal-induced peritoneal injury. Terabayashi T, Ito Y (14 名中 2 番目), Mizuno M, Suzuki Y, Kinashi H, Sakata F, Tomita T, Iguchi D, Tawada M, Nishio R, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y. Lab Invest. 2015 Sep;95(9):1029-43

[学会発表](計 4 件)

1. Yasuhiko Ito, Pathophysiology of the peritoneal membrane damage: fibrosis, angiogenesis and lymphangiogenesis. (Invited lecture) The 7th Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis 2015年9月(EXCO 大邱、韓国)
2. Yasuhiko Ito, Pathophysiology of the peritoneal membrane dysfunction. (Invited lecture) The 8th Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for

- Peritoneal Dialysis 2017年3月 (広州、中国)
3. Sun T, Sakata F, Ishii T, Tawada M, Suzuki Y, Kinashi H, Katsuno T, Takei Y, Maruyama S, Mizuno M, Ito Y.
High Salt Intake Increases Baseline Peritoneal Transport Rate Through Local TonEBP Activation in Subtotal Nephrectomized Mice, International Society for Peritoneal Dialysis 2018年5月 (バンクーバー、カナダ)
 4. 4. Sun T, Sakata F, Ishii T, Tawada M, Suzuki Y, Kinashi H, Katsuno T, Takei Y, Maruyama S, Mizuno M, Ito Y.
High Salt Intake Increases Baseline Peritoneal Transport Rate Through Local TonEBP Activation in Subtotal Nephrectomized Mice, 米国腎臓学会 2018年10月 (サンディエゴ、米国)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

水野 正司 (MIZUNO MASASHI)

名古屋大学大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号: 20303638

鈴木 康弘 (SUZUKI YASUHIRO)

名古屋大学大学院医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号: 20584676

坂田 史子 (FMIKO SAKATA)

名古屋大学大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号: 20726484

武井 佳史 (TAKEI YOSHI FUMI)

愛知学院大学薬学部 教授

研究者番号: 70362233