

令和元年5月27日現在

機関番号：33920

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06746

研究課題名(和文) 腹膜リンパ管新生におけるCTGFの役割

研究課題名(英文) The role of CTGF in peritoneal lymphangiogenesis

研究代表者

鬼無 洋(Kinashi, Hiroshi)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：70805275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜透析に伴う腹膜線維症・除水機能不全のメカニズム解明と治療法開発が望まれている。腹膜線維化に伴う新生リンパ管は除水機能を低下させると考えられる。我々は線維化のメディエーターであるCTGFと腹膜リンパ管新生との関連について検討した。ヒト腹膜透析排液・ヒト腹膜組織・培養ヒト腹膜中皮細胞において、CTGF発現とリンパ管成長因子であるVEGF-C並びにリンパ管マーカー発現との間に正の相関を認めた。ラット横隔膜線維症モデルにおいても同様の結果が得られた。CTGF遺伝子欠損マウスの腹膜線維症モデルにおいてVEGF-Cとリンパ管発現の減少がみられた。CTGFと腹膜リンパ管新生との密接な関連を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜透析に伴う腹膜線維症は、患者の生命予後を悪化させる除水機能不全を合併し、そのメカニズムと治療法の実現が望まれている。これまで除水機能不全の対策は、血管新生と血管透過性亢進に着目されてきたが、我々のリンパ管新生を治療標的とした試みは独創的な研究である。CTGFの抑制治療はさまざまな腎疾患モデルにおいて腎臓線維化を減少させることが報告されてきたが、近年では腹膜線維症モデルでの有効性が注目されつつある。我々のCTGF欠損マウスを用いた腹膜線維症とリンパ管新生におけるCTGF抑制効果の検討は世界に先駆けた研究である。

研究成果の概要(英文)：Lymphangiogenesis in peritoneal fibrosis may cause ultrafiltration failure in peritoneal dialysis (PD). We investigated the role of CTGF in PD-associated lymphangiogenesis. A positive correlation was observed between VEGF-C, a major lymphangiogenic growth factor, and CTGF concentration in human PD effluents. CTGF expression positively correlated with expression of lymphatic markers and VEGF-C in human peritoneal biopsies. There was a positive correlation between CTGF and VEGF-C increment in cultured human peritoneal mesothelial cells treated with TGF- β 1. The diaphragm is known as a central player in peritoneal lymphatic absorption. CTGF expression also correlated with expression of VEGF-C and lymphatics in a rat diaphragmatic fibrosis model induced by chlorhexidine gluconate (CG). Furthermore, CTGF gene deletion reduced VEGF-C expression and peritoneal lymphangiogenesis in the mouse CG model. Our results suggest a close relationship between CTGF and PD-associated lymphangiogenesis.

研究分野：腎臓病

キーワード：腹膜透析 腹膜線維症 リンパ管新生 CTGF VEGF-C

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 腹膜透析に伴う腹膜線維症は、患者の生命予後を悪化させる除水機能不全を合併し、そのメカニズムと治療法の開発が望まれている。そのメカニズムは、腹膜における血管新生・血管透過性の亢進や線維組織による浸透圧勾配の減少に焦点が置かれてきた。

(2) 腹膜透析において腹膜リンパ管が腹腔に貯留した透析液を持続的に吸収することが知られている。リンパ管研究は 1990 年代以降急速に進展し、主要な成長因子・受容体である VEGF-C、-D、VEGFR-3 が発見され、最も注目されている脈管研究分野の一つである。

2. 研究の目的

(1) 我々は、腹膜線維症と除水機能不全のメカニズムにおいて、腹膜リンパ管の役割に着目した。腎・透析領域におけるリンパ管研究はまだ始まったばかりである。その中、我々は臨床検体・動物モデルを用いて、腎臓・腹膜の線維化に伴うリンパ管新生を明らかにし、線維化の key molecule である TGF- β が VEGF-C 産生を誘導してリンパ管新生を促進するメカニズムを報告した<引用文献>。また線維化のメディエーターである CTGF に着目し、腎線維化において CTGF 抑制が VEGF-C の減少を介してリンパ管新生を抑制することを報告した<引用文献>。

(2) これまでの研究成果により、CTGF が腹膜線維症におけるリンパ管新生の機序に関与していることが示唆された。本研究では、腹膜リンパ管新生における CTGF の意義を解明し、CTGF を標的とした腹膜線維症の新しい治療法確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 夜間貯留したヒト腹膜透析排液(77 検体)を用いて、CTGF と VEGF-C の蛋白濃度を ELISA にて測定し、両者の発現の相関を解析した。

(2) 腹膜透析開始時と腹膜透析施行後(除水機能不全の合併ありとなし)のヒト腹膜組織(計 62 検体)を用いて、CTGF・VEGF-C・リンパ管マーカー(LYVE-1, podoplanin)の mRNA 発現を定量 RT-PCR にて測定し、CTGF の腹膜リンパ管新生への関与を検討した。

(3) 腹膜透析患者の排液由来のヒト腹膜中皮細胞(21 検体)を採取・培養し、TGF- β 1 刺激による CTGF と VEGF-C の mRNA 発現増加を定量 RT-PCR にて測定し、両者の増加の相関を解析した。

(4) 腹膜リンパ管吸収において、横隔膜が主要な役割を果たすことが知られている。ラットの腹腔内にグルコン酸クロルヘキシジン(CG)を投与して腹膜線維症モデルを作成した。横隔膜を採取して、CTGF・VEGF-C・LYVE-1 の発現を免疫組織学的手法により評価し、それぞれの発現の相関を解析した。

(5) CTGF 欠損マウスに CG を投与して腹膜線維症モデルを作成した。壁側腹膜を採取して VEGF-C とリンパ管マーカーの発現を免疫組織学的手法と定量 RT-PCR により評価し、腹膜リンパ管新生における CTGF 抑制の意義を検討した。

(6) 腹膜透析患者由来のヒト腹膜中皮細胞を採取・培養し、CTGF siRNA を用いて CTGF 発現を抑制した。TGF- β 1 刺激による CTGF と VEGF-C の mRNA 発現増加を定量 RT-PCR にて測定し、腹膜中皮細胞の VEGF-C 産生における CTGF 抑制の意義を検討した。

4. 研究成果

(1) 77 名のヒト腹膜透析排液中の CTGF と主要なリンパ管成長因子である VEGF-C 蛋白濃度を ELISA にて測定したところ、両者に有意な正の相関を認めた。このことから CTGF の腹膜リンパ管新生における有意な関連が示唆された。

(2) 62 名のヒト腹膜組織において CTGF と VEGF-C、リンパ管マーカーである LYVE-1 と podoplanin の mRNA 発現を定量 real-time PCR にて解析した。CTGF は LYVE-1、podoplanin、VEGF-C のいずれとも有意な正の相関を認めた。この結果により腹膜局所の CTGF 発現が、リンパ管新生に関連していることが明らかとなった(図 1)。

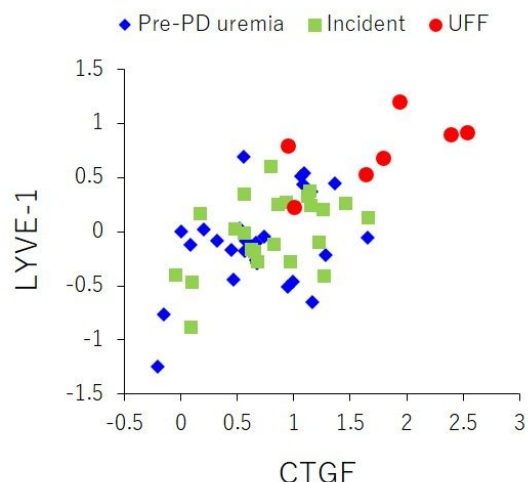


図 1 ヒト腹膜組織における CTGF と LYVE-1 発現の相関

Hiroshi Kinashi. Connective tissue growth factor is correlated with peritoneal lymphangiogenesis. ISN Frontiers Meetings 2018.

Hiroshi Kinashi. Connective tissue growth factor is involved in peritoneal lymphangiogenesis. The 61st Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology 2018.

Hiroshi Kinashi. Connective tissue growth factor is correlated with peritoneal lymphangiogenesis. ASN Kidney Week 2018.