

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15997

研究課題名(和文) 腹膜透析の腹膜機能低下を起こす機構の解明と血管新生抑制を介した新規治療法の開発

研究課題名(英文) elucidation of the mechanisms which cause deterioration of peritoneal function in peritoneal dialysis and development of a novel treatment by inhibiting neoangiogenesis.

研究代表者

狩谷 哲芳 (KARIYA, TETSUYOSHI)

名古屋大学・アジアサテライトキャンパス学院(医)・特任助教

研究者番号：60805290

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)：本研究では、腹膜機能低下においてTGF- $\beta$ 1がVEGF-A発現を増強する機構並びにVEGF-Aによる腹膜機能の低下機構を解明することを目的とした。腹膜機能が低下した群では有意に(1)腹膜透析液中のVEGF-A濃度、TGF- $\beta$ 1濃度は上昇する、(2)腹膜組織中のCD-31陽性血管数は増加する、(3)腹膜組織中のVEGF-A mRNA発現は亢進している、事を明らかにした。TGF- $\beta$ 1-VEGF-A経路の増強とそれによる血管恒常性の破綻が腹膜機能を低下させる事が示唆された。腹膜線維症モデルラットを用いた解析から、TGF- $\beta$ 1によるVEGF-Aの誘導には低酸素が関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓病が進行し末期腎不全の状態になると腎臓の機能を代替する腎代替療法が必要となる。治療法の内、腹膜透析は生活の質の面で有利な治療法である。しかしながら、腹膜機能の低下は腹膜透析の継続を難しくする要因の一つである。本研究から、腹膜でのTGF- $\beta$ 1-VEGF-A経路の増強とそれによる血管恒常性の破綻が腹膜機能の低下に関連しており、TGF- $\beta$ 1によるVEGF-Aの誘導には低酸素が関与していることが明らかとなった。今後、本研究で明らかにした経路をターゲットにした治療方法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the mechanisms how TGF- $\beta$ 1 induces VEGF-A, and VEGF-A causes peritoneal dysfunction in peritoneal dialysis. Sixty-six human peritoneal tissues and 136 peritoneal dialysis fluid were analyzed with microscopic examinations, immunological stains and protein measurements. Compared to the control groups, samples with peritoneal dysfunction had significantly (1) higher levels of VEGF-A and TGF- $\beta$ 1 protein in peritoneal dialysis fluid, (2) increased number of CD-31-positive vascular vessels in submesothelial compact zone of peritoneal tissues, and (3) higher level of VEGF-A mRNA expression in peritoneal tissues. It was suggested that TGF- $\beta$ 1-VEGF-A induction and subsequent loss of vascular integrity causes peritoneal dysfunction in peritoneal dialysis. Peritoneal fibrosis in animal model revealed that hypoxic change in macrophages of peritoneal membrane induces by TGF- $\beta$ 1 causes VEGF-A, resulting in increased angiogenesis and vascular permeability.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腹膜透析 腹膜機能低下

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腹膜透析療法は患者の Quality of Life 維持、残腎機能の保持、医療費の削減など、血液透析療法に比べいくつもの優れた点を持っている。しかし、腹膜機能低下は腹膜透析療法の継続を困難にし、生命予後悪化の一因となっている。腹膜透析低下の予防・治療は重要な課題であり、これらを目指した研究を進展させる必要がある。長期の腹膜透析において、尿毒症状態であること、生体非適合性の透析液への曝露、腹膜炎によって腹膜壁の線維化と血管新生を伴い、腹膜機能低下が起こる。また、腹膜機能の低下に伴って腹膜組織での TGF- $\beta$ 1 および VEGF-A 発現が亢進することが報告されたが(文献 )、両者の関係は不明であった。研究代表者は、腹膜機能が低下した患者では腹膜透析排液中の VEGF-A および腹膜組織中 VEGF-A 発現が亢進し、TGF- $\beta$ 1 と VEGF-A が相関すること、また、動物実験から、TGF- $\beta$ 1 が直接的に VEGF-A を誘導し血管数を増加させることを明らかにした。次に、腹膜透析患者からヒト腹膜中皮細胞(human peritoneal mesothelial cell: HPMC)を分離培養する実験系を確立し、HPMC において TGF- $\beta$ 1 刺激による VEGF-A 発現の増加率を解析した。腹膜機能の低下した患者では TGF- $\beta$ 1 刺激による HPMC の VEGF-A 発現が増強することを明らかにした(文献 )。また、HPMC における TGF- $\beta$ 1 型受容体発現は腹膜機能正常患者と低下患者間では差を認めなかったことを報告した(文献 )。以上の様に部分的な理解は進んだが、TGF- $\beta$ 1-VEGF-A 経路が腹膜機能低下を引き起こす機構は依然不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) 腹膜組織において TGF- $\beta$ 1 による VEGF-A 発現が増強される機構を解明する。

(2) VEGF-A によって腹膜機能低下が起こる機序を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 腹膜組織において TGF- $\beta$ 1 による VEGF-A 発現が増強される機構の解明。正常ラット及びグルコン酸クロルヘキジン液の腹腔内投与によって作製するラット腹膜線維症モデル(CG モデル)を用いた。腹膜平衡試験を行い、腹膜機能の低下および血管透過性の亢進を評価した。CG モデル群、及び、CG モデルに TGF $\beta$ R-I inhibitor を投与した群、生理的食塩水の群を用い、組織採取の 90 分前に低酸素を検出するための pimonidazole (Hypoxyprobe-1, Natural Pharmacia International, Burlington, MA)を 60 mg/kg の量で静脈注射した。採取した壁側腹膜組織に pimonidazole adduct を検出する抗体による染色を行い低酸素を検出した。

(2) 臨床検体の解析。ELISA 法を用い、患者腹膜透析排液中の TGF- $\beta$ 1、VEGF-A の測定を行った。腹膜機能の異なる患者由来の HPMC を分離培養した。HPMC を human recombinant TGF- $\beta$ 1 (R&D systems)存在下に 12 時間、あるいは、24 時間培養した。TGF- $\beta$ 1 による VEGF-A 発現の増強を評価した。

### 4. 研究成果

(1) CG モデルでは ED-1 陽性マクロファージに一致して低酸素領域を認めた(図 1. A: ED-1, B: Double staining of ED-1 and anti-pimonidazole adducts, C: pimonidazole adducts, D: Positive area of pimonidazole adducts)。また、CG モデルに TGF $\beta$ R-I inhibitor を投与した群では、有意に低酸素領域が減少していた。過去には、マクロファージにおいて TGF- $\beta$ 1 が HIF-1 $\alpha$  を介して VEGF-A を誘導することが報告されている。また、細胞を用いたルシフェラーゼアッセイの研究から TGF- $\beta$ 1 による VEGF-A 産生は HIF-1 $\alpha$ / $\beta$  と Smad3/4 の遺伝子発現を介していることが報告されている。以上より、腹膜線維症においてもその過程で誘導される TGF- $\beta$ 1 が直接的に低酸素を介して VEGF-A 産生を誘導することが明らかとなった。

HPMC を用いた TGF- $\beta$ 1 による VEGF-A 発現が増強される機構の解析は本研究では行わなかった。今後、特異的な遺伝子発現だけでなく網羅的な解析によってこの現象を司る機構を明らかにしたい。

(2) 66 人分のヒト腹膜組織、及び、136 人分の腹膜透析液を解析した結果、腹膜機能が低下した群では有意に(1)腹膜透析液中の VEGF-A 濃度、TGF-beta1 濃度

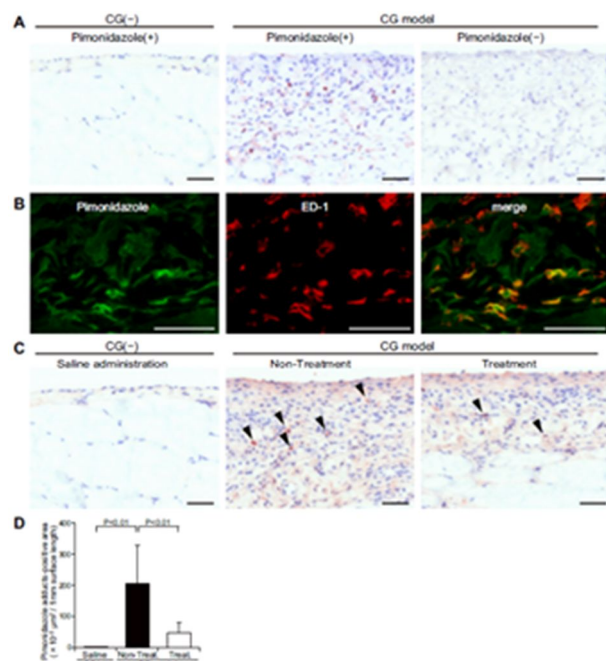


図 1. CGモデル動物腹膜組織において、マクロファージは低酸素状態となる。

は上昇する、(2)腹膜組織中の CD-31 陽性血管数は増加する、(3)腹膜組織中の VEGF-A mRNA 発現は亢進している、事を明らかにした。TGF-beta1-VEGF-A 経路の増強とそれによる血管恒常性の破綻が腹膜機能を低下させる事が示唆された。

< 引用文献 >

Pecoits-Filho R, Araujo MR, Lindholm B, Stenvinkel P, Abensur H, Romao JE, Jr., Marcondes M, De Oliveira AH, Noronha IL. Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(8):1480-1486.

Kariya T, Nishimura H, Mizuno M, Suzuki Y, Matsukawa Y, Sakata F, Maruyama S, Takei Y, Ito Y. TGF-beta1-VEGF-A pathway induces neoangiogenesis with peritoneal fibrosis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;314(2):F167-F180.

Mizutani M, Ito Y, Mizuno M, Nishimura H, Suzuki Y, Hattori R, Matsukawa Y, Imai M, Oliver N, Goldschmeding R, Aten J, Krediet RT, Yuzawa Y, Matsuo S. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis patients with high peritoneal solute transport rate. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(3):F721-733.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shigemoto Emi, Mizuno Masashi, Suzuki Yasuhiro, Kobayashi Kazuma, Sakata Fumiko, Kariya Tetsuyoshi, Katsuno Takayuki, Maruyama Shoichi, Ito Yasuhiko	4. 巻 39
2. 論文標題 Increase of Eosinophil in Dialysate during Induction of Peritoneal Dialysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis	6. 最初と最後の頁 90~92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3747/pdi.2017.00205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tetsuyoshi Kariya, Hayato Nishimura, Masashi Mizuno, Yasuhiro Suzuki, Yoshihisa Matsukawa, Fumiko Sakata, Shoichi Maruyama, Yoshifumi Takei, Yasuhiko Ito
2. 発表標題 TGF- 1-VEGF-A pathway and neoangiogenesis in patients of peritoneal dialysis
3. 学会等名 APCM-ISPD 2019, The 9th Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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