

機関番号：13901

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590972

研究課題名 (和文)

CAPD患者の腹膜機能不全に対する血管・リンパ管新生を中心とした病態解明と対策  
 研究課題名 (英文) Investigation of neoangiogenesis and lymphangiogenesis in ultrafiltration failure of CAPD patients and establishment of a novel therapeutic approach

研究代表者

伊藤 恭彦 (YASUHIKO ITO)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：60402632

研究成果の概要 (和文)：

腹膜透析において除水不全・腹膜機能障害は重要な課題である。本病態における、血管・リンパ管新生、線維化につき検討した。腹膜線維化において TGF- $\beta$  の下流に位置する CTGF が、病態を反映する腹膜機能のバイオマーカーになる可能性を明らかにした。一方、腹膜機能低下と共に VEGF-C 産生・リンパ管新生が亢進することを明らかにし、中皮細胞が VEGF-C の重要な産生源で、TGF- $\beta$  によって誘導されることを見出した。TGF- $\beta$  が CTGF, VEGF-C を誘導する pathway を抑制することによって線維化・腹膜透過性をコントロールできる可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：

Ultrafiltration failure (UFF) and peritoneal dysfunction are important complications of long-term peritoneal dialysis (PD). We investigated angiogenesis, lymphangiogenesis and peritoneal fibrosis in UFF. We demonstrated that CTGF acts downstream of TGF- $\beta$  and plays an important role in peritoneal fibrosis, and that CTGF concentrations in PD effluent might be a biomarker of peritoneal function. We showed that increase of VEGF-C production and lymphangiogenesis in peritoneum are associated with UFF. VEGF-C is produced mainly by peritoneal mesothelial cells through TGF- $\beta$ -VEGF-C pathway. Suppression on the TGF- $\beta$ -CTGF and -VEGF-C pathway might be effective to regulate the peritoneal fibrosis and increase of peritoneal permeability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学 腎臓内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腹膜透析、リンパ管新生、血管新生、線維化、VEGF-C、CTGF

## 1. 研究開始当初の背景

腹膜透析 (CAPD) は血液浄化療法の一方法である。血液透析に比べて、残腎機能の保持、

心血管に関わる合併症の発症の遅延、医療経済の改善等に利点があると考えられる。高齢者の透析導入が増加する中、この対策にも CAPD

療法は適していると考えられる。一方、CAPD療法  
の長期施行を考えると、腹膜機能の低下が妨げの大きな要因であり、本邦のCAPD離脱理由の約4割に相当する(Perit Dial Int 19; 515, 1999)。長期腹膜透析の問題点である腹膜機能障害予防の研究は腹膜透析の長期治療を可能とさせ、普及の増加から医療経済への負担の軽減につながると考える。

腹膜機能低下症は、今日まで血管新生、線維症が主な理由であるとされてきたが、ヒト組織においてPD期間とともに血管新生が起きていないといった報告もみられ、この点に関しても必ずしも明らかとはいえない(Nephro Dial Transplant 21; 1675, 2006)。腹膜炎は、腹膜機能不全の重要なリスクファクターであるがリンパ管新生への関与は明らかではない。

近年、腹膜透析施行中の腹膜の機能異常・構造の変化において中皮細胞の役割が注目されている。中皮細胞は、TGF- $\beta$ を中心とした成長因子、サイトカインを産生し、またepithelial-mesenchymal transition(EMT)によって線維化に関与している可能性が示されている。また、中皮細胞が加齢に伴い炎症性サイトカイン分泌を亢進することも報告された。腹膜の透過性亢進と線維化が平行して進行するメカニズムに中皮細胞の役割が関与する可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

腹膜機能障害の機序に関し、病理学的に、リンパ管新生は現在までほとんど研究が進んでいなかった。血管周囲細胞の欠落、基底膜の断裂が存在するリンパ管の構造から、その新生があれば透析液の吸収が亢進することは至極当然のことになる。現在までこの分野の進歩が遅かったことは、1)世界的にもヒトCAPD患者の腹膜組織の採取が極めて困難で

行われていなかった点、2)リンパ管のマーカーが少なかった点大きい。血管新生のみならず、リンパ管新生亢進も一因であることが証明することによって、新たな治療ターゲットを確立することができると思う。中皮細胞は、腹膜を被い腹膜機能のintegrityを保つのに重要な働きをしていることが推察されている。この点を踏まえ、中皮細胞と成長因子との関連性を検討し、中皮細胞の形質と腹膜機能保持との関連性も検討する。

我々の最終目的は、腹膜透析患者の腹膜機能温存から、腹膜劣化の予防・治療へと応用していくことである。なぜ腹膜透過性亢進と線維化が同時に進行するのか等不明な点が多く、治療ターゲットが線維化か、血管新生か、さらにリンパ管新生かも明らかとなっていない。この研究により長期腹膜透析への道が開かれると考える。血液透析に比べ、CAPDは医療費や労働力抑制も期待でき、最終的には医療費削減につながると考える。

## 3. 研究の方法

ヒト検体(透析液排液、腹膜組織、排液中から採取できる中皮細胞)を用いてにつき検討する。さらに、培養細胞、動物モデルを用いてその病態、治療法につき検討する。

(1) ヒト腹膜生検にて採取されたさまざまな条件の腹膜組織(PD開始時、UF failure時、腹膜炎、non-UF failure時)を用い、血管(CD31, PALE)、リンパ管(LYVE-1, D2-40)、線維化(collagen III等)、VEGF-A、VEGF-C、VEGFR3、CTGF等の発現を①免疫染色、②real-time PCR法、③in situ hybridizationにて検討する。これらの検討から、ヒトにおいて何が最も除水不良と相関が見られるかを検討する。

(2) PD排液中のこれらのサイトカイン(VEGF-A、VEGF-C、CTGF)を測定し、臨床のマ

ーカーになるかを D/P Cr を中心としたパラメーターと比較して検討する。

(3) 排液から採取されるヒト腹膜中皮細胞培養における成長因子と腹膜透過性の関連性を検討する。PD 療法を施行している患者の CAPD 排液より中皮細胞を Yanez-Mo らの方法(N Engl J Med 348: 403-13, 2003)を用いて下記を検討する。

A) 腹膜透析治療期間から、B) 腹膜透過性(D/P Cr)の差から、各成長因子の中皮細胞の線維化、血管・リンパ管新生への影響を検討する。

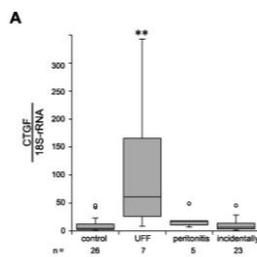
検討項目は、TGF-βによって刺激をし、CTGF, VEGF-A, VEGF-C 等の発現を検討し、中皮細胞の形質と線維化、間葉系細胞へ形質転換、腹膜透過性、TGF-βと関連する成長因子との関連を検討する。

#### 4. 研究成果

我々は腹膜透過性(D/P Cr)と腹膜線維化・血管新生の関連について、CTGF・TGF-β・VEGF-A, VEGF-Cを中心に検討した。

(1) CTGFと腹膜線維化、血管新生の関係(A m J Physiol Renal Physiol. 298: F721-33, 2010)

①ヒト腹膜組織における検討。腹膜組織中のCTGF mRNA を pre-PD(control) 群、UF failure(UFF)群、peritonitis 群、incidental 群で検討したところ、UFF 群で有意な増加を認め(Figure 1)、肥厚と関連したが、血管数とは相関を認めなかった。



(Figure 1)

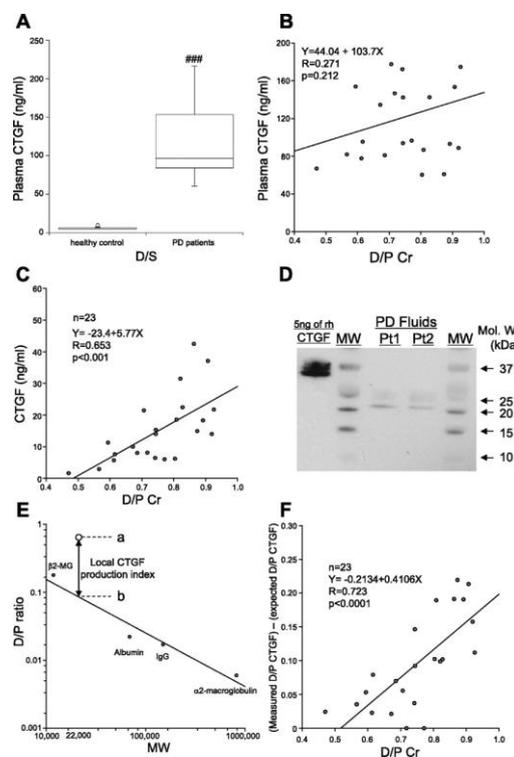
②In Situ Hybridization と免疫染色で、CTGF

mRNA と蛋白の発現を腹膜中皮細胞および血管内皮細胞にて認めた。特に腹膜機能不全群では fibroblast 様の陽性細胞が中皮下組織に多く検出された。すなわち、ヒト腹膜組織において、腹膜機能不全(腹膜透過性亢進)でCTGFのmRNA・蛋白の発現増加を確認した。

③次に血液・PD排液において検討した。

PD患者では有意に血中CTGFの増加を認めた(Fig 2A)。腹膜透過性(D/P Cr)とPD排液中のCTGF濃度(4時間貯留液)とでは正の有意な相関は認められ(Figure 2C)、排液中にCTGFがWestern blotting法にて検出された。PD排液中の実測CTGF濃度(a)と、分子量から推定される血管からPD液に移行するCTGF濃度(b)との差異である局所産生CTGF濃度を算出し(Figure 2D, E)、腹膜透過性(D/P Cr)との関連を検討したところ有意な正の相関が認められた。(Figure 2F)

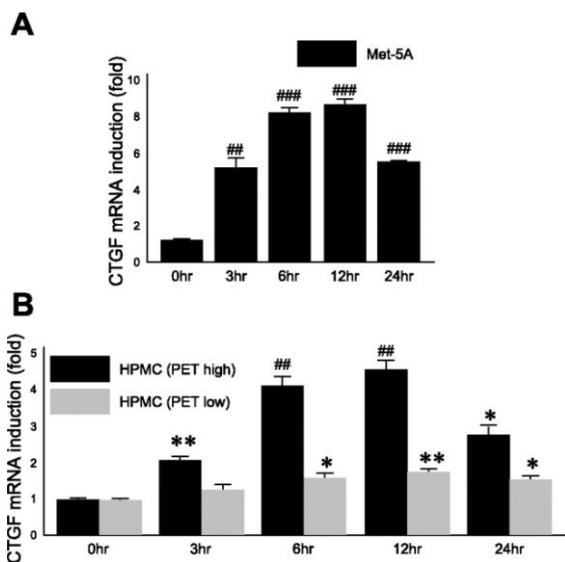
このことよりPD排液中のCTGF濃度が、腹膜機能不全(腹膜透過性)のbiomarkerとなりうると考えられた。



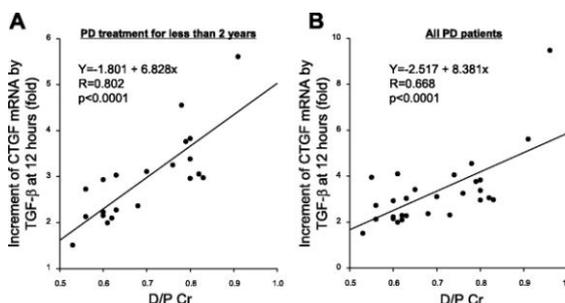
(Figure 2)

④次に排液中腹膜中皮細胞において検討した。

細胞形態について、腹膜透過性による違いは見られなかった。また CTGF mRNA の発現も見刺激状態では腹膜透過性による違いは見られなかった。ヒト中皮細胞 cell line (Figure 3A) および PD 排液中から得られたヒト腹膜中皮細胞において、TGF-β 刺激により CTGF mRNA 発現が増加した。(Figure 3B) TGF-β 刺激による CTGF mRNA 発現の増幅率は、12 時間後および 24 時間後でも腹膜透過性 (D/P Cr) と強い相関を認めた。(Figure 4A, B) 一方透析期間とは相関は認めなかった。また TGF-β type II receptor の発現は Western blotting 法において腹膜透過性による違いは認められなかった。



(Figure 3 A, Met5A 中皮細胞 cell line, B, ヒト腹膜透析排液から採取した中皮細胞)



(Figure 4, CTGF 増幅率と D/P Cr と相関する)

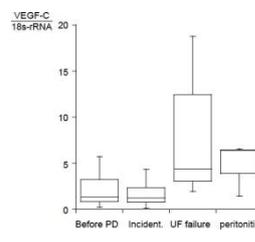
以上より PD 排液由来の腹膜中皮細胞においても、TGF-β 刺激前では相関はないが、TGF-β 刺激による CTGF mRNA 発現の増幅率は腹膜透過性 (D/P Cr) と強い相関を認めた。

すなわち腹膜組織・PD 排液・PD 排液由来腹膜中皮細胞において、CTGF mRNA、蛋白発現と腹膜透過性と相関が確認された。

線維化にかかわる CTGF は、腹膜透過性と強い関連性がみとめられた。透過性亢進と線維化が同時に進むメカニズムのひとつと考えられた。このことは、透過性亢進にともなった中皮細胞の形質の変化 (TGF-β1 の反応性の変化) が、重要な要因であると考えられた。

## (2) VEGF-C とリンパ管新生、腹膜透過性 (2011 米国腎臓学会で発表、投稿予定)

①ヒト腹膜組織における検討。腹膜組織中の VEGF-C mRNA を CTGF 同様 3 群で検討したところ、UFF 群で有意な増加を認め、腹膜の厚さとも相関を示した ( $R=0.696$ ,  $P<0.001$ )。

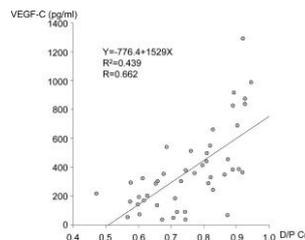


(Figure 5)

②免疫染色で、VEGF-C 蛋白の発現を腹膜中皮細胞および炎症細胞に認めた。特に腹膜機能不全群では発現上昇を確認した。

③次に PD 排液において検討した。

PET 排液では、排液中 VEGF-C と D/P Cr と  $R=0.662$  ( $p<0.001$ ) と良好な相関を得た。



(Figure 6)

④排液中腹膜中皮細胞培養および中皮細胞

cell line (Met5A)において、TGF- $\beta$ 刺激で 12 時間をピークとして 3-3.5 倍の VEGF-C mRNA、蛋白の上昇を確認し、TGF- $\beta$ I 受容体拮抗薬 (LY364947) で抑制がかかることも確認した。さらに、その VEGF-C mRNA 増幅率は、D/PCr と相関することが明らかとなった。

#### ⑤動物モデルにおける検討。

腹膜線維症もモデルある、クロルヘキシジンモデル (CGH) において 0.04%CGH を隔日に、TGF- $\beta$ I 受容体拮抗薬 (LY364947) を連日投与した。Type III collagen 低下とともに、VEGF-C, podoplanin, LYVE-1 (リンパ管) の抑制を確認した。培養細胞、動物実験から、腹膜線維化にともない TGF- $\beta$ -VEGF-C pathway でリンパ管新生が誘導され、治療ターゲットとなりうる可能性を確認した。

(3) 血管新生において、VEGF-A が腹膜組織で VEGF-A mRNA の上昇を確認し、中皮細胞からも VEGF-A が産生され、TGF- $\beta$ が VEGF-A を誘導することを明らかとした。TGF- $\beta$ -VEGF-A pathway が血管新生において重要であることを確認した。

(4) 血管、リンパ管新生を伴わない腹膜透過性亢進 (Nephrol Dial Transplant Plus3: 372-375, 2010 で発表)

我々は、慢性好酸球性腹膜炎を経験し、腹膜組織採取する機会をえた。組織では、好酸球の組織内浸潤のみならず、免疫組織学的検討によって肥満細胞 (chymase 陽性細胞、tryptase 陽性細胞) を多数確認した。一方では、血管新生は見られなかった。以上のことから、本症例においては、血管新生と異なる機序、すなわち化学遊走物質による腹膜透過性亢進が推察された。

(5) 慢性腎臓病においてもリンパ管新生が腹膜と同様に線維化とともに進んでいる点、VEGF-C が重要な役割を果たしている点を明らかとし報告した。

(Kidney Int 75; 828-838, 2009 で発表)

#### 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 18 件)

#### すべて査読あり

- 1, Specific collaboration between rat membrane complement regulators Crry and CD59 protects peritoneum from damage by autologous complement activation. Mizuno M, Matsuo S, Ito Y, (9 名中 9 番目), Nephrol Dial Transplant (2011 in press)
- 2, Peritoneal macrophage infiltration is correlated with baseline peritoneal transport rate in peritoneal dialysis patients. Ito Y, (12 名中 2 番目), Mizuno M, Takei Y, Matsuo S, Nephrol Dial Transplant (2011 in press)
- 3, Peritoneal dialysis patient developing myoclonus after dextromethorphan administration. Tanaka A, Nagamatsu T, Ito Y, (12 名中 12 番目) Ann Pharmacother 45; e1, 2011
- 4, Renal impairment after laparoscopic radical nephrectomy affects hypoglycemic therapy. Mizuno M, Ito Y, (12 名中 7 番目) J Clin Pharm Ther (2011 in press)
- 5, Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis patients with high peritoneal solute transport rate. Ito Y, (14 名中 2 番目), Mizuno M, Matsuo S, Am J Physiol Renal Physiol. 298: F721-33, 2010
- 6, Expression patterns of connective tissue growth factor and of TGF- $\beta$  isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. Ito Y, (10 名中 1 番目), Matsuo S, et al., Am J Physiol Renal Physiol. 299: F545-58, 2010
- 7, Pathological changes in chronic eosinophilic peritonitis in peritoneal dialysis patient. Yuzawa Y, Ito Y, (5 名中 2 番目) Mizuno M, Matsuo S, Nephrol Dial Transplant Plus3: 372 - 375, 2010
- 8, Involvement of Connective Tissue Growth Factor in Human and Experimental Hypertensive Nephrosclerosis. Ito Y, (7 名中 1 番目), Matsuo S Nephron Exp Nephrol 117; e9-e20, 2010
- 9, Acute kidney injury presenting a feature of leukemic infiltration during therapy for chronic myelogenous leukemia. Yuzawa Y, Mizuno M, Ito Y, (12 名中 11 番目), Matsuo S Intern Med 49; 1139-42, 2010
- 10, Lymphatic vessels develop during tubulo-interstitial fibrosis. Sakamoto I, Ito Y, (10 名中 2 番目), Mizuno M, Takei Y, Matsuo S Kidney Int 75; 828-838, 2009
- 11, Zymosan, but not lipopolysaccharide, triggers severe and progressive peritoneal injury accompanied by complement activation in a rat peritonitis model. Mizuno M, Ito Y, (9 名中 2 番目), Hepburn N, Matsuo S J Immunol. 183; 1403-12, 2009
- 12, Tissue-type plasminogen activator deficiency attenuates peritoneal fibrosis in mice.

Kurata K, Maruyama S, Mizuno M, Ito Y, (13名中11番目), Matsuo S, Am J Physiol Renal Physiol 297: F1510-7, 2009

13, The growth factor midkine regulates the renin-angiotensin system in mice. Hobo A, Yuzawa Y, Ito Y, (13名中8番目), Matsuo S J Clin Invest. 119; 1616-25, 2009

14, Mineralocorticoid receptor blockade ameliorates peritoneal fibrosis in new rat peritonitis model. Nishimura H, Ito Y, (8名中2番目), Mizuno M, Matsuo S, Am J Physiol Renal Physiol. 294; F1084-93, 2008

15, Plasma connective tissue growth factor is an independent predictor of end-stage renal disease and mortality in type 1 diabetic nephropathy. Ito Y, (10名中6番目), Diabetes Care. 31:1177-82, 2008

16, Low circulating CD34+ cell count is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients. Ito Y, (14名中8番目), Matsuo S Kidney Int. 74, 1603-1609, 2008

17, Intrarenal administration of recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates ischaemic acute renal failure. Ozaki T, Ito Y, (10名中7番目), Matsuo S Nephrol Dial Transplant. 23:110-9, 2008

18, High mobility group box chromosomal protein 1 in patients with renal diseases. Sato F, Ito Y, (11名中8番目), Matsuo S. Nephron Clin Pract 108:194-201, 2008

[学会発表] (計8件)

1, Peritoneal macrophage infiltration is correlated with baseline peritoneal transport rate in peritoneal dialysis patients. Ito Y, (12名中2番目), Mizuno M, Matsuo S, The 43<sup>rd</sup> Annual meeting of the American Society of Nephrology 2010 Nov. 11-16, Denver

2, Lymphangiogenesis develops during tubulo-interstitial fibrosis via the TGF- $\beta$ -VEGF-C pathway in rat unilateral ureteral obstruction. Ito Y, (10名中2番目), Mizuno M, Matsuo S, The 43<sup>rd</sup> Annual meeting of the American Society of Nephrology 2010 Nov. 11-16, Denver

3, Therapeutic potential of adipose -derived stem cell for anti-GBM glomerulonephritis. Ito Y, (11名中9番目), Matsuo S. The 43<sup>rd</sup> Annual meeting of the American Society of Nephrology 2010 Nov. 11-16, Denver

4, Association of CD34+ circulating progenitor cells and C-reactive protein with cardiovascular and all-cause mortality in hemodialysis patients. Ito Y, (11名中10番目), Matsuo S. The 43<sup>rd</sup> Annual meeting of the American Society of Nephrology 2010 Nov. 11-16, Denver

5, Lymphangiogenesis develops during tubulo-interstitial fibrosis via the TGF- $\beta$ -VEGF-C pathway in rat unilateral ureteral obstruction. Ito Y, (11名中2番目), Mizuno M, Matsuo S, ISN Nexus meeting 2010 April 15-18, Kyoto

6, Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis patients with high peritoneal solute transport rate. Ito Y, (12名中1番

目), Mizuno M, Matsuo S, The 12<sup>th</sup> European peritoneal dialysis meeting, Strasbourg, France, 2009 Oct 9-13

7, Specific collaboration between rat membrane complement regulators, crry and CD59, protects peritoneum from damage by autologous complement activation in peritoneal dialysis fluid. Mizuno M, Matsuo S, Ito Y, (8名中8番目) The 12<sup>th</sup> European meeting of complement in human disease, Visegrad, Hungary, 2009 Sep 5-8

8, Specific collaboration between rat membrane complement regulators, crry and CD59, protects peritoneum from damage by autologous complement activation in peritoneal dialysis fluid. Mizuno M, Ito Y, (8名中2番目), Matsuo S, The 12<sup>th</sup> International complement workshop, Basel, Switzerland, 2008 Sep 28-Oct 2

国内外の別:

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 恭彦 (YASUHIKO ITO)

名古屋大学・医学系研究科・

腎不全総合治療学寄附講座 教授

研究者番号: 60402632

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし