

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17725

研究課題名(和文)多発性嚢胞腎におけるリンパ管新生の意義の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)The role of lymphangiogenesis in polycystic kidney disease

研究代表者

鬼無 洋(kinashi, hiroschi)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70805275

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)：多発性嚢胞腎におけるVEGF-Cとリンパ管新生の意義を検討した。多発性嚢胞腎マウスモデルである4週齢のJckマウス・Pcyマウスに $1.0-2.5 \times 10^8$  pfuのリンパ管成長因子であるヒトVEGF-Cを発現するアデノウイルスベクター(AdVEGF-C)またはコントロールベクター(AdLacZ)を投与し、8週齢でサクリファイした。しかしながら、腎重量/体重比、腎嚢胞形成、リンパ管発現、血清クレアチニンのいずれにおいても、AdVEGF-C群とAdLacZ群との間に差はみられなかった。ウイルス投与量の再検討と長期的な研究が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性嚢胞腎は最も頻度の高い遺伝性腎疾患であり、両側の腎臓に多数の嚢胞が形成され進行性に腎機能が低下し、最終的に半数以上の患者が透析療法や腎移植を必要とする。原因遺伝子としてPKD1・PKD2が明らかにされ嚢胞形成機序の解明が進んでいるが、未だ有効な治療法は確立されていない。本研究では、ヒト臨床経過に類似した多発性嚢胞腎マウスモデルを用いて、嚢胞形成におけるVEGF-Cとリンパ管新生の意義を検討した。本研究は今後VEGF-Cなどを介したリンパ管発現の制御を、多発性嚢胞腎の新しい治療法として確立するための重要なステップであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of VEGF-C and lymphangiogenesis in polycystic kidney disease (PKD). Four-week-old Jck and Pcy mouse models for PKD received intravenous administration of adenoviral vectors expressing VEGF-C (AdVEGF-C), a major lymphangiogenic factor or -galactosidase (AdLacZ) as a control. Mice were killed at eight weeks old, however, there were no significant differences in the ratio of kidney to body weight, renal cyst formation, lymphangiogenesis, and serum creatinine between AdVEGF-C-treated and AdLacZ-treated groups. Further research will be required for assessing the possible VEGF-C therapy for PKD.

研究分野：腎臓内科

キーワード：多発性嚢胞腎 VEGF-C

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 多発性嚢胞腎は両側腎臓に多数の嚢胞が形成され、正常腎組織を圧迫・占拠することで進行性に腎機能を低下させる遺伝性腎疾患である。これまで有効な治療法が存在せず、半数以上の患者が末期腎不全に至り、2016 年末には 11,000 人以上の患者が慢性透析療法を施行中である。原因遺伝子として PKD1(16p13.3)・PKD2(4q21)の変異が明らかとなり、嚢胞形成機序の解明が進んでいる。近年、パゾプレシン受容体拮抗薬の嚢胞進展抑制効果が動物モデルと臨床試験で報告され、実臨床で使用可能となっている。

(2) リンパ管は、毛細血管から漏出した細胞や蛋白を含む過剰な組織液を再吸収して血液循環に戻す働きを持ち、間質の恒常性を保つ重要な役割を担っている。腫瘍・炎症など様々な疾患において新生リンパ管が発達することが報告され、脈管研究の新しい分野としてリンパ管新生が注目されている。また、血管内皮成長因子 VEGF-C, D とその受容体である VEGFR-3 を介したシグナルが、リンパ管新生の中心的な分子メカニズムとして認知されている。申請者はこれまで、腎疾患及び腹膜透析のリンパ管新生の研究報告を行ってきた<引用文献 >。

(3) 2016 年に、多発性嚢胞腎マウスモデルにおいて、VEGF-C 投与による嚢胞形成抑制効果が報告された<引用文献 >。しかしながら、生後 3 週で腎不全に至るモデルのため、中年以降に腎不全に至る多発性嚢胞腎患者の臨床経過との相違が大きく、また嚢胞形成におけるリンパ管新生の意義は詳細に検討されていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、多発性嚢胞腎患者の臨床経過に近い、複数の多発性嚢胞腎マウスモデルを用いて、嚢胞形成における VEGF-C とリンパ管新生の意義を明らかにすることを目的とした。

(2) VEGF-C を介したリンパ管新生により、多発性嚢胞腎マウスモデルの嚢胞形成が抑制されるかを解明するために、具体的に以下の項目を明らかにすることを目的とした。

多発性嚢胞腎における VEGF-C とリンパ管の発現はどのような傾向にあるか。

多発性嚢胞腎において VEGF-C 投与によりリンパ管新生が促進されるか。

リンパ管新生により嚢胞形成が抑制され、腎不全を予防できるか。

(3) 多発性嚢胞腎の治療において、リンパ管新生を標的とした検討は世界に先駆けた独創的な研究と考えられる。本研究は今後、VEGF-C など介したリンパ管発現の制御を、多発性嚢胞腎の新しい治療法として確立するための重要なステップであると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) 多発性嚢胞腎マウスモデルの嚢胞形成過程とリンパ管発現の解析

ICR 系統を遺伝背景とした Pcy マウスは、生後 3 週で腎皮髄境界の嚢胞形成が明らかとなる。その後、嚢胞形成・拡大が進行し、30 週齢でほとんどの腎組織が嚢胞に置き換わり、最終的に末期腎不全に至る。

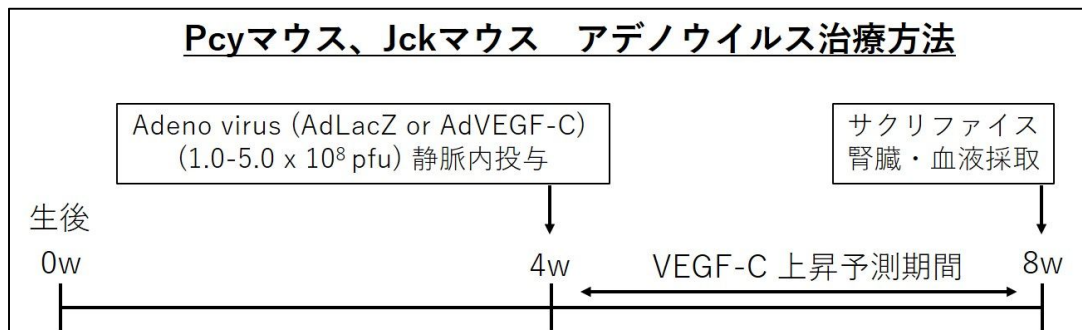
C57BL/6 系統を遺伝背景とした Jck マウスは、生後 4 週で初期の腎嚢胞が観察され、10 週齢で嚢胞形成が明らかとなる。嚢胞形成・拡大が進行し、最終的に末期腎不全に至り、平均 20-25 週で死亡する。

上記の 2 種類のマウスモデルを研究対象とした<引用文献 >。30 週齢までの Pcy マウス、20 週齢までの Jck マウスの両腎組織の嚢胞形成や間質障害を PAS・MT 染色で評価した。また、リンパ管マーカーである LYVE-1 染色によりリンパ管発現を評価した。

(2) アデノウイルスを用いた VEGF-C 過剰発現によるリンパ管新生と嚢胞形成抑制効果の解析  
VEGF-C は主要なリンパ管成長因子である。我々は *in vitro* において、ヒト VEGF-C によるリンパ管内皮細胞の有意なチューブ形成効果を確認した。これらの知見により、ヒト VEGF-C 過剰発現による動物モデルでの有意なリンパ管新生促進効果が期待された。

2 種類のマウスモデルは、生後 3-4 週で嚢胞形成が開始されるため、同時期に治療介入を計画した。正常 C57BL/6 マウスに  $5 \times 10^8$  plaque-forming units (pfu) のヒト VEGF-C を発現するアデノウイルスベクター (AdVEGF-C) を投与したところ、投与後 4 週まで血中ヒト VEGF-C 濃度の有意な上昇が確認された。また 2 種類のマウスモデルは、生後 3-4 週で嚢胞形成が開始される。これらの結果をふまえて、4 週齢の Pcy マウス・Jck マウスに  $1.0 \sim 5.0 \times 10^8$  pfu の AdVEGF-C または -galactosidase を発現するコントロール用のアデノウイルスベクター (AdLacZ) を投与した。投与後 4 週 (8 週齢) でサクリファイスし、マウスの両腎と血液採取を行った (図 1)。LYVE-1 染色によりリンパ管発現を評価し、腎重量比、血清クレアチニン測定、PAS・MT 染色にて嚢胞形成の進行と腎の炎症細胞浸潤・線維化、腎不全の程度を解析し、AdLacZ 群と比較して AdVEGF-C 群で嚢胞形成が抑制され、腎不全が予防されるかを評価した。

【図1】動物実験プロトコール

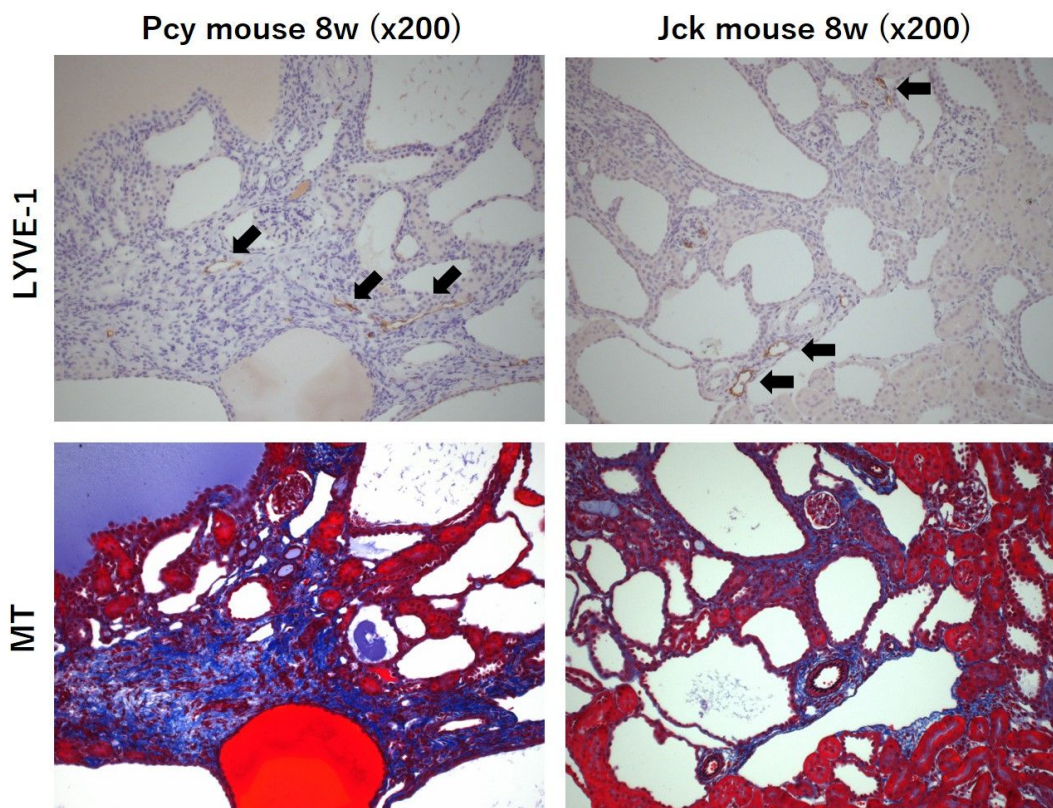


4. 研究成果

(1) Pcy マウス・Jck マウスの嚢胞形成過程とリンパ管発現

Pcy マウス・Jck マウスの腎組織において、腎嚢胞形成・間質障害・リンパ管発現を PAS 染色、MT 染色、LYVE-1 染色にて評価した。Pcy マウス・Jck マウスともに 8 週齢の段階で両腎の顕著な嚢胞形成が観察された。Pcy マウス、Jck マウスともに、LYVE-1 陽性リンパ管発現が間質線維化病変部位を主体に観察された(図2 矢印)。

【図2】8 週齢 Pcy マウス・Jck マウス LYVE-1(リンパ管マーカー)・MT 染色



(2) Pcy マウス・Jck マウスにおけるアデノウイルスを用いた VEGF-C 過剰発現による腎嚢胞形成抑制効果

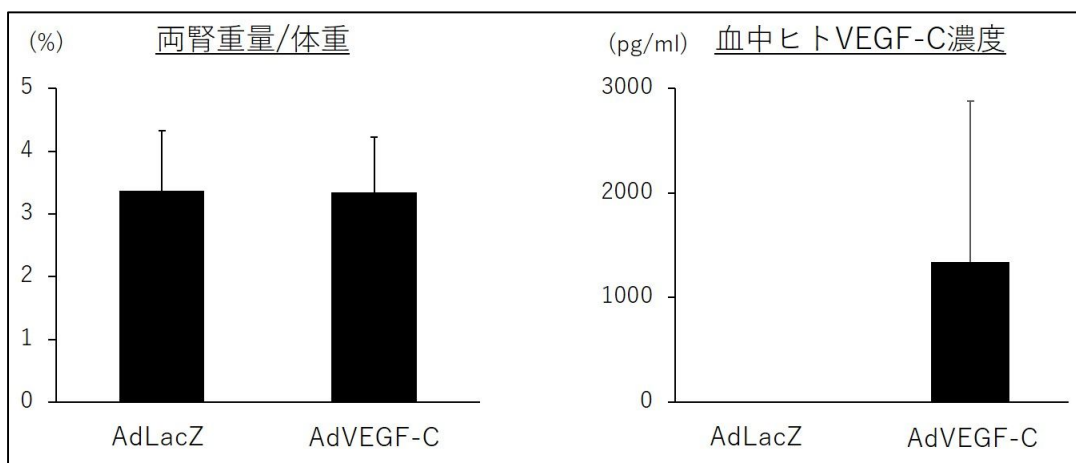
正常 C57BL/6 マウスに  $5 \times 10^8$  pfu の AdVEGF-C を静脈内投与したところ、投与後 4 週まで血中ヒト VEGF-C 濃度が有意に上昇しており、その有効性と安全性を確認した。しかしながら、同じ C57BL/6 系統を遺伝背景とした 4 週齢の Jck マウスに  $5 \times 10^8$  pfu の AdVEGF-C または AdLacZ を静脈内投与したところ、大多数のマウスが投与 1 週間以内に死亡した。そのため、ウイルス投与量を  $1.0-2.5 \times 10^8$  pfu に減量した。 $1.5 \times 10^8$  pfu 以上の AdVEGF-C 投与量にて 8 週齢のサクリファイス時の血中ヒト VEGF-C 濃度の上昇が確認された。しかしながら、両腎重量/体重比、腎嚢胞形成、リンパ管発現のいずれにおいても、AdVEGF-C 群と AdLacZ 群との間に差はみられなかった(図3)。

4 週齢の Pcy マウスに  $1.5-2.5 \times 10^8$  pfu の AdVEGF-C または AdLacZ を静脈内投与し、8 週齢でサクリファイスした。8 週齢の段階で血清クレアチンの上昇はほとんどなく、明らかな腎機能低下はみられなかった。腎重量/体重比、腎嚢胞形成、血清クレアチンのいずれにおいても両群の間に差は見られなかった(図4)。しかしながらサクリファイス時の血中 VEGF-C 濃度上昇がほ

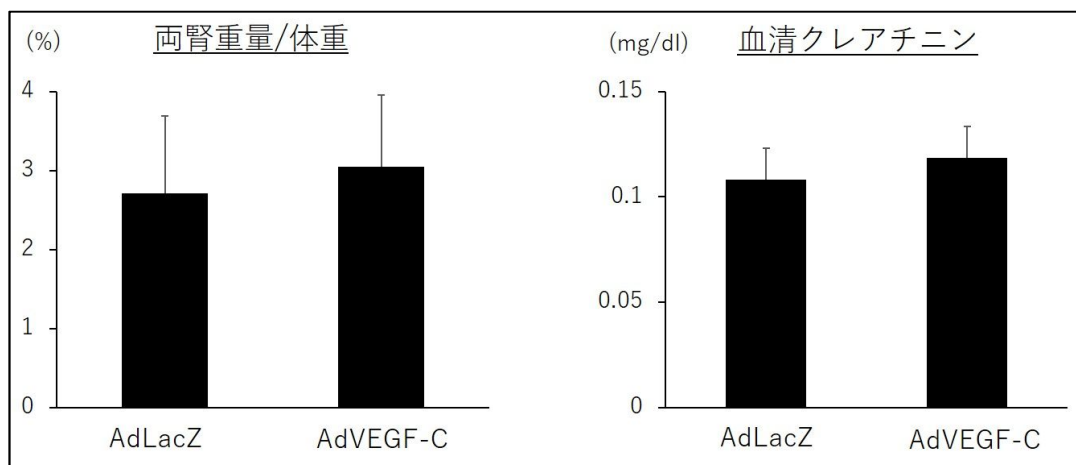
とんど確認できなかったため、ウイルス投与量の再検討が必要と考えられた。

腎不全モデルマウスのためマウス妊孕性の低下があり、実験用マウス個体をそろえるのに時間がかかるため、今後長期的に検討していく必要があると考えられた。

【図3】 Jck マウス 8 週齢検体 アデノウイルスベクター (AdVEGF-C・AdLacZ) 投与後



【図4】 Pcy マウス 8 週齢検体 アデノウイルスベクター (AdVEGF-C・AdLacZ) 投与後



< 引用文献 >

Kinashi H, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Terabayashi T, Nagura F, Hattori R, Matsukawa Y, Mizuno T, Noda Y, Nishimura H, Nishio R, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y. TGF-1 promotes lymphangiogenesis during peritoneal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Oct;24(10):1627-42.

Kinashi H, Falke LL, Nguyen TQ, Bovenschen N, Aten J, Leask A, Ito Y, Goldschmeding R. Connective tissue growth factor regulates fibrosis-associated renal lymphangiogenesis. *Kidney Int*. 2017 Oct;92(4):850-863.

Huang JL, Woolf AS, Kolatsi-Joannou M, Baluk P, Sandford RN, Peters DJ, McDonald DM, Price KL, Winyard PJ, Long DA. Vascular Endothelial Growth Factor C for Polycystic Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Jan;27(1):69-77.

Nagao S, Kugita M, Yoshihara D, Yamaguchi T. Animal models for human polycystic kidney disease. *Exp Anim*. 2012;61(5):477-88.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------