

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590400

研究課題名(和文)血管新生因子による血管障害とその修復に関する病理学的研究

研究課題名(英文)Pathological research on angiogenic growth factors that have the aspects of vascular repair and injury

研究代表者

中野 敏昭 (NAKANO, TOSHIAKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10432931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病の増加に伴い、動脈硬化性疾患は現在でも増加している。血管障害の進行の機序について、血管新生因子の関与を中心に様々な病態で検討した。ApoE欠損マウスにおける検討で、血管新生因子VEGF-AおよびVEGF-Cは動脈硬化病変を増悪させた。また、慢性腎臓病患者の冠状動脈硬化は進行しており、その機序には腎不全による慢性炎症の惹起が関与することを明らかにした。腹膜透析を行う患者の腹膜組織は未熟な血管新生が起こり機能障害に影響していた。腎間質障害に対して、リンパ管新生は組織障害を改善することが示唆された。このように、各種病態により血管新生因子は病態の修復・増悪に影響している。

研究成果の概要(英文)：Atherosclerotic diseases are increasing as lifestyle-related diseases increased. We investigated the mechanisms of vascular impairments with the focus on angiogenic growth factors in several diseases. We revealed that VEGF-A and VEGF-C progressed atherosclerotic lesions of ApoE-KO mice. CKD is associated with an increased risk of coronary heart disease caused by the acceleration of chronic inflammation. In peritoneal dialysis patients, immature angiogenesis in peritoneum is related with peritoneal dysfunction. Lymphangiogenesis in renal cortex may improve interstitial damages in ureteral obstruction mice. From these findings, angiogenic growth factors have the effects of vascular repairs and injuries in various types of diseases.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：人体病理

キーワード：血管新生 動脈硬化 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病としての動脈硬化性疾患である心血管病は、現在なお増加の一途をたどり、日本人の主要な死亡原因である。その病態解明、治療、予防法の確立は、21世紀においてきわめて重要な課題である。近年、難治性血管病である下肢閉塞性動脈硬化症患者に対し血管新生療法が試みられている。一方で、粥状動脈硬化や糖尿病性網膜症等の疾患においては、血管系の無秩序な発達により病勢が促進されることが明らかになり、血管新生には血管病改善と増悪の二面性があることが想定される。

また、生活習慣病の増加により慢性腎臓病患者は急増し、本邦における透析患者は2009年末に29万人以上となり、透析医療費は年間一兆五千万円を超えている。透析導入患者の約60%に冠状動脈病変を合併し、腎不全患者の多くは心血管病で死亡する。近年、慢性腎臓病患者は本邦に約1000万人以上存在することが判明し、腎不全患者の動脈硬化予防は重要な課題の一つである。

生体内における血管新生には「病的ならびに機能的血管新生プロセス」の両面があり、血管新生の病態学的意義を解明するためには疾患の病態生理に則した血管新生機構を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

(1) 「動脈硬化病変における血管新生因子 (VEGF family) の役割」

VEGFが動脈硬化を促進することは、我々(Lab Invest 1996)および他のグループ(Nat Med 2001)から実験的に指摘されているが、そのメカニズムは明らかではない。VEGFのいずれかのシグナルが動脈硬化の増悪に重要かについて、ApoE欠損マウスを用いて実験的に明らかにする。

(2) 「ヒト動脈硬化巣における慢性腎臓病による動脈硬化伸展の機序」

腎不全により動脈硬化が進行する機序を解明するために、ヒト剖検症例の冠状動脈を用いて、形態学的に血管新生による粥腫の促進への影響を検討する。

(3) 「腹膜透析患者における非機能的血管新生による腹膜劣化の検討」

腹膜透析患者の腹膜が毛細血管床の増生により腹膜機能低下を来し、被嚢性腹膜硬化症に発展すると致死性の腹膜障害を来することが知られている。腹膜透析患者の腹膜標本を用いて、腹膜障害と血管新生の成熟性の関連

について検討する。

(4) 「腎障害時におけるリンパ管新生による機能修復」

急増する腎不全患者において、腎臓のリンパ管の機能についてはほとんど検討されていない。腎障害時のリンパ管新生による腎機能障害の改善の検討のために、尿細管間質性腎炎モデルである尿管結紮マウス(UUO)において、リンパ管新生の促進因子VEGF-Cを投与することにより、腎障害の改善を認めるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 「動脈硬化病変における血管新生因子 (VEGF family) の役割」

ApoE欠損マウスは、コレステロール負荷食により高度の動脈硬化巣を来することが知られている。このマウスにおいて以下の実験を遂行する。

- ・ 組み換えヒト蛋白 VEGF-A(VEGF 受容体 1, 2 と結合)、VEGF-C (受容体 2, 3 と結合)、PlGF(VEGF 受容体 1 のみに結合)、VEGF-C 156S (受容体 3 のみに結合) を 2 μg/kg 連日 3 週間腹腔内投与することにより、マウス大動脈における動脈硬化の進行を病理組織学的に確認する。
- ・ VEGFs を投与した際に、骨髄中・血中の内皮前駆細胞および VEGF 受容体 1 陽性単球、VEGF 受容体 3 陽性単球が増加するかフローサイトメトリーを用い測定する。

(2) 「ヒト動脈硬化巣における慢性腎臓病による動脈硬化伸展の機序」

慢性腎臓病と動脈硬化の進行との関係を明らかにするために、剖検例の冠状動脈を採取し病理組織学的に観察を行う。久山町住民の連続剖検症例のうち、死亡3年以内に検診を受けた482名から対象例を126例無作為に選出する。対象例を推定糸球体濾過値(eGFR, ml/min/1.73m²)により、60以上、45-59、30-44、30未満の4群に分類した。各症例の冠状動脈主幹部3カ所を採取する。動脈硬化病変に対し酸化LDL、単球/マクロファージ、VEGFの免疫染色を行い、冠動脈内新生血管は冠動脈内膜内のCD34陽性血管数で評価する。また、内膜内出血の有無について、HE染色、MT染色を用いて検討する。

(3) 「腹膜透析患者における非機能的血管新生による腹膜劣化の検討」

当院病態機能内科および福岡赤十字病院

にて腹膜カテーテル抜去時に腹膜生検を行った 61 症例の腹膜組織を用い、血管内皮細胞(CD34 陽性)、小血管 (SMA 陽性) 週末糖化産物(AGE)に関して免疫染色を行った。単位距離あたりの脈管数を脈管密度として計算し、腹膜機能(D/P Cr4 時間値)との相関について検討した。

(4) 「腎障害時におけるリンパ管新生による機能修復」

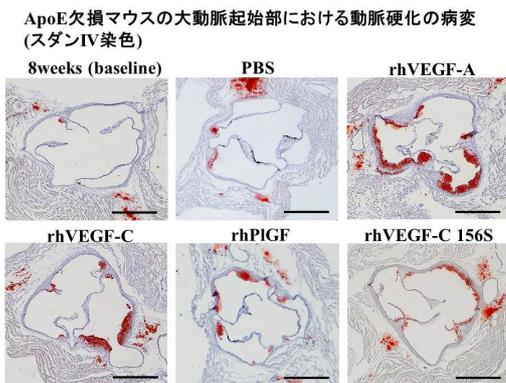
7 週齢の雄性 C57BL6 マウスに UUO 術を施行し、同時に VEGF-C を持続投与した群(VEGF-C 群、n=5)と無投与群(Control 群、n=5)において、リンパ管新生(LYVE-1 染色)、間質線維化(Sirius red 染色)および線維化関連遺伝子発現(Collagen I mRNA、SMA 蛋白)、マクロファージ浸潤(F4/80 染色)を比較検討した。

4 . 研究成果

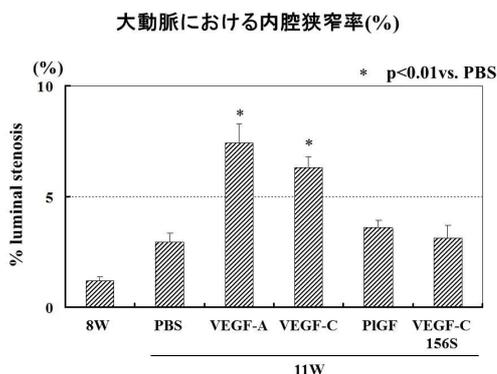
(1) 「動脈硬化病変における血管新生因子(VEGF family)の役割」

動脈硬化モデルにおける VEGF family の動脈硬化進展に与える影響

poE 欠損マウスに対して、組み換えヒト蛋白 VEGF-A)、VEGF-C、PlGF、VEGF-C 156S、を 2 μg/kg 連日 3 週間腹腔内投与することにより、大動脈起始部における粥状硬化病変の進行(スタン IV 染色)を認めた。

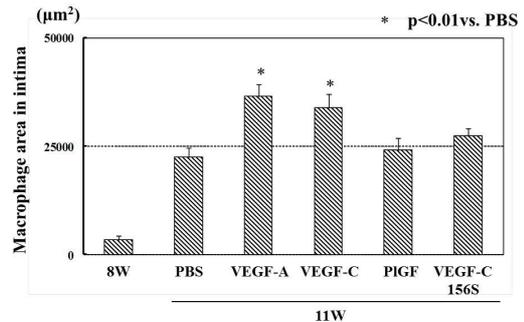


大動脈起始部における内腔狭窄率を計測したところ、VEGF-A 群および VEGF-C 群においてコントロール群(PBS)と比べて有意な内腔狭窄率の上昇を認めた(p<0.01)。



動脈硬化病変において単球/マクロファージに関して免疫染色(F4/80)を行ったところ、VEGF-A 群および VEGF-C 群において有意に単球/マクロファージの浸潤の増加を認めた(p<0.01)。

大動脈における単球/マクロファージの浸潤



また、VEGF-A および VEGF-C による動脈硬化病変の進行には、内膜内での血管新生およびリンパ管新生は認められなかった。

続いて、骨髄由来の内皮前駆細胞や単球/マクロファージの動員を検討するために、血中の内皮前駆細胞および VEGF 受容体 1 陽性単球、VEGF 受容体 3 陽性単球の数をフローサイトメトリー(FACS)を用い測定した。

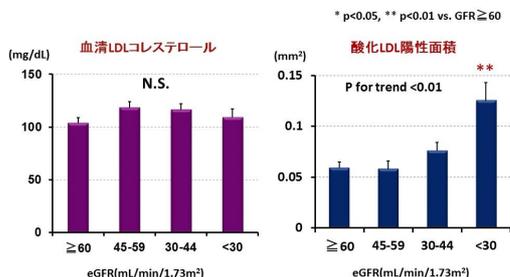
末梢血中の内皮前駆細胞(EPC)は、VEGF-A および VEGF-C 投与により明らかな増加を認めなかった。VEGF 受容体 1 陽性単球、VEGF 受容体 3 陽性単球に関しては、VEGF-A および VEGF-C の投与にて一部増加を認めたが、単球全体の増加には有意差を認めなかった。

これらのことから、VEGF-A および VEGF-C による粥状硬化進行の機序には、血中からの EPC や単球の動員を介さずに、直接的に動脈硬化巣に対して影響を与えることが推定された。

(2) 「ヒト動脈硬化巣における慢性腎臓病による動脈硬化伸展の機序」

脂質の影響に関しては、腎機能低下に伴って、血清 LDL コレステロール値は明らかな増加を認めなかった。これに対して、血管内膜内の酸化 LDL 陽性面積は、GFR の低下とともに有意に増加した(p<0.01)。また、マクロファージ陽性面積に関して、GFR の低下に伴いマクロファージの浸潤面積の増加を認めた(p<0.01)。

腎機能別での血清LDLコレステロール値と冠状動脈内膜内の酸化LDL陽性面積
久山町剖検例375標本、1998-2005年、未調整

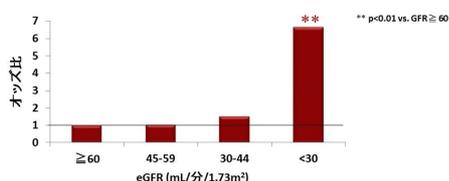


また、冠状動脈内膜内の新生血管数を測定したところ、eGFR 60 以上、45-59、30-44、30 未満の各群における新生血管数の平均は、それぞれ9.5、11.4、15.5、16.3であり腎機能低下により有意に増加した (p<0.01)。また、内膜内出血を来すリスクに関して検討したところ、eGFR 30 未満の群は、60 以上の群と比べ、6.22 倍にリスクが高いことが分かった。

腎機能別での内膜内出血の頻度

eGFR(ml/分/1.73m²)	≥60	45-59	30-44	<30	P for trend
冠状動脈数	107	108	106	53	
内膜内出血のある冠状動脈数	4	5	7	8	0.01

腎機能別での内膜内出血のオッズ比*



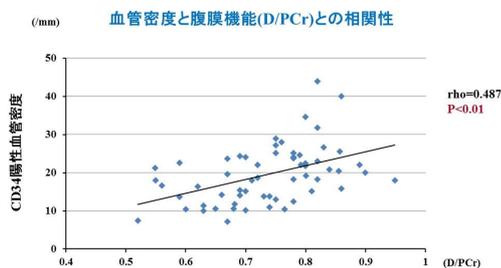
*調整変数: 年齢、性別、高血圧、HbA1c、LDL-C、HDL-C、カルシウム、リン、Hb、喫煙、飲酒。

これらのことから、慢性腎臓病患者の動脈硬化病変には、酸化 LDL の沈着、慢性炎症の促進が認められるため、動脈硬化病変は進行しやすい環境にあり、病的血管新生によるプラーク破裂の危険も高くなることが示唆された。

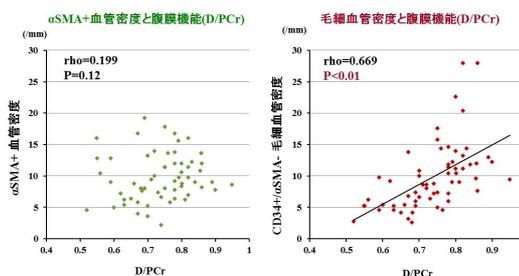
(3) 「腹膜透析患者における非機能的血管新生による腹膜劣化の検討」

肥厚した腹膜組織中の CD34 陽性血管密度と腹膜機能(D/PCr)との間には、正の相関を認めた (p<0.01, rho=0.487)。さらに、CD34 陽性 SMA 陰性の毛細血管密度と D/PCr の間には、強い正の相関を認めた (p<0.01, rho=0.669)。このことは、未熟な血管新生(毛細血管の増生)が腹膜機能の低下と強く相関することを示唆していると考えられた。

PDカテーテル抜去時の脈管密度と腹膜機能(D/PCr)の相関性



PDカテーテル抜去時の脈管密度と腹膜機能(D/PCr)の相関性



腹膜血管における AGE の沈着と毛細血管密度との間に相関を認め、未熟な血管新生の原因に AGE の組織沈着が影響していると考えられた。

PDカテーテル抜去時のAGEの沈着と腹膜機能、脈管新生の相関性

血管におけるAGEの沈着(grade 0~3)

grade	0	1	2	3	p
症例	3	31	20	7	-
男性(%)	66.7	67.7	60.0	85.6	0.7
年齢	51.3	53.3	54.9	55.0	0.5
原疾患(DM)(%)	0	22.6	20.0	0	0.4
CAPD期間(月)	40.3	57.2	71.1	75.0	0.07
腹膜炎回数	2.3	0.9	1.1	1.3	0.9
D/PCr	0.63	0.71	0.75	0.82	0.01
血管密度(CD34)(mm)	19.2	18.8	19.8	22.3	0.3
alphaSMA+血管密度(mm)	11.9	9.8	9.4	9.5	0.5
毛細血管密度(mm)	7.3	9.0	10.4	12.7	0.04

(4) 「腎障害時におけるリンパ管新生による機能修復」

Control 群では経時的にリンパ管増生、VEGF-R3 mRNA 発現亢進、線維化進行、Collagen I mRNA 及び SMA 蛋白の発現亢進、マクロファージ浸潤の増加が認められた。一方、VEGF-C 群では Control 群に比べ、リンパ管増生の亢進傾向、VEGF-R3 mRNA 発現のさらなる亢進(2.18 倍、p<0.05)に伴い、Collagen I mRNA 発現の抑制(0.45 倍、p<0.05)、SMA 蛋白発現の抑制傾向とともに、間質線維化は軽減(0.53 倍、p<0.01)した。

このことより、VEGF-C によるリンパ管新生は、腎間質の炎症と線維化が抑制する効果があると考えられた。

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1件)

Nakano T, Ninomiya T, Sumiyoshi S, Onimaru M, Fujii H, Itabe H, Nakashima Y, Sueishi K, Tsuruya K, Oda Y, Kitazono T, Kiyohara Y.

Chronic kidney disease is associated with neovascularization and intraplaque hemorrhage in coronary atherosclerosis in elders: results from the Hisayama Study. *Kidney Int.* 2013 Aug;84(2):373-80.

[学会発表](計6件)

Nakano T, Mizumasa T, Yoshida H, Eriguchi M, Taniguchi M, Masutani K, Hirakata H, Tsuruya K, Kitazono T

Glucose degradation product methylglyoxal induces immature angiogenesis and peritoneal dysfunction in peritoneal membrane in patients undergoing peritoneal dialysis

American Society of Nephrology, *Kidney Week 2013 Annual Meeting*, Nov. 8, 2013, Atlanta, GA

Nakano T, Ninomiya T, Onimaru M, Tsuruya K, Kiyohara Y, Kitazono T

Calcification is a risk factor for intraplaque hemorrhage in coronary atherosclerosis of patients with chronic kidney disease: the Hisayama Study
American Society of Nephrology, *Kidney Week 2013 Annual Meeting*, Nov. 7, 2013, Atlanta, GA

中野敏昭、水政透、吉田寿子、田中茂、江里口雅裕、升谷耕介、鶴屋和彦、平方秀樹、北園孝成

カルボニルストレスは腹膜の非機能的血管新生と透過性亢進に影響する

第19回日本腹膜透析医学会学術集会・総会
平成25年9月28日、大阪

中野敏昭、水政透、吉田寿子、谷口正智、鶴屋和彦、平方秀樹、北園孝成

腹膜透析中止期における腹膜毛細血管数の腹膜機能への影響

第18回日本腹膜透析医学会学術集会・総会

平成24年9月22日、徳島

Nakano T, Ninomiya T, Onimaru M, Tsuruya K, Kiyohara Y, Kitazono T

The Effect of Kidney Function on Intimal Neovascularization and Intraplaque Hemorrhage in Coronary Atherosclerosis: the Hisayama Study
American Society of Nephrology, *Kidney Week 2011 Annual Meeting*, Nov. 12 2011, Philadelphia, PA

中野敏昭、二宮利治、鬼丸瑞穂、鶴屋和彦、清原裕、北園孝成

腎機能障害による冠状動脈内血管新生と内膜内出血への影響

第54回日本腎臓学会学術総会

平成23年6月17日、横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中野 敏昭 (Nakano Toshiaki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 10432931

(2)研究分担者

鬼丸 満穂 (Onimaru Mitsuho)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：00380626

鶴屋 和彦 (Tsuruya Kazuhiko)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：20372740

谷口 正智 (Taniguchi Masatomo)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：60419562