

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591228

研究課題名(和文) PDの腹膜機能不全、慢性腎臓病に対するリンパ管新生を標的とした新規治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic target of lymphangiogenesis on ultrafiltration failure in PD and on chronic kidney diseases

研究代表者

伊藤 恭彦(ito, yasuhiko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60402632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：適切な体液量管理は、腹膜透析患者の良好な成績を得るために重要である。我々は、ヒト腹膜透析の排液、培養ヒト腹膜中皮細胞、ヒト腹膜組織、さらに腹膜線維化モデルを用いて腹膜透析におけるリンパ管の役割を検討した。今回の研究により、横隔膜を中心として線維化に伴いリンパ管新生が認められ、腹膜傷害時のリンパ管新生が普遍的現象であることを示した。そして、リンパ管新生にはTGF- $\beta$ -VEGF-C pathwayを介する経路があり、リンパ管抑制によって除水量の改善が期待できることが明らかとした。さら横隔膜リンパ管新生において、VEGF-Dも重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Appropriate fluid balance is important for good clinical outcomes and survivals in patients on peritoneal dialysis (PD). We studied the roles of lymphangiogenesis and vascular endothelial growth factor-C and -D (VEGF-C and -D), a potentially important mediator of lymphangiogenesis, in the relationship between peritoneal fibrosis and ultrafiltration failure using human dialysate effluents, human peritoneal tissues, human peritoneal mesothelial cells obtained from spent patient peritoneal dialysates, and rodent peritoneal fibrosis models. We demonstrated that lymphangiogenesis is a common feature, and is developed mainly in the diaphragm. Lymphangiogenesis is associated with fibrosis via the TGF- $\beta$ -VEGF-C pathway, and VEGF-D also plays an important role in the development of lymphangiogenesis. We showed that suppression of lymphatic absorption can improve the net ultrafiltration in PD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腹膜透析 VEGF-C リンパ管 VEGF-D 線維化 除水不全

### 1. 研究開始当初の背景

腹膜透析 (PD) 継続に伴う腹膜透過性亢進、除水機能不全 (UFF) は PD 中止の大きな要因である。PD に伴う腹膜障害は中皮細胞下の線維化と血管新生を特徴とするが、腹膜における血管密度と UFF に関連がないとする報告が複数存在する。これらの報告は UFF の病態に血管新生以外の要因が存在することを示唆する。リンパ管は間質の組織液や細胞、高分子を吸収し体循環に戻すように働いているため、腹膜においてリンパ管新生が進行すれば UFF の一因となることが考えられる。リンパ管新生は腫瘍の転移、炎症性呼吸器疾患、創傷治癒、腎臓移植拒絶などのさまざまな病態において報告されている。我々はヒト慢性腎疾患でリンパ管新生が間質の線維化病変とともに進行することを報告し、また慢性間質障害であるラット片側尿管結紮モデルを用いてリンパ管新生のメカニズムを報告した。

### 2. 研究の目的

腹膜透析における除水機能不全は、腹膜透析中止の主な原因の一つであるだけでなく、生命予後に関わる重要な課題である。これまで腹膜透析患者の腹膜組織においては線維化や血管新生に注目し検討されてきた一方で、リンパ管は体液の吸収、分子輸送に大きな役割を担っているとされつつも詳細な機構については、未だ未解明な部分が多い。本研究ではリンパ管新生とそれに関わる重要な成長因子である VEGF-C, -D の発現についてヒト腹膜組織、ヒト PD 排液、ヒト培養腹膜中皮細胞を用いて検討する。さらに 2 種類の動物腹膜傷害モデル (グルコン酸クロルヘキシジン (CG) モデル、メチルグリオキサール (MGO) モデル) を用い、腹膜傷害においてリンパ管新生が普遍的現象であるかどうかについての検討を行い、リンパ管新生のメカニズムと除水機能不全との関連を検討し、新規治療ターゲットとなるかをみる。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト PD 排液 (n = 130) 中の VEGF-C、-D、TGF- $\beta$ 1 蛋白濃度を ELISA 法にて評価し、腹膜透過性の指標である D/P Cr との関連を検討した。またヒト腹膜組織 (n = 75) 中の VEGF-C、-D、リンパ管マーカーである LYVE-1、podoplanin、VEGFR-3 mRNA 発現を real-time PCR 法、免疫組織化学法を用いて検討した。

(2) ヒト中皮細胞株 (Met-5A)、ヒト PD 排液由来腹膜中皮細胞 (HPMC, n = 29) を用い TGF- $\beta$ 1 による VEGF-C の発現調節を ELISA 法、real-time PCR 法で検討した。また TGF- $\beta$  受容体阻害剤 (LY364947) を用いて抑制試験を施行した。

(3) 8 週齢ラットに 0.04%CG を隔日に腹腔内投与し腹膜障害モデルを作成。Day16 にて腹膜組織を採取し成長因子である TGF- $\beta$ 、VEGF-C の発現とリンパ管マーカーである LYVE-1、podoplanin の発現を免疫組織化学、real-time PCR 法を用いて評価した。また LY364947 を腹腔内投与して TGF- $\beta$  シグナルを抑制し、リンパ管新生に与える変化を検討した。さらに COX-2 阻害剤であるセレコキシブを経口投与してリンパ管新生を抑制し、腹腔に FITC ラベルされた高分子デキストランを投与することで腹膜における新生リンパ管の吸収機能を評価し、その変化を検討した。

(4) MGO モデル、Day22 日において横隔膜・腹膜組織を採取し、それらの新生リンパ管、VEGF-C、-D の発現を上述の方法で検討した。

(5) マウス MGO モデルに対してアデノウイルスベクター s-VEGFR3-Ig (血中の VEGF-C/-D を Trap し受容体 VEGF-R-3 への結合を阻害する) の投与によるリンパ管新生の抑制を行った。またコントロールベクターとしてアデノウイルスベクター-LacZ の投与を行った。横隔膜・腹膜を採取し病理組織における新生リンパ管、炎症細胞、線維芽細胞の発現を評価した。またこれらマウスに対して腹膜機能検査 (従来法) を行い、除水機能などの腹膜機能の変化を検討した。さらに新たなリンパ管機能

評価方法の探索を目的として、イコデキストリンを用いた腹膜機能試験も行った同様の検討を行った。

(6) 線維化に伴うリンパ管新生の意義を検討するために遺伝子改変動物を作成する。Collagen type I  $\alpha 1$  をプロモーター(Dr. Jeremy S. Duffield ワシントン大学より供与)下で線維化に伴い VEGF-C が過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製する。本マウスにおいて線維化とともにリンパ管新生が進むかを検討した。

#### 4. 研究成果

ヒト検体からの結果：ヒト PD 排液中の VEGF-C 濃度は D/P Cr と相関を認め、排液中 TGF- $\beta 1$  濃度とも相関を認めた。UFF および腹膜炎のヒト腹膜組織において VEGF-C、LYVE-1、podoplanin mRNA の発現亢進を認め、これらは腹膜肥厚と相関を認めた。腹膜炎のヒト腹膜組織において VEGF-C は中皮細胞、マクロファージに発現していた。

培養細胞からの結果：培養ヒト中皮細胞株 (Met-5A)において TGF- $\beta 1$  刺激により VEGF-C の発現が増強された。TGF- $\beta$  刺激による VEGF-C 誘導は TGF- $\beta$  受容体阻害剤 (LY364947) により濃度依存的に抑制された。またヒト PD 排液由来腹膜中皮細胞 (HPMC) においても TGF- $\beta 1$  刺激により VEGF-C の発現が増強し、その増加の程度は腹膜透過性の指標である D/P Cr と相関を認め、PD 治療期間とは相関を認めなかった。

モデル動物からの結果：CG モデルにおいて壁側腹膜、横隔膜ともに LYVE-1 染色陽性のリンパ管は増加し、特に横隔膜で強い発現増加を認めた。また CG モデルにおいて TGF- $\beta 1$ 、VEGF-C、LYVE-1、VEGF-C の受容体である VEGFR-3 mRNA 発現の増加を認めた。ヒト腹膜組織と同様に CG モデル横隔膜においても VEGF-C は中皮細胞、マクロファージに発現していた。CG モデルに TGF- $\beta$  受容体阻害剤 (LY364947) を腹腔内投与したところ、線維

化の指標である type3 collagen、 $\alpha$ -SMA の発現低下とともに VEGF-C、LYVE-1 の発現が抑制された。さらに新生リンパ管の吸収機能を検討するために腹腔に FITC ラベルされた高分子デキストランを投与し、FITC-デキストランの横隔膜リンパ管内の発現と血中濃度を評価した。CG モデルに COX-2 阻害剤 (セレコキシブ) を経口投与することで新生リンパ管の発現は低下し、FITC-デキストランの横隔膜での発現と血中濃度が抑制された。

MGO モデル 組織免疫染色を行ったところ、横隔膜において LYVE-1 陽性リンパ管の増生を認めた。一方壁側腹膜には明らかなリンパ管新生は認めなかった。横隔膜と壁側腹膜の双方において VEGF-D の発現亢進を認めしたが、VEGF-C は横隔膜では有意な上昇を認めず、壁側腹膜でのみ上昇を認めた。MGO モデルに対し、アデノウィルスベクター sVEGFR3-Ig を用いたリンパ管新生の抑制実験を行ったところ Day22 においてリンパ管新生の抑制を認めた。またそのリンパ管新生抑制効果は、腹腔内の炎症細胞浸潤が改善した Day50 においても持続していることを確認した。これらのマウスに対し腹膜平衡機能試験 (PET) を実施し、排液量を計測して除水機能の変化につき検討した。その結果、従来法であるグルコース PET では Day22、Day50 の双方において、アデノウィルスベクター sVEGFR3-Ig 投与群、アデノウィルスベクター LacZ 群の間に有意な除水機能変化を認めなかった。Day50 で、新規法であるイコデキストリン PET においては、Day22、Day50 のどちらにおいてもアデノウィルスベクター sVEGFR3-Ig 投与群はアデノウィルスベクター LacZ 群に比べ、有意な除水機能の改善を認めた (それぞれ  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。腹膜透過性を示すパラメータ (D/P クレアチニン、D/D0 グルコース)、血管新生、線維化や炎症細胞浸潤において sVEGFR3-Ig による有意な影響は認められなかった。

VEGF-C Tg マウス: Collagen type I  $\alpha 1$  をプロモーター下で線維化に伴い VEGF-C が過剰発現する 2 種類の発現段階 (高、中等度コピー数をもつ) の VEGF-C Tg マウスを得た。本マウスにおいて腹膜擦過モデルを用いて線維化とともにリンパ管新生が進むことを確認した。今後、慢性腎障害モデルで意義を確認する。

我々は今回の研究により、CG モデル、MGO モデルともにおいて横隔膜主体のリンパ管新生が認められることから、腹膜傷害時のリンパ管新生が普遍的現象であることが明らかとなった。CG モデル実験からリンパ管新生には TGF- $\beta$  - VEGF-C pathway を介する点、リンパ管抑制によって除水量の改善が期待できることを見出し、PD の除水不全に対する新規治療標的となることを明らかにした (J Am Soc Nephrol 24: 1627-42, 2013 で報告)。また、MGO モデルにおけるリンパ管新生では、主に VEGF-D が重要な役割を果たしていることを明らかにした (投稿中)。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Y Sei, M Mizuno, Y Suzuki, M Imai, K Higashide, C L Harris, F Sakata, D Iguchi, M Fujiwara, Y Kodera, S Maruyama, S Matsuo, Y Ito  
Expression of membrane complement regulators, CD46, CD55 and CD59, in mesothelial cells of patients on peritoneal dialysis therapy.  
Mol Immunol. 査読有 2015 Jun; 65(2): 302-9. doi:10.1016/j.molimm.2015.02.005
2. Y Ito, M Mizuno, Y Suzuki, H Tamai, T Hiramatsu, H Ohashi, I Ito, H Kasuga, M Horie, S Maruyama, Y Yuzawa, T Matsubara, S Matsuo, Nagoya Spiro Study Group  
Long-Term Effects of Spironolactone in Peritoneal Dialysis Patients J Am Soc Nephrol. 査読有 2014 May; 25(5): 1094-102. doi: 10.1681/ASN.2013030273. pubmed:24335969
3. H Kinashi, Y Ito, M Mizuno, Y Suzuki, T Terabayashi, F Nagura, R Hattori, Y Matsukawa, T Mizuno, Y Noda, H Nishimura, R Nishio, S Maruyama, E Imai, S Matsuo, Y Takei  
TGF- $\beta$  1 Promotes Lymphangiogenesis during Peritoneal Fibrosis  
J Am Soc Nephrol. 査読有 2013 Oct; 24(10):1627-42. doi:10.1681/ASN.2012030226. pubmed23990681
4. T Mizuno, M Mizuno, M Imai, Y Suzuki, M Kushida, Y Noda, S Maruyama, H Okada, N Okada, S Matsuo, Y Ito  
Anti-C5a complementary peptide ameliorates acute peritoneal injury induced by neutralization of C5a and CD59  
Am J Physiol Renal Physiol. 査読有 2013 Dec1;305(11):1603-16 doi: 10.1152/ajprenal.00681.2012. pubmed 23904221
5. R Takahashi, Y Ito, H Takahashi, H Ishii, H Kasuga, M Mizuno, Y Suzuki, Y Yuzawa, S Maruyama, T Murohara, E Imai, S Matsuo  
Combined values of serum albumin, C-reactive protein and body mass index at dialysis initiation accurately predicts long-term mortality.  
Am J Nephrol. 査読有 2012;36(2):136-43 pubmed22813921
6. Y Suzuki, Y Ito, M Mizuno, H Kinashi, A Sawai, Y Noda, T Mizuno, H Shimizu, Y Fujita, K Matsui, S Maruyama E Imai, S Matsuo, Y Takei.  
Transforming growth factor- $\beta$  1 induces vascular endothelial growth factor-C

expression leading to lymphangiogenesis in rat unilateral ureteral obstruction.

Kidney Int. 査読有 2012 May. 81(9): 865-879 doi: 10.1038/ki.2011.464

7. M Mizuno, Y Ito, T Mizuno, Y Suzuki, CL Harris, N Okada, S Matsuo, BP Morgan  
Membrane complement regulators protect against fibrin exudation in a severe peritoneal inflammation model in rats.  
Am J Physiol Renal Physiol. 査読有 2012 May;302(10):F1245-F1251 doi: 10.1152/ajprenal.00652.2011.

[学会発表](計 3 件)

1. Lymphangiogenesis develops during peritoneal fibrosis in rat peritonitis models  
T Terabayashi, Y Ito, H Kinashi, M Mizuno, Y Suzuki, F Sakata, T Tomita, M Tawada, Y Sei, D Iguchi, S Matsuo  
The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology, May14-17 2014(東京都港区、品川プリンスホテル)
2. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 Can Be a New Target to Improve Ultrafiltration Dysfunction in Methylglyoxal-Induced Peritoneal Injury  
T Terabayashi, Y Ito, M Mizuno, Y Suzuki, H Kinashi, F Sakata, S Maruyama, Y Takei, S Matsuo  
American Society of Nephrology Kidney Week 2014, Nov11-16 2014(Pennsylvania, USA)
3. Transforming growth factor-1 promotes lymphangiogenesis during peritoneal fibrosis  
H Kinashi, Y Ito, M Mizuno, Y Suzuki,

T Terabayashi, F Nagura, S Maruyama, E Imai, S Matsuo, Y Takei

6<sup>th</sup> International Society for Peritoneal Dialysis-Asia Pacific Chapter Meeting, Sep 27-29 2013(Taipei Taiwan)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 恭彦 (ITO YASUHIKO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授  
研究者番号：60402632

### (2)研究分担者

水野 正司 (MIZUNO MASASHI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授  
研究者番号：20303638  
鈴木 康弘 (SUZUKI YASUHIRO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附座助教  
研究者番号：20584676  
武井 佳史 (TAKEI YOSHIFUMI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：70362233  
松尾 清一 (MATSUO SEIICHI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70190410