

リンパ管新生の腹膜透析除水不全における役割について

伊藤恭彦*^{1,2} 鬼無 洋*² 水野正司*^{1,2} 鈴木康弘*^{1,2} 坂田史子*² 寺林 武*²
松尾清一*²

*1 名古屋大学大学院医学系研究科腎不全総合治療学 *2 同 腎臓内科

key words : 腹膜透析, VEGF-C, TGF- β , リンパ管, 除水不全

要 旨

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。今日まで, PD におけるリンパ管の役割として透析液吸収に関与することが知られていたが, 腹膜透過性亢進時のリンパ管の関与に関する検討はほとんどない。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 vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) について, ヒト腹膜組織, PD 排液, 培養中皮細胞, 排液中の中皮細胞を用いて検討, さらに動物モデルを用いてリンパ管新生について検討した。排液中 VEGF-C 濃度は, 腹膜透過性・TGF- β と相関した。UFF の腹膜組織では VEGF-C, リンパ管新生マーカーの上昇を確認し, その程度は線維化と相関することを確認した。培養腹膜中皮細胞, マクロファージにおいて, transforming growth factor- β (TGF- β) が VEGF-C の発現を誘導することで線維化との関連性を確認した。クロルヘキシジンモデルにおいて, リンパ管新生が線維化とともに進行, TGF- β 受容体阻害剤によって抑制され, 腹膜線維化がリンパ管新生の大きい要因であることを示した。さらにこのリンパ管新生を抑制することで, 腹腔内に投与したデキストランの吸収が阻害されることを明らかにした。以上より, 腹膜線維化とともに UFF が進むさい, TGF- β -VEGF-C pathway によ

りリンパ管新生が進行し, PD 除水不全の一因となることが明らかとなった。

はじめに

腹膜透過性亢進, 除水機能不全 (UFF) は, 腹膜透析 (PD) 離脱の大きな原因となっている¹⁾。PD に伴う腹膜傷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^{2,3)}。

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 の発現について, ヒト腹膜組織, ヒト PD 排液を用いて検討した。また培養腹膜中皮細胞を用いて線維化の主要な成長因子である TGF- β 1 刺激による VEGF-C 発現の誘導を検討した。膜線維化

とリンパ、さらにグルコン酸クロルヘキシジン (CG) を用いたラット腹膜障害モデルを用いて腹管新生の関連について検討した。

1 方法

ヒト PD 排液 (n=130) 中の VEGF-C, TGF- β 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, リンパ管マーカーである lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1), podoplanin mRNA 発現を real-time PCR 法を用いて評価し、腹膜障害との関連を検討した。さらにヒト腹膜組織における VEGF-C の発現を免疫組織化学法を用いて検討した。ヒト研究は名古屋大学倫理委員会 (承認番号 298.299) の承認下で実施した。

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- β 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- β 受容体阻害剤 (LY 364947) を用いて抑制試験を施行した。

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した。Day 16 にて腹膜組織を採取し、成長因子である TGF- β , 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 TGF- β 受容体阻害剤 (LY 364947) を腹腔内投与して TGF- β 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 dextran 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。

2 結果と考察

ヒト PD 排液中の VEGF-C 濃度は D/P Cr と相関を認め (図 1 A, C), 排液中 TGF- β 1 濃度とも相関を認め

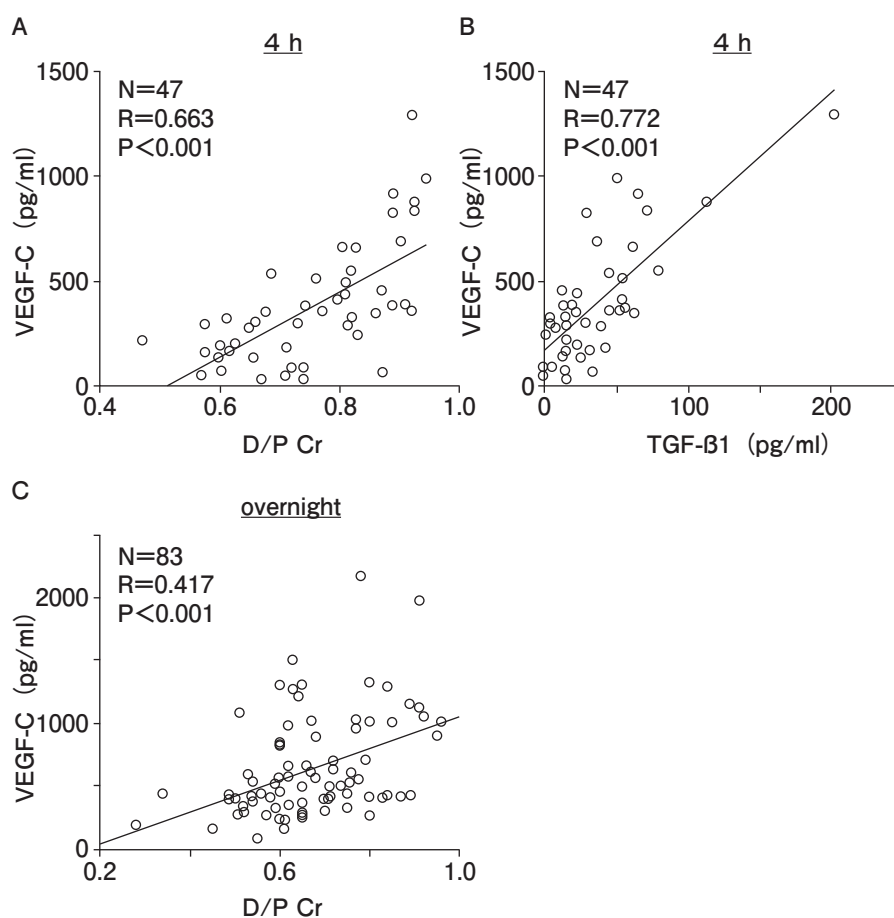


図1 VEGF-C 濃度と D/P Cr との関係

腹膜透析患者の排液中 VEGF-C 濃度は、排液中 TGF- β 1 濃度と、腹膜透過性 D/P Cr と相関する。

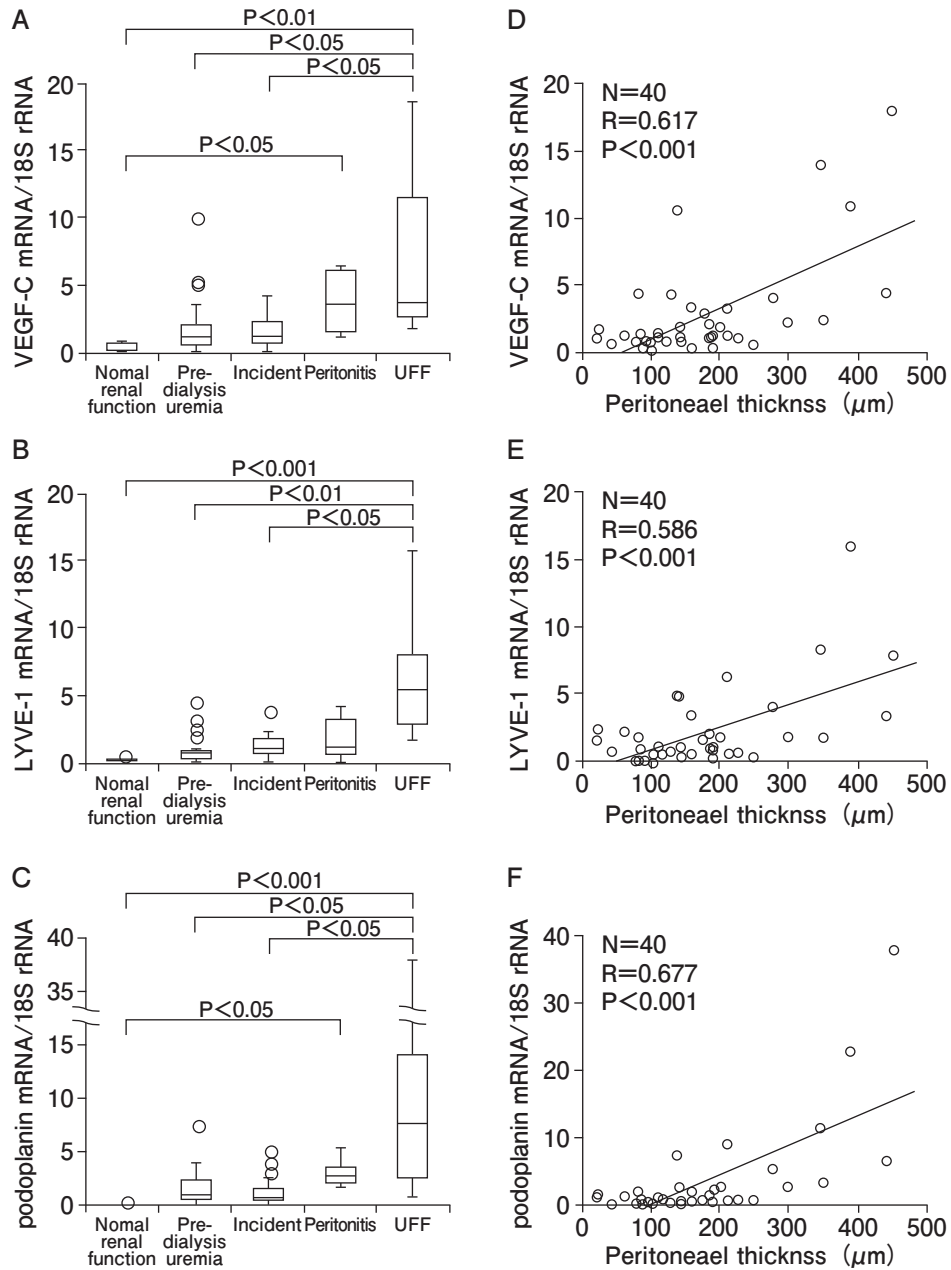


図2 ヒト腹膜生検組織の VEGF-C, LYVE-1, podoplanin の発現
ヒト腹膜生検組織中の VEGF-C, LYVE-1 および podoplanin mRNA の発現は、腹膜除水不全と腹膜の肥厚で上昇している。

た (図 1 B). UFF および腹膜炎のヒト腹膜組織において VEGF-C, LYVE-1, podoplanin mRNA の発現亢進を認めた (図 2 A~C). またヒト腹膜組織中の VEGF-C, LYVE-1, podoplanin mRNA 発現は腹膜の厚さと相関を認めた (図 2 D~F). 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。

培養ヒト中皮細胞株 (Met-5A) において、TGF-β1 刺激により VEGF-C の発現が増強された (刺激 6 時間 P<0.05, 12 時間 P<0.001, 24 時間 P<0.001). TGF-β

刺激による VEGF-C 誘導は、TGF-β 受容体阻害剤 (LY 364947) により濃度依存的に抑制された (阻害剤 0.1 μM P<0.01, 5 μM P<0.001, 20 μM P<0.001). またヒト PD 排液由来腹膜中皮細胞 (HPMC) においても、TGF-β1 刺激により VEGF-C の発現が増強し (図 3 A, B), 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 (図 3 C), PD 治療期間とは相関を認めなかった (図 3 D).

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

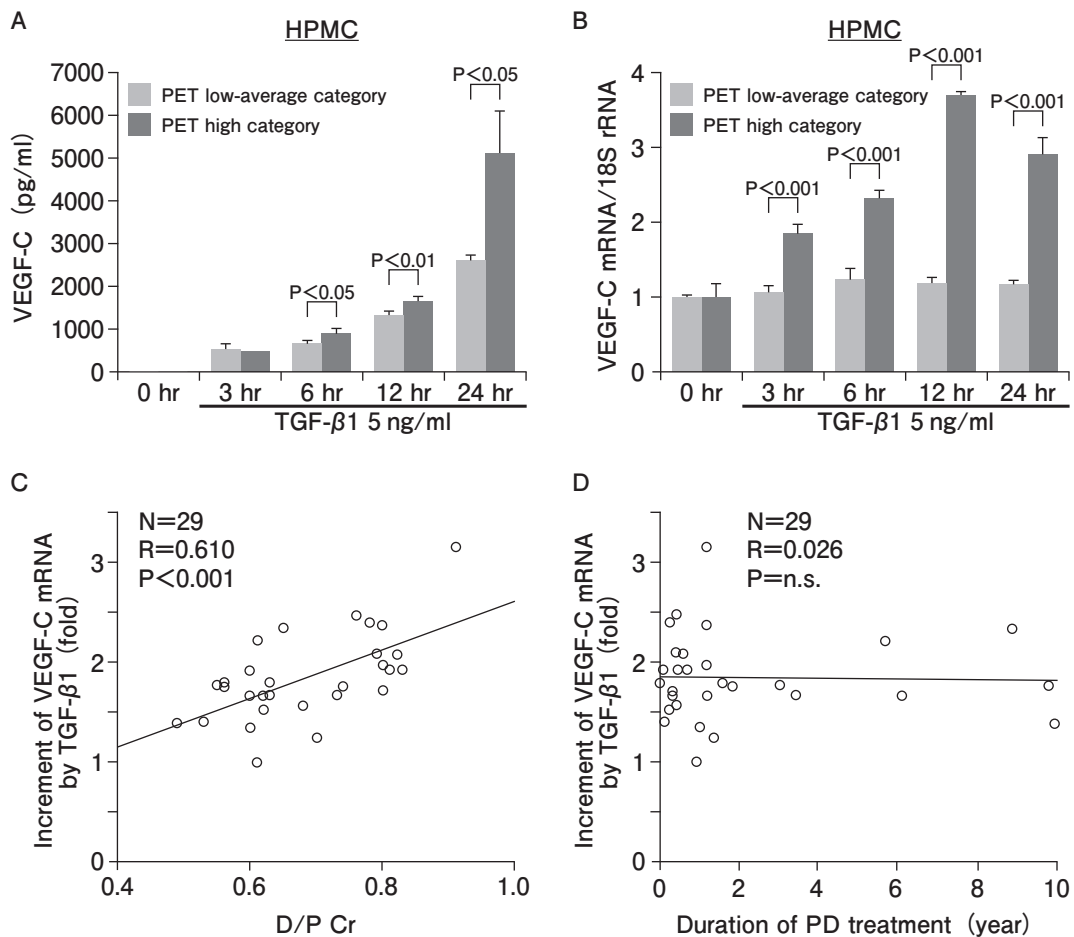


図3 PD 排液から培養した中皮細胞の VEGF-C 発現

ヒト（患者）の PD 排液から採取・培養した中皮細胞の VEGF-C 発現は、腹膜透過性 D/P Cr と相関する。

強い発現増加を認めた。また CG モデルにおいて TGF-β1, 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 T に GF-β 受容体阻害剤 (LY 364947) を腹腔内投与したと、線維化の指標である type 3 collagen, αSMA の発現低下とともに VEGF-C, LYVE-1 の発現が抑制された (図 4)。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 dextran を投与し、FITC-dextran 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-dextran の横隔膜での発現と血中濃度 (未治療群 59.0 ± 8.5 ($\mu\text{g/ml}$), 治療群 30.0 ± 18.3 ($\mu\text{g/ml}$), $P < 0.01$) が抑制された。

PD における除水量は、透析液浸透圧による毛細血管を介した除水量とリンパ管吸収量の差である⁴⁾。臨

床研究において、短期 PD 治療患者の UFF におけるリンパ管吸収の重要性が報告されているが、UFF や腹膜炎患者のリンパ管新生の病理、メカニズムなどの詳細についてはこれまでほとんど報告されていない。

本研究において、ヒト PD 排液中の VEGF-C 濃度は腹膜透過性と相関し、また UFF および腹膜炎患者の腹膜組織中の VEGF-C, リンパ管マーカー mRNA の発現が増加していたことより、腹膜透過性の亢進した患者においてリンパ管新生が進行していることが考えられた。また VEGF-C は腹膜において少なくとも中皮細胞、マクロファージに発現することがわかり、腹膜中皮細胞において TGF-β1 が VEGF-C の発現を誘導することが明らかとなった。

我々はマクロファージにおいても同様の結果を得て過去に報告している³⁾。化学的に炎症と線維化を惹起した CG モデルにおいて、腹膜の線維化とともにリンパ管新生が進行していた。TGF-β 受容体阻害剤を投与して TGF-β シグナルを抑制したところ、線維化の軽

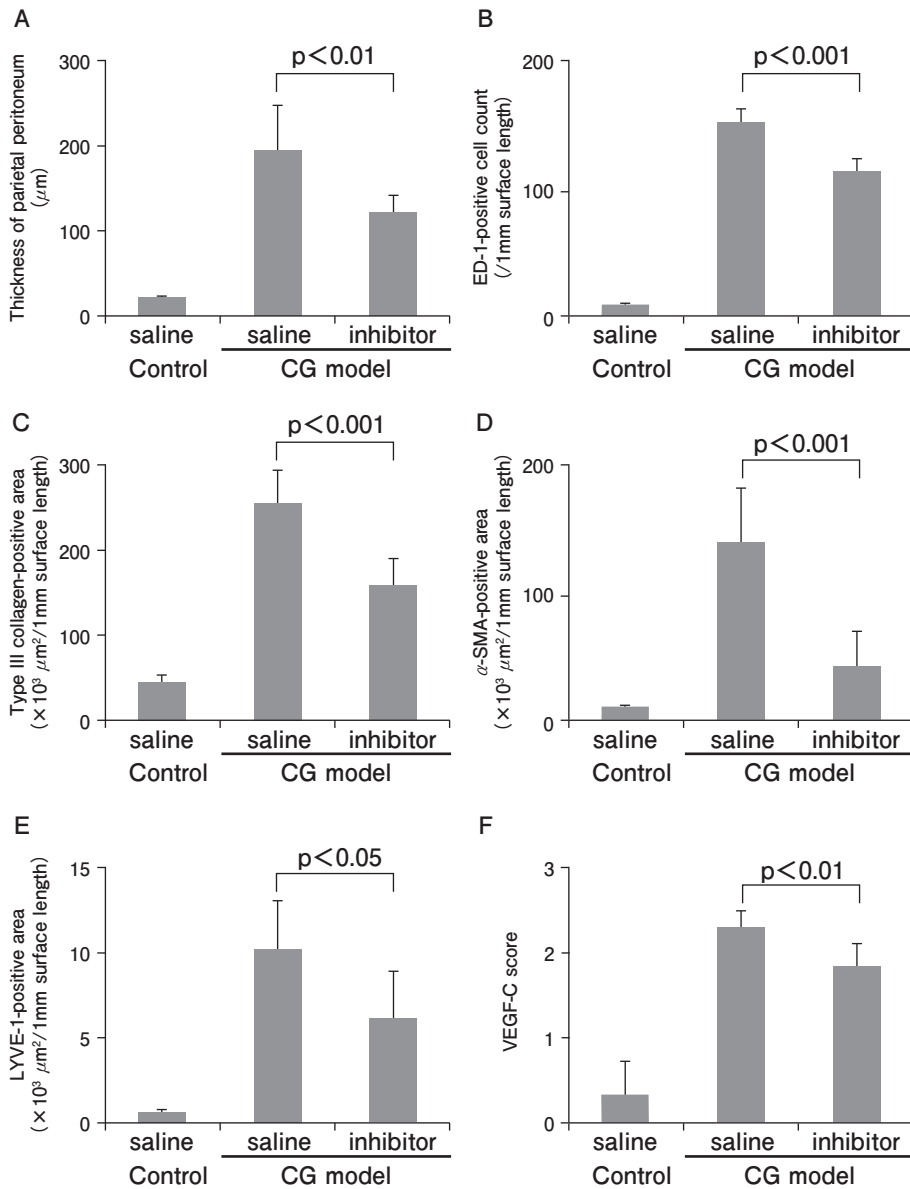


図4 CGモデルにおける免疫染色の半定量評価

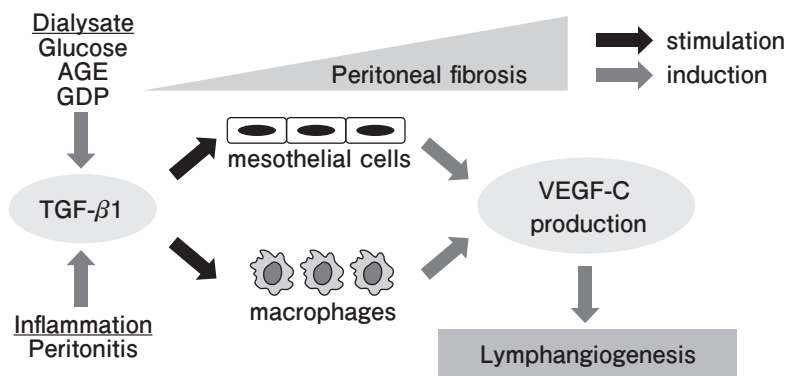


図5 我々が提唱する腹膜透析における腹膜線維化とリンパ管新生のメカニズム

減とともに VEGF-C の発現とリンパ管新生が抑制された。このことより、腹膜におけるリンパ管新生は TGF-β と VEGF-C の発現に強く関連すると考えられ

た。

PD 患者では、透析液由来のグルコースやグルコース分解産物、最終糖化産物などの暴露や腹膜炎などに

より、PD 排液中の TGF- β 1 濃度が上昇することが知られている^{5~7)}。腹膜線維化の進行とともに、TGF- β 1 が腹膜中皮細胞やマクロファージにおける VEGF-C 産生を誘導し、リンパ管新生が進行する TGF- β -VEGF-C pathway の存在が考えられた⁸⁾(図 5)。CG モデルの腹腔に FITC-dextran を投与した評価では、リンパ管新生の抑制により FITC-dextran の血中濃度が低下しており、新生リンパ管が PD の除水に関与していると推察された。今後 PD において、リンパ管新生を抑制することで UFF が改善されるかさらに検討していく必要があると思われた。

結 論

腹膜線維化とともに TGF- β -VEGF-C pathway を介し、リンパ管新生が進行することが明らかとなった。

この研究は、平成 23 年度日本透析医会公募研究助成によるものである。

本研究内容は、文献 8 として発表した。

文 献

- 1) Mizuno M, Ito Y, Tanaka A, et al. : Peritonitis is still an important factor for withdrawal from peritoneal dialysis therapy

- in the Tokai area of Japan. Clin Exp Nephrol, 15; 727-737, 2011.
- 2) Sakamoto I, Ito Y, Mizuno M, et al. : Lymphatic vessels develop; during tubulointerstitial fibrosis. Kidney Int, 75; 828-838, 2009.
- 3) Suzuki Y, Ito Y, Mizuno M, et al. : Transforming growth factor- β induces vascular endothelial growth factor-C expression leading to lymphangiogenesis in rat unilateral ureteral obstruction. Kidney Int, doi : 10. 1038/ki. 2011464, 2012.
- 4) Mactier RA, Khanna R, Twardowski Z, et al. : Contribution of lymphatic absorption to loss of ultrafiltration and solute clearances in continuous ambulatory peritoneal dialysis. J Clin Invest, 80; 1311-1316, 1987.
- 5) Kang DH, Hong YS, Lim HJ, et al. : High glucose solution and spent dialysate stimulate the synthesis of transforming growth factor-beta1 of human peritoneal mesothelial cells : effect of cytokine costimulation. Perio Dial Int, 19; 221-230, 1999.
- 6) De Vriese AS, Tilton RG, Mortier S, et al. : Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. Nephrol Dial Transplant, 21; 2549-2555, 2006.
- 7) Lai KN, Lai KB, Lam CW, et al. : Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis, 35; 644-652, 2000.
- 8) Kinashi H, Ito Y, Mizuno M, et al. : TGF- β 1 Promotes Lymphangiogenesis during Peritoneal Fibrosis. J Am Soc Nephrol, 24; 1627-1642, 2013.