

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (VEGFR-3) が、メチルグリオキサール惹起腹膜障害の腹膜機能不全の新たな治療ターゲットとなる

伊藤恭彦 寺林 武 水野正司 鈴木康弘 鬼無 洋 坂田史子 多和田光洋 富田貴子
丸山彰一 松尾清一

名古屋大学大学院医学系研究科腎不全システム治療学，腎臓内科

key words : VEGF-D, リンパ管新生, リンパ管吸収, イコデキストリン

要 旨

我々は、すでにリンパ管新生が線維化進行に伴い発現することを見出し報告している。今回の研究では、メチルグリオキサール惹起性腹膜障害モデルを用い、腹腔内の炎症に伴いリンパ管新生が生じること、さらにこの腹膜障害モデルに対し、VEGFR-3 を介すシグナル伝達を阻害すると除水機能が改善することを明らかにした。これらより、VEGFR-3 がリンパ管吸収を抑制し腹膜透析の除水を増加させるための新たな治療標的となりうることを示した。

緒 言

最適な体液バランスの維持は、腹膜透析におけるクリニカルアウトカムと生命予後において重要であり、除水機能不全は腹膜透析中止の主な原因の一つである^{1,2}。腹膜透析患者の腹膜障害の病理学的特徴は線維化や細胞外基質の沈着、血管新生である³。

我々は腹膜障害におけるリンパ管新生に着目し、リンパ管新生およびリンパ管成長因子の一つ vascular endothelial growth factor (VEGF-C) の発現が腹膜線維化と関連していることを、ヒト腹膜組織、腹膜透析排液、排液由来細胞、グルコン酸クロルヘキシジン惹起性腹膜傷害動物モデルを用いた検討により明らかにした⁴。しかしながら、リンパ管新生が腹膜透析の機能に及ぼす影響については議論の余地があり、またリ

ンパ管機能の評価方法も確立されていない。本研究では、VEGF-C/-D の受容体でありリンパ管内皮に発現する分子 vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) が、腹膜透析における除水機能不全に対する新たな治療標的となりうる可能性、およびリンパ管吸収の評価方法を検証する。またヒト検体におけるリンパ管新生において VEGF-D 発現についても検討を行った。

1 対象および方法

- ① 10 週齢マウス (C57BL/6J) に対し、メチルグリオキサール含有腹膜透析液の腹腔内投与により腹膜傷害^{5,6}を惹起し、Day 22 における横隔膜および壁側腹膜の病理学的変化につき検討した。また採取組織中のリンパ管マーカー lymphatic endothelial vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1), VEGFR-3 の発現および成長因子である VEGF-C/-D mRNA の発現レベルを real-time PCR 法を用い評価した。
- ② 上記メチルグリオキサール惹起性腹膜傷害モデルに対し、アデノウイルスベクター soluble-VEGFR-3-Ig⁷⁻⁹ (sVEGFR-3: 生体内の VEGF-C/-D をトラップすることにより VEGFR-3 への結合を阻害する)、もしくはアデノウイルスベクター LacZ (コントロールベクター) を投与してリンパ管新生の抑制効果について検討した。Day 22, Day 50

Vascular Endothelial Growth factor receptor-3 is a novel target to improve net ultrafiltration in methylglyoxal-induced peritoneal injury

Department of Nephrology and Renal Replacement Therapy, Nagoya University Graduate School of Medicine

Yasuhiko Ito

Takeshi Terabayashi

Masashi Mizuno

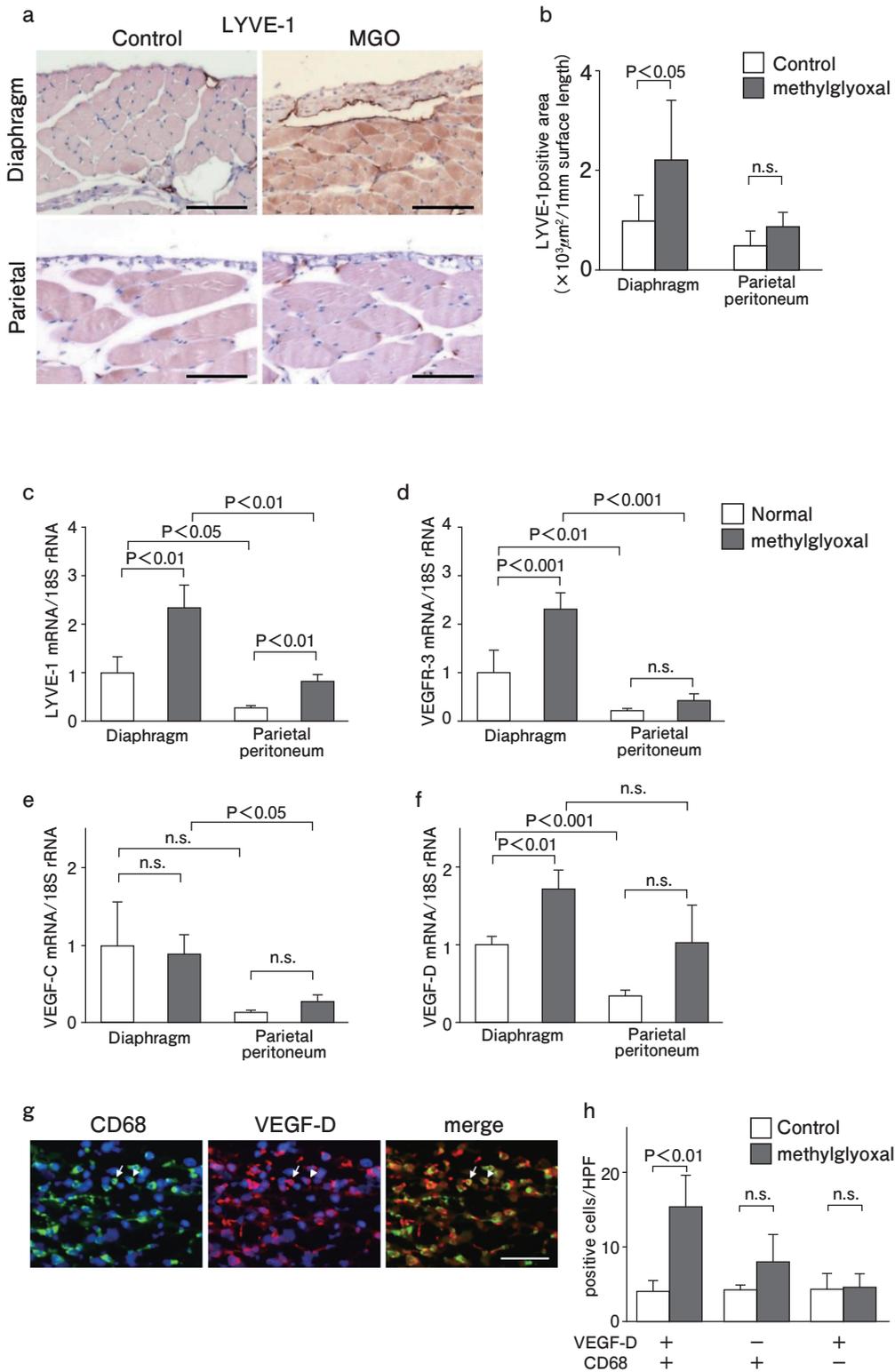


Figure 1 メチルグリオキサール惹起性腹膜傷害モデルの横隔膜において LIVE-1 陽性リンパ管の増生と拡張を認める (a) LYVE-1 免疫組織染色像 スケールバー, 100 μm ., (b) LYVE-1 陽性エリアの定量, (c~f) 定量 PCR による解析, (g, h) 横隔膜組織の二重染色 (VEGF-D, CD68) による解析 スケールバー, 50 μm .

に横隔膜および壁側腹膜組織を採取し, sVEGFR-3 が新生リンパ管, 血管新生, 線維化, 炎症細胞浸潤に対する効果を検証した. またこれらマウスに

対して, ブドウ糖含有透析液, およびイコデキストリン含有透析液を用いた腹膜平衡機能検査を行い, リンパ管吸収機能および腹膜機能に sVEG-

FR-3が与える影響を検証した。

- ③ ヒト腹膜透析患者における腹膜透析排液（4時間貯留排液（n=40）、一晩貯留 [8.95±1.63時間] 排液（n=83）中のVEGF-D濃度をELISA法で定量し、腹膜透過性の指標の一つDialysate/Plasma (D/P) クレアチニン比との相関をSpearmanの順位相関係数を用いて検定した。また、ヒト腹膜組織（n=54）中のVEGF-D、VEGFR-3の発現をreal-time PCR法を用いて検討した。

2 結果

- ① メチルグリオキサール惹起性腹膜傷害モデルに

おいて、主に横隔膜においてLYVE-1陽性リンパ管の増生およびリンパ管マーカーLYVE-1、VEGFR-3 mRNAの有意な増加を認めた (Figure 1 a~d)。また本モデルにおいてはリンパ管新生因子VEGF-Dの有意な発現上昇を認め (Figure 1 e, f)、その発現は主にCD68陽性マクロファージ由来であった (Figure 1 g, h)。

- ② アデノウイルスベクター sVEGFR-3 投与群では、Day 22からDay 50にかけて、リンパ管新生の抑制を認めた (Figure 2 a~c, Figure 3 a~b)。sVEGFR-3はリンパ管新生因子VEGF-C/Dの発現自体には影響を与えなかった (Figure 3 c~e)。

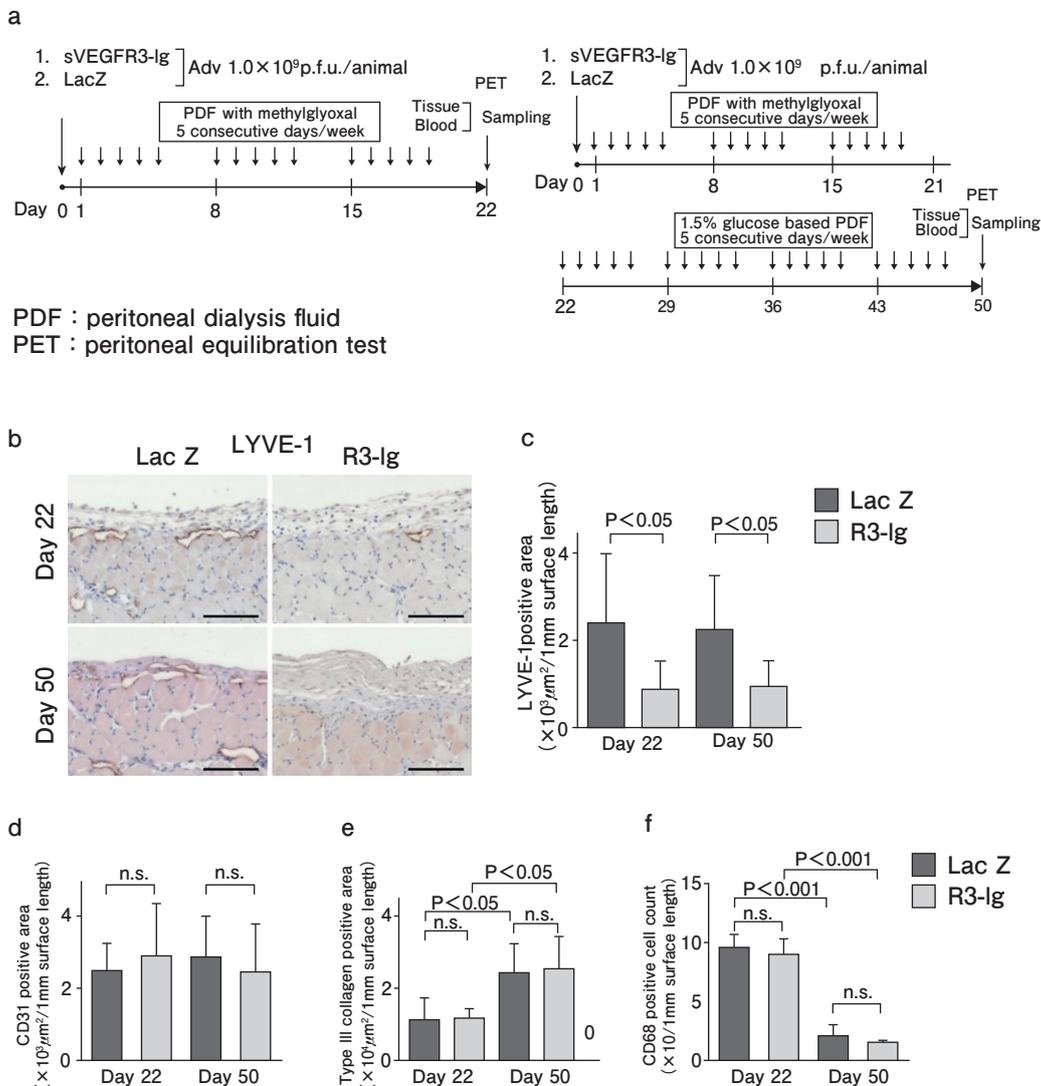


Figure 2 アデノウイルス-sVEGFR-3はLYVE-1陽性リンパ管を抑制したが、CD31陽性血管、type IIIコラーゲン、CD68陽性細胞を抑制しなかった

(a) 動物実験プロトコール (左図: Day 22, 右図: Day 50), (b, c) LYVE-1免疫組織染色像とLYVE-1陽性リンパ管面積の定量 (スケールバー, 100 μm), (d) CD31陽性血管面積の定量, (e) Type-IIIコラーゲン陽性面積の定量, (f) CD68陽性細胞数。

Lac Z: treatment with Adeno-LacZ, R3-Ig: treatment with Adeno-sVEGFR-3-Ig.

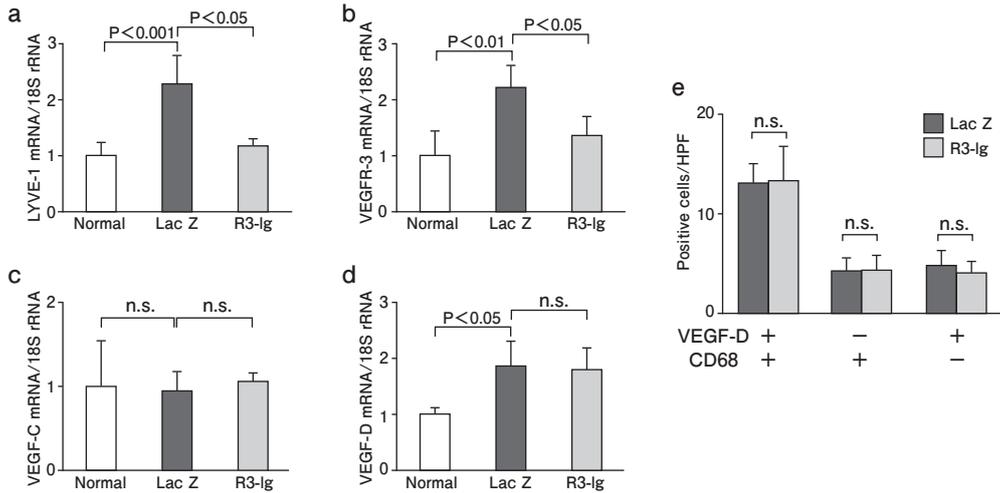


Figure 3 アデノウイルス-sVEGFR-3 はメチルグリオキサルモデルの横隔膜における LIVE-1, VEGFR-3 mRNA の発現を抑制するが, VEGF-C/-D の発現には変化を認めなかった (Day 22) (a~d) 定量 PCR 法での検討, (e) 横隔膜組織の二重染色 (VEGF-D, CD68) による解析.

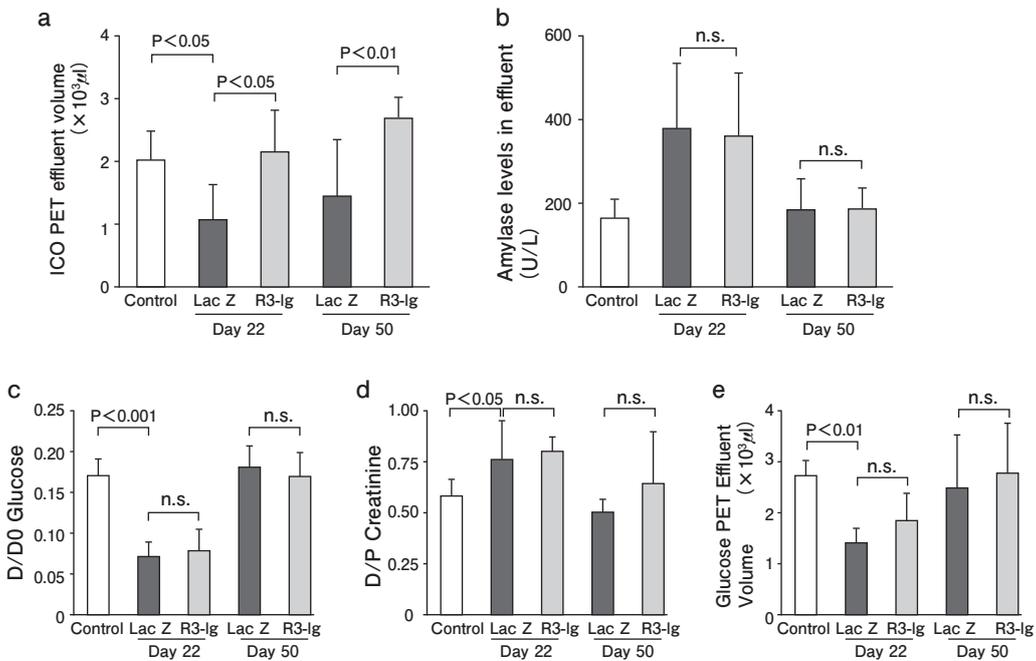


Figure 4 腹膜機能の評価: イコデキストリン含有透析液による腹膜平衡機能試験はリンパ管新生とその抑制状態を明らかにすることができる (a, b) イコデキストリン含有透析液による腹膜平衡機能試験, 排液量 (a) と排液中アミラーゼ濃度 (b) の比較, (c~e) プドウ糖含有透析液による腹膜平衡機能試験, 腹膜透過性 (c, d) と排液量 (e) の比較. Lac Z : treatment with Adeno-LacZ, R3-Ig : treatment with Adeno-sVEGFR-3-Ig.

また sVEGFR-3 は血管新生, 線維化に対し有意な影響を与えなかった (Figure 2 d~e). CD68 陽性マクロファージの浸潤は Day 22 から Day 50 にかけて両群で著明に減少していた (Figure 2 f).

これらのマウスにイコデキストリン含有透析液を用いて腹膜平衡機能試験を実施した結果, Day 22 において, LacZ 群は Control 群に比べて有意

に除水が低下するが, sVEGFR-3 群は LacZ 群に比べて有意な除水機能の改善を認め, また Day 50 においても sVEGFR-3 群は LacZ 群に比べ有意な除水機能の改善を認めた (Figure 4 a). イコデキストリンの加水分解酵素アミラーゼの透析排液中濃度は, Day 22, Day 50 の双方において LacZ 群と sVEGFR-3 の間に有意な変化を認めなかった

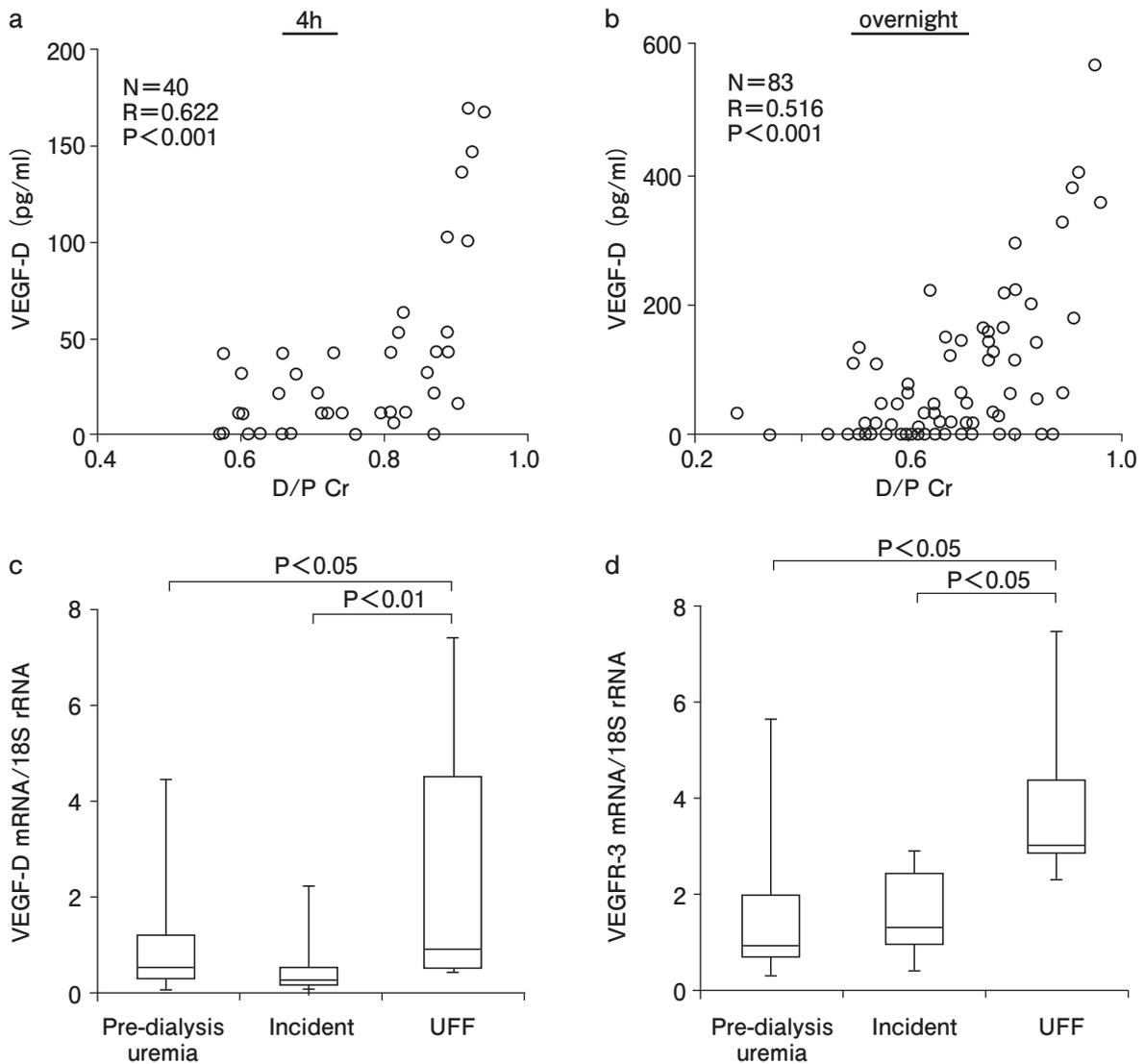


Figure 5 ヒト排液中の VEGF-D 濃度と腹膜透過性 (D/P クレアチニン) は正の相関関係を示す。VEGF-D, VEGFR-3 mRNA の発現は除水不全を有する患者の腹膜生検検体において上昇を示す

(a, b) ヒト腹膜透析排液中 VEGF-D 濃度と D/P クレアチニンの相関, 4 時間貯留排液 (a) と一晚貯留排液 (b), (c, d) 定量 PCR を用いたヒト腹膜生検組織の検討。

Pre-dialysis uremia: 保存期慢性腎不全患者群 (腹膜透析カテーテル導入手術時), Incident: 移植, 出口部感染症, 精神的問題, 手技的問題のため腹膜透析カテーテル抜去となった患者群, UFF: 除水不全を有する腹膜透析患者群

(Figure 4 b). またブドウ糖含有透析液による腹膜平衡機能試験 (従来法) を用いて検証したところ, Day 22, Day 50 の双方において, sVEGFR-3 群での排液量の増加傾向を認めましたが, sVEGFR-3 群と LacZ 群の間に腹膜透過性 (D/P クレアチニン, D/D0 グルコース) の有意な変化を認めなかった (Figure 4 c~e).

③ ヒト腹膜透析排液中の VEGF-D 濃度は腹膜透過性の指標 D/P クレアチニンと正の相関を認めた (Figure 5 a, b). またヒト腹膜組織中の VEGF-D,

VEGFR-3 mRNA の発現は, 除水不全群 (UFF 群) において, それぞれ有意な上昇を認めた (Figure 5 c, d).

3 考察

主要臓器において, リンパ脈管系は体液や大分子を体循環に還す機能を果たしている^{10~12)}. 腹膜透析における実際の除水量は, 「毛細血管からの限外濾過量」と「リンパ管からの再吸収量」の差により決定される¹²⁾ ことより, リンパ吸収を制御することは除水量

を増やすための重要な戦略となる。

我々のグループはすでにクロルヘキシジン惹起性腹膜傷害モデルやヒト検体を用い、リンパ管新生が線維化進行に伴い発現することを見出してこれをすでに報告した⁴⁾。さらに今回の研究では、メチルグリオキサール惹起性腹膜傷害モデルにおいて、炎症に伴いリンパ管新生が生じることを明らかにした。この結果とこれまでの研究から、リンパ管新生が腹膜傷害時の炎症・線維化に伴う普遍的な現象であることを示した。クロルヘキシジンによる腹膜傷害では VEGF-C の発現亢進を認めた一方で、メチルグリオキサールによる腹膜傷害モデルでは、興味深いことに、VEGF-C は有意な上昇を示さずに VEGF-D の発現が有意であった。これらの結果から、VEGF-C/-D 共通の受容体である VEGFR-3 が腹腔内のリンパ管新生に対する最適な治療標的となりうると思った。メチルグリオキサール腹膜傷害モデルに対して、アデノウイルスベクター sVEGFR-3 により VEGFR-3 を介するシグナル伝達を阻害すると、リンパ管新生を特異的に抑制し、除水機能が改善することを明らかにした。この結果より、リンパ管新生は除水不全において重要な役割を果たしていることを示した。イコデキストリンは多糖類の浸透圧物質であり、主にリンパ管を経て腹腔内より消失するとされている^{13,14)}。

本研究において、炎症がある状況下 (Day 22) であっても、イコデキストリン含有透析液による腹膜平衡機能試験は、リンパ管新生とその抑制の状態を判別することができた。一方、グルコース含有透析液を用いた従来法の腹膜平衡機能試験では、アデノウイルス-sVEGFR-3 群で排水量が高めの傾向ではあるものの有意ではなく、リンパ管吸収を反映しにくいと考えられた。しかしながら、ヒト患者においてもこういった方法が適応可能か否かについては、さらなる検討が必要となる。

今回、我々は、ヒト腹膜検体・腹膜透析排液において、VEGF-D 発現が腹膜透過性およびリンパ管マーカー発現と共に上昇していることを初めて報告した。これはヒト腹膜透析患者においても VEGF-D がリンパ管新生に関わっていることを示唆する。

結 語

VEGFR-3 はリンパ管吸収を抑制し、腹膜透析の除

水を増加させるための新たな治療標的となることを明らかにした。

本論文は、日本透析医学会研究助成 (平成 25 年透医第 25067 号) により行われた研究¹⁵⁾ の報告書である。

文 献

- 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* 2011; 15 : 727-737.
- Kawaguchi Y, Ishizaki T, Imada A, et al. : Searching for the reasons for drop-out from peritoneal dialysis : a nationwide survey in Japan. *Perit Dial Int* 2003; 23(Suppl 2) : S175-177.
- Williams, JD, Craig, KJ, Topley, et al. : Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 : 470-479.
- Kinashi H, Ito Y, Mizuno M, et al. : TGF-beta1 promotes lymphangiogenesis during peritoneal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24 : 1627-1642.
- Hirahara I, Ishibashi Y, Kaname S, et al. : Methylglyoxal induces peritoneal thickening by mesenchymal-like mesothelial cells in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24 : 437-447.
- Kitamura M, Nishino T, Obata Y, et al. : Epigallocatechin gallate suppresses peritoneal fibrosis in mice. *Chem Biol Interact* 2012; 195 : 95-104.
- He Y, Kozaki K, Karpanen T, et al. : Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94 : 819-825.
- He Y, Rajantie I, Pajusola K, et al. : Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* 2005; 65 : 4739-4746.
- Yang H, Kim C, Kim MJ, et al. : Soluble vascular endothelial growth factor receptor-3 suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in bladder cancer. *Mol Cancer* 2011; 10 : 36.
- Tammela T, Alitalo K : Lymphangiogenesis : Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 2010; 140 : 460-476.
- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV : Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; 438 : 946-953.
- 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* 1987; 80 : 1311-1316.
- Moberly JB, Mujais S, Gehr T, et al. : Pharmacokinetics of icodextrin in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 62 : S23-S33.

- 14) Johnson DW, Agar J, Collins J, et al. : Recommendations for the use of icodextrin in peritoneal dialysis patients. *Nephrology (Carlton)* 2003; 8 : 1-7.
- 15) Terabayashi T, Ito Y, Mizuno M, et al. : Vascular endothelial growth factor receptor-3 is a novel target to improve net ultrafiltration in methylglyoxal-induced peritoneal injury. *Labo Invest* 2015; 95 : 1029-1043.