

主論文の要旨

**TGF- β 1-VEGF-A pathway induces neoangiogenesis
with peritoneal fibrosis in patients undergoing
peritoneal dialysis**

腹膜透析施行中の患者において TGF- β 1-VEGF-A
経路が腹膜線維症に伴う血管新生を誘導する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

狩谷 哲芳

【緒言】

腹膜機能低下は腹膜透析の継続を困難とし腹膜透析患者の生命予後を悪化させる要因であるが、その機序は不明である。長期間の腹膜透析において腹膜に線維化と血管新生が起こることが報告されている。しかしながら、線維化に伴い血管新生が進行する詳細な機序は明らかにされていない。本研究では、線維化の主要な成長因子である TGF- β 1 と血管新生の主要な成長因子である VEGF-A の関係に着目し、腹膜線維化の過程で血管新生が誘導される機序を明らかにすることを目的とした。腹膜線維化において TGF- β 1 が VEGF-A を誘導するという仮説をたて、ヒト腹膜組織検体、培養細胞、動物モデルを用いて検討した。

【対象と方法】

(1)ヒト検体の解析

名古屋大学病院と関連病院で腹膜透析を施行している患者のうち、同意を得た患者より採取した腹膜透析排液及び腹膜組織を用いた。1 ヶ月以内の腹膜炎、悪性疾患、血液透析との併用療法を行っているものは除外した。腹膜透析排液は腹膜平衡試験(Peritoneal equilibration test: PET)時の 4 時間貯留液または夜間貯留液を評価対象とし、VEGF-A、TGF- β 1 濃度を ELISA 法を用いて測定し腹膜機能の指標である D/P Cr 値と比較検討した。

ヒト腹膜組織を腹膜透析カテーテル挿入時あるいは腹膜透析を離脱しカテーテル抜去時に採取した。腹膜透析カテーテル挿入時の透析導入前(Predialysis uremia)群、カテーテル抜去時のうち、腹膜炎離脱 (Peritonitis) 群、除水不全離脱 (Ultrafiltration failure: UFF) 群、それ以外の離脱(Incidental)群に分類し、組織中 VEGF-A mRNA 発現、CD31 陽性血管数、腹膜肥厚を評価した。

(2)培養細胞実験

中皮細胞(Met-5A, Human peritoneal mesothelial cell: HPMC)、線維芽細胞(NRK-49F)、マクロファージ(RAW264.7)における TGF- β 1 による VEGF-A 発現の誘導を検討した。HPMC は腹膜透析排液から回収し培養した。各細胞を TGF- β 1(5ng/ml)を添加した培養液で培養し、培養液中の VEGF-A 濃度、細胞の VEGF-A mRNA 発現を評価した。HPMC において TGF- β 1 で誘導された VEGF-A mRNA 発現を TGF- β 1 を含まない培養液をコントロールとした増幅率で評価し、その患者の腹膜機能と比較検討した。

(3)動物実験

SD ラット(8 週齢)の腹腔にグルコン酸クロルヘキシジン(Chlorhexidine Gluconate: CG)を 7 回隔日投与し腹膜線維症モデル(CG モデル)を作製した。この CG モデルに TGF- β I 型受容体(TGF β R-I)阻害薬(LY364947)を連日 14 回腹腔投与した。16 日目に腹膜組織、腹腔洗浄液を採取、腹膜組織を光学顕微鏡所見(壁側腹膜肥厚)、免疫組織学的所見(ED1, α -SMA, TGF- β 1, VEGF-A, CD31, HBME-1)にて評価した。また、腹腔洗浄液の TGF- β 1、VEGF-A 濃度を測定した。

【結果】

(1) ヒト検体の解析

腹膜透析排液は4時間貯留液を39検体および夜間貯留液を87検体について解析した。4時間貯留液($R=0.364$, $P<0.05$, Figure 1A)及び夜間貯留液($R=0.635$, $P<0.001$, Figure 1B)における VEGF-A 濃度は D/P Cr と相関した。また、VEGF-A 濃度と TGF- β 1 濃度が相関した(4時間貯留液: $R=0.464$, $P<0.01$, Figure 1C; 夜間貯留液: $R=0.703$, $P<0.001$, Figure 1D)。

ヒト腹膜組織は66検体を解析した(Table 1)。UFF 群では Predialysis Uremia 群($P<0.001$)、Incidental 群($P<0.01$)と比較し有意に VEGF-A mRNA 発現が増加していた(Figure 2A)。VEGF-A mRNA は CD31 陽性血管数($R=0.406$, $P<0.01$, Figure 2B)および腹膜肥厚($R=0.617$, $P<0.001$, Figure 2C)と相関した。

(2) 培養細胞実験

TGF- β 1 によって中皮細胞(Met-5A)、線維芽細胞(NRK-49F)における VEGF-A 発現は mRNA レベル、タンパクレベル共に亢進した(Figure 3A, B, Figure 5A, B)。また、TGF β R-I inhibitor は用量依存性に VEGF-A 発現を抑制した(Figure 3C, D, Figure 5C, D)。マクロファージ(RAW264.7)においては、TGF- β 1 によって VEGF-A 発現は有意には誘導されなかった。HPMC は様々な腹膜機能をもつ患者排液から得た30検体を用いて解析した(Table 2)。TGF- β 1 で誘導された VEGF-A 発現の増幅率は24例で12時間、6例で24時間後に最高値を示し、何れの時間においても VEGF-A 増幅率は D/P Cr 値と相関した(Figure 4A, B)。

(3) 動物実験

CG モデルでは、腹膜肥厚、ED1 陽性マクロファージ、 α -SMA 陽性線維芽細胞、TGF- β 1 陽性細胞、VEGF-A 陽性細胞、CD31 陽性血管が増加した(Figure 6, 7A-F)。TGF β R-I inhibitor によってそれらは抑制され、脱落中皮細胞の回復を認めた(Figure 6, 7G)。また、腹腔洗浄液中の VEGF-A 濃度は TGF β R-I inhibitor によって抑制された(Figure 7H)。また、VEGF-A 濃度は TGF- β 1 濃度と相関した($R=0.834$, $P<0.001$, Figure 7J)。免疫二重染色によって VEGF-A は ED1 陽性マクロファージ、 α -SMA 陽性線維芽細胞、HBME-1 陽性中皮細胞、CD31 陽性血管内皮細胞での発現を認めた(Figure 8)。また、低酸素を評価するためにピモニダゾールを CG モデルに投与しその代謝産物を免疫染色で検出したところ、ピモニダゾール代謝産物陽性の低酸素領域にマクロファージ浸潤を認めた(Figure 9A, B)。TGF β R-I inhibitor によってピモニダゾール陽性領域は減少した(Figure 9C, D)。

【考察】

腹膜透析排液の解析より、腹膜機能の指標である D/P Cr 値と VEGF-A、TGF- β 1 発現が相関し、VEGF-A と TGF- β 1 間にも相関がみられた。ヒト腹膜組織において、腹膜機能の低下した UFF 群において VEGF-A 発現が亢進し、腹膜肥厚(線維化)とも相関していた。これらは腹膜組織において血管新生は線維化と関連し、さらに VEGF-A 発

現は TGF- β 1 と関連することを示唆した。

次に、培養細胞実験の結果より中皮細胞、線維芽細胞において TGF- β 1 が VEGF-A 発現を直接的に誘導することを明らかにした。HPMC では TGF- β 1 による VEGF-A 発現の増幅率は D/P Cr 値と相関していた。腹膜透析排液の解析結果も考慮すると、腹膜機能が低下している D/P Cr 高値の患者では排液中 TGF- β 1 濃度は高値で、さらに VEGF-A 増幅率がより高いことによって VEGF-A 発現が亢進していると考えられた。

最後に、動物実験を行い線維化と血管新生について TGF- β 1 と VEGF-A との関連を検討した。TGF- β 1 抑制実験より、TGF- β 1 が VEGF-A を誘導し血管新生を進展させると考えられた。また、免疫二重染色より、中皮細胞、マクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞が VEGF-A を発現することを明らかにした。細胞実験では、マクロファージにおいて TGF- β 1 による VEGF-A 発現の誘導が認められなかったが、マクロファージにおける VEGF-A 発現には TGF- β 1 に加え低酸素が関与しているという報告があり、本研究においてもマクロファージが低酸素領域に認められたことから、VEGF-A 発現に低酸素が相乗的に働くと考えた。

生体非適合性の透析液への曝露、ブドウ糖、終末糖化産物(Advanced glycation end products)や腹膜炎で誘導されるサイトカイン等により腹膜において TGF- β 1 が産生されることが報告されている。本研究から、TGF- β 1 が中皮細胞と線維芽細胞において直接的に VEGF-A 発現を誘導することが明らかとなった。また、マクロファージにおいては低酸素や炎症が TGF- β 1 と相乗的に VEGF-A 発現を誘導することが示唆された。(Figure 10)。TGF- β 1 が直接的に VEGF-A を調整する機構が腹膜障害を促進し線維化と血管新生を誘導すると考えられた。

【結語】

腹膜透析患者において、TGF- β 1-VEGF-A 経路が腹膜線維症に伴う血管新生を誘導し、腹膜機能障害が進展することが示唆された。この経路をさらに解明することで、腹膜機能障害による除水不全のあらたな治療ターゲットになりうると思われた。