

主論文の要約

**Transforming growth factor- $\beta$ 1 promotes  
lymphangiogenesis during peritoneal fibrosis**

〔 腹膜線維症において Transforming growth factor- $\beta$ 1 が  
リンパ管新生を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：松尾 清一 教授)

鬼無 洋

## 【緒言】

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。

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- $\beta$ 1 刺激による VEGF-C 発現の誘導を検討した。さらにグルコン酸クロロヘキシジン (CG) を用いたラット腹膜障害モデルを用いて腹膜線維症とリンパ管新生の関連について検討した。

## 【対象および方法】

ヒト PD 排液 (n=130) 中の VEGF-C、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、リンパ管マーカーである 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) を用いて 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。

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 TGF- $\beta$  受容体阻害剤 (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 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。

## 【結果】

ヒト PD 排液中の VEGF-C 濃度は D/P Cr と相関を認め (Fig.1A,C)、排液中 TGF- $\beta$ 1 濃度とも相関を認めた (Fig.1B)。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 (Fig.2A-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 (Fig.2D-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 (Fig.3)。

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 (Fig.4A,B)。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 (Fig.4C,D)。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 (Fig.5A,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 (Fig.5C)、PD 治療期間とは相関を認めなかった (Fig.5D)。

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 (Fig.6A-D)。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 (Fig.6E)。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 (Fig.7,8)。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が抑制された (Fig.9)。

## 【考察】

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。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分かり、腹膜中皮細胞において TGF- $\beta$ 1 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。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- $\beta$ 受容体阻害剤を投与して TGF- $\beta$ シグナルを抑制したところ線維化の軽減とともに 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- $\beta$ 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- $\beta$ 1 濃度が上昇することが知られている。腹膜線維化の進行とともに TGF- $\beta$ 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- $\beta$ -VEGF-C pathway の存在が考えられた (Fig.10)。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- $\beta$ -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。