

主論文の要旨

**Vascular endothelial growth factor receptor-3 is
a novel target to improve net ultrafiltration in
methylglyoxal-induced peritoneal injury**

Vascular endothelial growth factor receptor-3 は
メチルグリオキサール惹起性腹膜傷害における除水を
改善するための新たな治療標的となる

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：丸山 彰一 准教授)

寺林 武

【諸言】

最適な体液バランスの維持は、腹膜透析における臨床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。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。

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 (Kinashi H et al., J Am Soc Nephrol. 2013; 24: 1627-1642.)。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。

【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を惹起し、Day22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-Ig (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。Day22、Day50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sVEGFR-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), 一晚貯留 [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ひとつ 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。

【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 1a-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 1e, 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 1g, h)。

2) アデノウィルスベクター-sVEGFR-3 投与群では、Day22 から Day50 にかけてリンパ管新生の抑制を認めた (Figures 2a-c, 3a-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 3c-e)。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 2d-e)。CD68 陽性マクロファージの浸潤は Day22 から Day50 にかけて両群で著明に減少していた (Figure 2f)。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、Day22 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 Day50 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 4a)。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 Day22、Day50 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 4b)。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 Day22、Day50 の双方において sVEGFR-3 群での排液量の増加傾向を認めたが、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 4c-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 5a, 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 5c, d)。

【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。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。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得ると考えた。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ィルスベクター-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。本研究において、炎症がある状況下（Day22）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ィルス-sVEGFR-3 群で排液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示唆する。

【結論】

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。