

## 161. 腎機能の評価指標としての尿中 VEGF-A<sub>165</sub>b 測定意義構築

菊地 良介

名古屋大学 医学部附属病院 医療技術部 臨床検査部門

Key words : 腎機能障害, 血管内皮細胞増殖因子, VEGF-A<sub>165</sub>b

### 緒言

1980年代に同定された血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) は、脈管形成および血管新生に関与する一群の糖タンパク質である<sup>1,2)</sup>。VEGF-A には様々なアイソフォームが存在することが報告されているが、その中でも特に、165 アミノ酸残基の VEGF-A<sub>165</sub> が生体内で最も多く存在し、血管新生能が最も強い VEGF-A アイソフォームであるとされている。しかし、末梢動脈閉塞性疾患 (PAD) 患者のように、血中 VEGF-A 濃度が上昇しているにも関わらず血管形成不全が生じるといった、いわゆる「VEGF-A パラドックス」についての報告がある<sup>3)</sup>。

2002年、VEGFA 遺伝子の 3'UTR における特異的なスプライスによって生成される新規アイソフォーム (VEGF-A<sub>165</sub>b) が同定された。VEGF-A<sub>165</sub>b は、従来考えられていた VEGF-A の作用である血管内膜の増殖、生体内血管新生および腫瘍成長を抑制するため、本来の VEGF-A の役割とは相反する「抗血管新生因子」として考えられている<sup>4)</sup>。VEGF-A<sub>165</sub> (血管新生促進型) と VEGF-A<sub>165</sub> b (抑制型) は、C-末端側の 6 アミノ酸残基の配列だけが異なるため、これまでの VEGF-A タンパク質発現・濃度測定に使用されている N 末端側を認識する抗体では、VEGF-A の血管新生促進型と抑制型の区別が出来ていなかった。我々は、従来の VEGF-A 評価法では、VEGF-A 発現の増減に伴う病態を正確に評価出来ないことを提唱し、PAD 患者で増加している血中 VEGF-A は血管新生抑制型であり、抑制型の VEGF-A<sub>165</sub>b が病態進展に深く関与していることを報告した<sup>5)</sup>。さらには、内臓脂肪で増加している VEGF-A 発現も、VEGF-A<sub>165</sub> であり、肥満時における微小血管障害の誘発に VEGF-A<sub>165</sub> が関与している可能性について報告してきた<sup>6)</sup>。

肥満に伴う代謝障害は心血管病 (CVD) および慢性腎臓病 (CKD) 発症の重要な危険因子であることが明らかとなっている。腎臓において VEGF-A<sub>165</sub>b は、糖尿病腎症でみられる炎症性サイトカインや酸化ストレス亢進によるグリコカリックスの傷害から糸球体内皮細胞障害を防ぐ働きがあることが報告されている。また、糸球体上皮細胞での VEGF-A<sub>165</sub>b 過剰発現は、糸球体透過性を減少させる効果があるとの報告もある。現時点において VEGF-A<sub>165</sub>b は、腎臓組織中においては保護的作用を有すると考えられる。しかし、これまでにヒト尿中の VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度を定量し、腎機能の評価することについての報告はない。このような背景から、本研究では、尿中 VEGF-A<sub>165</sub>b が腎機能障害をより早期に評価し、生活習慣の改善等で回復が見込める段階で治療を開始することができる尿中バイオマーカーとしての意義があるかについて評価することを目的とした。

### 方法

#### 1. 測定対象検体

名古屋大学医学部附属病院生命倫理委員会承認のもと、当院臨床検査部門で保管されている残余検体を使用した。

#### 2. Pan VEGF-A 濃度と VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度測定

Pan VEGF-A 濃度測定は、Human VEGF Quantikine ELISA Kit (DVE00, R&D Systems) を使用した。VEGF-A<sub>165</sub>b 濃度測定には、Human Vascular Endothelial Growth Factor-165b ELISA Kit (MBS720132, MyBioSource) を使用した。血清・尿サンプルは、残余血清および随時尿を用いて測定した。

### 3. 吸光度測定

ELISA kit での吸光度測定には、Infinite F500 フィルター方式プレートリーダーを用いた (Tecan)。

### 4. 統計解析

各種統計解析には、GraphPad Prism6 (USACO Corporation) を使用した。統計検定には Repeated measures two way ANOVA を用いて行い、p 値が 0.05 未満を有意差ありと評価した。

## 結果

### 1. VEGF-A<sub>165b</sub> ELISA 測定系の構築

我々は、市販 ELISA kit を用いた性能評価に関する再評価を行った。その結果、添付文書に記載されている従来通りの方法では、ほとんどすべての検体が測定感度以下となった。そこで我々は、VEGF-A<sub>165b</sub> の立体構造解析を行い、VEGF-A<sub>165b</sub> 特有のアミノ酸配列について詳細な解析を行った (data not shown)。解析結果を踏まえて、最適化した条件下で前処理してから測定を行うことで、測定系が安定するのではとの仮説を立てた。その結果、前処理を行うことですべての検体の VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度が検出可能となった (data not shown)。我々は、前処理方法による ELISA 系への反応阻害についても確認した (data not shown)。これらの結果を踏まえて、我々は VEGF-A<sub>165b</sub> 測定法について、至適化した検体前処理法と市販キットの組み合わせにより、高精度な VEGF-A C-末端特異的定量評価法を確立することが出来た。

### 2. 血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度と BMI との関連

我々はこれまでに、VEGF-A<sub>165b</sub> が肥満時の代謝障害による微小血管障害の誘発に関与していることを報告してきた<sup>4)</sup>。この報告の中で、肥満症 (BMI: 44 ± 8 kg/m<sup>2</sup>) と健常人 (BMI: 21 ± 2 kg/m<sup>2</sup>) を比較した場合、肥満症において有意に VEGF-A<sub>165b</sub> 発現量が増加していることを見出していた。しかし、これまでの VEGF-A<sub>165b</sub> 発現量の解析は患者血清を直接用いた Western Blot 法による解析にて行ってきた。そこで我々は、構築した VEGF-A<sub>165b</sub> ELISA 測定系を用いて、これまでの研究成果を追試することとした。残余検体 91 検体を用いて VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度を測定し、BMI との相関関係の検討を行った。その結果、血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度は有意に BMI と相関していることが明らかとなった (図 1)。

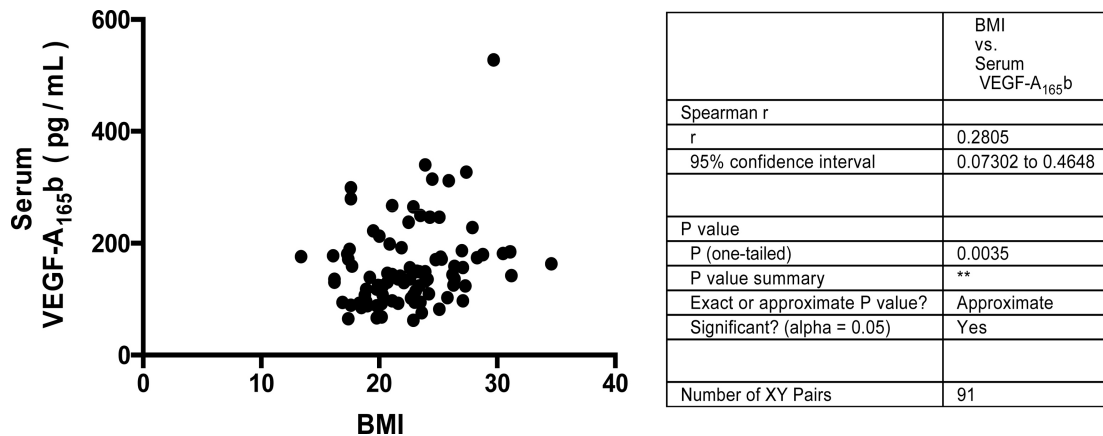


図 1. 血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度と BMI との相関

ELISA 系を用いて血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度を測定し、BMI との相関について評価した。

### 3. 尿中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度と推算糸球体濾過量との関連

重要な肥満関連疾患の中に CKD があることが知られており、肥満症において、腎機能を早期に評価し、CKD 発症を未然に防ぐことは極めて重要である。そこで我々は、構築した VEGF-A<sub>165b</sub> ELISA 系で尿中の VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度を測定し、腎機能との関連性について評価した。その結果、尿中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度と各種腎機能評価指標と有意に相関することが明らかとなった (表 1)。

表 1. 尿中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度と各種腎機能評価指標との相関

Variable	Urinary pan VEGF-A / Cre (ng / gCr)		Urinary VEGF-A <sub>165b</sub> / Cre (ng / gCr)	
	r	P value	r	P value
Serum Creatinine	-0.251	0.016	-0.429	< 0.001
eGFR	0.277	0.007	0.427	< 0.001
Cystatin C	-0.210	0.045	-0.371	< 0.001
eGFRcys	0.198	0.058	0.340	< 0.001
mGFR	0.222	0.034	0.321	0.002

eGFR; estimated glomerular filtration rate.

mGFR; inulin renal clearance measurements for the accurate measurement of GFR.

さらに興味深いことに、eGFR の低下に伴い尿中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度が減少していた (図 2)。

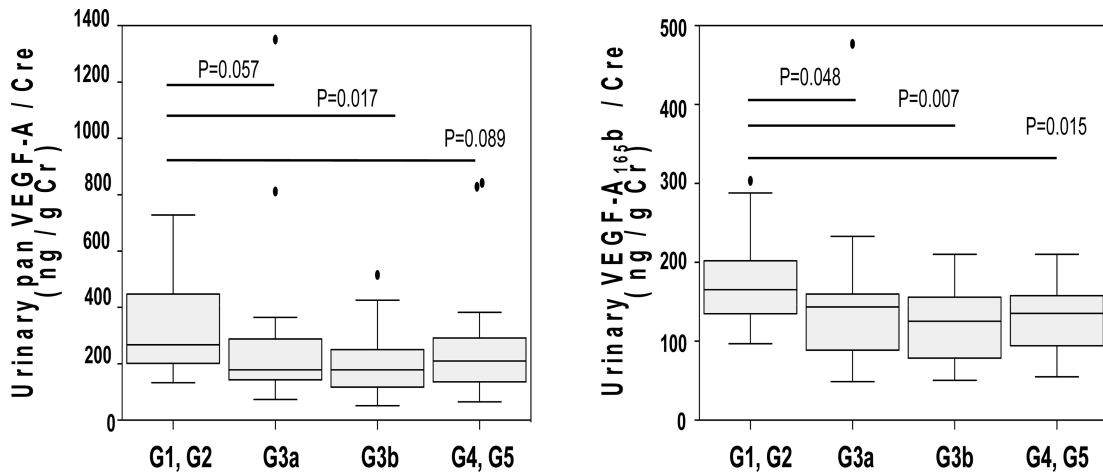


図 2. 尿中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度と eGFR 各種 stage 分類との関連

尿中 pan VEGF-A と VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度について、腎機能障害度別で評価を行った。

## 考 察

食生活の欧米化、高齢者人口の増加などの変化に伴い、CVD および CKD の患者数は増加の一途にある。肥満や加齢は、血管新生障害を伴う末梢動脈閉塞性疾患 (PAD) をはじめ、CVD や CKD 発症の危険因子である。しかし、CVD と CKD の早期診断と病期に応じた最適な治療法を選択するための臨床検査技術は未だ十分に確立されていない。我々はこれまでに、PAD 患者をはじめ、代謝障害を背景とした微小血管障害に、VEGF-A<sub>165b</sub> が深く関与することを明らかにしてきた<sup>5,6)</sup>。しかし、現在市販されている VEGF-A ELISA は VEGF-A 血管新生促進と血管新生抑制アイソフォームを区別する事が出来ない。この事実は、これまで VEGF-A 関連疾患における VEGF-A 濃度が正確に評価されていないことを意味していた。そこで、我々ははじめに、現在市販されている Human VEGF-A<sub>165b</sub> ELISA Kit を

用いて、同一ロット複数個での性能評価を行った。その結果、適切な前処理法により、これまで検出感度以下が多く認められた検体群において濃度測定が可能となった。この理由は、VEGF-A<sub>165b</sub> 特有のアミノ酸配列によることが推察される (data not shown)。そこで、本 ELISA 系を用いて、名古屋大学医学部附属病院臨床検査部門で保管している残余検体を用いた検討を行った。

我々はこれまでに、病的肥満症患者で増加している VEGF-A 発現は VEGF-A<sub>165b</sub> であること。さらに、皮下脂肪と比較して内臓脂肪では VEGF-A<sub>165b</sub> 発現が有意に増加していることを報告してきた<sup>6)</sup>。そこで、構築した VEGF-A<sub>165b</sub> ELISA 系を用いて、BMI と血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度との関連について検討を行った。その結果、血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度は BMI と有意に相関していた (図 1)。すなわち、本 ELISA 系による VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度測定は、微小血管障害発症を未然に防ぐことができる臨床検査として応用できる可能性がある。

腎臓における VEGF-A の作用は、糸球体上皮細胞 (たこ足細胞) で産生され、糸球体内皮細胞に達し、濾過機能の維持に重要な働きがあるとの報告がある。糸球体内皮細胞の有窓細胞は、VEGF-A により維持されており、VEGF-A 発現が減少すると内皮細胞障害を引き起こし、蛋白尿が排泄される。逆に多すぎても蛋白尿が排泄される。腎組織中の VEGF-A 発現が適正レベルに維持されることが重要である。一方、腎臓において VEGF-A<sub>165b</sub> は、糖尿病腎症で見られる炎症性サイトカインや酸化ストレス亢進によるグリコカリックスの傷害から糸球体内皮細胞障害を防ぐ働きがあることが報告されている<sup>7)</sup>。また、糸球体上皮細胞での VEGF-A<sub>165b</sub> 過剰発現は、糸球体透過性を減少させる効果があるとの報告もある<sup>8)</sup>。現時点において VEGF-A<sub>165b</sub> は、腎組織中においては保護的作用を有すると考えられる。CKD における透析療法導入後の生命予後はきわめて不良であり、CKD の病期・病態を理解して、早期診断と病期に応じた最適な治療法を選択することが極めて重要である。そこで我々は、構築した VEGF-A<sub>165b</sub> ELISA 系を用いて、GFR と尿中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度との関連について検討を行った。その結果、尿中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度が各種腎機能評価指標と有意に相関すること、GFR の低下とともに尿中排泄量が有意に減少することを見出すことができた (表 1, 図 2)。すなわち、尿中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度測定は、早期に腎機能障害を検出し、CKD 患者の早期発見ができる病態検査として応用できる可能性がある<sup>9)</sup>。

最後に、本研究を遂行する上で、貴重な研究助成を賜りました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。また、研究遂行にご協力をいただきました名古屋大学医学部附属病院医療技術部臨床検査部門の職場の皆様がこの場をお借りして深謝申し上げます。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学医学部附属病院検査部部長の松下正、名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科学講座教授の室原豊明、名古屋大学大学院医学系研究科腎臓内科学講座の丸山彰一および名古屋大学医学部 CKD 地域連携システム寄附講座准教授の安田宣成である。

## 文 献

- 1) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 219: 983-5.1983.
- 2) Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-8.1989.
- 3) Findley CM, Mitchell RG, Duscha BD, Annex BH, Kontos CD. Plasma levels of soluble Tie2 and vascular endothelial growth factor distinguish critical limb ischemia from intermittent claudication in patients with peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol*. 52:387-393, 2008. doi: 10.1016/j.jacc.2008.02.045.
- 4) Harper SJ and Bates DO. doi: 10.1016/j.jacc.2008.02.045. VEGF-A splicing : the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*. 2008 ; 8(11): 880-87. doi: 10.1038/nrc2505.
- 5) Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, Ngo DT, Shimizu I, Fuster JJ, Katanasaka Y, Yoshida S, Qiu Y, Yamaguchi TP, Matsushita T, Murohara T, Gokce N, Bates DO, Hamburg NM, Walsh K. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med*. 20:1464-1471, 2014. doi: 10.1038/nm.3703.
- 6) Doan TM, Farb M, Kikuchi R, Karki S, Tiwari S, Bigornia S, Bates DO, Hamburg NM, Vita JA, Hess DT, Walsh K, Gokce N. Anti-angiogenic actions of VEGF-A<sub>165b</sub>, a novel isoform of VEGF-A, in human obesity. *Circulation*. 130: pp1072-1080. (2014) doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008171.
- 7) Oltean S, Qiu Y, Ferguson JK, Stevens M, Neal C, Russell A, Kaura A, Arkill KP, Harris K, Symonds C, Lacey K, Wijeyaratne L, Gammons M, Wylie E, Hulse RP, Alsop C, Cope G, Damodaran G, Betteridge KB, Ramnath R, Satchell SC, Foster RR, Ballmer-Hofer K, Donaldson LF, Barratt J, Baelde HJ, Harper SJ, Bates

- DO, Salmon AH. Vascular Endothelial Growth Factor-A165b Is Protective and Restores Endothelial Glycocalyx in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 26(8):1889-904. 2015. doi: 10.1681/ASN.2014040350.
- 8) Overexpression of VEGF165b in podocytes reduces glomerular permeability.  
Qiu Y, Ferguson J, Oltean S, Neal CR, Kaura A, Bevan H, Wood E, Sage LM, Lanati S, Nowak DG, Salmon AH, Bates D, Harper SJ. *J Am Soc Nephrol.* 21(9):1498-509.2010. doi: 10.1681/ASN.2009060617.
- 9) 菊地良介、松下正、室原豊明。尿中 VEGF-A165b を指標とした腎機能の検査方法及び検査装置、腎機能の検査装置として機能させるためのプログラム及び記録媒体。特願 PCT/JP2016/65325。