

原著

アリストロキア酸中毒性腎症に対する Hepatocyte Growth Factor (HGF) の線維化抑制作用の検討

渡辺 裕輔

Hepatocyte Growth Factor Attenuates Reactive Renal Fibrosis in Aristolochic Acid Nephrotoxicity

Yusuke Watanabe (Department of Nephrology, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Despite the diverse initial causes, chronic renal disease that progress to end-stage renal failure is a remarkably monotonous process that is characterized by the relentless accumulation of extracellular matrix (ECM) leading to widespread interstitial fibrosis. Hepatocyte growth factor (HGF), originally identified and cloned as a potent mitogen for hepatocyte, shows mitogenic, morphogenic and anti-apoptotic activities for a wide variety of cells including renal tubular epithelial cells. And HGF has been demonstrated to attenuate acute tubular necrosis and interstitial fibrosis in some of rodent models of kidney disease. But the mechanism of anti-fibrotic effects of HGF has been poorly understood in detail. Then, using HGF transgenic mice, we investigated how HGF could affect chronic toxic nephropathy/interstitial fibrosis caused by a nephrotoxin, aristolochic acid (AA). To find out molecular mechanisms of anti-fibrotic effects of HGF, cultured murine tubular epithelial cells (mProx24) were also employed. Significant tubular degeneration was observed both in the transgenic and the wild-type mice to the same degree after 2 weeks' treatment with AA. Interstitial fibrosis subsequently developed in the wild-type mice 4 weeks after cessation of AA administration. However, the transgenic mice manifested less fibrotic changes. Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) could partially account for the attenuation of fibrogenesis in the transgenic mouse kidney. HGF at 10 ng/mL and 100 ng/mL could block TIMP-1 gene expression in mProx24 induced by epidermal growth factor (EGF), but a decrease in the number of mProx24 via apoptosis induced by AA was blocked only by HGF at 100 ng/mL.

In conclusion, circulating transgene-derived HGF (2~10 ng/mL) could not prevent tubular degeneration caused by AA, but facilitate its regeneration without significant fibrogenesis. These findings suggest possible therapeutic efficacy for renal interstitial fibrosis following tubular degeneration even of low-dose HGF.

Keywords: hepatocyte growth factor (HGF), aristolochic acid (AA), renal interstitial fibrosis, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), epidermal growth factor (EGF), type I collagen

J Saitama Med School 2004;31:13-24

(Received November 1, 2003)

緒言

あらゆる進行性糸球体疾患の末期腎不全に至る過程において認められる腎間質線維化病変は、糸球体障害と比較し腎機能予後とより強く相関することが明らかにされている¹⁻³⁾。そのため、腎間質線維化の進行阻止が末期腎不全への進行抑制につながる可能性が示され、腎間質線維化に関する研究が現在盛んに行

われている。正常腎の間質において細胞外基質は産生と分解が保たれ、生理的な構築を保持し、周辺細胞の分化・接着・増殖に関与しているが、病的状態ではその代謝バランスが崩れて細胞外基質の蓄積が起これ、腎間質線維化が生じるとされる^{1,3)}。

最近、ベルギーで痩せ薬として漢方薬を使用した多数の女性に急速に進行する腎不全が見られ、Chinese herbs nephropathy と報告された⁴⁾。処方された漢方薬の分析からアリストロキア酸 (aristolochic acid, AA) 代謝産物が分離され、原因として混入した aristolochia

fangchiに含まれるAAが腎障害を起こしたことが明らかとなった。その後AAは、ラットおよびウサギに慢性間質性腎炎および間質線維化を惹起し、げっ歯類を用いた慢性腎不全モデルの一つとなりうる事が示された^{5,6)}。

一方、肝再生因子として同定されたHepatocyte growth factor (HGF)は肝細胞以外の多種類の細胞に対しても多彩な生理活性を持つことが明らかとなっている。腎臓においても、間質線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージおよびメサングウム細胞がHGFを産生し、尿細管上皮細胞および血管内皮細胞やメサングウム細胞自身がHGFの受容体であるc-Metを発現しており、その標的細胞となる^{7,8)}。培養尿細管上皮細胞を用いた検討では、HGFが管腔構造形成を誘導しmorphogenとしての作用を持つことが示されており⁹⁾、また抗アポトーシス作用や¹⁰⁻¹²⁾、mitogen^{13,14)}としての作用も報告されている。急性尿細管壊死を主たる病態とする急性腎不全モデルにおいて、組み換え型HGFの投与は虚血による腎障害を軽減するばかりでなく、その回復をも促進する事が知られている^{15,16)}。また近年、HGFによる慢性腎不全進行抑制効果の報告もいくつか認められ、その機序としてtransforming growth factor- β (TGF- β)との拮抗作用や抗アポトーシス作用、細胞外基質分解促進作用などが想定されているが詳細は明らかでない⁷⁾。また既報での抗腎間質線維化作用に関しては、500~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weightに及ぶ大量の組み換え型HGFを頻回に投与する方法がとられているが^{17,18)}、薬剤誘発性プロモーター下に全身の組織でHGFを産生するトランスジェニックマウスでは腫瘍が多発するなど、HGFの弊害も報告されている¹⁹⁾。またヒト慢性腎不全は緩徐に進行する疾患であり、HGFの慢性腎疾患治療薬としての臨床応用に際し、組み換え型HGFを長期間に渡り頻回に投与するのではなく、生体内での遺伝子発現系によるHGF持続補充がより有望であると考えられる。

そこで本研究において我々は、マウスAA中毒性腎症モデル(aristrochic acid nephrotoxicity, AAN)を肝臓においてHGFが定常的に発現し、2~10 ng/mlと低濃度ながら持続的に末梢循環に分泌されているHGFトランスジェニックマウスに対して作成し、尿細管上皮細胞変性および反応性間質線維化、細胞外基質蓄積に対する慢性低濃度HGFの治療効果を検討した。

方法

動物モデルの作成

HGFトランスジェニックマウス(HGF TGマウス, FVB background)は鳥取大学医学部第二内科汐田剛史先生より御供与頂き自家繁殖して用いた²⁰⁾。このHGF TGマウスはalbumin enhancer/promoter-HGF

cDNA融合遺伝子を用いたmicroinjection法により作製され、hetero接合体HGF TGマウスと野生型FVB strain (wild-typeマウス: WTマウス)との交配によって維持継代された。子孫の導入遺伝子の確認は、マウス尾からのDNA抽出物をpolymerase chain reaction (PCR)法にて行った。PrimerとしてTCTTTGTGAAGGAACCTTACTTCTGおよびTTTTCTTGTATAGCAGTGCAGCTTTを用い、熱変性94°C 1分、アニーリング55°C 1分、伸長72°C 1分のサイクルを35回にてPCR反応を行い、PCR産物を1%アガロースゲルにて泳動し導入遺伝子の有無を判定した。このHGF TGマウスの血清HGF値はWTマウスと比べて有意に高値であった²⁰⁾(2~10 ng/mL vs 検出感度以下)。6~8週令の雄性HGF TGマウスおよびWTマウスは標準飼育飼料と自由飲水環境で飼育した。WTマウスを用いた予備実験において、aristrochic acid (AA) (Sigma-Aldrich Corp, MO, USA)を生理食塩水に溶解し5.0 mg/kg body weight/day 2週間連日腹腔内投与を行ったところ、有意な死亡率上昇を示さずに明らかな尿細管上皮細胞の変性を生じさせた。より大量(15および50 mg/kg body weight/day)のAAは致死的であり、5.0 mg/kg body weight/dayを投与量とした。対照動物には等量の生理食塩水を連日腹腔内投与した。実験動物と対照動物は実験開始時(aristrochic acid nephrotoxicity day 0, AAN D0)、2週間連日AA投与終了時(AAN D14)、投与停止1週間後(recovery day 7, REC D7)および4週間後(REC D28)に各群5匹ずつ屠殺し腎組織および血液を採取した。一つの腎臓はRNA抽出に使用し、他方は細切し4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS)にて固定した。全ての動物実験は埼玉医科大学動物実験委員会の承諾を得たのち、動物実験指針に準拠して行った。

血清生化学検査

屠殺時に後眼窩から採血を行い、血清creatinineとglutamic-pyruvic transaminase (GPT)値は自動測定器(ドライケム3000, 富士フィルムメディカル株式会社, 東京)にて測定した。

腎線維化領域の計測

4% PFA in PBS固定腎組織paraffin包埋blockよりhematoxylin-eosin (HE)染色およびMasson's trichrome (MT)染色を行い、形態計測用検体を得た。MT染色上の線維化病巣の評価は200倍率下で無作為に選択した20視野において行った。顕微鏡画像をcomputerに取り込み、画像処理software (Mac SCOPE, 三谷商事株式会社, 福井)を用い線維化領域を定量化した。その際、視野に含まれる糸球体および脈管系はsubtraction処理した。

免疫蛍光抗体法

採取した腎臓を 4% PFA in PBS で 4℃ 5 時間固定の後、20% sucrose-PBS にて浸漬、Tissue-Tek O.C.T compound (サクラ精機株式会社, 東京) に包埋、急速凍結した。cryostat を用いて 4 μ m に薄切し、1 次抗体として fluorescence isothiocyanate (FITC) -conjugated mouse anti- α -smooth muscle actin (α SMA) (Sigma-Aldrich Corp), rabbit anti-fibroblast specific protein 1 (FSP1) および anti-type I collagen (Col I) (Monosan, Uden, Netherlands) を用いた²¹⁾。2 次抗体として FITC-conjugated anti-rabbit IgG (American Qualex, CA, USA) および Rhodamine-conjugated anti-rabbit IgG (Chemicon International, CA, USA) を用いた。対照として 1 次抗体を省いたものを用いた。

免疫組織化学間接法

4% PFA in PBS 固定腎組織 paraffin 包埋 block は 4 μ m に薄切、脱 paraffin 処理の後、蛋白分解酵素処理 (Proteinase K 室温 20 分間) および microwave 加熱処理 (100℃ 5 分間) にて抗原賦活を図った。PBS にて洗浄の後、0.3% 過酸化水素 methanol 処理によって内因性 peroxidase 活性を不活化した。2% skim milk PBS 溶液にて室温 60 分間 prehybridization の後、1 次抗体として goat anti-mouse TIMP-1 antibody (G-T Research Product, MN, USA) 室温 60 分間、2 次抗体として biotin-conjugated anti-goat IgG (Chemicon International) 室温 60 分間反応させ、avidin-biotin complex (ABC kit, Vector Laboratories, CA, USA) 室温 30 分間、3-amino-9-ethylcarbazole (AEC standard kit, DAKO Cytomation, CA, USA) にて発色を行い、hematoxylin にて核染色し封入を行った。

Gelatin zymography

腎組織中の matrix metalloproteinase (MMP) 活性を検討する為、gelatin を基質とした gelatin zymography (ゼラチンザイモ電気泳動キット, ヤガイ中央研究所, 山形) を行った。摘出した腎組織は sample buffer (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, pH 6.8) を用いて可溶化し、溶解液は 4℃ にて 5 分間遠心し、上清を蛋白抽出液とした。蛋白定量は Bradford 法 (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いた。各群 15 μ g の蛋白を 0.1% gelatin 含有 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて分離した後、37℃ にて 30 時間酵素反応、Coomassie brilliant blue を用いて室温 30 分間蛋白染色を行い、蛋白染色されなかった各 band を NIH image (Ver.1.62, NIH Division of Computer Research and Technology, MD, USA) を用いて定量した。陽性対照として human ProMMP-2, MMP-2, ProMMP-9 を用いた。

培養細胞

培養マウス近位尿細管上皮細胞 (mProx24) は筑波大学先端学際領域研究センター菅谷健博士より御供与頂き²²⁾、growth Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium:D-MEM, 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) にて継代維持し、供与後 5~7 継代の細胞を実験に用いた。6 well plate (100000 個/well), 4 chamber slide (30000 個/chamber), 10 cm culture dish (400000 個/dish) に培養し、12 時間後に resting medium (D-MEM, 0.5% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin) へ交換し、12 時間後に recombinant human HGF (rhHGF), (R&D Systems, Inc. MN, USA) が最終濃度 10 および 100 ng/ml となるよう添加し、48 時間後に AA (6.0 μ g/ml) を実験群に添加した。AA 添加 24 時間後に 6 well plate で培養した細胞を回収し 0.04% trypan blue にて 5 分間染色した。細胞増殖に対する HGF の作用を調べるため、染色されない細胞を hemocytometer にてカウントした。また一部の細胞は HGF の mProx24 に対する増殖促進効果を検討するために AA 添加直前に回収し、細胞数をカウントした。アポトーシスの検討には、4 chamber slide で培養した細胞のアポトーシスを terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick end labeling (TUNEL) 法にて検出した。アポトーシス関連蛋白の発現変化を western blotting 法にて検討するため、10 cm culture dish で培養した細胞から、蛋白を抽出した。また HGF の tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) 遺伝子の発現への影響を検討するため、同様に mProx24 を 12 時間 resting した後、HGF 最終濃度 10 および 100 ng/ml 添加と同時に recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) (R&D Systems, Inc.) を最終濃度 100 ng/ml になるよう添加し、3 時間後に RNA を抽出した。

Western blotting 法

回収した mProx24 は、冷却した RIPA lysis buffer (1% NP40, 0.1% SDS, 100 μ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 2 μ g/ml antipain, 2 μ g/ml leupeptin in PBS) を用いて可溶化し、溶解液は 4℃ で 5 分間遠心し、上清を蛋白抽出液とした。蛋白定量は Bradford 法を用いた。各群 30 μ g の蛋白を 12.5% SDS-PAGE にて分離した後、nitrocellulose membrane へ転写し、一次抗体として anti mouse Bcl-xL, Bcl-2, Bax 抗体 (Santa Cruz, CA USA) 室温 12 時間、2 次抗体として alkaline phosphatase conjugate goat anti mouse IgG 抗体を 1 時間反応させた後、化学発光法 (Immun-Star Chemiluminescent kit, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて検出した。

アポトーシス細胞の評価

cryostat で 4 μm に薄切した腎組織凍結切片および 4 chamber slide で培養した mProx24 は、4% PFA にて 4°C 5 時間固定した後 0.5% Tween 20 を滴下し室温にて 15 分間処理し細胞の浸透性を亢進させた。精製水にて洗浄の後 37°C 60 分間 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 反応 (MEBSTAIN Apoptosis Kit, 株式会社医学生物学研究所, 名古屋) を行い、細胞内の核における断片化 DNA の 3'-OH 末端部分に FITC-dUTP を結合させ、蛍光顕微鏡にて観察した。

Ribonuclease protection assay (RPA)

摘出した腎組織および培養細胞から TRIzol (GIBCO BRL, NY, USA) を用いて total RNA を抽出し、試料とした。cRNA probe 合成に用いた template を以下に示す。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (114 bp, 673 to 787 corresponding to rat GAPDH) および TGF- β 1 (255 bp, 500 to 754 corresponding to rat TGF- β 1) は新潟大学大学院医歯学総合研究科付属腎研究施設構造病学分野山本格教授より御供与頂いた。TIMP-1 (737 bp, 1 to 737 corresponding to rat TIMP-1) は東京大学医科学研究所癌細胞学研究部岡田明子博士より御供与頂いた。HGF (252 bp, 963 to 1214 corresponding to rat HGF) および α 1 (I) procollagen (285 bp, 625 to 909 corresponding to mouse α 1 (I) procollagen), epidermal growth factor (EGF) (236 bp, 2700 to 2935 corresponding to mouse EGF) は当教室で reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて取得した。³²P-UTP label した cRNA probe と 10 μg の total RNA を 45 °C, 16 時間 hybridization の後、ribonuclease A (1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および ribonuclease T1 (120 U/ml) で 30°C, 60 分間処理した。Proteinase K (0.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 37°C, 60 分間処理にて ribonuclease を不活化し、Ethanol 沈殿にて精製後、6% acrylamide 変性 gel を用いて protected-band を分離した。-80°C で 3 時間から 5 日間または室温 8~24 時間にて autoradiography の後、film を透過型 scanner で取り込み、各 protected-band を NIH image を用いて定量した。各 mRNA 発現量は、GAPDH との比で標準化した。

統計処理

本文中の値は平均値±標準誤差で表わした。各群間の検定には analysis of variance (ANOVA) を用い、検定は Bonferroni/Dunnett's 法を用いた。統計計算には StatView (SAS Institute, CA, USA) を使用した。危険率 5% 未満を統計学的に有意とみなした。

結果

1) AA 連日 2 週間投与終了時 (AAN D14) での検討

連日 2 週間の AA 投与により HGF TG マウスおよび WT マウス双方に顕著な尿細管上皮細胞の変性が認められた。しかし有意な腎間質線維化はそのどちらにも認めなかった (Fig. 1a, b)。変性した尿細管上皮や尿細管構造から脱落した上皮細胞は主に皮質および髓質外層の近位および遠位尿細管に位置していた。またアポトーシスを起こした上皮細胞および一部の間質細胞の核は、TUNEL 法によって局所的に検出された (Fig. 1c)。生理食塩水を投与された対照群と比較し、AA 投与を受けた HGF TG マウスと WT マウス両群の血清 creatinine 値は有意に高値であった (実験群対照群 WT マウス: $1.1 \pm 0.3 \text{ mg/dL}$ vs $0.3 \pm 0.1 \text{ mg/dL}$, $p < 0.05$ HGF TG マウス: $1.1 \pm 0.3 \text{ mg/dL}$ vs $0.3 \pm 0.1 \text{ mg/dL}$, $p < 0.05$)。両群の血清 GPT 値は共に異常値を示さなかった。以上より連日 2 週間の AA 投与終了時点 (AAN D14) での尿細管間質病変は、HGF TG マウスと WT マウスで同程度であると考えられた。

2) AA 投与後 4 週間回復期間をおいた時点 (REC D28) での検討

AA 投与終了後 4 週間の回復期間を置くと、WT マウスでは尿細管上皮の著しい再生と共に腎間質線維化を生じ (Fig. 2a)、FSP1 または α SMA 陽性の間質細胞からなる中等度の尿細管周囲もしくは間質の線維化 (Fig. 2c) や type I collagen の蓄積 (Fig. 2e) を生じた。尿細管上皮の再生は同程度であったが、HGF TG マウスは WT マウスと比較し腎の線維性変化はより軽度であり (Fig. 2b)、FSP1 または α SMA 陽性間質細胞からなる線維化病巣も WT マウスと比較し軽度であった (Fig. 2d)。また type I collagen の蓄積もより軽度であった (Fig. 2f)。MT 染色での間質線維化面積定量 (%) では、WT マウスと比較し有意に低値であった (6.7 ± 1.0 vs 2.0 ± 0.3 , $p < 0.05$) (Fig. 2g)。生理食塩水を投与した対照群では、 $1.0 \pm 0.1\%$ と AAN D0 の時点と有意な変化はみられなかった。血清 creatinine 値は WT マウスと比較し HGF TG マウスにおいてより低い傾向が認められたが、有意差はなかった ($0.4 \pm 0.1 \text{ mg/dL}$ vs $0.5 \pm 0.1 \text{ mg/dL}$, n.s.)。

3) 腎組織 α 1 (I) procollagen, TGF- β 1, TIMP-1, HGF, EGF mRNA 発現の検討

導入遺伝子由来の循環 HGF の存在にもかかわらず、RPA にて腎組織での線維化関連分子である α 1 (I) procollagen と TGF- β 1, HGF そして EGF の mRNA 発現レベルは実験期間 (Fig. 3a, b, d および f) を通して、WT マウスと比較し HGF TG マウスで有意な変化はみられなかった。また EGF mRNA の発現は、AA 投与

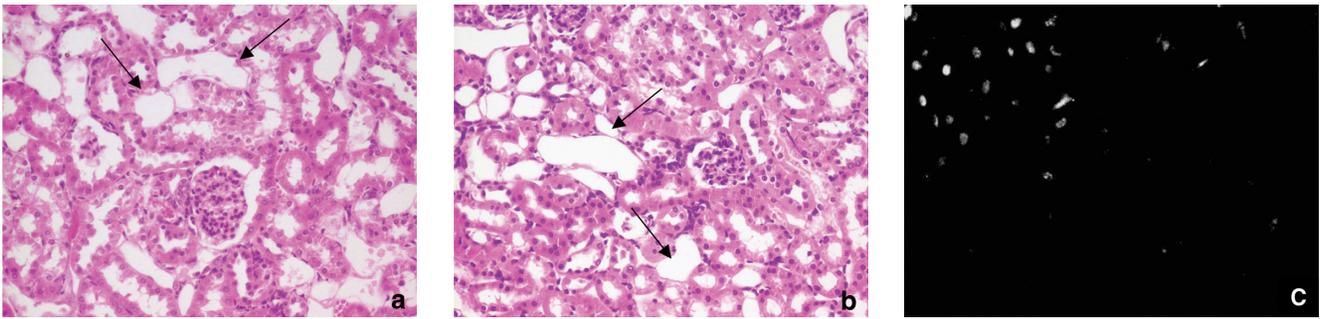


Fig. 1. a. AAN in wild-type mice at week 2(AAN D14). (HE stain, x 200) b. AAN in tg mice at AAN D14. (HE stain, x 200) Focal disappearance of tubular epithelium in the kidney (arrows) was seen in both groups, whereas the glomerulus remained intact. c. Apoptotic cells within tubules of AAN in wild-type mice at AAN D14. TUNEL-positive nuclei were only seen focally. (FITC, x 400) There were no significant histopathological differences between the wild-type mice and the tg mice at AAN D14.

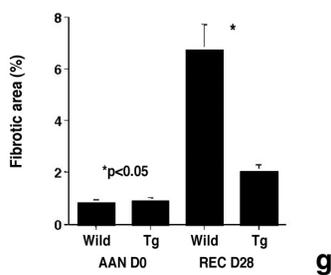
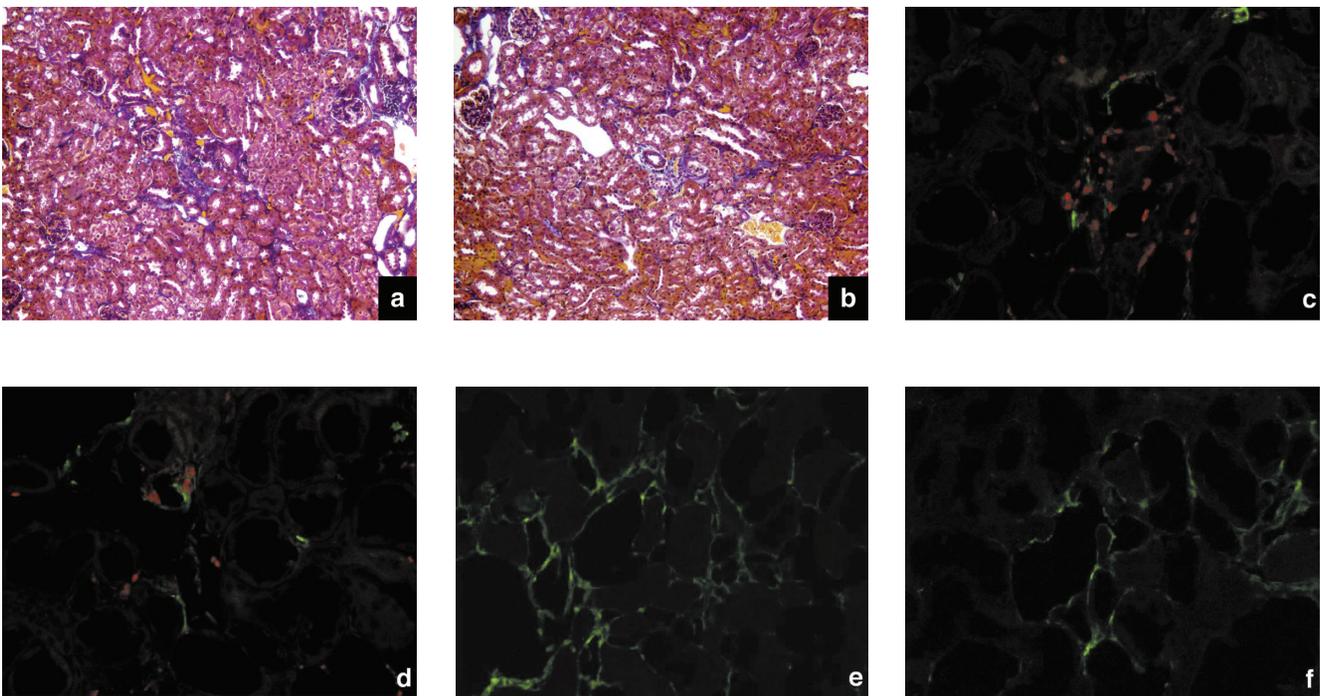


Fig. 2. Reactive interstitial fibrosis in AAN after cessation of AA administration(REC D28). a, b. Collagenous, fibrotic changes were seen in the peritubular and perivascular interstitium in wild-type mice (a) and tg mice (b). (MT stain, x 100) c, d. Dual immunofluorescence (IF) of FSP1 (in red) and α SMA (in green) in wild-type mice (c) and tg mice (d). The number of FSP1⁺ interstitial cells was significantly increased in wild-type mice (c) compared to tg mice (d). (Rhodamine & FITC, x 200) e, f. IF of type I collagen (Col I) in wild-type mice (e) and tg mice (f). The accumulation of Col I was more significant in wild-type mice (e) than tg mice (f). (FITC, x 200) (a, b, c, d, e & f at REC D28)g. Quantification of collagenous, fibrotic areas (in blue) in the kidney of Fig. 2a & b. Each value represents the fibrotic area as a fractional percentage of the tubulointerstitium. There were no significant fibrotic areas in both groups at the start of AA administration (AAN D0). However, the fibrotic area was significantly increased in wild-type mice 4 weeks after cessation of AA administration compared to tg mice (REC D28).

停止の1週間後, 両群のマウスにおいて亢進が見られた (Fig. 3e, f). 対照的に TIMP-1 mRNA 発現は, HGF TG マウスにおいて AA 投与停止1週間後 (RECD7) に WT マウスと比較し有意に低下した (Fig. 3c, f).

4) AA 投与後1週間回復期間をおいた時点 (REC D7) の腎組織での TIMP-1 蛋白発現および MMP 活性の検討

そこで REC D7 の時点における腎組織での TIMP-1 蛋白発現および MMP 活性を検討した. REC D7 の腎組織では, WT マウスと比較し HGF TG マウスの尿細管上皮での TIMP-1 蛋白の発現は著明に抑制されていた (Fig. 4a, b).

また gelatin zymography では ProMMP-9, MMP-9, ProMMP-2, MMP-2 活性を評価可能であり, REC D7 の時点で, WT マウスと比較し HGF TG マウスにおいて腎組織の MMP-9 活性は有意に上昇しており TIMP-1 蛋白の発現低下に合致する所見であった (1.6 \pm 0.2 倍, $p < 0.05$) (Fig. 4c, d). 以上より HGF TG マウ

スでは細胞外基質の分解が促進され, 腎間質線維化が抑制されたと考えられた.

5) HGF の mProx24 における増殖促進作用の検討

HGF の抗線維化作用の分子機構を明らかにするために, 培養マウス近位尿細管上皮細胞 (mProx24) を用いた in vitro の検討を行った. 10 および 100 ng/mL の HGF は, subconfluent な状態の mProx24 の増殖を促進した (Fig. 5a). AA 投与による mProx24 細胞数の減少は, HGF 濃度 100 ng/mL での 48 時間前処置によってのみ阻害された (Fig. 5b).

6) HGF の mProx24 における抗アポトーシス作用の検討

AA 単独投与と比較し, AA 投与に HGF 濃度 100 ng/mL の前処理を行うと TUNEL 法にて検出されるアポトーシス細胞核は有意に減少し, HGF により尿細管上皮細胞のアポトーシスが抑制された (Fig. 6a,b).

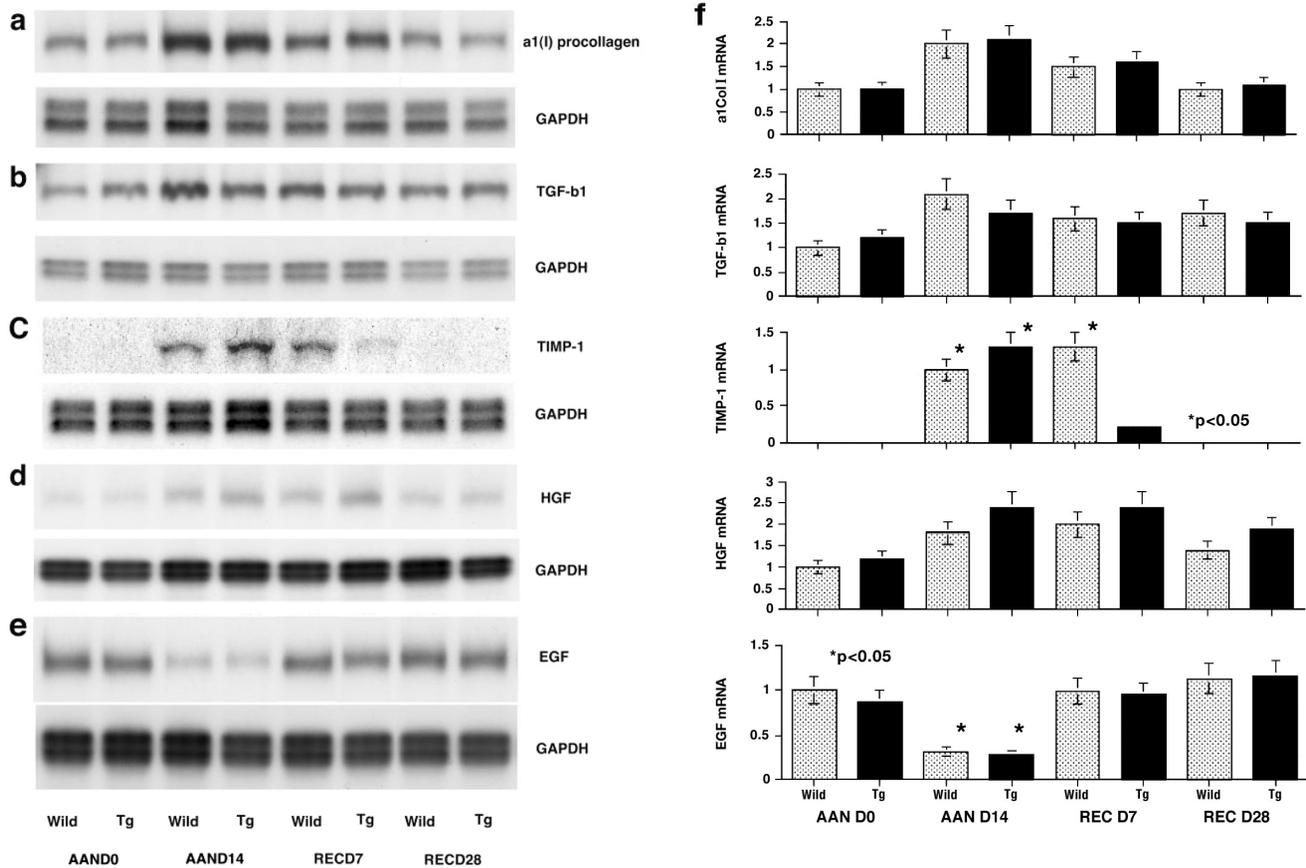


Fig. 3. Renal gene expression of $\alpha 1\text{Col I}$, pro-fibrotic and anti-fibrotic humoral factors in the AAN model mice. a. $\alpha 1\text{Col I}$ mRNA expression. b. TGF- $\beta 1$ mRNA expression. c. TIMP-1 mRNA expression. d. HGF mRNA expression. e. EGF mRNA expression. f. A quantitative densitometric analysis of Fig. 3a to e. *means a significant difference from wild-type mice of AAN D0. In spite of HGF derived from the transgene, tg mice expressed $\alpha 1\text{Col I}$, TGF- $\beta 1$, HGF, and EGF genes to the same degree as wild-type mice throughout the study. In contrast, the gene expression of TIMP-1 was significantly lowered in tg mice 1 week after cessation of AA administration (REC D7). In Fig. 3a to e, a representative blot selected from 3 separate experiments is shown, and the densitometric data in Fig. 3f were obtained from these 3 blots.

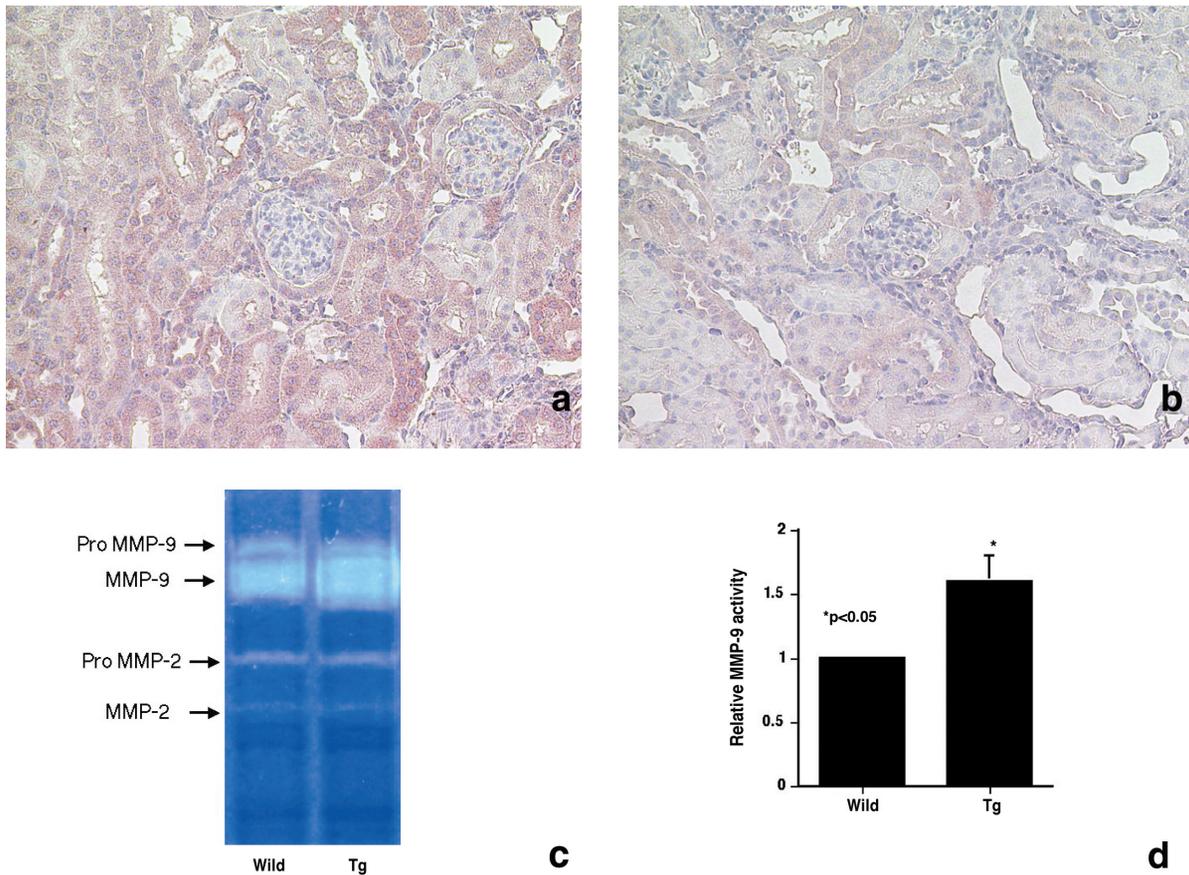


Fig. 4. TIMP-1 protein expression at week 1 after cessation of AA (REC D7). a, b. TIMP-1 protein expression was suppressed in tubular epithelial cells in tg mice (b) compared to wild-type mice (a). (AEC, x 100) c, d. MMP activities in the kidney at REC D7. c. Gelatin zymography showing renal ProMMP-9, MMP-9, ProMMP-2, and MMP-2 activities. The density of the lytic bands of MMP-9 were the most significantly expressed. Renal MMP-9 activity was significantly increased in tg mice than wild-type mice. In contrast, there were no differences in other MMP activities between wild-type mice and tg mice. d. A quantitative densitometric analysis of MMP-9 activity in tg mice and wild-type mice. Fig. 4c, a representative gel selected from 3 separate experiments is shown, and the densitometric data in Fig. 4d were obtained from these 3 gels.

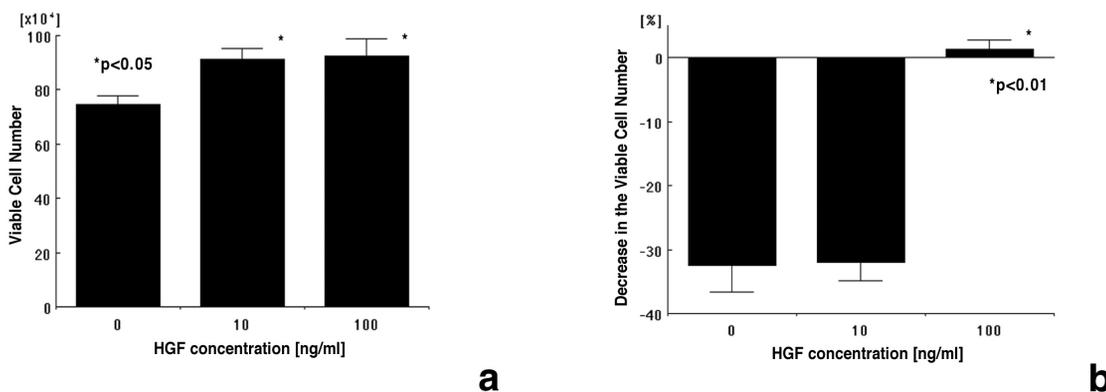


Fig. 5. In vitro effects of HGF on murine proximal tubular epithelial cells (mProx24). a. Promotion of increases in the cell number of mProx24. Both of 10 and 100 ng/mL of HGF significantly enhanced mProx24 proliferation. b. Prevention of decreases in the viable cell number of mProx24 treated with AA. 100 ng/mL but not 10 ng/mL of HGF could also prevent decreases in the viable cell number of mProx24 treated with AA.

western blotting 法による検討では mProx24 において、AA 投与は抗アポトーシスタンパク質である Bcl-xL の発現を軽度亢進させたが、アポトーシス促進タンパク質である Bax の発現も同時に亢進させ、結果として Bcl-xL/Bax 比を減少させアポトーシスを誘導した。この際 HGF 100 ng/mL の前処理が、Bcl-xL/Bax 比の低下を抑え、AA 投与により生じる mProx24 のアポトーシスを抑制した (Fig. 6c, d)。この効果は HGF 10 ng/mL の前処理では得られなかった。

7) EGF と HGF の相互作用に関する検討

mProx24 において、HGF 投与は TIMP-1 mRNA の基礎発現量は低下させないが (データ不提示)、EGF 投与は TIMP-1 mRNA 発現を誘導した。HGF はこの

EGF による TIMP-1 発現誘導効果を容量依存的に抑制した (Fig. 7a, b)。以上の *in vitro* の実験結果は、*in vivo* での HGF の抗間質線維化作用が尿細管上皮細胞に対する抗アポトーシス作用ではなく、EGF 等の TIMP-1 遺伝子発現誘導作用を抑制することで生じていることを示唆すると考えられた。

考 察

本研究において、HGF TG マウスでは AA 投与中止後に生じる腎間質線維化は WT マウスと比較して軽度であり、導入遺伝子に由来する循環 HGF はマウス AA 中毒性腎症モデルで反応性腎線維化を抑制することが明らかとなった。その機序の一つとして、HGF TG マウスでは REC D7 での尿細管上皮細胞における

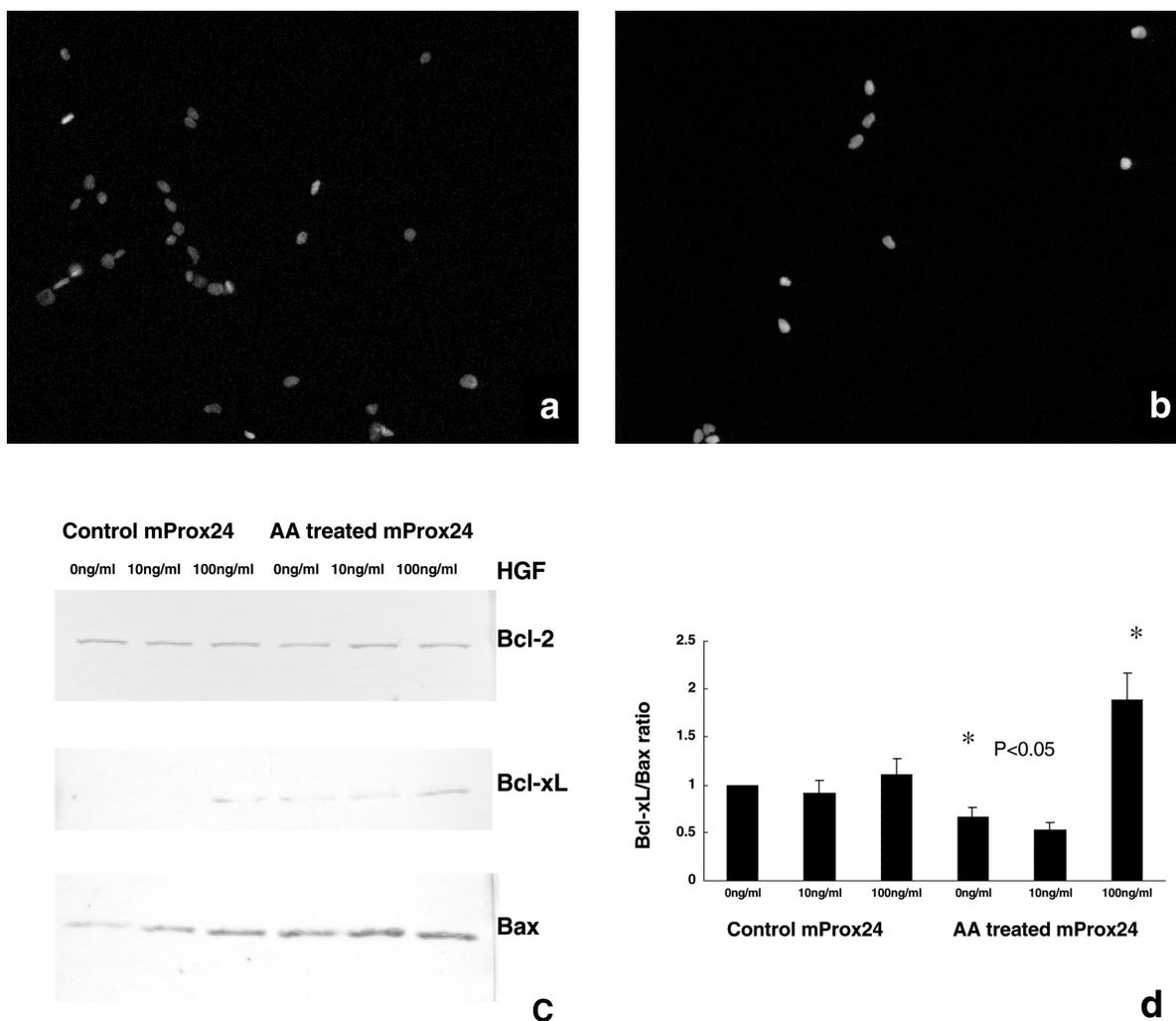


Fig. 6. Anti-apoptotic effects of HGF on mProx24. a. Apoptotic nuclei in mProx24 treated with AA. (FITC, x200) b. Apoptotic nuclei in the mProx24 treated with HGF followed by AA. (FITC, x200) c. Expression of anti- and pro-apoptotic proteins in mProx24 treated with AA. Treatment with AA significantly increased expression of a pro-apoptotic protein, Bax, in spite of the mildly increased expression of an anti-apoptotic protein, Bcl-xL, resulting in a decrease of the Bcl-xL/Bax ratio and induction of apoptosis in mProx24. 100 but not 10 ng/mL of HGF could attenuate such a decrease in the Bcl-xL/Bax ratio in mProx24 treated with AA, thereby suppressing apoptosis. d. Densitometric analysis of c. The blot is representative of 3 independent experiments, and the densitometric data were obtained from these 3 blots.

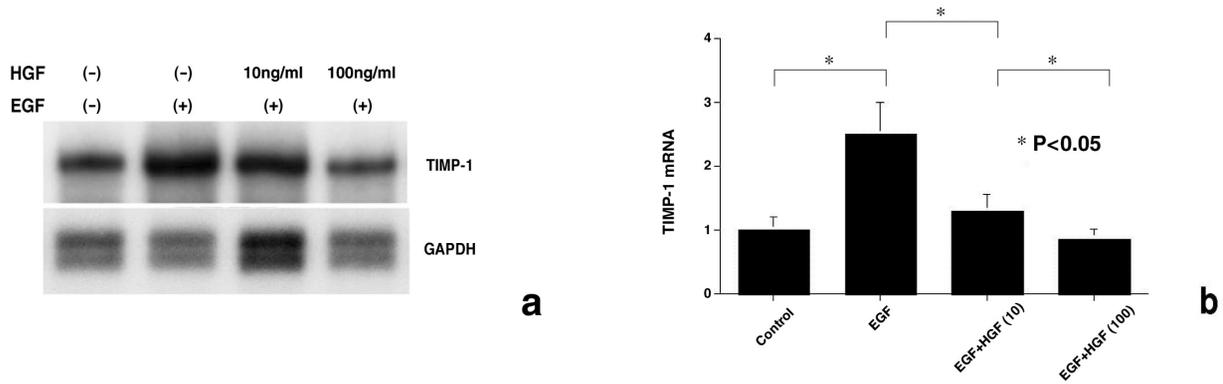


Fig. 7. Anti-fibrotic effects of HGF on mProx24. a. TIMP-1 gene expression induced by EGF in mProx24. HGF, even at 10 ng/mL, could significantly lower TIMP-1 mRNA expression of mProx24 treated with 10 ng/mL of EGF. b. Densitometric analysis of a. The blot is representative of 3 independent experiments, and the densitometric data were obtained from these 3 blots.

TIMP-1 mRNA および蛋白発現が WT マウスと比較し有意に抑制され、またそれに対応して MMP-9 活性が亢進したことから、HGF により細胞外基質の分解が促進され、腎間質線維化が抑制された可能性が示唆された。また培養細胞を用いた実験から、HGF は尿細管上皮細胞における EGF 等の TIMP-1 遺伝子発現誘導作用を抑制する機序が推測された。

HGF の腎間質線維化抑制効果について既報としては、進行性腎障害モデルに先天性ネフローゼ症候群マウス (ICGN マウス) を用い、組み換え型 HGF の投与が TGF- β 陽性細胞数を減少させ、尿細管障害、間質への type I collagen 沈着を抑制したというもの¹⁷⁾、あるいは同じ ICGN マウスもしくは 5/6 腎摘ラットにおいて抗 HGF 中和抗体投与が腎線維化を増悪させたというもの^{23,24)}、また閉塞性腎症モデルにおいて組み換え型 HGF 投与が TGF- β 発現を減弱させ、アポトーシスを抑制することにより腎線維化進展を抑制したとの報告などがある¹⁸⁾。これらの報告において、HGF 投与の結果 TGF- β 発現が抑制され、TGF- β による尿細管上皮細胞、内皮細胞のアポトーシスの抑制、TGF- β による線維芽細胞の形質転換及び ECM 産生の亢進の抑制が認められるが⁷⁾、TGF- β 陽性細胞である間質のマクロファージ、線維芽細胞には HGF/c-MET receptor の存在が証明されておらず、これらの抗線維化機序が HGF の直接作用とは考えにくい。c-Met 陽性である培養尿細管上皮細胞を用いた検討では HGF が ECM の産生を抑制するのではなく、MMP-9 産生を亢進させ、TIMP-1 産生を抑制し、ECM の分解を促進するとの報告があり、本研究の結果と合致する²⁴⁾。今回の我々の検討から、HGF には近位尿細管上皮細胞において EGF による TIMP-1 産生誘導に対する抑制効果があり、それに伴い腎組織での MMP-9 活性亢進作用がある事が示された。

その他に REC D28 の腎組織では、HGF TG マウスにおいて、FSP1 陽性細胞数が WT マウスと比較し少ない傾向が認められた。近年、HGF が尿細管上皮細胞の線維芽細胞への分化 (Epithelial-mesenchymal transdifferentiation: EMT) を抑制するとの報告もあり²⁵⁾、今回の HGF による線維化軽減作用に EMT の抑制が関与した可能性も考えられる。また本研究では、HGF TG マウスを用いており、AA 投与によって腎障害が生じる以前に、既に TG マウスでは WT マウスと比較し高い濃度の HGF が存在していたが、2 週間の AA 投与終了時点 (AAN D14) での腎障害の程度は TG, WT 両群で有意な差はみられず、腎障害の発症に導入遺伝子由来の HGF が大きな影響は与えていないと考えられた。腎機能の指標である血清 creatinine 値は、AA 投与終了後 4 週間の回復期間をおいた REC D28 の時点で WT マウスと HGF TG マウスで有意な差はみられず、またいずれも正常対照群と比較して著しい上昇はみられなかった。また間質線維化面積の定量では WT マウスと HGF TG マウスで有意な差がみられたが、両群とも高度の腎間質線維化はみられなかった。これらの結果から今回用いたマウス AA 中毒性腎症モデルは、高度の腎機能障害を生じるモデルではなく、そのため HGF の治療効果も検出しにくい可能性が考えられた。今回我々は培養尿細管上皮細胞を用いた検討を行ったが、腎尿細管間質領域では血管内皮細胞も HGF を産生し、またその受容体である c-Met を発現していることが知られている⁷⁾。培養血管内皮細胞を用いた検討では、HGF 投与によって内皮細胞の MMP 産生が亢進することが報告されており²⁶⁾、今回の HGF による抗腎間質線維化作用に間質領域の血管内皮細胞が関与した可能性があり、今後検討が必要であると考えられる。

我々が作成したマウス AA 中毒性腎症モデルは、

WT マウスにおいて2週間のAA投与で顕著な尿細管変性を起こしたが、有意な間質線維化は生じさせなかった。その後4週間の観察期間をおくと、尿細管上皮の再生と共に有意な腎間質線維化を生じた。Chinese herbs nephropathyは、糸球体障害を全く伴わないにもかかわらず、顕著な尿細管萎縮と間質線維化によって特徴づけられる疾患である^{4, 27)}。本研究において我々の用いたモデルは糸球体障害を全く伴わずに高度な尿細管上皮の変性および反応性腎間質線維化を呈し、Chinese herbs nephropathyと病理学的に類似していると考えられた。また本モデルにおいて腎組織でのTGF- β 1, EGF, HGF, α 1 (I) procollagen mRNA発現の検討にて、AA投与を中止した後の回復期においても、TGF- β 1, α 1 (I) procollagen, EGFのmRNA発現は対照群と比較し高値を示した。尿細管上皮細胞の再生作用を有する既知の成長因子のなかでHGFを除くEGF, fibroblast growth factor-2 (FGF-2), platelet-derived growth factor (PDGF)などは腎間質の線維芽細胞に対する増殖作用を有しており、尿細管間質に対して線維化促進的であると考えられている³⁾。これはマウスAA中毒性腎症モデルで、回復期にWTマウスにおいて観察される尿細管上皮細胞の再生と反応性の間質線維化と合致する。したがってChinese herbs nephropathyでは、AAを含んでいる漢方薬の習慣的飲用の結果生じている慢性反復性尿細管障害が、線維化促進成長因子の活性化を通して腎間質線維化の進行を生じさせていると考えられる。

HGFの抗線維化効果を応用した肝硬変に対する治療²⁸⁾、血管新生作用を応用した閉塞性動脈硬化症やBuerger病、虚血性心疾患に対する治療については効果的な投与方法も確立され²⁹⁾、HGFは最も臨床応用が近いgrowth factorのひとつであり、腎線維化を呈する慢性腎不全もそのターゲットとなりうると期待できる。また透析導入となる代表的な原疾患である慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症の進行は緩徐であり、数年から数十年の経過で末期腎不全に至る。こうした状況に対して治療法として組み換え型HGFの投与以外に生体内での遺伝子発現系によるHGF持続補充療法が考えられる。今回の実験で生体内遺伝子発現系での低濃度HGFでも腎線維化抑制が得られることが明らかとなり、今後の臨床応用に期待がもたれる。しかし強力な薬剤誘発性プロモーター下で全身の組織でHGFを発現するトランスジェニックマウスでは乳癌や肉腫など様々な腫瘍が多発し¹⁹⁾、腎では糸球体硬化や嚢胞性変化が生じることが報告されている³⁰⁾。また我々の検討でも低濃度のHGFはTGF- β トランスジェニックマウス5/6腎摘モデルで腎障害を増悪させる事が確認されており^{31, 32)}、今後は病態に応じたHGFの発現量や発現部位を検討することが必要であると考えられた。

結 論

アリストロキア酸 (AA) 投与によって引き起こされる慢性中毒性腎症および腎間質線維化に対するHGFの作用を検討するために、マウスAA中毒性腎症モデルをHGF TGマウスを用いて作成した。またHGFの抗線維化作用の分子機構を明らかにするために、培養マウス近位尿細管上皮細胞 (mProx24) を用いたin vitroの検討を行った。2週間のAA連日投与によって有意な尿細管上皮細胞の変性がWTマウスおよびHGF TGマウス双方に生じた。AA投与後4週間の観察においてWTマウスでは腎間質線維化が出現した。しかしHGF TGマウスでは間質線維化は抑制され、TIMP-1の発現減弱およびMMP-9の活性亢進がHGF TGマウスでの線維化の軽減を部分的に説明しうると考えられた。EGFによって誘導されたmProx24でのTIMP-1遺伝子の発現をHGFは容量依存的に抑制した。今回用いたHGF TGマウスにおける導入遺伝子由来循環HGFはAA投与によって生じる尿細管上皮細胞の変性は阻止し得ないが、有意な線維化を伴わない上皮細胞の再生を促進する。これらの知見は尿細管変性に引き続いて生じる腎間質線維化に対する低濃度HGF治療の可能性を示唆する。

謝 辞

本研究にあたり、御指導、御協力を頂きました埼玉医科大学腎臓内科学教室 鈴木洋通教授、岡田浩一講師および教室員各位に深く感謝致します。なお本研究の一部は第35回米国腎臓学会 (Philadelphia, 2002) において発表した。

引用文献

- 1) Okada H, Strutz F, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contrib Nephrol* 1996;118:147-54.
- 2) Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998;339:1448-56.
- 3) Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 2000;15:290-301.
- 4) Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993;341:387-91.
- 5) Cosyns JP, Dehoux JP, Guiot Y, Goebbels RM, Robert A, Bernard AM, et al. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy? *Kidney Int* 2001;59:2164-73.
- 6) Debelle FD, Nortier JL, De Prez EG, Garbar CH,

- Vienne AR, Salmon IJ, et al. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:431-6.
- 7) Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 2001;59:2023-38.
- 8) Schena FP. Role of growth factors in acute renal failure. *Kidney Int Suppl* 1998;66:S11-5.
- 9) Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 1991;67:901-8.
- 10) Liu Y, Sun AM, Dworkin LD. Hepatocyte growth factor protects renal epithelial cells from apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:821-6.
- 11) Liu Y. Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms. *Am J Physiol* 1999;277:F624-33.
- 12) Yo Y, Morishita R, Nakamura S, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, et al. Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney Int* 1998;54:1128-38.
- 13) Igawa T, Kanda S, Kanetake H, Saitoh Y, Ichihara A, Tomita Y, et al. Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for cultured rabbit renal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:831-8.
- 14) Harris RC, Burns KD, Alattar M, Homma T, Nakamura T. Hepatocyte growth factor stimulates phosphoinositide hydrolysis and mitogenesis in cultured renal epithelial cells. *Life Sci* 1993;52:1091-100.
- 15) Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4357-61.
- 16) Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol* 1994;266:F129-34.
- 17) Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest* 1998;101:1827-34.
- 18) Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2001;59:1304-14.
- 19) Takayama H, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, et al. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:701-6.
- 20) Shiota G, Wang TC, Nakamura T, Schmidt EV. Hepatocyte growth factor in transgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* 1994;19:962-72.
- 21) Okada H, Ban S, Nagao S, Takahashi H, Suzuki H, Neilson EG. Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int* 2000;58:587-97.
- 22) Takaya K, Koya D, Isono M, Sugimoto T, Sugaya T, Kashiwagi A, et al. Involvement of ERK pathway in albumin-induced MCP-1 expression in mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F1037-45.
- 23) Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, Mizuno-Horikawa Y, Nakamura T. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2000;57:937-48.
- 24) Liu Y, Rajur K, Tolbert E, Dworkin LD. Endogenous hepatocyte growth factor ameliorates chronic renal injury by activating matrix degradation pathways. *Kidney Int* 2000;58:2028-43.
- 25) Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:96-107.
- 26) Wang H, Keiser JA. Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:900-5.
- 27) Cosyns JP, Jadoul M, Squifflet JP, De Plaen JF, Ferluga D, van Ypersele de Strihou C. Chinese herbs nephropathy: a clue to Balkan endemic nephropathy? *Kidney Int* 1994;45:1680-8.
- 28) Fujimoto J. Gene therapy for liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15 Suppl:D33-6.
- 29) Morishita R. Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J* 2002;66:1077-86.
- 30) Takayama H, LaRochelle WJ, Sabnis SG, Otsuka T, Merlino G. Renal tubular hyperplasia, polycystic disease, and glomerulosclerosis in transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Lab Invest* 1997;77:131-8.
- 31) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kikuta T, Kanno Y, et al. TGF-beta1 and HGF

coordinately facilitate collagen turnover in subepithelial mesenchyme. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:255-60.

32) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kanno Y, Kopp JB, et al. Hepatocyte growth factor

counteracts transforming growth factor-beta1, through attenuation of connective tissue growth factor induction, and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. *Faseb J* 2003;17:268-70.