

原 著

尿細管上皮細胞における Connective Tissue Growth Factor (CTGF) 発現の検討

小林 竜也

Expression of Connective Tissue Growth Factor in Renal Tubular Epithelial Cells

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

Background/Purpose: Connective tissue growth factor (CTGF) is a member of CCN family which mediates profibrotic effects of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), promoting fibroblast proliferation and extracellular matrix (ECM) production. CTGF has been presumed to involve in a variety of organ fibrogenesis. In the kidney at health and a disease, by using in situ hybridization glomerular parietal and visceral epithelial cells, mesangial cells, and interstitial fibroblasts were shown to express CTGF. Recently, tubular epithelial cells have been also revealed to express CTGF especially in diabetic nephropathy. Therefore, in this study, I evaluated CTGF protein expression in the tubular epithelium of renal biopsy specimens by immunohistochemistry, and the expression regulation and the role of CTGF in the cultured tubular epithelial cells (mPTEC). **Methods:** Using an anti-CTGF antibody, I performed catalyzed signal amplification immunohistochemistry on renal biopsy specimens from patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS), diffuse proliferative lupus nephritis (DPLN), IgA nephropathy (IgAN), and diabetic nephropathy (DN). Using mPTEC cultured in monolayer and co-culture with renal fibroblasts (TFB), whether a given humoral factor could induce CTGF mRNA expression and whether CTGF derived from mPTEC could stimulate TFB to produce type I collagen were tested. The expression of mRNA and type I collagen were determined by ribonuclease protection assay and indirect enzyme-linked immunosorbent assay, respectively. **Results:** Significant CTGF expression in the tubular epithelium was found in parallel to the interstitial fibrosis in DN samples. In addition, it was revealed that glucocorticoid (GC) therapy resulted in significant induction of tubular CTGF expression in MCNS and DPLN. Among profibrotic growth factors and proinflammatory cytokines employed, only TGF- β 1 could induce CTGF mRNA expression in mPTEC in time- and dose-dependent fashion. D-glucose and dexamethasone could also induce CTGF expression in mPTEC. CTGF derived from mPTEC by TGF- β 1 and d-glucose could subsequently induce type I collagen production in TFB. **Conclusion:** Renal tubular epithelial cells can express CTGF in vivo and in vitro, which is likely involved in renal fibrogenesis at least in DN and other diseases undergoing GC therapy.

Keywords: connective tissue growth factor (CTGF), tubular epithelial cells, transforming growth factor- β (TGF- β), d-glucose, glucocorticoid (GC)

J Saitama Med School 2003;30:37-49

(Received December 10, 2002)

緒 言

あらゆる腎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て腎機能予後とより有意に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盛んに行われるようになった。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り、

腎間質線維化が生じるとされる^{1,3,4)}。その典型的病理組織所見は、間質への単核球浸潤・障害尿細管の萎縮・周囲の線維芽細胞による細胞外基質産生の亢進である。腎間質線維化の進行において、中心的役割を果たす増殖因子として transforming growth factor- β (TGF- β) が報告されている^{1,3,5)}。TGF- β は多様な作用を持つ増殖因子で、腎においてメサンギウム細胞、尿細管上皮細胞、線維芽細胞などから分泌され、パラクリン／オートクリン的に作用して標的細胞の細胞外基質蛋白合成を促進する。

近年われわれのグループでは、一群の線維化関連分子の中で TGF- β の線維化促進作用を仲介している connective tissue growth factor (CTGF)⁶⁻⁸⁾ に着目し、検討を進めている。CTGF は 349 個のアミノ酸よりなる 36~38kD のペプチドであり、近年多数の類似する分子が登録されている CTGF/fisp12, cyr61, nov (CCN) ファミリーの一員である。ヒト CTGF は 1991 年にヒト臍帯静脈内皮細胞の cDNA ライブラリーより⁹⁾、またマウス CTGF (fisp12) は 1988 年にマウス胎児線維芽細胞 NIH3T3 の cDNA ライブラリーよりクローニングされ¹⁰⁾、94% の homology が認められている。CTGF 発現は各種線維芽細胞、血管内皮細胞／平滑筋細胞、軟骨細胞、腫瘍細胞に認められ、それぞれにおいてパラクリン／オートクリンとして固有の作用；増殖促進／アポトーシス誘導、遊走、細胞外基質産生、血管新生作用を呈する⁶⁻⁸⁾。各細胞に共通する強力な CTGF 発現誘導因子は前述した TGF- β 1 であり、その他の増殖因子にはほとんど発現誘導作用は認められない¹¹⁾。CTGF は線維芽細胞に対しては増殖促進および細胞外基質蛋白 (コラーゲン、フィブロネクチン) 産生促進作用を有しており、TGF- β 1 による線維芽細胞に対するこれらの作用が抗 CTGF 中和抗体により抑制されることより、TGF- β 1 によって誘導される CTGF が線維芽細胞に対する作用を仲介していると推定されている^{12,13)}。

CTGF は生体の様々な臓器；心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、筋肉、脾臓、腎臓において発現が認められるが、もっとも多く発現しているのは腎臓である⁶⁻⁸⁾。正常腎では podocyte, Bowman 嚢上皮細胞、一部の血管内皮細胞と間質細胞に発現が認められる。ヒト IgA 腎症 (IgAN)、半月体形成性糸球体腎炎、ループス腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎およびモデル動物の腎炎組織において、糸球体病変では半月体やメサンギウム増殖性病変、間質病変では尿細管周囲および糸球体周囲間質細胞に CTGF 発現が報告されており、細胞外基質蛋白産生と蓄積に関与していると考えられている^{14,15)}。ヒト糖尿病性腎症 (DN) に関しても、in vitro でブドウ糖刺激によりメサンギウム細胞における CTGF 産生が亢進し、また糖尿病モデル動物の糸球体においても CTGF 産生亢進が認められ、糖尿病性糸球体硬化

への CTGF の関与が推定されている^{16,17)}。DN ではさらに尿細管上皮細胞にも CTGF mRNA 発現が報告されている^{14,18)}。現在までの CTGF 発現の局在に関する検討ではほとんどが in situ hybridization 法を用いており^{14,18)}、蛋白レベルでの発現の裏付けがなく免疫組織化学による検討が必要である。今回、尿細管上皮細胞における CTGF 発現に関する知見をさらに発展させるため、ヒト腎生検組織を用いて腎間質病変における尿細管上皮細胞の CTGF 発現を高感度免疫組織化学を用いて検討し、また培養近位尿細管上皮細胞を用いて上皮細胞におけるその発現制御因子を検討する。

対象と方法

対象：1990 年から 2001 年に当院および関連施設で腎生検を行った微少変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) 10 例、びまん性増殖型ループス腎炎 (DPLN) 10 例、IgAN 10 例、DN 5 例を対象とし、これらの腎生検組織を用いた (Table 1)。それぞれの疾患は、臨床所見と腎生検組織の光学顕微鏡および免疫蛍光抗体法所見によって診断した。MCNS は最終的な糖質コルチコイド (GC) 有効性を参考に診断し、GC 投与開始後 (プレドニゾロン 1 mg/kg-wt/日) の症例も含めた。DPLN 患者はアメリカリウマチ協会の診断基準を満たす全身性エリテマトーデス (SLE) 患者で、腎生検組織でびまん性増殖型糸球体腎炎を呈し、GC 治療中 (プレドニゾロン 1 mg/kg-wt/日) の症例も含めた。また IgAN の診断では、SLE、肝疾患、Schoenlein-Henoch 紫斑病は除外した。各患者の臨床／病理パラメーターを Table 1 に示した。MCNS と DPLN では GC 治療群と未治療群の群間比較も検討した。

組織病理：ホルマリン固定腎生検組織のパラフィンブロックより 4 μ m 厚の切片を作成し、hematoxylin-eosin 染色および Masson's trichrome (MT) 染色を行い病理診断に供した。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視野において行った。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。顕微鏡画像をコンピューターに取り込み、画像処理ソフト (Mac SCOPE, Ver. 2.5, Mitani Corp., Fukui, Japan) を用い定量化し¹⁹⁾、陽性画像領域 (%) で表した (Fig. 1 g, h, & Table 1)。

免疫染色：CTGF の免疫染色のためにパラフィン切片をキシレン処理で脱パラフィンし (5 分間 3 回)、エタノール (EtOH) 処理による親水化 (100% EtOH 5 分間 3 回, 75% EtOH 10 分間 1 回, distilled water 5 分間 3 回, Phosphate-buffered saline (PBS) 5 分間) を行った。その後、抗原活性化のためクエン酸緩衝液中 (10 mM sodium citrate buffer pH 6.0) でマイクロウェーブ煮沸した (600 W 10 分間 3 回)。以下の行

Table 1. Clinical and pathological parameters of patients at biopsy

Case	Gender	Age	PSL [mg/day]	Proteinuria [mg/day]	HbA1c [%]	Creatinine [mg/dl]	Fibrotic area(%)	CTGF expression			
								Glo		TubInt	
								Epi	Mes	Tub	Int
MCNS-1	M	23	none	3500	n.c.	0.7	1.2	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
2	M	36	none	6200	n.c.	1.07	2.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	M	28	none	4800	n.c.	0.84	2.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	F	22	none	5500	n.c.	0.53	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	M	33	none	6800	n.c.	0.75	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	M	40	none	9000	n.c.	0.69	3.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7*	M	23	none	9500	n.c.	0.7	2.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	M	27	50	6800	n.c.	0.78	1.7	(+)	n.d.	(+)	n.d.
9	F	22	50	7900	n.c.	0.67	2.5	(+)	n.d.	(++)	n.d.
10*	M	27	60	5600	n.c.	0.69	7.6	(+)	n.d.	(++)	n.d.
DPLN-1	F	22	none	1500	n.c.	0.69	2.5	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
2	F	23	none	2900	n.c.	0.63	1.5	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
3	F	26	none	3000	n.c.	0.78	3.5	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
4	F	28	none	5000	n.c.	0.44	15.8	(+)	(+)	(+)	n.d.
5*	F	35	none	4800	n.c.	0.6	3.5	(++)	(+)	(+)	(+)
6	F	39	40	5100	n.c.	0.51	4.4	(+)	n.d.	(++)	(+)
7	F	28	50	3800	n.c.	0.87	7.6	(+)	n.d.	(++)	(+)
8	F	30	50	6000	n.c.	0.68	10.5	(+)	n.d.	(++)	(+)
9	F	42	60	3300	n.c.	0.98	18	(+)	(+)	(+++)	(+)
10*	F	38	60	3800	n.c.	0.77	14.6	(++)	(+)	(+++)	(++)
IgAN-1	F	30	none	400	n.c.	0.54	1.2	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
2	M	46	none	400	n.c.	0.8	2.5	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
3	F	22	none	900	n.c.	0.77	2.1	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
4	F	30	none	1200	n.c.	0.94	13.1	n.d.	n.d.	(+)	(+)
5	M	26	none	1000	n.c.	0.66	10.5	(+)	(+)	(+)	n.d.
6	M	28	none	600	n.c.	0.9	10.5	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
7	F	26	none	800	n.c.	0.98	8	(+)	(+)	n.d.	n.d.
8	M	59	none	600	n.c.	0.72	5.2	(+)	n.d.	n.d.	n.d.
9	M	62	none	800	n.c.	0.81	8.3	(+)	(+)	n.d.	n.d.
10*	M	66	none	1100	n.c.	1.12	13.4	(+)	n.d.	(+)	(+)
DN-1	M	37	none	2800	9.2	1.07	8.9	(+)	n.d.	(+)	n.d.
2	F	43	none	4300	10.1	1.01	10.5	(+)	n.d.	(++)	n.d.
3	M	58	none	3100	7.9	0.95	14.5	(+)	n.d.	(++)	(+)
4	M	59	none	4500	8.2	0.77	17.5	(+)	(+)	(+++)	n.d.
5*	M	37	none	8300	8.5	1.07	30.8	(+)	n.d.	(+++)	(++)

n.c., not checked; n.d., not detected; PSL, administered prednisolone; Glo, glomerulus; TubInt, tubulointerstitium; Epi, glomerular epithelium; Mes, mesangium cell; Tub, tubular epithelium; Int, interstitial cells; (+), faint; (++), moderate; (+++), strong. *presented cases

程は Biotin Blocking System キットおよび Catalyzed Signal Amplification (CSA) System Peroxidase キット (DAKO, Carpinteria, CA, USA) を用いて行った。また洗浄には TBST 液 (0.05 M Tris-HCl pH 7.6, 0.3 M NaCl, 0.1 % Tween 20) を用いた。内因性ビオチン阻害のためアビジンおよびビオチン処理をそれぞれ 15 分間行った。その後、内因性ペルオキシダーゼ阻害のために H_2O_2 処置を室温で 5 分間、また非特異的染色を予防するため PROTEIN BLOCK 液による prehybridization を室温で 1 時間行った。その後、一次抗体として岡山大学歯学部滝川正春教授から御供与頂いた抗マウス CTGF ウサギ血清を使用²⁰⁾、室温で 1 時間反応させ洗浄した後 (10 分間 3 回)、二次抗体にビオチン化抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体 (American Qualex, San Clement, CA, USA) を用い室温で 1 時間反応させた。洗浄後 (10 分間 3 回)、STREPTAVIDIN-BIOTIN COMPLEX 液、AMPLIFICATION REAGENT 液、STREPTAVIDIN-PEROXIDASE 液を用いたシグナル増幅を洗浄過程を挟んでそれぞれ室温で 15 分間行った。最終洗浄後、

diaminobenzidine (DAB) と H_2O_2 を加えた Substrate-Chromogen Solution による発色反応を必要時間 (30 秒～5 分) 行った。陰性コントロールには一次抗体の代わりに非免疫ウサギ血清を使用した。疑陽性シグナルを極力排除するため、対応する陰性コントロール組織切片において非特異的なシグナルを認めた際はその染色検体を廃棄し、新たな切片にて再度 CSA 法を施行した。

培養細胞：マウス近位尿細管上皮細胞 (mPTEC) は、田辺製薬 (株) 創薬研究所菅谷健博士より、マウス腎間質線維芽細胞 (TFB) は、当教室の岡田浩一講師より御供与頂いた^{21, 22)}。共に、Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)、10 % fetal calf serum (FCS)、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin で継代維持し、実験に用いた。各処置前の resting medium には、0.5 % FCS D-MEM を用いた。なお、mPTEC および TFB にはそれぞれ 1 型コラーゲンおよび CTGF 産生能が認められないことが、当研究室における pilot study により明らかとされている²¹⁾。

mPTEC単層培養系: 6-well plateにmPTECを15000個/cm²の濃度で播種し、24時間後に resting mediumへ交換の後、48時間 resting したものを単層培養系として実験に供した。使用した増殖因子/サイトカインは、recombinant human CTGF (rhCTGF)は岡山大学歯学部滝川正春教授から御供与頂き²⁰⁾、その他recombinant human TGF- β 1 (rhTGF- β 1), recombinant human HGF (rhHGF), recombinant human EGF (rhEGF), recombinant human FGF-2 (rhFGF-2), recombinant mouse IL-1 β (rmIL-1 β), recombinant rat PDGF-BB (rrPDGF), recombinant mouse TNF- α (rmTNF- α)はすべて R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)より購入した。また dexamethasone (DEX) および d-glucose (GLC)はSigma (St. Louis, MO, USA)より購入し使用した。TGF- β 1に関しては、反応時間および投与濃度を変化させ、その他の液性因子 (rhCTGF, rrPDGF, rhEGF, rhFGF, rhHGF, rmIL-1 β , rmTNF- α)については一定の刺激時間として投与濃度を変化させ、また GLC に関しては anti-TGF- β 中和抗体 (IgG, 50 μ g/ml) (Genzyme, Cambridge, MA, USA) を添加した検討も加えた。RNA 抽出は以下に示す方法で行った。

mPTEC / TFB共培養系: 6-well plate に TFB を15000個/cm²の濃度で播種し、また 0.4 μ m pore size の culture insert (FALCON CELL CULTURE INSERTS, BECTON DICKINSON, Franklin Lakes, NJ, USA) に mPTEC を30000個/cm²の濃度で播種し、24時間後に上記の TFB の 6-well plate に重層し、同時に resting medium に交換の後、48時間 resting したものを PTEC/TFB 共培養系として実験に供した。GLC 100 mM, GLC 100 mM+anti-TGF- β あるいは GLC 100 mM+anti-TGF- β +anti-CTGF を添加した resting medium, および DEX 1000nM あるいは DEX 1000nM+anti-CTGF を添加した resting medium に交換の後、48時間後に培養上清を用いて以下の方法で1型コラーゲン産生量を定量した。細胞数はトリプシン-EDTA 処理による浮遊後、hemocytometer を用いて測定した。

Ribonuclease protection assay (RPA): 培養細胞から TRIzol (GIBCO BRL, Grand Island, 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) は新潟大学腎研究施設構造病理学分野 山本格教授から御供与頂いた。CTGF (202 bp, 731 to 932 corresponding to mouse CTGF) は当教室で reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) にて取得した。³²P-UTP label した cRNA probe と 10 μ g の total RNA を 45°C, 16 時

間 hybridization の後、ribonuclease A (1.2 μ g/ml) および ribonuclease T1 (120 U/ml) で 30°C, 60 分処理した。Proteinase K (0.45 μ g/ml) 37°C, 60 分処理にて ribonuclease を不活化し、EtOH 沈殿にて精製後、6%の acrylamide 変性ゲルを用いて 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、フィルムを透過型 scanner (GT-9600, EPSON, Nagano, Japan) で取り込み、各 protected-band を NIH image (Ver.1.62, NIH Division of Computer Research and Technology, Bethesda, MD, USA) を用いて定量した。各 mRNA 量は、GAPDH との比で標準化した。

Indirect enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA): 培養上清を ELISA 用 96-well plate (Nunc-Immuno Plate, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) に各 200 μ l 分注し、37°C, 60 分間 incubate して可溶性蛋白の coating を行った。Coating 後、洗浄液 (0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) にて5回洗浄後、ブロッキング液 (10% スキムミルク, 0.1% Tween 20, 0.05% アジ化ナトリウム) で室温にて60分間 preincubate した。その後、抗ラット1型コラーゲンウサギポリクローナル抗体 (1:3000; Chemicon, Temecula, CA, USA) を加え室温で30分間反応後、5回洗浄し、alkaline phosphatase 化抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体 (1:3000; Sigma) にて室温で30分間反応させた。再度5回洗浄後、disodium p-nitrophenyl phosphate (Sigma) を加え発色させ、吸光度計 (405 nm) で計測した。1型コラーゲン総産生量を細胞数で除し、一細胞あたりの1型コラーゲン産生量を算出した。また検量線作成のため、精製ラット1型コラーゲン (Sigma) を陽性コントロールとして用いた。

統計処理: 各 mRNA および1型コラーゲンの発現量に関しては、計算には Stat View (Macintosh Version 1.03, Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) を使用して ANOVA を行い、検定は Bonferroni/Dunn 法を用いて、またノンパラメトリックなパラメーターの群間比較には Wilcoxon テストを用いた。CTGF 発現とその他のパラメーターと相関解析には一次回帰分析を行った。p<0.05 を統計学的有意と見なした。本文中のデータは mean $\pm$ SD で表わした。

結 果

ヒト腎生検組織における CTGF 蛋白の局在 (超高感度免疫組織化学による検討) (Table 1.)

1) 微少変化型ネフローゼ症候群 (MCNS:10 例)

a) 未治療群 (7 例)

MCNS の腎生検組織では、未治療の全例において

有意な CTGF 蛋白発現は認められなかった (Fig. 1a). 正常な腎組織において定常的に発現が認められる podocyte, Bowman 嚢上皮細胞にも発現は認められず, 上皮細胞の病的状態が示唆された.

b) 糖質コルチコイド (GC) 投与群 (3 例)

プレドニゾロン投与中の患者は, すべて効果発現以前の蛋白尿強陽性状態での腎生検組織である. Podocyte, Bowman 嚢上皮細胞における CTGF 発現が回復しており, GC 療法の効果と考えられた (Fig. 1b). 一部の近位もしくは遠位尿細管上皮細胞に CTGF 発現が認められたが, 明らかな尿細管周囲の線維化は伴っていなかった (Table 1).

各群内での検討では, 各パラメーター間に有意な相関は認めなかった. また両群間の比較では, podocyte, Bowman 嚢上皮細胞および近位もしくは遠位尿細管上皮細胞における CTGF 発現頻度に有意差を認めた ($p < 0.05$).

2) びまん性増殖型ループス腎炎 (DPLN:10 例)

a) 未治療群 (5 例)

糸球体増殖性病変において著明な糸球体上皮細胞およびメサングウム細胞の CTGF 陽性所見が認められた (Fig. 1c). しかし, ごく少数の近位もしくは遠位尿細管上皮細胞にのみ CTGF が認められるのみであった.

b) 糖質コルチコイド投与群 (5 例)

未治療群と同様に, 糸球体増殖性病変の podocyte, Bowman 嚢上皮細胞およびメサングウム細胞に CTGF 陽性を認め, また広範な近位および遠位尿細管上皮細胞に CTGF が強陽性であった (Fig. 1d). また尿細管周囲間質細胞にも CTGF 発現を認めた.

各群内での検討では, 各パラメーター間に有意な相関は認めなかった. また両群間の比較では, 近位もしくは遠位尿細管上皮細胞における CTGF 発現頻度と fibrotic area に有意差を認めた ($p < 0.05$). 全症例の検討では尿細管上皮における CTGF 発現と fibrotic area との間で正の相関を認めた (Fig. 2a).

3) IgA 腎症 (IgAN:10 例)

Podocyte, Bowman 嚢上皮細胞において CTGF 発現が認められたが, メサングウム増殖性病変に一致した発現は認めなかった (Fig. 1e). 近位および遠位尿細管上皮細胞, またその周囲の間質細胞において CTGF 発現が散見された.

IgAN 症例内の検討では各パラメーター間に有意な相関は認めなかった.

4) 糖尿病性腎症 (DN:5 例)

著明な糸球体硬化病変, 尿細管基底膜肥厚~周囲間質線維化病変に一致して, podocyte, Bowman 嚢上皮細胞, メサングウム細胞, 近位および遠位

尿細管上皮細胞, 間質細胞に高度な CTGF 発現を認めた (Fig. 1f).

DN 症例内の検討では生検症例数が少なく, 各パラメーター間に有意な相関は認めなかったが, 近位および遠位尿細管上皮細胞における CTGF 発現程度と fibrotic area の間に正の相関が示唆された (Fig. 2b).

培養尿細管上皮細胞における CTGF mRNA 発現 (mPTEC 単層培養による検討)

1) 増殖因子

Fig. 3 に示すように, 近位尿細管上皮細胞 mPTEC による CTGF mRNA 発現は TGF- β 1 刺激により容量依存性 (0.3~30ng/ml) に誘導され, またそのピークは刺激後 3~6 時間で認められた. この結果から以後の検討においては至適刺激時間を 3 時間とした. 腎間質線維化に関与すると考えられるその他の増殖因子; rrPDGF, rhEGF, rhFGF-2, rhHGF そして rhCTGF 自身の刺激では, 有意な CTGF mRNA 発現誘導は認められなかった (結果省略).

2) サイトカイン

代表的な炎症惹起性のサイトカインである rmTNF- α , および rmIL-1 β による有意な CTGF mRNA 発現誘導は認められなかった (Fig. 4).

3) d-Glucose (GLC)

GLC 濃度 30 mM までの刺激では有意な CTGF mRNA 発現は認められなかったが, 100 mM において発現誘導が認められた (Fig. 5). GLC 100 mM 刺激によって mPTEC においても他の培養細胞と同様に軽度の TGF- β 1 発現が誘導されたが (結果省略), 抗 TGF- β 中和抗体の同時投与によっても CTGF 発現誘導は抑制されず, 合成/分泌された TGF- β 1 の間接的な関与は否定的であった (Fig. 5).

4) Dexamethasone (DEX)

DEX 刺激により mPTEC における CTGF mRNA 発現は濃度依存性 (0.1~1000 nM) に誘導された (Fig. 6). DEX 刺激により mPTEC における TGF- β 1 発現は抑制され (結果省略), TGF- β 1 の関与は否定的であった.

尿細管上皮細胞由来 CTGF 蛋白による腎線維芽細胞の 1 型コラーゲン産生 (mPTEC/TFB) 共培養による検討)

1) TGF- β 1

rhTGF- β 1 (3 ng/ml) を mPTEC および TFB の共培養系に投与すると, TFB 単層培養に比較して有意な 1 型コラーゲン産生亢進が認められた (Fig. 7). この効果は抗 CTGF 中和抗体により抑制され (Fig. 7), また TFB には CTGF 産生能が認められないことから, TGF- β 1

によって誘導された CTGF による間接的な効果と考えられた。

2) d-Glucose (GLC)

GLC 刺激 (100 mM) により共培養系において有意な 1 型コラーゲン産生亢進が認められ、この作用は抗 TGF- β 中和抗体および抗 CTGF 中和抗体によって抑制された (Fig. 8)。このことから GLC は mPTEC による CTGF 産生を介して、間接的にも TFB による 1 型コラーゲン産生を亢進させることが示された。

3) Dexamethasone (DEX)

DEX 刺激 (1000 nM) は共培養系において 1 型コラーゲン産生を亢進させる傾向が認められたが、有意差は認められなかった (結果省略)。

考 察

今回の検討では、正常のマウス腎由来の近位尿細管上皮細胞に、TGF- β 1, GLC および DEX 刺激下において有意な CTGF 産生能が認められた。また様々な腎疾患の腎生検組織において、近位もしくは遠位尿細管上皮細胞の CTGF 発現が陽性となり、現在、解明さ

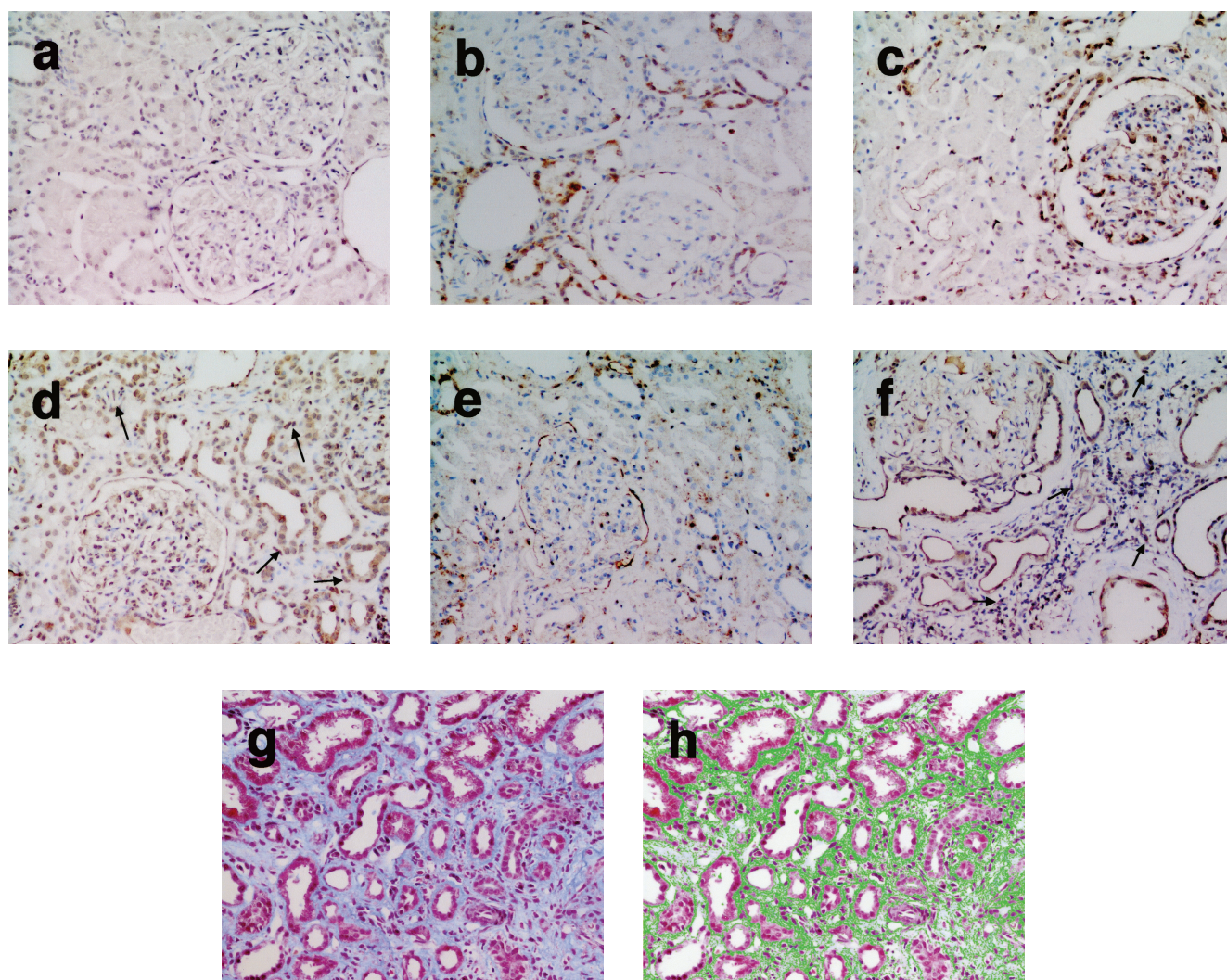


Fig. 1. Identification of CTGF protein expression in renal biopsy specimens by catalyzed signal amplification immunohistochemistry. (a, b, c, d, e, f; DAB, x200. g, h; MT, x200) a. A typical case of untreated MCNS. No CTGF expression was observed even in the glomerular epithelial cells. b. Another case of MCNS treated with glucocorticoid. Tubular expression of CTGF was found, and CTGF expression by glomerular parietal and visceral epithelium was rescued. c. A typical case of untreated DPLN. CTGF expression was observed in the glomerular cells, but not in the tubular epithelial cells. d. Another case of DPLN treated with glucocorticoid. Significant tubular expression of CTGF was found. Some interstitial cells were also positive for CTGF (arrows). e. A typical case of IgAN. CTGF expression was occasionally observed in glomerular parietal and visceral epithelial cells and interstitial cells. f. A typical case of DN. Not only glomerular cells, but also tubular epithelial cells, interstitial cells (arrows) and vascular endothelial cells were revealed to express CTGF significantly. g, h. Quantitative analysis of histopathology by light-microscopy. A target area was measured quantitatively by a computer-assisted image analyzer (MacSCOPE), which focused on the blue area of fibrosis (g), which then turned to green (h). The analyzer calculated the percentage of this green area (22%~).

れていない複雑な病態に関与している可能性が示唆された。Fig. 9 にマウス CTGF 遺伝子の 5' 側上流域に存在する主要な転写調節部位を示す ([gb:M70641]). Grotendorst らは CTGF の強力な発現誘導因子である TGF- β 1 の作用部位として TGF- β Response Element (T β RE) を同定し、この T β RE はまだ未同定の結合蛋白を介して CTGF 遺伝子転写を促進することを報告している²³⁾。T β RE の塩基配列は CTGF 遺伝子に特異的であり、現在までのところマウスとヒトの CTGF

遺伝子にしか確認されていない²³⁾。一方、Leask らのグループは T β RE が皮膚線維芽細胞における CTGF の発現レベルに関与し、TGF- β 1 の誘発的な作用はリン酸化 Smad3/Smad4 の Smad binding element (SBE) への結合によると報告している²⁴⁾。実際、強皮症患者の皮膚線維芽細胞では *in vitro* においても T β RE を介した定常状態での過剰な CTGF 産生が認められ、その病的形質の一因と推定されている^{24, 25)}。現在までのところ、TGF- β 1 による CTGF の最大発現には

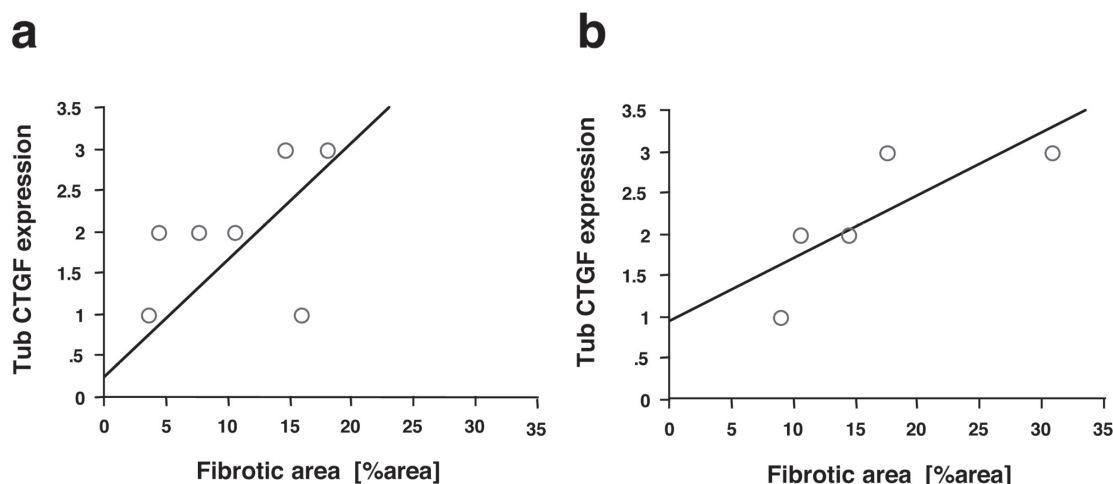


Fig. 2. Regression between fibrotic area and tubular CTGF expression. a. Cases with DPLN. A significant correlation was observed between fibrotic area and tubular CTGF expression. b. Cases with DN. Fibrotic area was likely correlated with tubular CTGF expression.

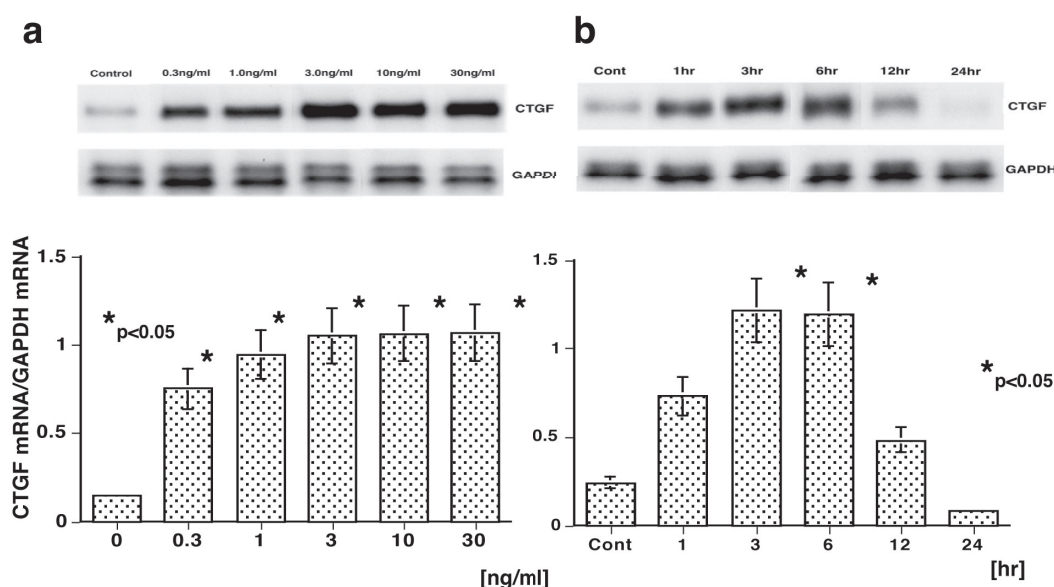


Fig. 3. Quantification of CTGF mRNA expression in mPTEC treated with a profibrotic growth factor, rhTGF- β 1. Expression of CTGF mRNA in mPTEC was induced by 3 hr treatment with rhTGF- β 1 in a dose-dependent fashion and achieved to the peak at 3ng/ml of rhTGF- β 1 (a). The peak expression of CTGF in mPTEC by rhTGF- β 1 (3ng/ml) occurred after 3 to 6 hr (b). A representative blot (a, & b) selected from 3 separate experiments was shown, and the densitometric data here were obtained from these 3 blots.

T β RE と SBE 双方が必要であると考えられている。TGF- β 1 による CTGF 遺伝子発現誘導は皮膚、肺、腎臓、歯肉、および胎児由来の線維芽細胞、メサンギウム細胞、毛細血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、軟骨細胞、膵臓癌細胞、乳癌細胞等に認められ⁶⁻⁸⁾、今回の検討より近位尿細管上皮細胞においても確認された。前述のように腎臓においても TGF- β 1 は重要な線維化関連増殖因子であり、DN では TGF- β 1 の高発現が認められ、糸球体硬化や尿細管基底膜肥厚～間質線維化に関与している^{26, 27)}。メサンギウム細胞、近位・遠位尿細管上皮細胞および線維芽細胞においてブドウ糖およびアンジオテンシン II 刺激は TGF- β 1 産生を誘導することが *in vitro* において確認されており、糖尿病における高血糖や亢進したレニンアンジオテンシン系 (RAS) の作用により、腎臓において TGF- β 1 の高発現が認められると考えられている²⁶⁻²⁸⁾。近年、同様に DN における CTGF 発現の亢進が報告されている^{14, 18)}。DN における CTGF mRNA の発現部位は、糸球体細胞および尿細管上皮細胞であり、今回の超高感度免疫組織化学による蛋白レベルの発現部位に一致している。培養メサンギウム細胞を用いた検討より、ブドウ糖刺激は直接的に、また TGF- β 1 産生を介して間接的に CTGF 産生を誘導することが明らかとされており^{16, 17)}、近位尿細管上皮細胞においては TGF- β 1 に対する中和抗体の効果が認められなかったことより、直接的

な作用がより重要と考えられる。ブドウ糖刺激による TGF- β 1 遺伝子発現には、protein kinase C (PKC) 活性化を介した AP-1 への c-Jun 蛋白の結合が関与しており²⁹⁾、CTGF 遺伝子上流にも AP-1 が存在していることから (Fig. 9)、その発現誘導に AP-1 が関連している可能性がある。さらにメサンギウム細胞では TGF- β 1 による誘発的な CTGF 遺伝子発現および定常な発現に Smad/SBE を介した経路とともに PKC/MAP kinase を介した経路が重要であることが報告されており³⁰⁾、CTGF 遺伝子発現における AP-1 の重要性が示唆される。今回の共培養系の検討より、近位尿細管上皮細胞では TGF- β 1 およびブドウ糖刺激により CTGF 遺伝子発現のみではなく、線維芽細胞に 1 型コラーゲン産生を誘導することができる活性体の CTGF 蛋白が合成/分泌されうることが明らかとなり、免疫組織化学の結果も間質線維化と相関する傾向を示したことから、DN における尿細管上皮細胞の CTGF 分子発現は重要と考えられる。厳格な血糖コントロールと RAS の強力な抑制によって DN の近位もしくは遠位尿細管上皮細胞における CTGF 発現が抑制されうるのは興味深く、今後の検討を要する。

糖質コルチコイド (GC) の効果については、DEX の CTGF 産生亢進作用がマウス胎児線維芽細胞 NIH3T3 において報告されており³¹⁾、今回の検討では同様の効果が近位尿細管上皮細胞においても認めら

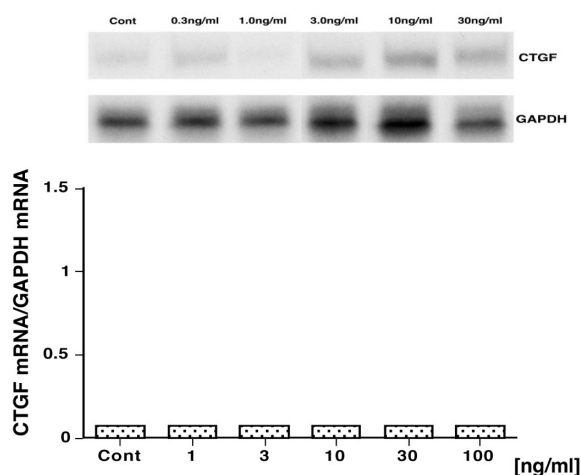


Fig. 4. Quantification of CTGF mRNA expression in mPTEC treated with a proinflammatory cytokines, rmTNF- α . Expression of CTGF mRNA in mPTEC was not significantly induced by 3 hr treatment with rmTNF- α at various concentrations. A representative blot selected from 3 separate experiments was shown, and the densitometric data here were obtained from these 3 blots.

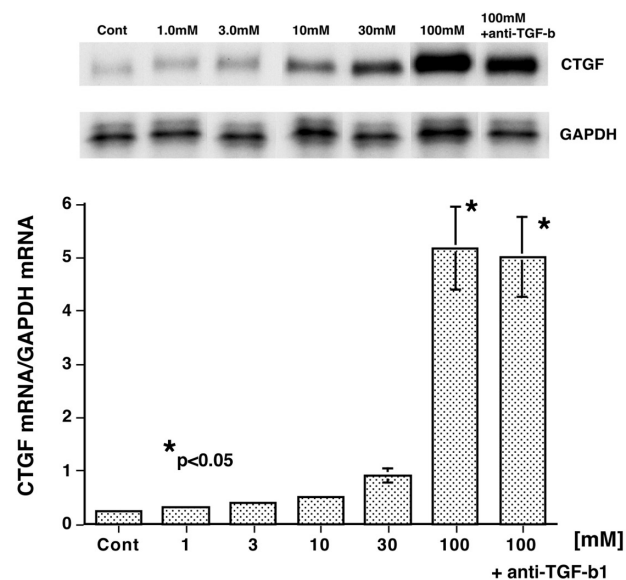


Fig. 5. Quantification of CTGF mRNA expression in mPTEC treated with d-glucose (GLC). Expression of CTGF mRNA in mPTEC was significantly induced by 3 hr treatment with GLC in a dose-dependent fashion. A peak expression of CTGF was obtained by GLC at 100mM, which was not ameliorated by co-administration with a neutralizing anti-TGF- β antibody. A representative blot selected from 3 separate experiments was shown, and the densitometric data here were obtained from these 3 blots.

れた. NIH3T3 および近位尿細管上皮細胞の TGF- β 1 産生は DEX により抑制されることより, DEX の CTGF 産生亢進作用は Smad/SBE $\sim$ T β RE を介さないものと考えられる. GC の普遍的な作用発現機序は, 細胞質中に浸透した GC が GC レセプター (GR) に結合後, 核内に移行して標的遺伝子の発現調節領域に存在する Glucocorticoid Response Element (GRE) に結合し, その転写活性を促進させるというものである^{31,32}. ヒトおよびマウスの CTGF 遺伝子 5' 上流域には GRE の基本配列は認められず, GC による CTGF 遺伝子発現促進作用は GRE を介さない機序によるものと考えられる. γ フィブリノーゲン遺伝子は 5' 側上流域に Signal Transducer and Transcription Activator 3 Response Element (Stat3RE) を有し, ラット肝細胞においては Stat3 と GC-GR 複合体との相互作用で GC による γ フィブリノーゲン遺伝子発現促進が認められる³³. また同様に乳腺細胞において Stat5 と GC-GR 複合体が β カゼイン遺伝子 5' 側上流域の Stat5RE に結合することで, Stat5 単独での結合時に比べて有意に β カゼイン遺伝子発現を亢進させる³⁴. Fig. 9 に示すようにマウス CTGF 遺伝子の 5' 側上流域には Stat3RE および Stat5RE が存在し, これらを介した GC の作用発現の可能性が示唆される. 腎生検組織を用いた免疫組織化学により, GC 投与中の MCNS および DPLN の症例において, 非投与症例に比較して近位もしくは

は遠位尿細管上皮細胞における CTGF 発現の亢進が認められた. ループ腎炎では TGF- β 1 発現が報告されているが, 今回の検討では GC 非投与症例においては近位および遠位尿細管上皮細胞における有意な CTGF 発現は認められず, 同様に TGF- β 1 発現が認められる IgAN 症例においても近位および遠位尿細管上皮細胞における CTGF 発現は認められなかった^{35,36}. 今回の近位尿細管上皮細胞を用いた *in vitro* の検討では炎症性サイトカインである TNF- α の CTGF 発現に対する効果は認められなかったが, 線維芽細胞を用いた検討では TGF- β 1 および DEX による CTGF 遺伝子発現を TNF- α が抑制した^{31,37}. このことから *in vivo* の腎炎組織においては炎症性サイトカインによって CTGF 発現が抑制されており, GC の抗炎症作用で炎症性サイトカイン産生が低下することも GC による CTGF 発現促進に関与している可能性がある. 今回の共培養系の検討では, 近位尿細管上皮細胞では DEX 刺激により活性体の CTGF 蛋白が合成/分泌されうことは明らかにできなかった. しかし, DPLN の免疫組織化学の結果からは近位もしくは遠位尿細管上皮細胞における CTGF 発現と線維化に相関を認めた. この相違の原因としては, *in vitro* の条件では DEX の線維芽細胞への直接作用が強調されてコラーゲン産生が抑制された可能性がある^{38,39}. DPLN 群の GC 投与症例における fibrotic area の拡大傾向は単に重症度と比

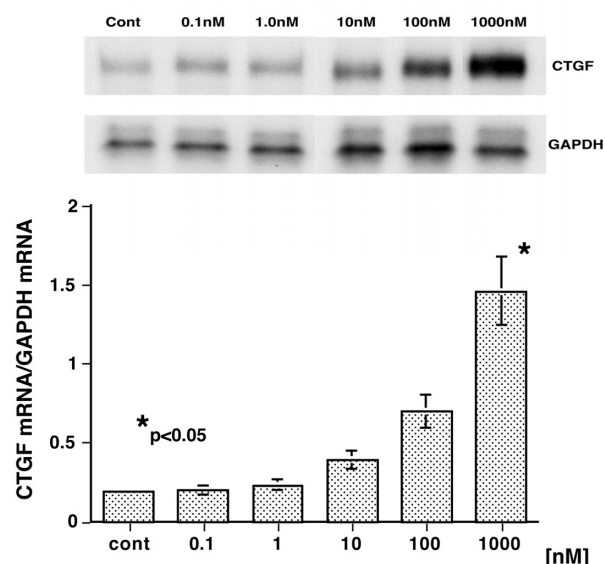


Fig. 6. Quantification of CTGF mRNA expression in mPTEC treated with dexamethasone (DEX). Expression of CTGF mRNA in mPTEC was significantly induced by 3 hr treatment with DEX in a dose-dependent fashion. A representative blot selected from 3 separate experiments was shown, and the densitometric data here were obtained from these 3 blots.

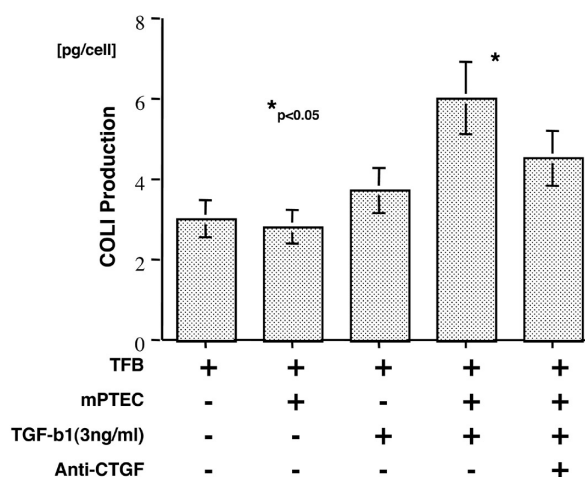


Fig. 7. Quantification of type I collagen protein (COLI) production by TFB by 48 hr after stimulation with rhTGF- β 1 in monolayer and co-culture with mPTEC. rhTGF- β 1 (3ng/ml) induced COLI in TFB monolayers, and significantly more COLI in TFB co-cultured with mPTEC. Co-administration with a neutralizing anti-CTGF antibody significantly ameliorated COLI production by TFB in co-culture. The data shown here were obtained from 3 independent experiments.

例した現象とも考えられるが、GC 投与による近位もしくは遠位尿細管上皮細胞における CTGF 分子発現が、DPLN において腎間質線維化に関与した可能性は否定できない。DPLN の治療に関してはサイクロフォスファミドを中心とする免疫抑制薬療法のプロトコールが検討され、いずれも経口 GC 単独療法に比較して短期的な腎炎症状の抑制効果および長期的腎機能保護効果に優れたものとなっている⁴⁰⁾。この後者の理由としては、経口 GC 単独療法による免疫抑制／抗炎症作用では十分な腎炎の鎮静化もしくは再燃防止が得られないため、腎臓の恒久的な組織変化を生じ慢性腎不全へと進行するとされている。しかし今回の結果より、GC 投与による直接的な腎間質線維化の促進が関与している可能性がある。また今回の MCNS 症例は初発例であり線維化は認められなかったが、頻回再発型 (GC

依存型) もしくは GC 抵抗性の慢性化した MCNS 症例に認められる腎機能低下は、合併する巣状糸球体硬化症によるものと説明されており⁴¹⁾、近年は近位尿細管上皮細胞に対する長期間の尿蛋白負荷による腎間質線維化促進の可能性が指摘されている⁴²⁾。さらに今回の結果より、長期 GC 投与による直接的な腎間質線維化の促進が関与している可能性も考えられる。ただし、GC-GR 複合体が AP-1 への蛋白結合を抑制してその転写促進作用を低下させるという報告もあり³²⁾、また前述のように細胞外基質産生に対する GC の作用も多彩であるため^{32, 43, 44)}、*in vivo* の複雑な病態における GC の CTGF 産生／線維化促進作用に関しては今後とも検討が必要である。

今回の検討で用いた CSA 法は、フェノール誘導体タイラミンのペルオキシダーゼによる酸化反応を応用して抗原物質を超高感度に検出する方法として開発された免疫組織化学法であり⁴⁵⁾、間接法に比較して 500 倍、ABC 法に比べて 100 倍程度の検出感度を得られる。ホルマリン固定のパラフィン切片に残る微量な CTGF 蛋白が検出可能であったが、非特異的反応の可能性を排除するため結果の判定には十分な配慮を行った。CTGF 蛋白発現の腎臓における局在に関しては信頼性のある結果であると思われるが、近位もしくは遠位尿細管上皮細胞における CTGF 発現がパラクリンとして病態生理学的に意味のある発現量であるかは明らかではない。そのため今後、何らかの CTGF 発現抑制によるモデル動物に対する修飾効果を検討する必要がある。In vitro の検討では、TNF- α 、cAMP および PGE₂ は線維芽細胞に対する CTGF 産生抑制効果が認められ^{12, 37, 46)}、また *in vivo* の検討では PGI₂ 投与により強皮症患者の皮膚における CTGF 産生低下が報告されている⁴⁷⁾。腎臓に関しては、Inoue らが *in vitro* において HGF による近位尿細管上皮細胞における CTGF 産生抑制効果を明らかにし²²⁾、また TGF- β 1 トランスジェニックマウス 5/6 腎摘モデルを用いた検討によって、間質線維化過程において近位尿細管上皮細胞の CTGF 産生が亢進し、HGF 投与によってその産生を減少させることで腎間質線維化が抑制されたことより、近位腎尿細管上皮細胞における CTGF 産生の

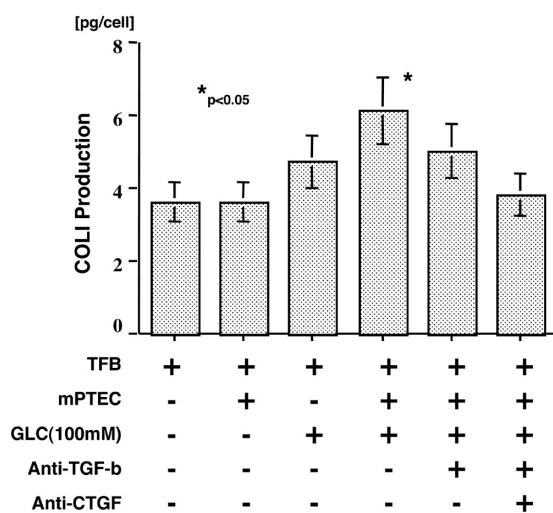


Fig. 8. Quantification of type I collagen protein (COLI) production by TFB by 48 hr after stimulation with d-glucose (GLC) in monolayer and co-culture with mPTEC. GLC (100mM) induced COLI in TFB monolayers, and significantly more COLI in TFB co-cultured with mPTEC. Neutralizing TGF- β 1 slightly, and neutralizing both of TGF- β 1 and CTGF significantly ameliorated COLI production by TFB in co-culture. The data shown here were obtained from 3 independent experiments.

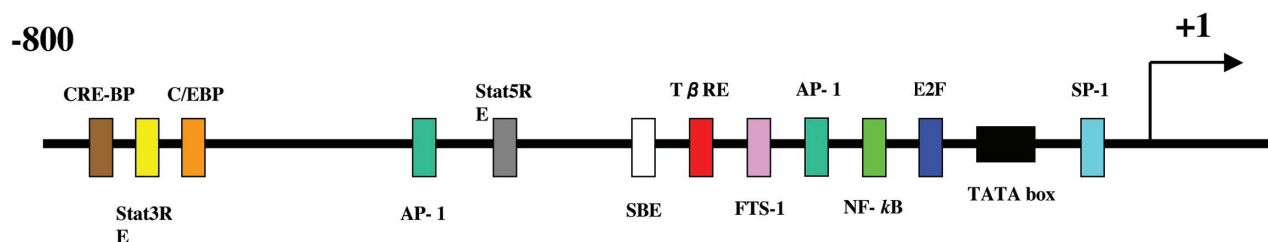


Fig. 9. Regulatory control elements in the gene promoter of murine CTGF (SBE: Smad binding element, T β RE: TGF- β response element)

病的意義が示された²¹⁾。TGF- β はその作用が線維化促進のみならず、上皮細胞増殖抑制（癌化抑制）や免疫系制御にも関与し^{49, 50)}、また TGF- β 1 ノックアウトマウスが若年死することから⁵¹⁾、単純な作用抑制による抗線維化治療への応用は困難と考えられている。今回の検討より、正常な糸球体の podocyte, Bowman 嚢上皮細胞において発現されていた CTGF は微少変化群では消失しており、またステロイド投与により再出現していることから、これら上皮細胞の正常な機能維持に関与しているものと推定される。一方、尿細管上皮に発現誘導される CTGF は線維化に関与するものと推定され、TGF- β に代わる抗線維化治療の有望なターゲット分子と考えられる。多様な腎疾患において複数の細胞が CTGF 産生に関与していることが明らかとなり、また現在までに各々の発現調節機構がかなり異なっていることが示唆されている。今後の抗線維化治療法の開発には、各細胞および各病態毎の特異的な CTGF 発現制御が重要であり、より詳細な分子レベルでの発現調節機構の解析が必要と思われる。

まとめ

尿細管上皮細胞における CTGF 発現に関し、ヒト腎生検組織を用いて近位および遠位尿細管上皮細胞の CTGF 蛋白発現を超高感度免疫組織化学を用いて検討し、また培養近位尿細管上皮細胞を用いて CTGF mRNA 発現制御因子について検討した。その結果、in vivo において糖尿病性腎症および糖質コルチコイド投与患者の近位もしくは遠位尿細管上皮細胞において CTGF 蛋白発現が認められ、また in vitro において TGF- β 1, ブドウ糖、および糖質コルチコイド刺激によって近位尿細管上皮細胞の CTGF mRNA 発現が確認された。また、近位尿細管上皮細胞において CTGF 遺伝子発現のみでなく、線維芽細胞に対し I 型コラーゲン産生を誘導する活性体の CTGF 蛋白が合成／分泌されることも明らかとなった。TGF- β に比較して、尿細管上皮細胞において発現される CTGF はより特異的な抗線維化治療のターゲット分子になりうると考えられ、CTGF 遺伝子発現制御機構の解明が望まれる。

謝 辞

本研究にあたり、御指導、御協力を頂い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、同大学病理学教室 廣瀬隆則教授に深く感謝いたします。なお本研究の一部は第 45 回日本腎臓学会学術総会（大阪、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 A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 2000; 15: 290-301.
- 4) Strutz F, Okada H, Neilson E. The role of the tubular epithelial cells in renal fibrogenesis. *Clin Exp Nephrol* 2001; 5: 62-74.
- 5) Border WA, Noble NA. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 1997; 51: 1388-96.
- 6) Moussad EEA, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 2000; 71: 276-92.
- 7) Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 171-9.
- 8) Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 2000; 58: 1389-99.
- 9) Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 1991; 114: 1285-94.
- 10) Almendral JM, Sommer D, Macdonald-Bravo H, Burckhardt J, Perera J, Bravo R. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 2140-8.
- 11) Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 637-45.
- 12) Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor b-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 1999; 13: 1774-86.
- 13) Kothapalli D, Frazier KS, Welply A, Segarini PR, Grotendorst GR. Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 61-8.
- 14) Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998; 53: 853-61.
- 15) Ito Y, Goldschmeding R, Bende R, Claessen N,

- Chand M, Kleij L, et al. Kinetics of connective tissue growth factor expression during experimental proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 472-84.
- 16) Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, et al. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 25-38.
 - 17) Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, et al. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 5830-4.
 - 18) Umezono T, Suzuki D, Toyoda M, Zhang S, Sakai H. Localization of connective tissue growth factor mRNA in human diabetic nephropathy by in situ hybridization. *Clin Exp Nephrol* 2002; 6: 13-20.
 - 19) Okada H, Moriwaki K, Kalluri R, Imai H, Ban S, Takahama M, et al. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 expression in tubular epithelium attenuates tubulointerstitial alteration in rat Goodpasture syndrome. *Kidney Int* 2000; 57: 927-36.
 - 20) Shimo T, Nakanishi T, Kimura Y, Nishida T, Ishizeki K, Matsumura T, et al. Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells. *J Biochem (Tokyo)* 1998; 124: 130-40.
 - 21) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kanno Y, Kopp JB, et al. Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor- β 1 via attenuation of connective tissue growth factor induction and prevents renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. *FASEB J* 2003; 17: 268-70.
 - 22) Inoue T, Okada H, Kobayashi T, Watanabe Y, Kikuta T, Kanno Y, et al. TGF- β 1 and HGF coordinately facilitate collagen turnover in subepithelial mesenchyme. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 255-60.
 - 23) Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor β response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 469-80.
 - 24) Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001; 276: 10594-601.
 - 25) Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, et al. Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 280-4.
 - 26) Border WA, Noble NA. Evidence that TGF- β should be a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1998; 54: 1390-1.
 - 27) Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int* 1999; 56: 1627-37.
 - 28) Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1998; 31: 181-8.
 - 29) Weigert C, Sauer U, Brodbeck K, Pfeiffer A, Haring HU, Schleicher ED. AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF- β 1 promoter in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 2007-16.
 - 30) Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ, Leask A. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* 2002; 62: 1149-59.
 - 31) Dammeier J, Beer HD, Brauchle M, Werner S. Dexamethasone is a novel potent inducer of connective tissue growth factor expression. Implications for glucocorticoid therapy. *J Biol Chem* 1998; 273: 18185-90.
 - 32) Almawi WY, Melemedjian OK. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 9-15.
 - 33) Fuller GM, Zhang Z. Transcriptional control mechanism of fibrinogen gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936: 469-79.
 - 34) Stoecklin E, Wissler M, Moriggl R, Groner B. Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6708-16.
 - 35) Grande JP. Mechanisms of progression of renal damage in lupus nephritis: pathogenesis of renal scarring. *Lupus* 1998; 7: 604-10.
 - 36) Wada T, Hamakawa S, Hori Y, Kaname S, Shimizu S, Kurokawa K, et al. Immunohistochemical localization of latent transforming growth factor- β binding

- protein in IgA nephropathy. *Kidney Int Suppl* 1997; 63: S182-4.
- 37) Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor α suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor- β in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem* 2000; 275: 15220-5.
 - 38) Bird JL, Tyler JA. Dexamethasone potentiates the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on collagen production in cultured human fibroblasts. *J Endocrinol* 1994; 142: 571-9.
 - 39) Cutroneo KR. Relationship between glucocorticoid-mediated early decrease of protein synthesis and the steady state decreases of glucocorticoid receptor and TGF- β activator protein. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34: 194-203.
 - 40) Austin HA, Balow JE. Natural history and treatment of lupus nephritis. *Semin Nephrol* 1999; 19: 2-11.
 - 41) Hayslett JP, Krassner LS, Bensch KG, Kashigarian M, Epstein FH. Progression of "lipoid nephrosis" to renal insufficiency. *N Engl J Med* 1969; 281: 181-7.
 - 42) Remuzzi G, Ruggenti P, Perico N. Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Ann Intern Med* 2002; 136: 604-15.
 - 43) Beer HD, Fassler R, Werner S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. *Vitam Horm* 2000; 59: 217-39.
 - 44) Canalis E, Delany AM. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 73-81.
 - 45) Sanno N, Teramoto A, Sugiyama M, Itoh Y, Osamura RY. Application of catalyzed signal amplification in immunodetection of gonadotropin subunits in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Am J Clin Pathol* 1996; 106: 16-21.
 - 46) Ricupero DA, Rishikof DC, Kuang PP, Poliks CF, Goldstein RH. Regulation of connective tissue growth factor expression by prostaglandin E₂. *Am J Physiol* 1999; 277: L1165-71.
 - 47) Stratton R, Shiwen X, Martini G, Holmes A, Leask A, Haberberger T, et al. Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J Clin Invest* 2001; 108: 241-50.
 - 48) Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 1999; 248: 44-57.
 - 49) Ling E, Robinson DS. Transforming growth factor- β 1: its anti-inflammatory and pro-fibrotic effects. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 175-8.
 - 50) Akhurst RJ, Balmain A. Genetic events and the role of TGF β in epithelial tumour progression. *J Pathol* 1999; 187: 82-90.
 - 51) Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-9.