

原 著

Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) との拮抗作用による Hepatocyte Growth Factor (HGF) の抗腎線維化作用の検討

井 上 勉

Hepatocyte Growth Factor (HGF) Prevent Progression of Renal Interstitial Fibrosis via Its Counteraction Against Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) in 5/6 Nephrectomized Mice

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

5/6 nephrectomy (Nx) causes a progressive form of chronic renal injury in rats. However, 5/6 Nx seldom induces severe renal injury in mice, and the reason remains unclear. Transforming growth factor- β (TGF- β) is known as a key cytokine involving in organ fibrosis. Connective tissue growth factor (CTGF) is an important downstream mediator of profibrotic activities of TGF- β . Hepatocyte growth factor (HGF) originally identified as a potent mitogen for hepatocyte has been shown to promote tubule repair following acute renal injury. In renal fibrosis, HGF has been assumed to block profibrotic effects of TGF- β , attenuating renal fibrosis. However, such a counteraction between HGF and TGF- β remains to be determined in detail. Then we investigated the mechanism of the anti-fibrotic effects of HGF on renal fibrosis using the 5/6 Nx model in the wild and TGF- β_1 transgenic mice and the co-culture system. In wild type mice, ribonuclease protection assay (RPA) revealed that HGF and TGF- β_1 mRNA levels in the remnant kidneys simultaneously increased at 8 hours after the nephrectomy, then decreased, and increased again at week 4 to 12. CTGF and $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA levels also increased at 8 hours, then decreased, but didn't increased again. In the remnant kidneys of 5/6 Nx mice, endogenous HGF seemed to prevent renal fibrogenesis promoted by TGF- β_1 . In co-culture system, RPA revealed that TGF- β_1 alone could significantly enhance the expression of $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA in renal tubulointerstitial fibroblasts (TFB) in the co-culture with renal proximal tubular epithelial cells (PTEC). In contrast, TGF- β_1 with HGF did not enhance the expression of $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA in TFB in the co-culture. This enhancement was partially because of additional production of CTGF by PTEC stimulated by TGF- β_1 in the co-culture. In 5/6 Nx TGF- β_1 transgenic mice, excess TGF- β_1 caused significant interstitial fibrosis compared to the 5/6 Nx wild mice at week 12. The supplement of recombinant HGF was demonstrated to suppress CTGF expression thereby preventing renal fibrosis.

In conclusion, profibrotic effects of TGF- β_1 on TFB was enhanced by the co-existence of PTEC, and HGF can modulate such interaction, resulting in the antifibrotic effects. This anti-fibrotic effect of HGF against TGF- β_1 was demonstrated to be mediated by suppressing CTGF mRNA expression in the tubular epithelial cells induced by TGF- β_1 .

Keywords: transforming growth factor- β (TGF- β), connective tissue growth factor (CTGF), hepatocyte growth factor (HGF), nephrectomy, renal fibrosis

J Saitama Med School 2002;29:13-26

(Received November 17, 2001)

緒 言

あらゆる腎疾患は末期腎不全に到る過程で腎線維

化を伴う¹⁾。腎線維化の中心的病理は、障害を受けた尿細管の萎縮と、その周囲の線維芽細胞による細胞外基質産生の亢進で特徴付けられる¹⁾。慢性的な腎機能の低下は、糸球体障害程度より腎線維化の程度と相関するため²⁾、腎線維化の進行阻止は、慢性腎不全の進

行抑制につながると考えられている。

腎線維化において中心的役割を果たす growth factor として、Transforming Growth Factor – beta (TGF- β) があげられる³⁾。TGF- β は間葉系細胞に対する強力な細胞外基質産生増加作用を有するだけでなく、線維化病巣に働く他の growth factor の発現を誘導する。Connective Tissue Growth Factor (CTGF)⁴⁾ はその代表的 growth factor であり、TGF- β と同様に強力な線維化促進作用をもつ⁵⁾。

肝再生因子として同定された Hepatocyte Growth Factor (HGF) は⁶⁾、種々の肝障害時のみならず、腎障害にも伴って障害臓器および遠隔臓器によって産生される⁷⁾。供給された HGF は、障害臓器の主に上皮系細胞に働き、細胞保護的に作用するほか、細胞増殖の促進、器官形成に寄与する⁸⁾。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、HGF の投与は虚血による腎障害を軽減するばかりでなく、その回復を促進する事が知られている⁹⁾。その他、肝硬変症や閉塞性動脈硬化症に対する HGF の治療効果は広く認められており^{10,11)}、臨床応用が始まっている。近年、HGF による慢性腎不全進行抑制効果の報告も認められるが¹²⁾、TGF- β との拮抗作用が推定されているものの作用機序の詳細は明らかでない。

Rat 5/6腎摘 model は代表的な進行性腎障害の model であり¹³⁾、10週以上を経て糸球体硬化から尿細管間質病変を生じるが、その際も TGF- β は線維化促進に主要な役割を果たす。一方多くの mouse strain は 5/6腎摘処理後の腎線維化に抵抗性であり¹⁴⁾ その理由は明らかではなかった。今回我々は mouse 5/6腎摘 model を用い、残存腎が線維化に抵抗性を示す理由を、線維化を促進する growth factor (TGF- β) と抑制する growth factor (HGF) の拮抗作用という観点から検討した。さらに、人為的に TGF- β と HGF の balance を操作することによって実際に腎線維化が促進され、更にその抑制が可能であることを示した。また、TGF- β によって誘導される CTGF 発現を抑制することが、HGF の抗線維化作用機序の一部を説明することを明らかにした。

方 法

動物：TGF- β transgenic mouse (TGF- β TG mouse, CBA/C57B6 background) は米国、National Institutes of Health, Dr. Kopp から御供与いただき自家繁殖して用いた。CBA と C57BL/6 を交雑した F1 に常に戻し交配することで系統を維持する。同胞のうち transgene negative の個体を wild type mouse (WT mouse) として用いた。

動物 model の作成：実験群は WT mouse 5/6腎摘 (WTNx) 群 (n=57) および TGF- β TG mouse 5/6腎摘 (TGNx) 群 (n=103) とした。予備実験の結果から、未処置 TGF- β TG mouse 早期死亡例の entry を避け、且つ、腎摘による影響が明らかな組織学的変化を生じるに十分な期間を考慮し、生後5週から腎摘後12週間を実験期間とした。Nembutal 麻酔下に5週齢の mouse の右腎臓を2/3切除後、1週間の間隔をおいて更に左腎臓の片腎摘を施行し、mouse 5/6腎摘 model を作成する¹⁷⁾ (Fig. 1A)。初回の摘出腎を各群の control とした。腎摘8時間、24時間、72時間、1週間、2週間、4週間、8週間および12週間後に各 n=5~7 の残存腎を採取した。

deleted HGF (dHGF) 投与による腎病変および生存率の変化を検討するため TGF- β TG mouse 5/6腎摘 dHGF 投与群 (TGNx+dHGF) (n=35) および control 群として TGF- β TG mouse 5/6腎摘 Phosphate-Buffer Salines (PBS) 投与群 (TGNx+PBS) (n=58) を用いた (Fig. 1B)。dHGF¹⁸⁾ は雪印乳業 (株) 医薬品部 小林敏也先生より御供与頂いた。上記と同様に処置した後、腎摘2週間後から4週間にわたって 5.0 mg/kg・day を半量ずつ1日2回皮下注射した。薬剤投与前 (腎摘2週間後)、薬剤投与終了時 (腎摘6週間後)、腎摘8週間、および12週間後の各時点で生存例の残存腎 (n=5~7) を採取し、TGNx+dHGF 群 (n=30)、TGNx+PBS 群 (n=23) を解析した。残存腎を採取したものは生存分析には加えなかった。生存分析の途中の死亡例については全例解剖し、肉眼的に腎以外の臓器に変化がなく、組織学的に末期腎不全に矛盾しない変化を認める mouse を検討に加えた。

また、全ての動物実験は埼玉医科大学動物実験指針に準拠して行われた。

腎線維化領域の計測：4% paraformaldehyde-PBS 固定の腎組織 paraffin block より hematoxylin eosin (HE) 染色と masson trichrome (MT) 染色を行ない、光学顕微鏡所見を得た。MT 染色上の線維化病巣の評価は対物 lens 20倍率下で無作為に選択した視野において行った。顕微鏡画像は computer 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：TGNx 群、腎摘8週間後の個体から採取した腎臓を4% paraformaldehyde-PBS で4℃、5時間固定の後、20% sucrose-PBS に浸漬、Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan) に包埋、急速凍結した。Cryostat で 5 μ m に薄切し 5% bovine serum albumin (BSA)-PBS (5% BSA, 0.02% Tween20, 0.02% NaN₃ in PBS) で室温、

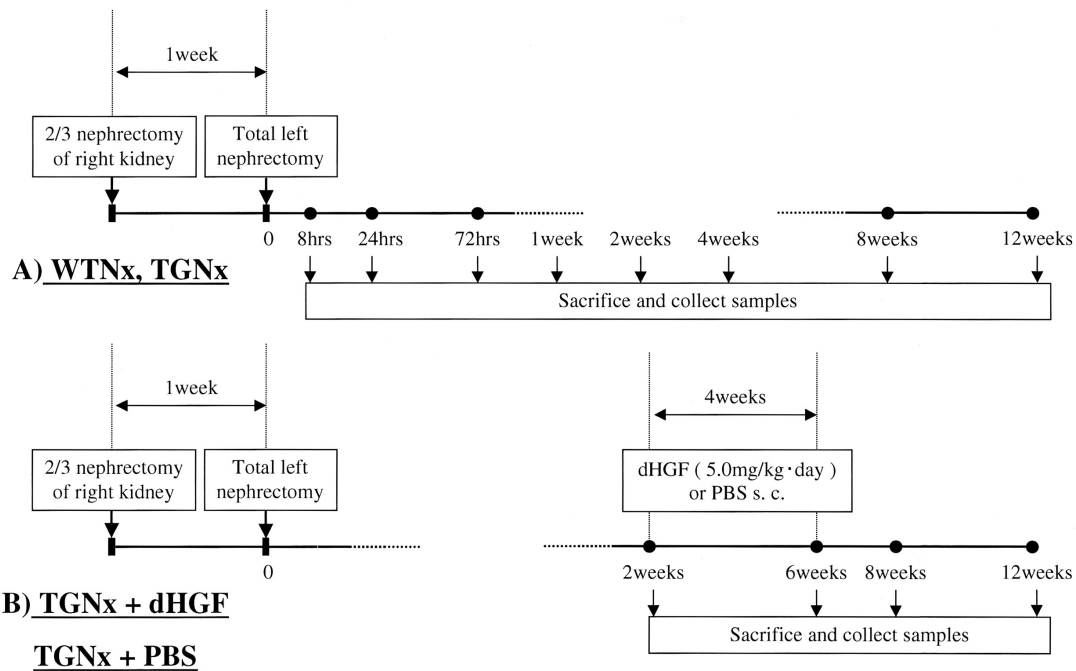


Fig. 1. Experimental schedule of 5/6 nephrectomy and dHGF administration. The vertical arrows indicate time points of sacrifice.

30分間blocking, その後anti-CTGF抗体 (rabbit, IgG)¹⁹⁾ と室温, 1時間反応させた。PBSで5分, 3回洗浄の後fluorescence isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit IgG抗体を反応させ, 蛍光顕微鏡にて観察した。Controlとしてanti-CTGF抗体反応を省いた切片を用いた。

培養細胞: mouse近位尿細管上皮細胞 (PTEC) は田辺製薬 (株) 創薬研究所菅谷健博士より, mouse腎間質線維芽細胞 (TFB)²⁰⁾ は当教室の岡田浩一講師より御供与頂き, 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, 供与後5~7継代の細胞を実験に用いた。各処置前の培養細胞のrestingには無血清培地 (K-1 medium: D-MEM/F12, 5 μ g/ml transferrin, 5 μ g/ml insulin, 5 $\times 10^{-8}$ M hydrocortisone) を用いた²⁰⁾。

TFB単相培養系およびPTEC/TFB共培養系: 6 well plateにTFB細胞を15000個/ cm^2 の濃度で播種し, 24時間後に無血清培地へ交換の後, 72時間restingしたものをTFB単相培養系として実験に供した。0.4 μ m pore sizeのculture insert (FALCON CELL CULTURE INSERTS, BECTON DICKINSON, NJ, USA) にPTEC細胞を30000個/ cm^2 の濃度で播種し, 24時間後に上記と同様に播種したTFB細胞の6 well plateに重層し, 同時に無血清培地へ交換の後, 72時間restingしたものをPTEC/TFB共培養系として実験に供した

(Fig. 2). Recombinant Human TGF- β (rhTGF- β) (R&D Systems, Inc. MN, USA) 10 ng/ml, rhTGF- β 10 ng/ml + rhHGF (R&D Systems, Inc. MN, USA) 100 ng/mlあるいはrhTGF- β 10 ng/ml + CTGF中和抗体 (IgG, 50 μ g/ml) を添加した無血清培地に交換の後, 24時間後にTRIzolを用いてtotal RNAを抽出し, TFBにおける $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA, PTECにおけるCTGF mRNAの発現量を検討した。CTGF中和抗体は岡山大学歯学部滝川正春教授から御供与頂いた¹⁹⁾。無添加の無血清培地に交換の後, 上記同様24時間培養した各細胞をcontrolとした。

Ribonuclease protection assay (RPA): 腎臓からは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) (115bp, 673 to 787 corresponding to rat GAPDH)²¹⁾ およびTGF- β_1 (255 bp, 500 to 754 corresponding to rat TGF- β_1 [gb:RTGFB1]) 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。HGF (252 bp, 963 to 1214 corresponding to rat HGF [gb:E03330]), CTGF (202 bp, 731 to 932 corresponding to mouse CTGF [gb:MUSFISP12B]), および $\alpha 1(I)$ procollagen (285 bp, 625 to 909 corresponding to mouse $\alpha 1(I)$ procollagen [gb:MUSC1AIB]) は当教室でreverse transcribed-polymerase chain reaction (RT-PCR)

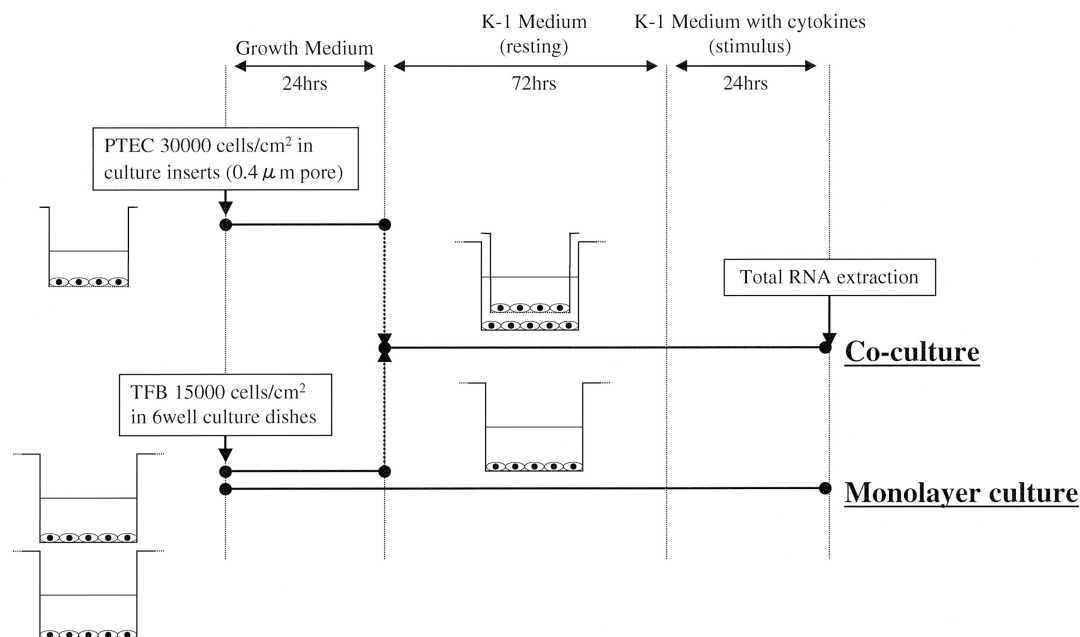


Fig. 2. Experimental design of cell culture. In this study, we used two culture systems; co-culture system and monolayer culture system.

にて取得した。 ^{32}P -UTP label した cRNA probe と $10 \mu\text{g}$ 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 ($120 \text{U}/\text{ml}$) で 30°C , 60 分処理した. Proteinase K ($0.45 \mu\text{g}/\text{ml}$) 37°C , 60 分処理にて ribonuclease を不活化し, ethanol 沈殿にて精製後, 6% の 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 autoradiography の後, film を透過型 scanner (GT-9600, EPSON, Nagano, Japan) で取り込み, 各 protected-band を NIH image (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, *in vivo* の実験では WT mouse の control 群を 1.00 とし, *in vitro* の実験では TFB については単相培養系の無血清培地条件を, また, PTEC については共培養系の insert 上, 無血清培地条件を 1.00 とした場合の相対値として比較した.

統計処理: 各 mRNA の発現量に関して統計学的処理は StatViewSE (Macintosh Version 1.03, Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) を用いた ANOVA を行ない, 検定は Bonferroni/Dunn 法を用いた. TGNx + dHGF 群, TGNx + PBS 群の生存分析は同 software を用いた Kaplan-Meier 法にて行ない, 検定は Logrank 法を用いた. $p < 0.05$ を統計学的に有意とみなした. 本文中の data は mean $\pm$ SD で表した.

結 果

I WTNx 群, TGNx 群残存腎組織の光顕所見

腎摘 12 週間後において両群とも腎切断面近くには尿管の萎縮, 単核球の浸潤および軽度の線維化を認めた. その他の領域については (Fig. 3) に示す通り WTNx 群では control 群との差は認められなかったが (Fig. 3B), TGNx 群については著明な尿管萎縮, 間質の線維化および細胞浸潤が認められ control 群と比して明らかな腎線維化の進行があり, 末期腎不全状態の腎臓と考えられた (Fig. 3D).

II WTNx 群の残存腎における TGF- β_1 , HGF, CTGF, $\alpha 1(\text{I})$ procollagen の mRNA 発現量の推移 (Fig. 4)

TGF- β_1 の発現量は腎摘 8 時間後に control の 2.58 ± 0.32 倍まで増加した後漸減し, 2 週間後には control level まで減少した. その後発現量は再上昇し, 観察期間が終了となる 12 週間後まで有意な高値を保った (Fig. 5A). HGF の発現量は腎摘 24 時間後に control の 2.43 ± 0.74 倍まで増加した後漸減し, 2 週間後には control level まで減少した. その後発現量は再上昇し, TGF- β_1 と同様, 腎摘 12 週間後まで有意な高値を保った (Fig. 5B). CTGF の発現量は腎摘 8 時間後に control の 2.27 ± 0.42 倍まで増加した後漸減し, 1 週間後には control のレベルまで減少した. 以降 12 週間後まで有意な上昇を認めなかった (Fig. 5C). $\alpha 1(\text{I})$ procollagen の発現量は腎摘 8 時間後から 72 時間後まで control の 4~6 倍と著増を示した後, 漸減した. 4 週間後には control level となり以降 12 週間後まで上昇を認めなかった (Fig. 5D).

III TFB 単相培養系および PTEC/TFB 共培養系における検討

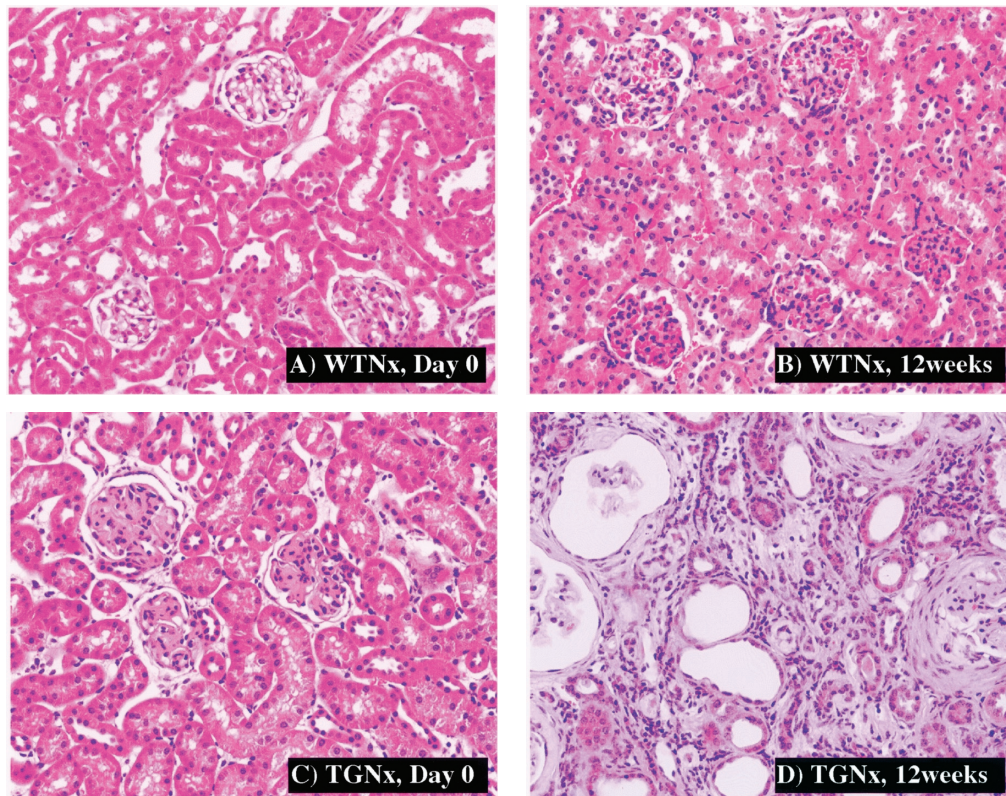


Fig. 3. Light microscopic finding of remnant kidney tissues from WTNx mice (A and B) and TGNx mice (C and D). The interstitium was nearly normal in both groups at day 0 (A and C). There were no tubulointerstitial alterations in WTNx group at 12 weeks after nephrectomy (B). In contrast, kidney tissues of TGNx group at 12 weeks showed interstitial expansion and increased extra cellular matrix accumulation (D). (H.E. staining, Mo.: 20 $\times$)

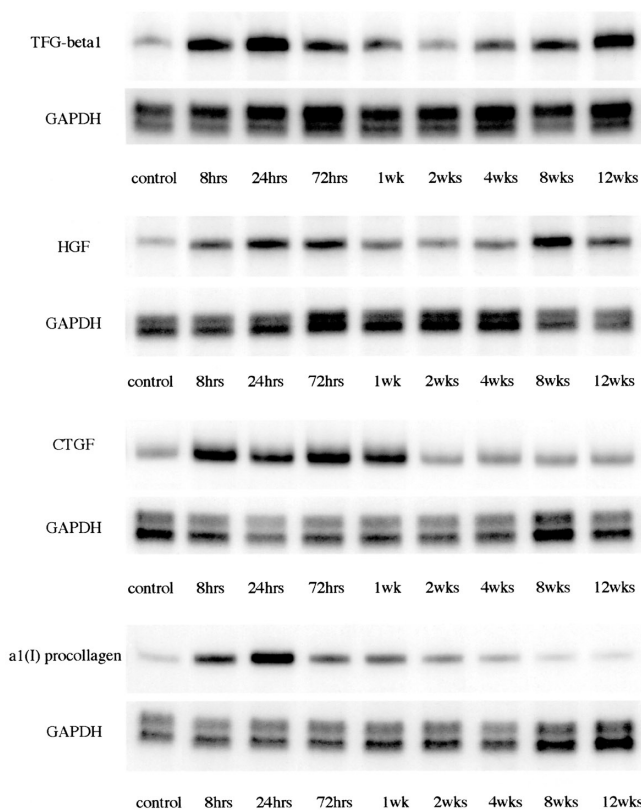


Fig. 4. Changes in mRNA expression of fibrosis-related molecules in the remnant kidney of WTNx group.

TGF- β の $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA 発現量は、無血清培地中では PTEC の有無に関わらず同等であった (Fig. 6). rhTGF- β (10 ng/ml) 刺激下では control と比して有意な発現量の増加を認めたが、その増加程度は単相培養系に比べ共培養系において有意に大きかった (1.32 ± 0.06 vs 2.14 ± 0.07 , $p < 0.05$). rhTGF- β (10 ng/ml) + rhHGF (100 ng/ml) では、単相培養系においては rhTGF- β のみの刺激時との差異を認めなかったが、共培養系においては発現量の有意な減少を認め、単相培養、共培養間にも有意差を認めた (1.34 ± 0.05 vs 0.97 ± 0.12 , $p < 0.05$). rhTGF- β (10 ng/ml) + CTGF 中和抗体添加でも、共培養系においてのみ rhTGF- β 単独刺激時と比して $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA の有意な発現量減少を認めた. この条件では単相培養、共培養間には有意差を認めなかった (1.29 ± 0.13 vs 1.57 ± 0.07 n.s.) (Fig. 6).

PTEC の CTGF mRNA 発現量は rhTGF- β (10 ng/ml) 刺激で control と比して有意に増加を認め (1.00 vs 2.23 ± 0.20 $p < 0.05$), rhTGF- β (10 ng/ml) + rhHGF (100 ng/ml) で rhTGF- β 単独刺激時と比して有意な減少を認めた (2.23 ± 0.20 vs 1.55 ± 0.20 $p < 0.05$). また、CTGF 中和抗体添加でも rhTGF- β によ

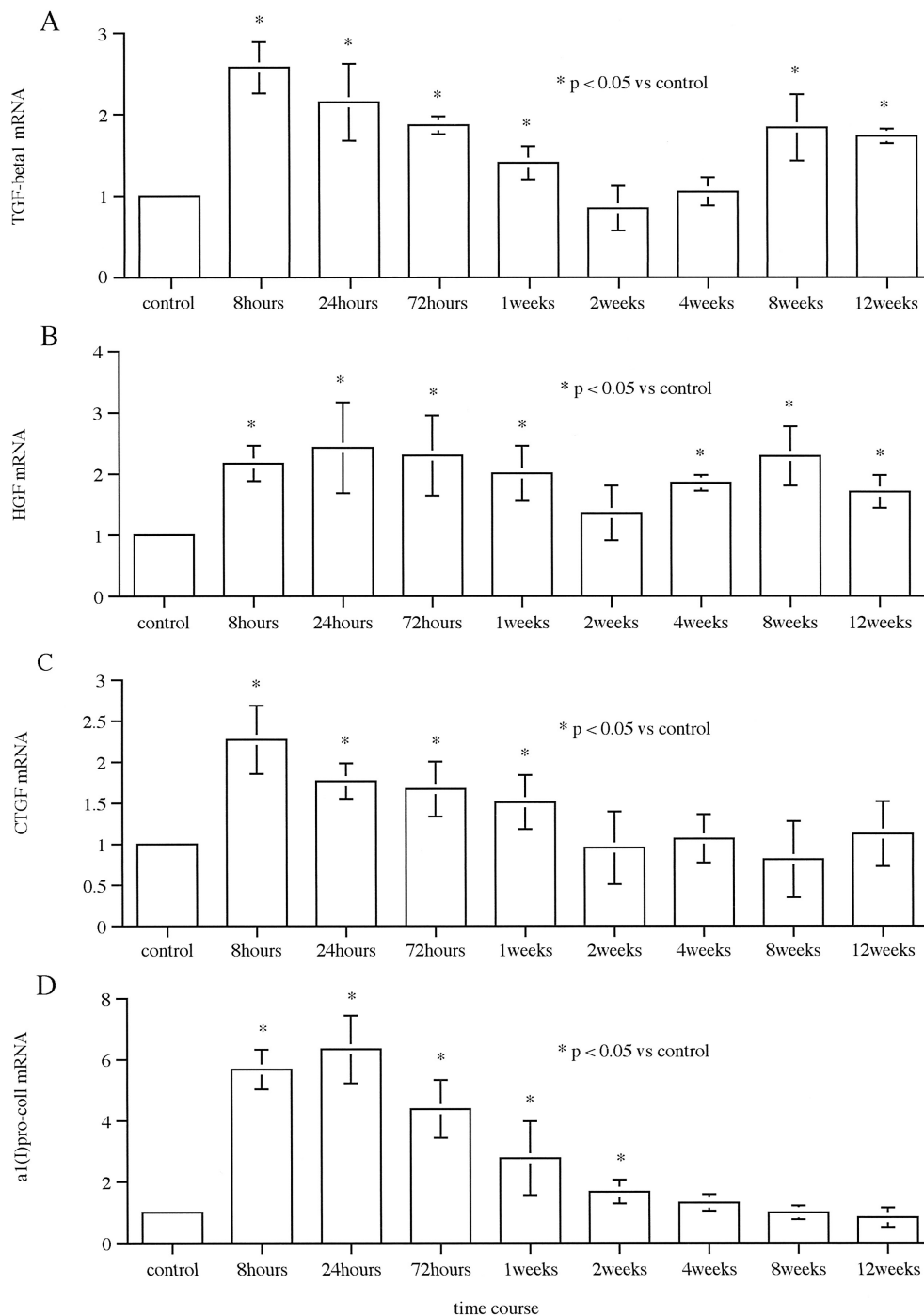


Fig. 5. Quantification of mRNA expression of fibrosis-related molecules in the remnant kidney of WTNx group. The peak of all mRNA expression occurred at 8 hours after the total left nephrectomy. The expression levels gradually decreased to the basal levels by 2 weeks (A-D). HGF and TGF- β expression levels re-increased and reached to the second peak at 8 weeks after the nephrectomy (A and B), in contrast, CTGF and $\alpha 1(I)$ procollagen expression levels remained low until 12 weeks (C and D).

る CTGF 発現増加の程度は変わらなかった (Fig. 7).

IV TGNx 群における検討

i 残存腎における $\alpha 1(I)$ procollagen の mRNA 発現量の推移

腎摘2週間後までの発現量の推移はWTと同様であった。以降、発現量は再上昇し、腎摘8週間後には 5.53 ± 0.98 倍、12週間後には 2.95 ± 1.36 倍と

いずれも control (TGNx) と比して有意に高値を示した (Fig. 8)。

ii dHGF 投与群残存腎における CTGF, $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA 発現量の推移

dHGF 投与終了時 (腎摘6週間後) PBS および dHGF 投与群の CTGF 発現量は 5.34 ± 0.49 倍、 2.92 ± 0.39 倍であり、PBS 投与群では control 群と比して有

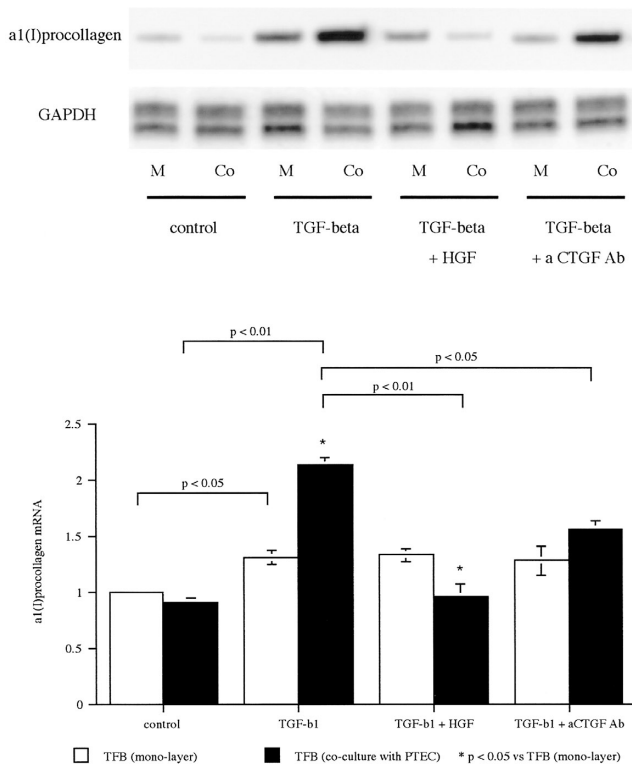


Fig. 6. Quantification of $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA expression in TFB. Expression of $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA increased in TFB in the co-culture with PTEC more than the one in the monolayer culture of TFB. The increase in the $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA expression was inhibited by HGF or anti-CTGF antibody to the control level.

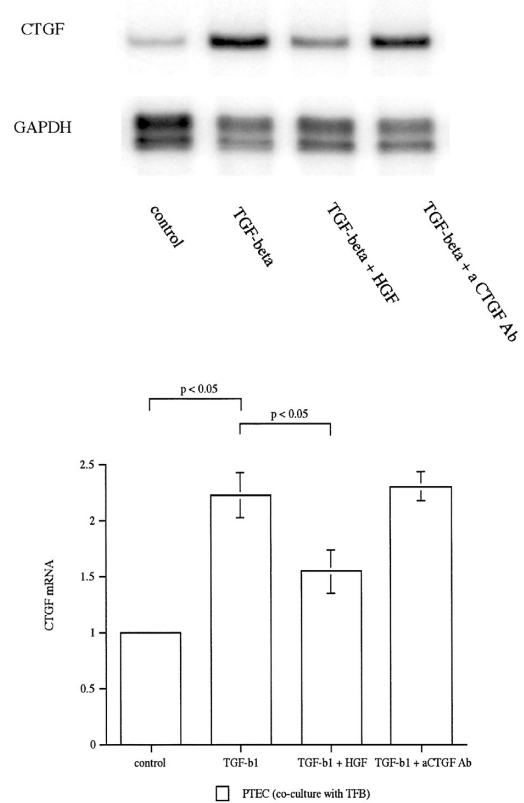


Fig. 7. Quantification of CTGF mRNA expression in PTEC. TGF- β_1 stimulated PTEC to produce CTGF, and this production was partially, but significantly blocked by HGF.

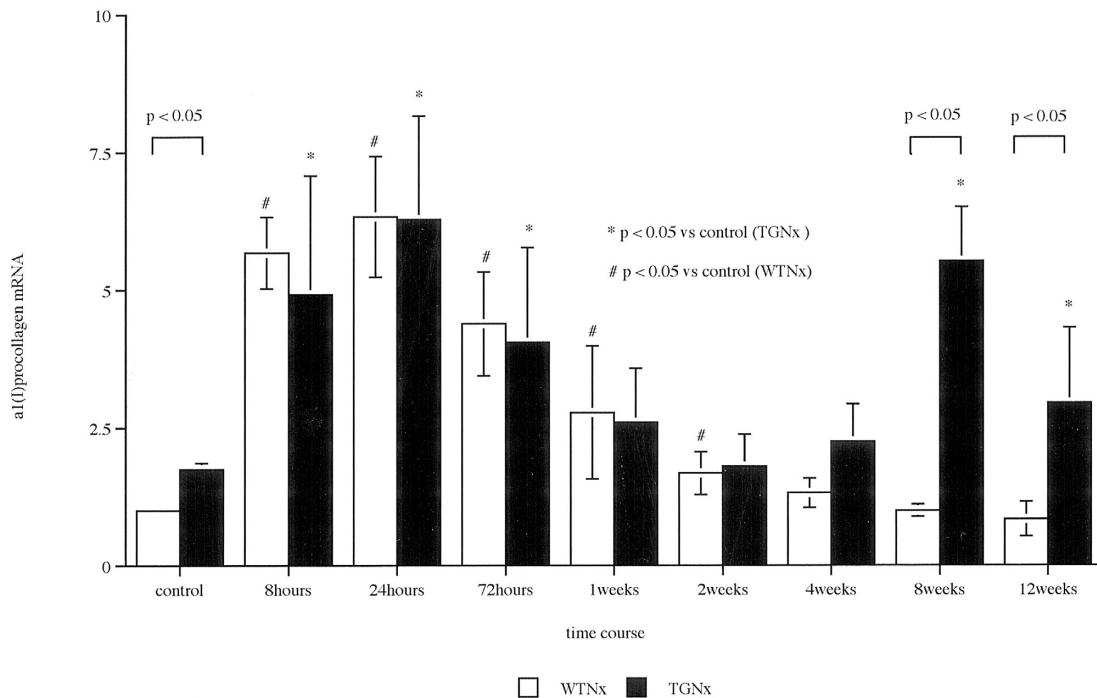


Fig. 8. Changes in $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA expression in the remnant kidneys of WTNx group and TGNx group. (The data of WTNx group are the same as shown in fig. 5D.) The expression of $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA significantly increased in the remnant kidney of TGNx group at 8 and 12 weeks after the nephrectomy. This increased level continued until the end of studies.

意な発現量増加を認めたが、dHGF投与群では発現量がPBS投与群の約1/2に抑制された (Fig. 9). $\alpha 1(I)$ procollagenの発現量に関しても同様でPBS, dHGF投与群でそれぞれ 6.17 ± 0.36 倍, 3.17 ± 0.66 倍であり、dHGF投与群では発現量の有意な抑制が確認された (Fig. 10). 腎摘8週間後についてもPBS投与群ではCTGF, $\alpha 1(I)$ procollagenの発現量ともcontrol群と比して有意な発現量の増加を認めたが、dHGF投与群は投与終了時と同様の発現量であり、PBS群と比して有意に発現量が抑制された (Fig. 9, 10).

iii dHGF投与終了時点 (腎摘6週間後) での両群残存腎の組織学的検討

PBS投与群は過半数の尿細管が拡張あるいは萎縮しており、正常構造の尿細管は少数であった。明らかな間質領域の拡大を認め、著明な細胞浸潤と線維化を伴っており、腎線維化の進行が認められた (Fig. 11C, D). dHGF投与群は一部に拡張した尿細管を認めるのみで大部分の尿細管は正常に近い構造を保っており、間質領域の拡大、細胞浸潤、線維化ともPBS投与群に比して有意に抑制されていた (Fig. 11E, F). また、PBS投与群で認められた糸球体径の増大も抑制されていた。MT染色を用いた腎線維化領域の定量的評価でも、全視野に対する線維化領域

の割合はdHGF投与前 $5.14 \pm 3.12\%$ (Fig. 12), 投与終了時点でPBS投与群 $19.51 \pm 4.25\%$, dHGF投与群 $3.59 \pm 0.99\%$ であり、dHGF投与により腎線維化領域の拡大が有意に抑制されていた。

iv PBSおよびdHGF投与群の累積生存率

PBS投与群は薬剤投与中から死亡例が認められ、以降も持続的に多数の死亡例が出現した。dHGF投与群は薬剤投与終了時まで全例生存し、以降断続的に少数の死亡例を認めるのみであった。観察終了時点の生存率はPBS投与群で0.13, dHGF群で0.68でありdHGF投与によって生存率は有意に改善した (Fig. 13).

v TGNx群残存腎におけるCTGF局在の検討

$\alpha 1(I)$ procollagenの発現量が最大となる腎摘8週間後の腎臓と、anti-CTGF抗体を用いた蛍光抗体法による検討では、主に尿細管上皮に陽性所見が認められた。凍結blockを使用したため尿細管の区分については言及できないが、拡張し扁平となった尿細管上皮に多くの陽性所見を認めた (Fig. 14). また、写真は示さないが髄質内層の尿細管上皮も陽性であった。

考 察

Mouse腎摘modelの経過については、18週観察しても組織学的に何の変化も見られないとする報告

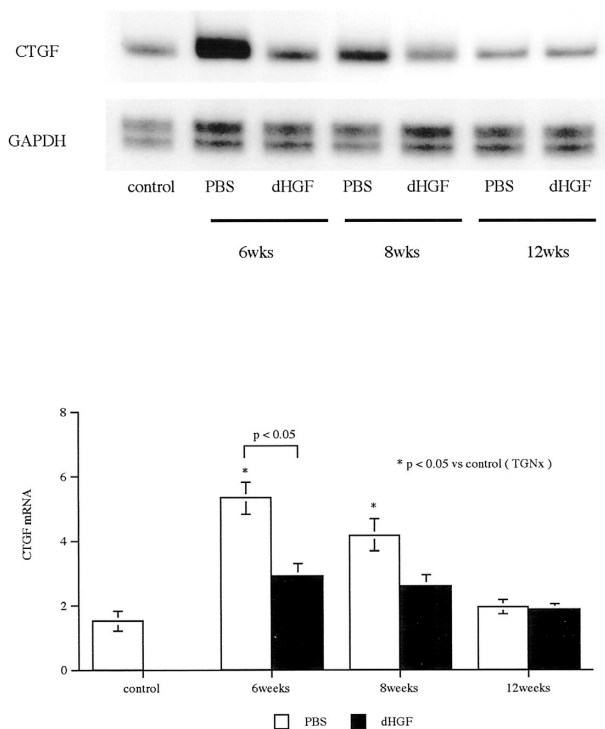


Fig. 9. Quantification of CTGF mRNA in the remnant kidneys of TGNx+PBS group and TGNx+dHGF group. CTGF mRNA expression was significantly reduced in the remnant kidney of TGNx+dHGF at 6 and 8 weeks after the nephrectomy.

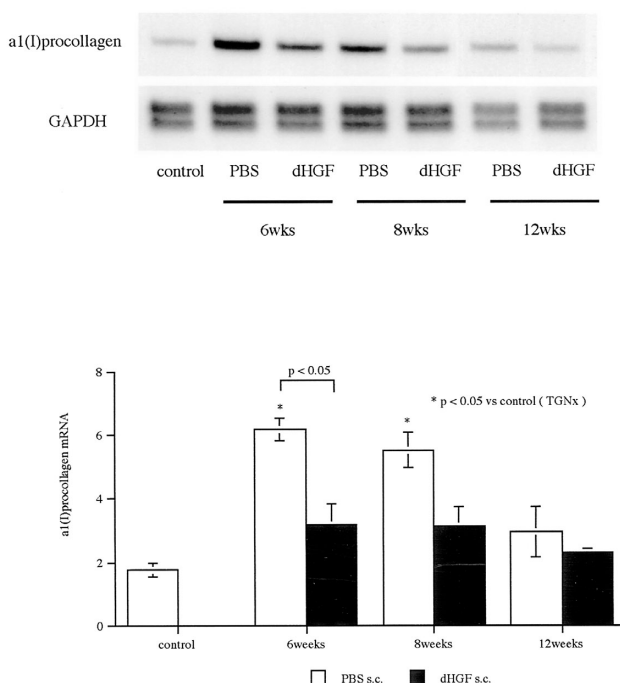


Fig. 10. Quantification of $\alpha 1(I)$ procollagen mRNAs in the remnant kidneys of TGNx+PBS group and TGNx+dHGF group. Reduction in CTGF mRNA expression in the remnant kidney of TGNx+dHGF group at 6 and 8 weeks after the nephrectomy, likely resulting in the decrease in the $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA expression.

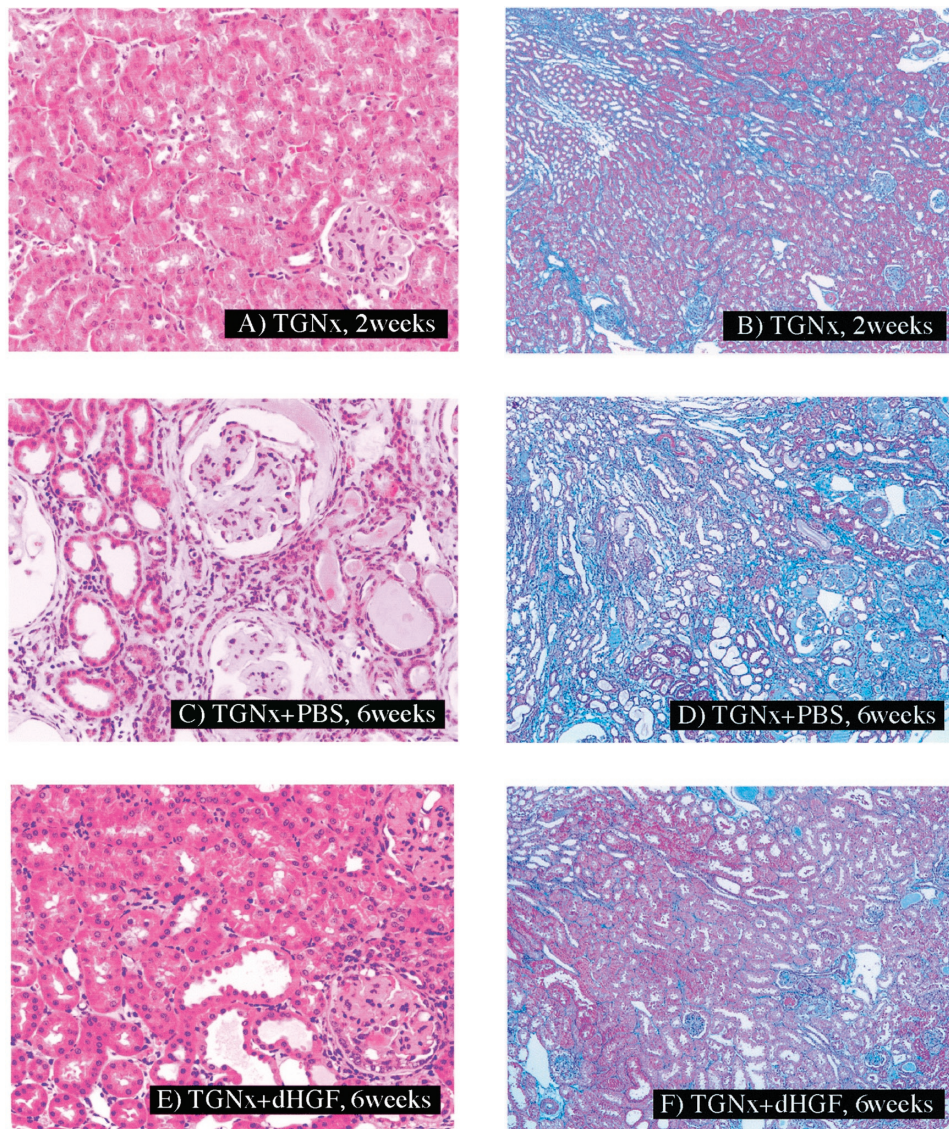


Fig. 11. Histology of the remnant kidney tissues of TGNx+PBS group and TGNx+dHGF group. The remnant kidney of both groups at 2 weeks after the nephrectomy showed slightly widened interstitium (A and B). The remnant kidney tissue of TGNx+PBS group at week 6 (C and D) shows tubular atrophy, interstitial expansion and increased matrix accumulation, however in the remnant kidney of TGNx+dHGF group such alterations were significantly attenuated (E and F). (Left column; H.E. staining, Mo.: 20 $\times$, Right column; M.T. staining, Mo.: 4 $\times$)

から²²⁾, 10週までに尿毒症状態となり細胞性免疫不全を認める²³⁾とする報告までratに比べて多様である。報告により腎摘の方法にも相違があり一概に比較は出来ないが, 系統差による影響が考慮される。とくに, mouseは近交系を用いた実験がほとんどであり, genetic backgroundによる疾患感受性の違いが大きく結果に影響する。我々が用いたのはC57BL/6とCBAとの雑種であるが, C57は腎摘に対して抵抗性^{14,22)}, CBAは²³⁾感受性と考えられる。CBA/C57BL6については観察終了時の12週において腎の切断面近くに尿細管萎縮, 単核球の浸潤および軽度の線維化を認めるのみで, その他の部位について光学顕微鏡による観察では明らかな異常所見を指摘できず, 腎摘に抵抗性と

考えられた。

この抵抗性を示す理由を残存腎におけるgrowth factor balanceから検討した。TGF- β は非常に多様な機能を持つgrowth factorである³⁾。臓器障害時において急性期は組織修復に働くが, 持続的な高発現は該当臓器の線維化を招き, 臓器機能不全症を誘起するkey moleculeと考えられている³⁾。我々の検討でも2回目の腎摘から1週間後まではTGF- β の有意な発現増加が見られたが, これは腎摘処置に対する組織修復過程に該当すると考えられた。同様にHGFも1週間にわたって発現増加が認められた。葉酸²⁴⁾あるいは虚血^{25,26)}による急性腎障害, 腎摘後の残存腎においてはHGFの発現増加が認められ²⁷⁻³⁰⁾臓器保護的に

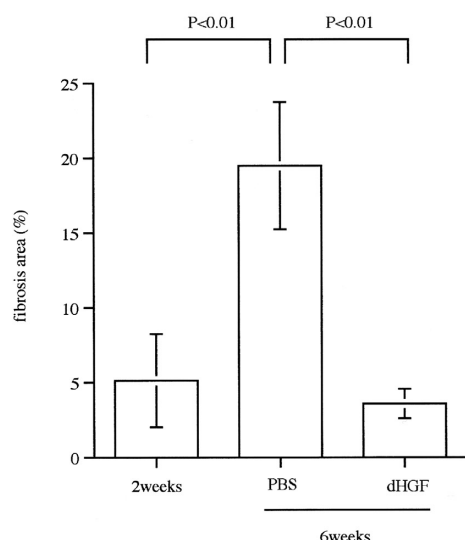


Fig. 12. Quantitative analysis of interstitial fibrosis by light microscopy. Fibrosis area in blue in the MT stained section was measured quantitatively by computer-assisted image analyzer. It revealed that the supplement of dHGF significantly prevented interstitial fibrosis.

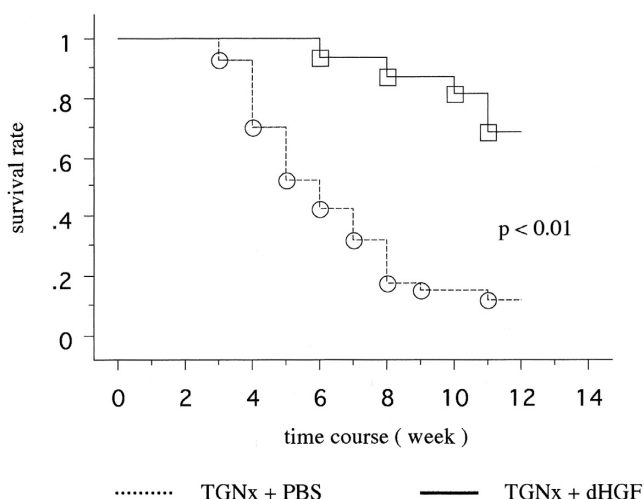


Fig. 13. Life Survival of the nephrectomized mice in TGNx + PBS group and TGNx + dHGF group. Life-table analyses are presented as Kaplan-Meier plot. The survival rate was significantly improved in the nephrectomized mice treated with dHGF in TGNx + dHGF group.

作用するほか、障害臓器の再生に寄与すると言われている³¹⁾。具体的には、腎臓においては間質細胞、内皮細胞、macrophageおよびmesangial細胞がHGFを産生し、尿細管上皮細胞および内皮細胞やmesangial細胞自身がc-Metを発現しておりその標的細胞となりうる^{31,32)}。尿細管上皮に対してHGFはanti-apoptosisに作用する^{33,34)}ほか、mitogen^{35,36)}、morphogen³⁷⁾としての作用もあり、急性尿細管壊死を主たる病態とする急性腎不全modelに対する臓器保護および治療効果が報

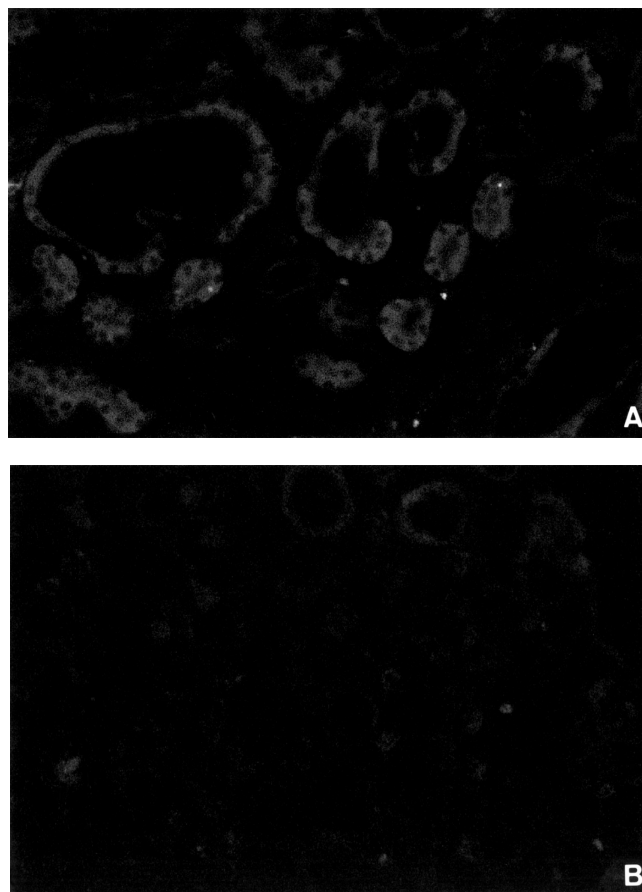


Fig. 14. CTGF protein expressed in the remnant kidney of TGNx + PBS group at 8 weeks after the nephrectomy. CTGF protein was localized in the tubular epithelial cells as well as interstitial cells (A). No signals were observed in the negative control (B).

告されている。

本研究で我々は腎線維化の進行を評価するparameterとして間質の線維化病巣に増加するextra cellular matrix (ECM) の一つである $\alpha 1(I)$ procollagen mRNA¹⁾を使用した。しかし、有意な発現増加を認める腎摘後2週間目までの腎組織において尿細管間質領域に線維化病巣は認められず、TGF- β やHGFと同様、腎摘直後から見られる $\alpha 1(I)$ procollagenの発現増加は腎摘処置に対する障害修復過程を観察していると考えられた。

腎摘2週後に一度control levelにまで減少するTGF- β 、HGFの発現量は4週後以降再び増加傾向となり、8週後をpeakに観察終了時の12週後まで有意な高値を保った。両growth factorとも腎摘72時間後とほぼ同等の発現亢進を数週間にわたって持続しているが、この期間 $\alpha 1(I)$ procollagen mRNAの発現亢進は認められず、結果に示した通り腎線維化の進行も認められなかった。Dataは示さないがRT-PCR、RPAを用

いた検討で、TGF- β 、HGFの再上昇が見られる腎摘4週間後以降も、TGF- β receptor type I, II および HGF receptor/c-Met の発現抑制は認められなかった。この間 TGF- β の持続的な高発現に対し、同様に発現増加が見られる HGF が TGF- β の作用に拮抗し、腎線維化抑制的に作用している可能性が考えられた。HGF の腎線維化抑制効果について既報としては、進行性腎障害 model に先天性ネフローゼ症候群 mouse を用い、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¹²⁾、あるいは 5/6 腎摘 rat において anti HGF antibody の投与が腎線維化を増悪させたというものがある²⁷⁾。作用機序として、HGF の供給が TGF- β の発現を抑制し、TGF- β による尿細管上皮細胞、内皮細胞の apoptosis を抑制、さらに再生を促進するだけでなく、TGF- β による fibroblast の形質転換、ECM 産生亢進を抑制する³¹⁾、あるいは alpha smooth muscle actin (α -SMA) 陽性尿細管上皮に作用し matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 産生を増加、tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) 産生を抑制し ECM の degradation を促進するというものが想定されている²⁷⁾。しかし、TGF- β 陽性細胞である間質の macrophage, fibroblasts¹²⁾ は c-Met が証明されておらず、 α -SMA 陽性尿細管上皮は病変の極く一部にしか認められない²⁷⁾。また、我々のモデルにおいては HGF の発現が増加しても TGF- β 発現は抑制されておらず、TGF- β 発現と α 1(I) procollagen の発現とは同期していなかった。したがって、少なくとも間質の線維化病巣形成における HGF の抗 TGF- β 作用の機序に関しては既存の仮説は当てはまらない。そこで我々は CTGF⁴⁾ に注目した。CTGF は promoter 領域に TGF- β response element を持ち³⁸⁾ TGF- β とともに線維化病巣の形成、維持に作用する³⁹⁾。我々のモデルにおいて残存腎に於ける CTGF の発現は腎摘8時間後に peak を認め、以後漸減し2週間後に control level となり、以降12週間まで再上昇を認めなかった。 α 1(I) procollagen の発現変化と並行しており、線維化病巣の進行を規定する key molecule の可能性があると考えられた。

線維化病巣の形成には間質の線維芽細胞だけでなく浸潤してくる炎症細胞および活性化した尿細管上皮細胞の関与が不可欠である。活性化した尿細管上皮細胞は TGF- β ⁴⁰⁾、CTGF^{41,42)} を含む profibrotic growth factor を分泌する。また尿細管上皮細胞は c-Met 発現細胞であり⁴³⁾ 腎臓における主要な HGF の標的細胞である。我々は TGF- β により活性化し CTGF を産生する尿細管上皮細胞に HGF が作用することで、間質線維芽細胞の ECM 産生に影響が及ぶという仮説を立

て、尿細管上皮細胞 (PTEC) / 間質線維芽細胞 (TFB) 共培養系を用いて検討した。その結果、共存する尿細管上皮細胞によって TGF- β 単独刺激下では間質線維芽細胞の ECM 産生が促進され、また TGF- β 、HGF 共刺激下では ECM 産生が著明に抑制された。単層培養系との比較から、この作用は HGF の間質線維芽細胞への直接効果ではないこと、また、anti-CTGF 抗体を用いた検討から、TGF- β によって尿細管上皮細胞に誘導される CTGF 発現を抑制することが、HGF の抗線維化作用機序の一部であることが明らかとなった。CTGF の発現抑制因子として TNF- α ⁴⁴⁾ および cAMP⁴⁵⁾ が知られているが、現時点では HGF との相互関連についての報告は認められない。

以上の検討から TGF- β と HGF の拮抗作用は CTGF の発現量の変化を介する α 1(I) procollagen の発現量の変化として現れる可能性があると考えられた。透析患者における検討ではあるが African American は Caucasian American より血中の TGF- β ₁ 濃度が高く⁴⁶⁾、African American に end-stage renal disease (ESRD) の頻度が高い原因の1つと考えられている。そこで我々は TGF- β TG mouse を用いて人為的に TGF- β の作用を優位とした場合の腎病変の変化を検討した。本研究に用いた TGF- β TG mouse¹⁵⁾ の genetic background は C57BL/6 と CBA の雑種であり均一ではなく、腎摘後の腎線維化の進行程度に個体間差を生じたことが、腎摘後の死亡時期が個体により大きく異なった理由と考えられる。生存個体残存腎の検討によれば、TGNx 群では腎摘4週間後以降に CTGF、 α 1(I) procollagen 発現亢進が認められ、以降、組織所見上も腎線維化の進行が確認された。Transgene 由来の TGF- β のみでは腎線維化は進行せず、また、WTNx 群でも認められた腎摘4週間後以降の残存腎における TGF- β の発現亢進だけでは腎線維化促進効果は認められない。Transgene あるいは腎局所由来の TGF- β の作用を分けて考察することは困難であるが、TGF- β の作用が過剰な状態では *in vitro* での検討と同様、CTGF の発現亢進を介して α 1(I) procollagen 発現量が増加し腎線維化が進行したと考えられた。

そこで我々は、TGNx 群に大量の HGF を投与することで、TGF- β と HGF の作用を拮抗させた場合の、CTGF、 α 1(I) procollagen 発現量および腎線維化進行への効果を検討した。dHGF は HGF の一部 amino acid が欠損した variant であるが、生理活性は HGF と同等とされている。肝障害に対する検討ではあるが ~7.5mg/kg 投与にいたるまで特に毒性は指摘し得ず、容量依存性に transaminase の改善効果を認めたとす

る報告がある⁴⁷⁾。また、4週間以内の投与ではdHGFに対する抗体価の上昇は無いとされている (personal communication)。TGNx+dHGF群に於ける検討では、薬剤投与終了時(腎摘6週間後)の残存腎におけるCTGF、 $\alpha 1(I)$ procollagen発現量は著明に抑制され、腎線維化領域の縮小、生存率の改善が認められた。dHGF投与が腎摘により生じる腎線維化病巣の進行を抑制することで生存率の改善を生じたものと考えられた。HGFの抗線維化作用を応用した肝硬変症に対する治療⁴⁸⁾や、血管新生作用を応用した閉塞性動脈硬化症に対する治療⁴⁹⁾については、効果的な投与方法も確立され、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targetと考えられる。

結 論

Mouse 5/6腎摘modelを用い、TGF- β とHGFの拮抗作用という観点から腎線維化病変の形成について検討した。その結果、TGF- β によって活性化された尿細管上皮に誘導されるCTGF発現を抑制することで、HGFは抗線維化作用を生じることが明らかとなった。腎線維化病巣進行過程において、TGF- β とHGFの作用balanceが尿細管上皮細胞におけるCTGFの発現量の変化を介して $\alpha 1(I)$ procollagenの発現量を規定しており、HGF投与により腎線維化進行抑制が期待できる。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり御指導、御協力いただいた埼玉医科大学腎臓内科岡田浩一講師ならびに教室員各位、同第二病理学伴慎一講師、大阪大学大学院医学系研究科バイオメディカル教育研究センター腫瘍生化学教室中村敏一教授、新潟大学医学部附属腎研究施設構造病理学分野山本格教授、同矢尾板永信助教授に深謝いたします。なお本研究の一部は第44回日本腎臓学会学術総会(品川、2001)、第33回米国腎臓学会(Chicago、2000)および国際腎臓学会(San Francisco、2001)において発表した。また本研究は第11回落合記念賞より研究費の助成を受けている。

引用文献

- 1) Okada H, Strutz F, Danoff TM, Neilson EG. Possible pathogenesis of renal fibrosis. *Kidney Int Suppl* 1996;54:S37-8.
- 2) Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with

- persistent glomerular nephritis. *Lancet* 1968;2:363-6.
- 3) Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-92.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989;342:440-3.
- 7) Miyazawa K, Shimomura T, Naka D, Kitamura N. Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J Biol Chem* 1994;269:8966-70.
- 8) Boros P, Miller CM. Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine. *Lancet* 1995;345:293-5.
- 9) 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.
- 10) Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999;5:226-30.
- 11) Aoki M, Morishita R, Taniyama Y, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor: potential gene therapy for ischemic diseases. *J Atheroscler Thromb* 2000;7:71-6.
- 12) 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.
- 13) Shimamura T, Morrison AB. A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol* 1975;79:95-106.
- 14) Kren S, Hostetter TH. The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int* 1999;56:333-7.
- 15) Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Bottinger EP, et al. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta

- 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 1996;74:991-1003.
- 16) Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, et al. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2572-6.
- 17) Zhang H, Wada J, Kanwar YS, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Hida K, et al. Screening for genes up-regulated in 5/6 nephrectomized mouse kidney. *Kidney Int* 1999;56:549-58.
- 18) Masunaga H, Fujise N, Shiota A, Yamashita Y, Yasuda H, Higashio K. Amelioration of disordered hepatic protein synthesis by the deleted form of hepatocyte growth factor in models of liver failure in rats. *J Pharm Pharmacol* 1996;48:876-9.
- 19) Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, Asano M, Kanyama M, Kuboki T, et al. Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells *in vitro*, and angiogenesis *in vivo*. *J Biochem (Tokyo)* 1999;126:137-45.
- 20) Okada H, Danoff TM, Kalluri R, Neilson EG. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 1997;273:F563-74.
- 21) Yamamoto T, Sasaki S, Fushimi K, Ishibashi K, Yaoita E, Kawasaki K, et al. Expression of AQP family in rat kidneys during development and maturation. *Am J Physiol* 1997;272:F198-204.
- 22) Esposito C, He CJ, Striker GE, Zalups RK, Striker LJ. Nature and severity of the glomerular response to nephron reduction is strain-dependent in mice. *Am J Pathol* 1999;154:891-7.
- 23) Gibb IA, Hamilton DN. An experimental model of chronic renal failure in mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1985;35:276-84.
- 24) Liu Y, Tolbert EM, Lin L, Thursby MA, Sun AM, Nakamura T, et al. Up-regulation of hepatocyte growth factor receptor: an amplification and targeting mechanism for hepatocyte growth factor action in acute renal failure. *Kidney Int* 1999;55:442-53.
- 25) 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.
- 26) Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Tilney NL. Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding. *Transplantation* 1997;64:1520-5.
- 27) 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.
- 28) Ishibashi K, Sasaki S, Sakamoto H, Hoshino Y, Nakamura T, Marumo F. Expressions of receptor gene for hepatocyte growth factor in kidney after unilateral nephrectomy and renal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1454-9.
- 29) Kono S, Nagaike M, Matsumoto K, Nakamura T. Marked induction of hepatocyte growth factor mRNA in intact kidney and spleen in response to injury of distant organs. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;186:991-8.
- 30) Nagaike M, Hirao S, Tajima H, Noji S, Taniguchi S, Matsumoto K, et al. Renotropic functions of hepatocyte growth factor in renal regeneration after unilateral nephrectomy. *J Biol Chem* 1991;266:22781-4.
- 31) Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 2001;59:2023-38.
- 32) Schena FP. Role of growth factors in acute renal failure. *Kidney Int Suppl* 1998;66:S11-5.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 1991;67:901-8.
- 38) Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element

- controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996;7:469-80.
- 39) Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999;181:153-9.
- 40) Johnson DW, Saunders HJ, Baxter RC, Field MJ, Pollock CA. Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. *Kidney Int* 1998;54:747-57.
- 41) Pawar S, Kartha S, Toback FG. Differential gene expression in migrating renal epithelial cells after wounding. *J Cell Physiol* 1995;165:556-65.
- 42) Hammes MS, Lieske JC, Pawar S, Spargo BH, Toback FG. Calcium oxalate monohydrate crystals stimulate gene expression in renal epithelial cells. *Kidney Int* 1995;48:501-9.
- 43) Yang XM, Park M. Expression of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor tyrosine kinase is localized to epithelia in the adult mouse. *Lab Invest* 1995;73:483-91.
- 44) Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem* 2000;275:15220-5.
- 45) Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 1999;13:1774-86.
- 46) Suthanthiran M, Khanna A, Cukran D, Adhikarla R, Sharma VK, Singh T, et al. Transforming growth factor-beta 1 hyperexpression in African American end-stage renal disease patients. *Kidney Int* 1998;53:639-44.
- 47) Masunaga H, Fujise N, Shiota A, Ogawa H, Sato Y, Imai E, et al. Preventive effects of the deleted form of hepatocyte growth factor against various liver injuries. *Eur J Pharmacol* 1998;342:267-79.
- 48) Fujimoto J. Gene therapy for liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15 Suppl:D33-6.
- 49) Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther* 2001;8:181-9.