

# 線維化抑制による慢性腎臓病治療薬の創出に関する研究

高倉 浩二

## 目 次

略語表.....	5
第1章 緒 言 .....	8
第2章 ラット 5/6 腎臓摘出モデルでの pirfenidone の有効性検証	
第1節 はじめに .....	15
第2節 実験方法	
2.1. 試薬 .....	15
2.2. 動物 .....	16
2.3. 5/6 腎臓摘出モデル作製.....	16
2.4. 群設定および実験スケジュール .....	16
2.5. 生化学的パラメーター測定 .....	17
2.6. 病理組織評価 .....	18
2.7. mRNA 測定 .....	18
2.8. 統計解析 .....	18
第3節 結果	
3.1. 尿中タンパク排泄量および腎機能パラメーターに対する作用 .....	19
3.2. 病理組織評価 .....	22
3.3. Azan 染色領域の解析および fibronectin の発現解析 .....	24
3.4. $\alpha$ -SMA 免疫染色による評価.....	26
第4節 考察 .....	28

### 第3章            ラット糸球体腎炎モデルでの pirfenidone の有効性検証

第1節	はじめに .....	30
第2節	実験方法	
2.1.	試薬 .....	31
2.2.	動物 .....	31
2.3.	病態モデル作製および群設定 .....	32
2.4.	生化学的パラメーター測定と検体採取 .....	32
2.5.	病理組織学的評価 .....	33
2.6.	mRNA 定量 .....	33
2.7.	western blotting .....	34
2.8.	統計解析 .....	35
第3節	結果	
3.1.	実験プロトコール .....	35
3.2.	予防的投与によるタンパク尿および腎機能に対する作用 .....	36
3.3.	予防的投与試験の病理組織学的検討 .....	37
3.4.	予防的投与試験における線維化および炎症性因子の発現 .....	40
3.5.	予防的投与によるポドサイト発現因子に対する作用 .....	42
3.6.	治療的投与によるタンパク尿および腎機能に対する作用 .....	46
3.7.	治療的投与試験の病理組織学的検討 .....	48
第4節	考察 .....	50

### 第4章            ラット近位尿細管上皮細胞からの線維化関連因子の発現に                      対する pirfenidone の作用の検討

第1節	はじめに .....	53
第2節	実験方法	
2.1.	試薬 .....	55
2.2.	細胞培養 .....	55
2.3.	mRNA の定量.....	56
2.4.	培養上清中の PAI-1 タンパク測定 .....	57
2.5.	western blotting .....	57
2.6.	統計解析 .....	57
第3節	結果	
3.1.	TGF- $\beta$ 1 刺激による線維化関連因子発現に対する pirfenidone の作用.....	58
3.2.	TGF- $\beta$ 1 と PDGF-BB の共刺激での pirfenidone の作用 .....	61
第4節	考察 .....	63
第5章	総 括 .....	65
謝 辞	.....	69
参考文献	.....	70

## 発表論文目録

本論文は学術情報雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

1. Renoprotective properties of pirfenidone in subtotaly nephrectomized rats

(ラット 5/6 腎摘モデルにおけるピルフェニドンの腎保護効果)

Koji Takakura, Akira Fujimori, Toshihiro Chikanishi, Akira Tanokura, Yoshiyuki, Iwatsuki,

Masanori Yamamoto, Hidenori Nakajima, Masamichi Okada, Hiroyuki Itoh

European Journal of Pharmacology Vol.629, No.1-3, p.118-124, 2010

2. Antifibrotic effects of pirfenidone in rat proximal tubular epithelial cells

(ラット近位尿細管上皮細胞におけるピルフェニドンの抗線維化効果)

Koji Takakura, Atsuo Tahara, Masanao Sanagi, Hiroyuki Itoh, Yuichi Tomura

Renal Failure Vol.34, No.10, p.1309-1316, 2012

3. Antiproteinuric effect of pirfenidone in a rat model of anti-glomerular basement membrane  
glomerulonephritis

(ラット抗糸球体基底膜腎炎モデルにおけるピルフェニドンの抗タンパク尿効果)

Koji Takakura, Kazuhiko Mizukami, Hikaru Mitori, Takahisa Noto, Yuichi Tomura

European Journal of Pharmacology Vol. 737, p.106-116, 2014

## 略語表

本論文では以下の略語を使用した。

$\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -smooth muscle actin

BUN: blood urea nitrogen (血中尿素窒素)

bp: base pair (塩基対)

CCL2: chemokine (C-C motif) ligand 2

Ccr: creatinine clearance (クレアチニンクリアランス)

CKD chronic kidney disease (慢性腎臓病)

CT: computed tomography

CTGF connective tissue growth factor

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA: deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)

ECM: extracellular matrix (細胞外マトリックス)

EDTA: ethylene diamine tetra acetic acid

EGTA: ethylene glycol tetra acetic

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EMT: epithelial-mesenchymal transision

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ESRD end stage of renal disease (末期腎臓病)

FBS: fetal bovine serum (ウシ胎児血清)

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GBM: glomerular basement membrane (糸球体基底膜)

HE: hematoxylin and eosin (ヘマトキシリン／エオジン)

HRP: horseradish peroxidase

IPF: idiopathic pulmonary fibrosis (特発性肺線維症)

JNK: Jun N-terminus kinase

MCP-1: monocyte chemotactic protein-1

mRNA: messenger ribonucleic acid

MAPK: mitogen activated protein kinase

MEK: MAPK/ERK kinase

MRI: magnetic resonance imaging

NAG: N-acetyl- $\beta$ -D-glycosaminidase

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PAI-1: plasminogen activator inhibitor 1

PAS: Periodic acid-Schiff

PFD: pirfenidone (ピルフェニドン)

PCR: polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

p.o.: per os (経口投与)

PDGF: platelet derived growth factor (血小板由来増殖因子)

pCr: plasma creatinine concentration (血中クレアチニン濃度)

PVDF: polyvinyl difluoride membranes

RAS: renin-angiotensin system (レニン・アンジオテンシン系)

SBP: systolic blood pressure (収縮期血圧)

SDS: sodium dodesyl sulfate

TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$  (トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ )

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ )

UPE: urinary protein excretion (尿中タンパク排泄量)

UPCR: urinary protein creatinine ratio (尿中タンパク／クレアチニン比)

UV: urinary volume (尿量)

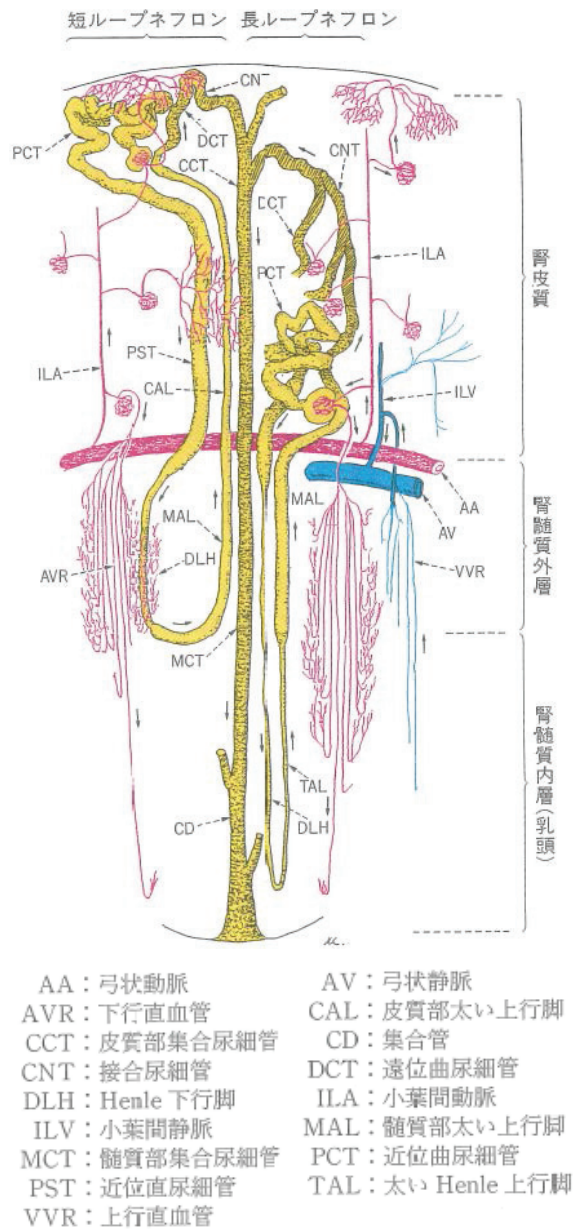
UUO: unilateral ureteral obstruction (一側尿管結紮)

WT-1: Wilms' tumor-1

## 第1章 緒言

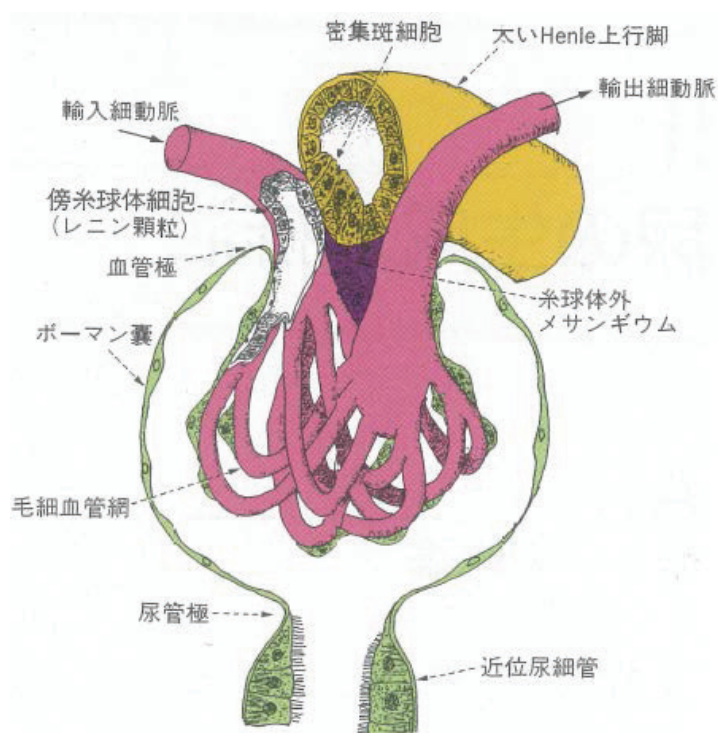
腎臓は大きく分けて2つの機能を持つ臓器である。その一つは排泄機能であり、尿生成を通じて代謝物や異物を体外に排出するとともに、体液量と組成の調節を行っている。排泄機能は、糸球体での濾過、尿細管での再吸収あるいは分泌というメカニズムで成り立っている。もう一つの機能は、赤血球分化に関わるエリスロポエチンや血管収縮に関わるレニンなどのホルモン/オータコイドの分泌や、糖・脂質・タンパク質などの代謝である。これらの機能を果たすために、腎臓は血管系から尿管系へと物質の受け渡しができる構造をしている (Figure 1)。腎臓の最小機能単位をネフロンと言い腎小体 (Figure 2) と尿細管からなっている。げっ歯類と霊長類の腎臓を比較すると、ネフロン数や大きさに違いはあるが基本構造と機能は同じであるため、腎臓に関する創薬研究はげっ歯類を中心に行われている。

**Figure 1.** 腎臓における尿細管と血管の走行  
(標準生理学第4版 (医学書院) より引用)



**Figure 2.** 腎小体の構造

(標準生理学第4版 (医学書院) より引用)



腎臓が機能不全となると、尿生成ができなくなるために窒素代謝物などが蓄積するため尿毒症が生じ、体液量調節もコントロールできないため生体機能を維持できなくなる。腎臓の機能が一定以上低下した場合にも生体機能に異常が生じる。とくに腎機能が慢性的に低下していく病態を慢性腎臓病 (chronic kidney disease, CKD) という。CKD の定義は、①腎障害を示唆する所見 (検尿異常, 画像異常, 血液異常, 病理所見など) の存在、②糸球体濾過率 (GFR)  $60 \text{ mL/分/1.73 m}^2$  未満、①②のいずれかまたは両方が3 カ月以上持続することとされている (CKD 診療ガイド2012、日本腎臓学会)。現在CKD 患者は先進国を中心に増加し、日本における患者数は約 1300 万人と推定されている (CKD 診療ガイド2012 ; 日本腎臓学会編)。慢性腎臓病となり腎機能が低下し続けると末期腎臓病 (end stage of renal disease、ESRD) となり透析治療や腎臓移植が必要となる。2014 年現在、日本の慢性血液透析患者は約 31 万人とされ、毎年 3 万 8000 人程度の新規患者が透析医療に登録されている (図説 わが国の慢性透析療法の現

況；日本透析医学会編）。血液透析医療は透析濾過膜など高価な機材を必要とし医療経済を圧迫する要因の1つと指摘されている。また腎臓移植治療はドナー数が圧倒的に不足している。2014年8月現在、日本で12000人以上の患者が移植希望者として登録されている（日本臓器移植ネットワークホームページ）。脳死移植が盛んな米国においても待機登録者数が7万人を超えている（UNOS: United Network for Organ Sharing）。このためCKDを予防あるいは治療する薬剤の創出が強く望まれている。

現行のCKD治療薬は、アンジオテンシン変換酵素阻害薬（angiotensin converting enzyme inhibitor: ACEI）およびアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬（angiotensin Ⅱ type I receptor blocker: ARB）の2種類のrenin/angiotensin（RAS）系阻害薬がある。これらの薬物はアンジオテンシンⅡによる血管平滑筋収縮を阻害することで全身血圧の上昇を抑制し、さらに糸球体輸出細動脈を弛緩することで糸球体高血圧を是正する。CKDではネフロン消失に伴い残存ネフロンに負荷がかかるため、この機序による糸球体保護は理にかなっている。しかしCKDの病態は血行動態異常以外に、炎症、酸化ストレス、低酸素など多様であるため、RAS系阻害薬のみではCKD治療は不十分であるとされ、新規機序の薬物創出が望まれている。

CKDの代表的な原疾患として高血圧症、糖尿病、糸球体腎炎がある。近年は特に生活習慣病である糖尿病を原因とした糖尿病性腎症の患者数が増えている（CKD診療ガイド2012；日本腎臓学会編）。糖尿病性腎症の腎障害メカニズムは、酸化ストレス、微小炎症、糸球体内圧上昇などによる血管内皮細胞や腎固有細胞の障害である。高血圧による腎障害メカニズムは糸球体内圧上昇による糸球体傷害とそれによる血流低下である。糸球体腎炎の腎障害メカニズムは、補体や抗体あるいは炎症性細胞による組織障害を起点としている。いずれの原因においても糸球体とその下流である尿細管が障害を受ける。ネフロンが障害を受けると別のネフロンに負荷が掛かるという悪循環サイクルも障害に関与している（Figure 3）。

**Figure 3.** CKD での腎機能低下機序



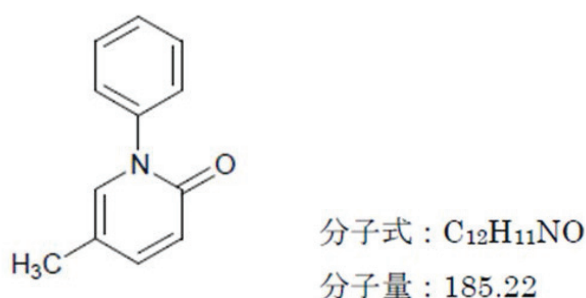
CKD 病態進行において、腎線維化はどのような原疾患においても認められるため CKD 進行の共通経路と言われている (Eddy, 2005; Boor et al., 2010)。糸球体ではメサンギウム基質の蓄積による糸球体硬化像として、また尿細管周囲では間質線維化が認められる。線維化の程度と相関して腎機能は低下することから、腎線維化は組織障害後の結果として見られる像としてだけではなく原因であるとも考えられており、腎線維化阻害は CKD 進行を抑制する方法の一つと考えられている (Negri, 2004; Declèves and Sharma, 2010; Yanagita, 2012)。しかし腎線維化を抑制することで CKD 進行が抑制できるかについては結論に至っていない。そこで本研究では、線維化阻害により CKD 進行抑制が可能であるのか検証を行なった。げっ歯類の腎疾患モデルを作製し線維化阻害薬による有効性を検証することで、「線維化抑制による CKD 進行抑制」という創薬コンセプトの妥当性を検証することを研究目的とした。そして CKD 治療に対する抗線維化薬の臨床応用について考察した。

「線維化による CKD 進行抑制」のコンセプト検証には、臨床において唯一、抗線維化作用を証明している pirfenidone を使用した。pirfenidone は特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) の治療薬 Pirespa® (ピレスパ錠、塩野義製薬) と

して 2008 年に承認されている。欧州でも 2011 年に Esbriet® (InterMune 社) として承認され (Maher et al., 2010)、米国においても承認申請中である。pirfenidone は分子量 185.22 の低分子化合物である (Figure 4)。

**Figure 4.** pirfenidone の構造式、分子式および分子量

(ピレスパ錠製品添付文書、医薬品医療機器情報提供ホームページより引用)



ピレスパ錠の製品添付文書によると、治療効果は IPF 患者の肺間質線維化を抑制することで肺活量低下を抑制するとされている。ターゲット分子は不明であるが、作用機序は炎症性サイトカイン等の各種サイトカイン及び線維化形成に関与する増殖因子に対する産生調節作用、線維芽細胞増殖抑制作用やコラーゲン産生抑制作用など複合的な作用に基づき抗線維化作用を発揮するとされている。前臨床エビデンスとして肺線維症モデルでの有効性が多数報告されているが、腎臓病に対するエビデンスは 5/6 腎摘モデルおよび片側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction; UUO) モデルで線維化を抑制することが報告されている (Shimizu et al. 1997 and 1998)。また糖尿病性腎症モデルでメサンギウム基質の蓄積を抑制することが報告されている (RamachandraRao et al., 2009)。しかしタンパク尿や腎機能低下に対する有効性は明らかにされていない。臨床においては、巣状糸球体硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis; FSGS) および糖尿病性腎症において有効性を示唆する報告がなされているが、これらは少数の患者での試験であり有効性の証明にまでは至っていない (Cho et al., 2007; Sharma et al., 2011)。

そこで本研究では、臨床において抗線維化作用が示されている pirfenidone を用いて線維化抑制による腎疾患モデルでの有効性を検証した。評価には線維化抑制効果に加えてタンパク尿および腎機能低下に対する作用を確認し腎機能保護作用の有無を検証した。

第二章では、CKD の代表的な病態モデルである 5/6 腎臓摘出モデルに対する pirfenidone の有効性を検証した。評価には病理学的検査による線維化評価に加えてタンパク尿や腎機能低下への作用を検討した。また間質線維化に伴って起きる尿細管上皮細胞の形質変化を観察する目的で $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の組織染色を行った。

第三章では、ヒトにおける進行性糸球体腎炎を外挿したモデルである抗 GBM 腎炎モデル (GBM : glomerular basement membrane) に対する pirfenidone の有効性を検証した。評価は病理学的検査に加えてタンパク尿および腎機能低下に対する評価を行った。予防的だけでなく治療的效果について検証することで、臨床での有効性予測の向上に努めた。また抗線維化薬がタンパク尿を抑制しうるかについてはこれまで統一した見解がないため、タンパク尿抑制効果についても注目した。

第四章では、*in vivo* モデルで認められた pirfenidone の作用を確認する目的で、培養腎近位尿細管上皮細胞からの細胞外マトリックス関連因子の発現に対する作用を検証した。近年、尿細管上皮細胞は腎障害にともなう線維化に重要であることが示唆されていることから、本検討は CKD での作用予測につながると考え実施した。

本研究において、原因の異なる 2 種類の腎障害モデルでの pirfenidone の作用を検証した結果、抗線維化による CKD 治療薬創出を推進するための知見が得られたので報告する。

## 第2章

### ラット 5/6 腎臓摘出モデルでの pirfenidone の有効性検証

#### 第1節 はじめに

本章では pirfenidone の CKD に対する有効性を外挿するために 5/6 腎摘モデルでの薬効評価を行なった。5/6 腎摘モデルは腎臓の 5/6 を切除することで、残存した 1/6 の腎臓に慢性的に糸球体過剰負荷をかけ腎機能低下を誘導するモデルである。ヒトにおいても糸球体過剰濾過は糖尿病性腎症や腎硬化症など様々な病態で認められ、本モデルでの有効性は臨床を外挿するうえで重要である。臨床で CKD 治療薬として使用されている RAS 系阻害薬は全身血圧を下げることで糸球体過剰濾過を是正し、本モデルで有効性を示す。一方で pirfenidone は全身血圧には影響せず糸球体過剰濾過を是正する作用はないと考えられる。したがって pirfenidone を本モデルで評価することで、糸球体過剰濾過によって惹起される CKD 病態に対して降圧によらない機序での有効性を検証することができる。薬効評価は組織学的検査による抗線維化作用の有無に加えてタンパク尿および腎機能低下に対する作用を検証した。最後に pirfenidone の腎保護作用について考察を加えた。

#### 第2節 実験方法

##### 2.1. 試薬

pirfenidone はアステラス製薬（株）で合成した。陽性対照薬として angiotensin II converting enzyme 阻害薬（ACE 阻害薬）である enalapril を陽性対照薬として使用した。enalapril は Sigma 社より購入した（enalapril maleate salt, E6888）。enalapril の用量はフリー体換算した。

## 2.2. 動物

6 週齢の雄性 wistar ラットは日本 SLC (株) より購入した (体重 200~250g)。動物は照明 7 時 30 分、消灯 19 時 30 分の 12 時間サイクルで飼育した。飼料は固形飼料 (CE-2: 日本クレア) を自由摂餌させた。pirfenidone 投与動物には 1% (重量比) の pirfenidone 含有固形飼料 (CE-2) を自由摂餌させた。全ての実験は、動物を用いる生物医学研究のための国際指導原則に準拠し、アステラス製薬 (株) 動物実験委員会の承認を得て実施した。

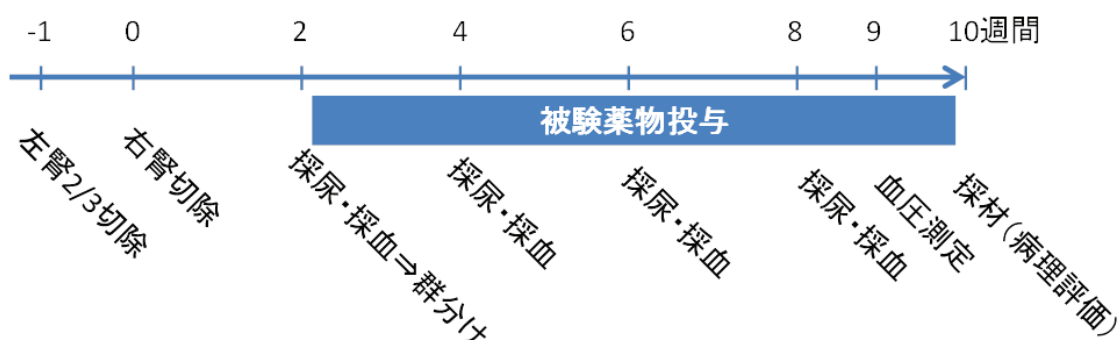
## 2.3. 5/6 腎臓摘出モデル作製

腎臓の 5/6 摘出は左腎臓を 2/3、右腎臓を全摘出することにより作製した。入荷したラットは 1 週間経過の馴化の後モデル作製に使用した。ラットを 50 mg/kg/mL のペントバルビタール (腹腔内投与) で麻酔し、左背部をバリカンにより剃毛しアルコール綿にて消毒した。長さ 1.5~2 cm で皮膚と筋層を切開し、腎皮膜を剥き、腎臓動脈と静脈をクレンメにより止血した状態で、左腎の 2/3 をメスにより切除した。すぐに切除部分に適切なサイズのスポンゼルを貼りあわせ止血を行ない、十分に止血されたことを確認した後にクレンメを取り外し、腎臓を腹腔内に戻し筋層と皮膚を縫合した。ラットは麻酔が覚醒するまで保温した。左腎の処置の 1 週間後、右腎の全摘出を行なった。ラットを 50 mg/kg/mL のペントバルビタールで麻酔し、左腎と同様に右腎にアクセスした。右腎の皮膜を剥いた後、動脈および静脈を 4-0 絹糸で結紮した。筋層および皮膚を縫合し、5/6 腎臓摘出動物を完成させた。正常対照動物 (sham) には、腎臓切除以外の処置を実施した。

## 2.4. 群設定および実験スケジュール

実験のスケジュールを Figure 5 に示した。

**Figure 5. 5/6 腎摘モデル評価の実験スケジュール**



5/6 腎摘の完成から 2 週間後、代謝ケージを使用して 24 時間採尿し、尿中タンパク排泄量 (urinary protein excretion; UPE) および血中の腎機能パラメーターにより群分けを行なった。群は病態発症コントロール群 (13 例)、pirfenidone 投与群 (13 例)、enalapril 投与群 (8 例) および sham 正常対照群 (8 例) を設定した。pirfenidone は正常食 (CE-2、日本クレア) に 1% の濃度で pirfenidone を添加した餌を与えた。平均摂餌量からの計算によると 700 mg/kg/day の投与量となった。enalapril は 0.5% メチルセルロースに溶解し 5 mg/kg/day で 1 日 1 回経口投与し、pirfenidone 投与群、病態コントロール群および正常対照群にも 0.5% メチルセルロース液を 1 日 1 回投与した。薬物投与は 2 週間目から 10 週間目まで行なった。10 週間目にイソフルラン麻酔下において採血を行ない、残存した腎臓を摘出した。腎臓は一部分を病理解析のため 10% 中性ホルマリンに浸漬し、残りの部分を mRNA 発現量あるいはタンパク発現量解析のため  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

## 2.5 生化学的パラメーター測定

体重は週 1 回に測定した。尿中タンパク排泄量 (UPE)、血中クレアチニン (pCr) および血中尿素窒素 (BUN) は、薬物投与開始から 2 週間おきに 10 週間目まで測定した。UPE は Protein assay (Bradford 法、Bio-Rad) にて測定した。pCr および BUN は自動分析機 (7250、日立製作所) により、それぞれデターミナー L CRE またはデターミナー L UN (共に協和メディックス) を使用して測定した。9 週間目に全身血圧への

影響を確認するため非観血的に収縮期血圧を測定した (Softron, BP-98)。

## 2.6. 病理組織評価

10%中性ホルマリンにて固定した腎臓は、パラフィン包埋し、3 - 4  $\mu\text{m}$  厚の切片を作製し HE 染色および Azan 染色を行なった。また $\alpha$ -SMA 染色を行なった。方法は脱パラフィン化した切片を 10%過酸化水素水で内因性のペルオキシダーゼ活性をブロックし、抗 $\alpha$ -SMA 抗体 (DAKO 社) でインキュベートした後、ペルオキシダーゼ検出試薬 (NICHIREI Bioscience 社, Histofine SAB-PO(M)) および hematoxylin 核染色を行なった。病理組織評価は盲検にて実施し、次のように格付けした。normal, score 0; mild, score 1; moderate score 2; marked, score 3。間質線維化および尿細管変性について目視によるグレード付けを行なった。

## 2.7. mRNA 測定

凍結保存した腎臓から total RNA を TRIzol 試薬 (Life Technology 社) で抽出した。定量 PCR は TaqMan ABI7900 (Applied Biosystems 社) にて行なった。各遺伝子の発現は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 発現を内部コントロールとして補正した。

## 2.8. 統計解析

生化学的パラメーターの解析には Dunnett 検定による多重比較を行なった。病理組織の解析には Kruskal-Wallis 検定による多重比較を用いた。  $P < 0.05$  のときに統計学的に有意であると判断した。統計解析は GraphPad Prism 5 (MDF) を用いて解析した。

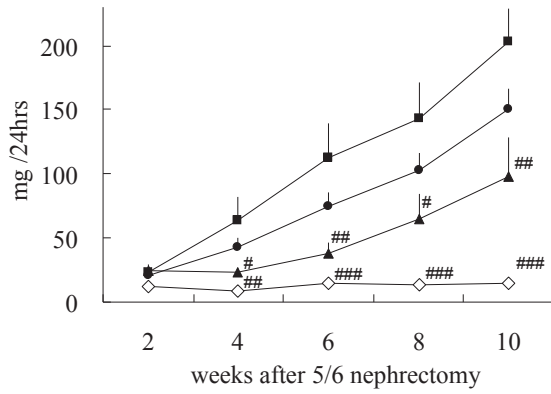
### 第3節 結果

#### 3.1. 尿中タンパク排泄量および腎機能パラメーターに対する作用

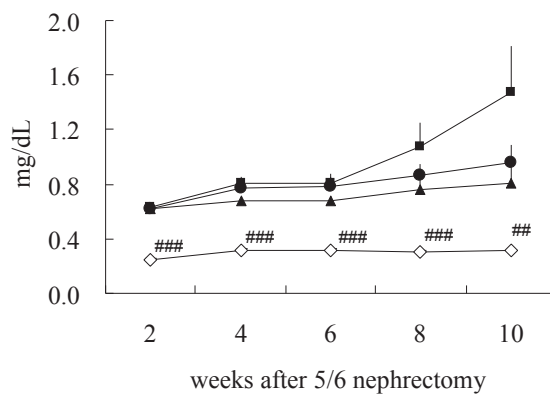
Figure 6A に病態発症2週間目から評価終了の10週間目までの尿中タンパク排泄量 (UPE) の推移を示した。5/6 腎摘により病態 control 群の UPE は10週間目まで増加し続けた。sham 群との比較では4週間目から統計的有意差が認められた。病態 control 群に対して enalapril 群は4週間目から10週間目まで有意に UPE 増加を抑制した。一方で pirfenidone 群は病態 control 群に対して UPE を低下させる傾向はあるものの有意差は認められなかった。血中クレアチニン濃度 (pCr) は、群分け時の2週間目において病態 control 群は sham 群に比べて有意に上昇しており、8 から10週間目にかけてさらに上昇した (Figure 6B)。これに対して enalapril 群は、病態 control 群の pCr 上昇を抑制した (個体間のバラツキのため統計的有意差はなし)。pirfenidone 群も enalapril 群と同様に8 から10週間目の病態コントロール群の pCr 上昇を抑制した。血中尿素窒素 (blood urea nitrogen; BUN) においても、pirfenidone 群は病態 control 群の BUN 上昇を抑制した (Figure 6C)。以上のように、pirfenidone はタンパク尿増加に対する抑制作用は明確ではなかったが、腎機能低下に対して抑制する傾向を示した。

**Figure 6.** 尿中タンパクおよび腎機能パラメーター

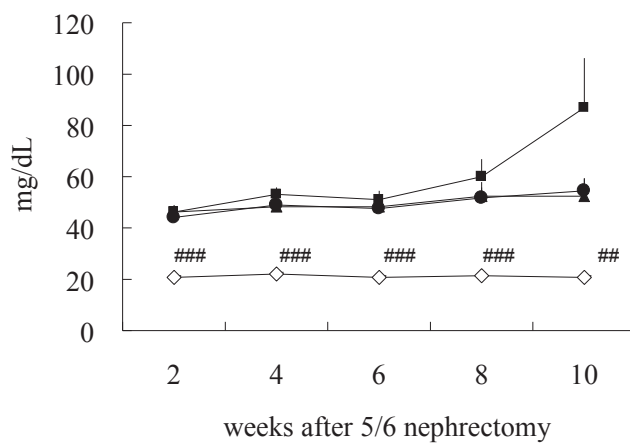
**A:** urinary protein excretion



**B:** plasma creatinine concentration



**C:** blood urea nitrogen



**Figure 6. Time course for urinary protein excretion (A), plasma creatinine concentration (B) and blood urea nitrogen (C) in sham-operated (open diamond, n=8) and 5/6 nephrectomized rats [control (closed square n=13), enalapril-treated (closed triangle, n=10), and pirfenidone-treated (closed circle, n=13)].** Values are expressed as the mean±S.E.M., #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$  vs control group.

評価最終時点（10 週間目）でのその他の生化学的パラメーターを Table 1 に示した（全身血圧は 9 週間目に測定）。試験開始時は群間の平均体重に差はなかった。病態 control 群は sham 群に比べて体重増加が減少傾向であった（統計的有意差なし）。enalapril 投与群は体重増加が回復傾向であったが病態 control 群との統計的有意差はなかった。体重あたりの腎重量 (KW/BW) は sham 群に比べて病態 control 群で増加していた (sham 群は左腎重量)。これに対して enalapril 群および pirfenidone 群は腎重量増加を軽減する傾向であった（統計的有意差なし）。全身血圧は sham 群に対して病態 control 群で高く ( $133 \pm 2.6$  vs  $168 \pm 5.3$ ;  $P<0.001$ )、enalapril 群では sham 群と同レベルにまで全身血圧が低下していた ( $137 \pm 3.3$ ;  $P<0.001$ )。一方 pirfenidone 群も病態 control 群と比べて全身血圧が低い傾向であった ( $153 \pm 3.7$ ;  $P<0.05$ )。尿中の N-acetyl- $\beta$ -D-glycosaminidase (NAG) 活性は尿細管障害とともに上昇し、sham 群に比べて病態 control 群では上昇傾向であった（統計的有意差なし）。これに対して enalapril 群と pirfenidone 群は sham 群と同レベルであった。creatinin clearance (Ccr) は sham 群と比較して病態 control 群で低下し ( $1.16 \pm 0.03$  vs  $0.41 \pm 0.06$ ;  $P<0.001$ )、enalapril 群または pirfenidone 群で改善傾向が認められた。

Table 1. Renal and systemic function at tenth week after 5/6 nephrectomy

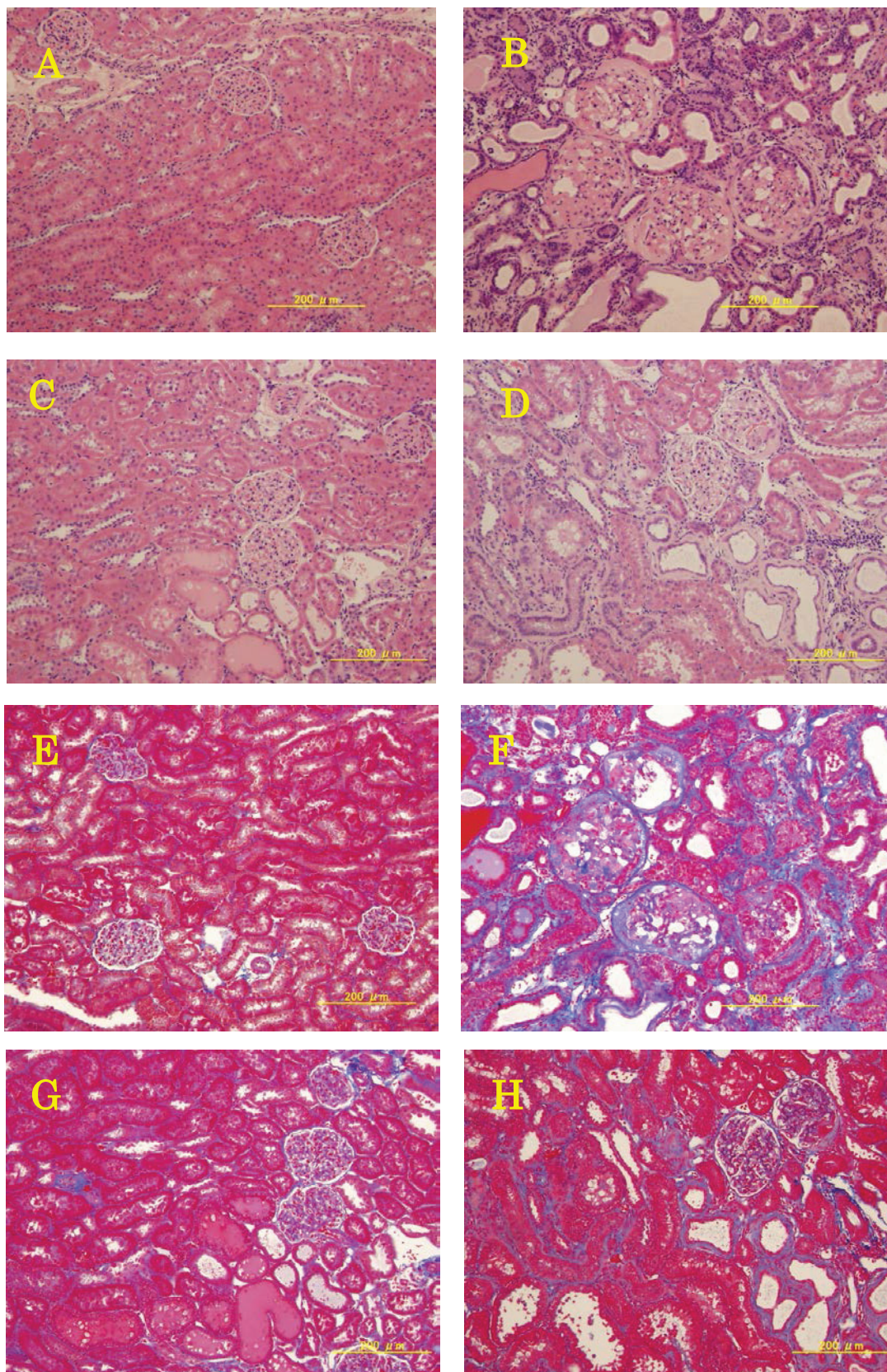
Group	n	BW (g)	KW/BW (g/kg)	SBP (mm Hg)	UV (mL)	NAG (IU)	Ccr (L/day/100gBW)
sham	8	320±6	3.1±0.0 <sup>b</sup>	133±2.6 <sup>b</sup>	11.9±0.6 <sup>b</sup>	0.13±0.01	1.16±0.03 <sup>b</sup>
control	13	284±11	4.8±0.3	168±5.3	35.1±2.2	0.29±0.07	0.41±0.06
enalapril	8	287±9	4.0±0.2	137±3.3 <sup>b</sup>	29.8±1.5	0.14±0.01	0.54±0.06
pirfenidone	13	283±6	4.6±0.2	153±3.7 <sup>a</sup>	31.2±3.1	0.17±0.01	0.45±0.04

Results are expressed as mean±S.E.M. Abbreviations are: BW, body weight; KW/BW, left kidney weight per body weight; SBP, systolic blood pressure; UV, urinary volume; NAG, N-acetyl-β-D-glycosaminidase activity; Ccr, creatinine clearance. SBP was measured at ninth week. a or b:  $P<0.05$  or  $0.001$  vs control.

### 3.2. 病理組織評価

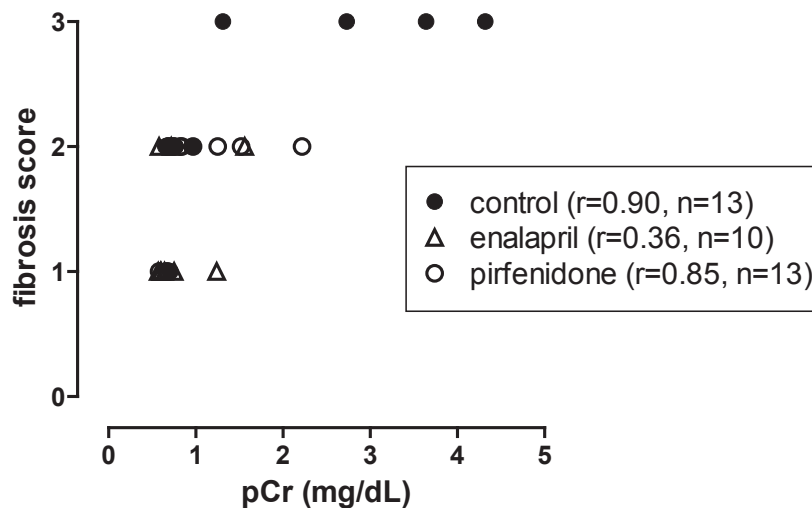
pirfenidone の抗線維化作用を確認するため、評価終了 10 週間目の腎臓の hematoxylin-eosin (HE) 染色および Azan 染色切片を病理学的に評価した (Figure 7)。病態 control 群では糸球体は肥大化してボウマン囊領域が広がり、空胞変性や糸球体硬化が顕著であった (Figure 7B, F)。糸球体周囲の尿細管は高度に変性し尿細管管腔は拡大していた。炎症性細胞の浸潤が間質に認められると同時に間質線維化が認められた。糸球体やボウマン囊周囲での細胞外マトリックス蓄積も顕著であった。これに対して enalapril 群は糸球体および尿細管の変性を全般的に改善した (Figure 7C, G)。炎症性細胞浸潤や間質線維化にも改善が認められた。pirfenidone 群は糸球体周囲および尿細管周囲の線維化を改善した (Figure 7D, H)。ボウマン囊壁の拡大や空胞変性など糸球体内外の変性の抑制は軽微であった。尿細管変性は軽微であったが炎症性細胞浸潤の抑制は明確でなかった。間質線維化レベルと腎機能パラメーターの関係を Figure 8 に示した。病態 control 群および pirfenidone 群において線維化と腎機能 (pCr) に相関が認められた (control  $r=0.90$ , enalapril  $r=0.36$ , pirfenidone  $r=0.85$ )。以上のように、enalapril 群の改善効果は組織全般に認められたが、pirfenidone 群は線維化を軽減し腎機能との相関が認められた。

**Figure 7.** HE 染色（A-D）および Azan 染色（E-H）による病理組織評価



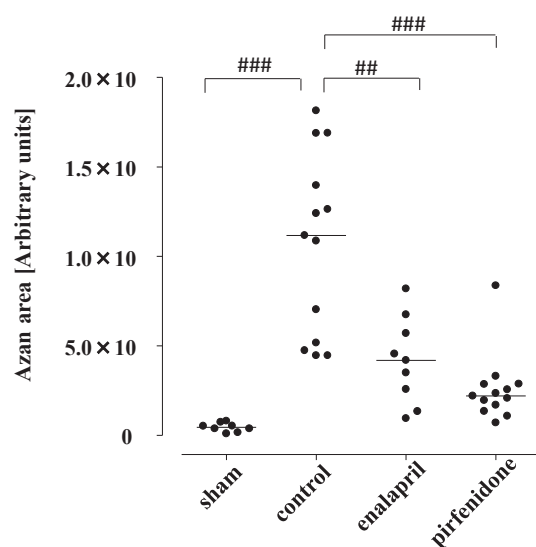
**Figure 7. Representative light micrographs of renal tissues obtained from sham-operated (A and E) and 5/6 nephrectomized rats [control (B and F), enalapril-treated (C and G), and pirfenidone-treated (D and H)] 10 weeks after renal ablation. A through D is representative of the hematoxylin and eosin staining results. E through H is representative of the Azan staining results.**

**Figure 8. 線維化と腎機能パラメーターの関係**

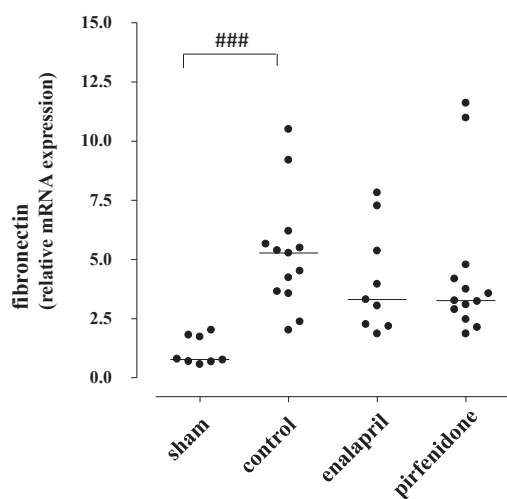


**Figure 9.** Azan 染色の画像解析および fibronectin の発現解析

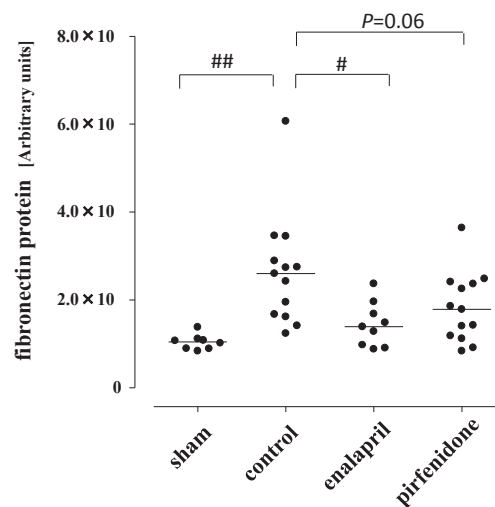
A.



B.



C.



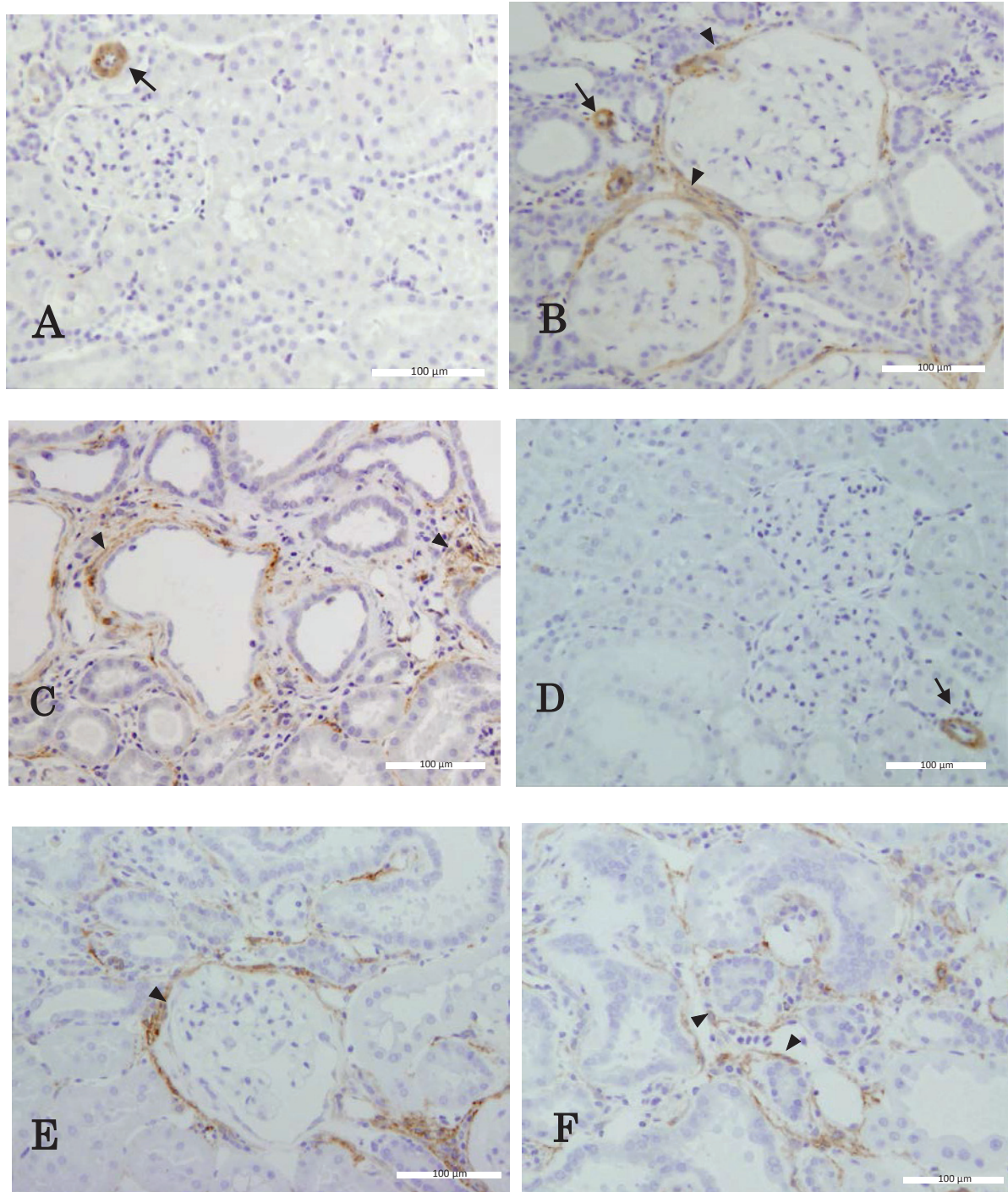
**Figure 9. Regulatory effects of pirfenidone on interstitial fibrosis.** A) The renal fibrotic area was assessed using Azan staining and measured using an NIH scion image analyzer; B) show the mRNA expression of fibronectin relative to the expression of  $\beta$ -actin in the renal tissue; C) fibronectin expression was examined using western blotting, and the bands were quantified using densitometry. The closed circles represent values for individual animals, and the horizontal bar represents the

median value. #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$  vs control group.

#### 3.4. $\alpha$ -SMA 免疫染色による評価

HE と Azan による病理検査に加えて、間質線維化に伴って起きる尿細管上皮細胞の形質変化を観察する目的で  $\alpha$ -SMA 染色を実施した。その結果 sham 群の腎臓では血管平滑筋細胞にのみ  $\alpha$ -SMA の発現が認められた (Figure 10A)。病態 control 群では皮質や傍髄質の間質とボウマン囊周囲に  $\alpha$ -SMA 発現が認められた (Figure 10B)。 $\alpha$ -SMA の染色は必ずしも細胞外マトリックスの蓄積と一致するわけではないが、尿細管上皮細胞の変形が高度である周辺での発現は高度で、線維化を伴った組織の変性と一致していた (Figure 10C)。加えて  $\alpha$ -SMA 高発現は膨張したボウマン囊も認められ、それは糸球体硬化像と一致していた (Figure 10B)。これに対して enalapril 群では  $\alpha$ -SMA 発現は血管平滑筋を除いて明確に減弱していた (Figure 10D)。一方で pirfenidone 群では線維化が改善されていたにも関わらず、 $\alpha$ -SMA 染色がボウマン囊上皮周辺や尿細管周囲に観察された (Figure 10E-F)。このように pirfenidone は病態に伴い上昇するボウマン囊上皮や尿細管上皮細胞の  $\alpha$ -SMA 発現は抑制しなかったことから、これら上皮細胞の形質変化に影響しないことが示唆された。

**Figure 10.**  $\alpha$ -SMA 免疫染色



**Figure 10. Immunohistochemistry of  $\alpha$ -SMA** in sham-operated (A) and 5/6 nephrectomized rat kidney [control (B and C), enalapril-treated (D), and pirfenidone-treated (E and F)]. Arrow heads indicated myofibroblastic transdifferentiated cells. Arrows indicated blood vessels. Scale size: 100  $\mu$ m.

#### 第4節 考察

本章ではヒト CKD を外挿したモデルであるラット 5/6 腎摘モデルに対する pirfenidone の有効性検証を行なった。その結果 pirfenidone は腎線維化の進展を抑制し腎機能低下を軽減した。

今回行なった混餌による pirfenidone 投与では摂餌量換算すると約 700 mg/kg/day が投与されたこととなる。血中濃度測定は行っていないが、肺疾患モデル評価で報告されている最高量は 300 mg/kg/day (Oku et al., 2008) であり、また組織特異性もないと報告されている (ピレスパ錠®医薬品インタビューフォーム) ことから、pirfenidone が作用を示すための十分量が処置されたと考えられた。

pirfenidone は陽性対照として設定した enalapril とは異なる特徴を示した。すなわち enalapril は糸球体過剰濾過を抑制することでタンパク尿増加を抑制し腎保護効果を示すと考えられるが、pirfenidone はタンパク尿を明確には抑制しないにもかかわらず腎機能低下を抑制した。タンパク尿は糸球体濾過機構の障害を表しているため線維化とは直接的な関係がないかもしれない。pirfenidone は抗線維化作用により腎保護作用を発揮したためタンパク尿への効果は軽微であった可能性がある。ただし抑制効果が全くなかったわけではないため、タンパク尿抑制効果についてはさらなる検証が必要と考えられた。enalapril は腎機能障害進展に伴う収縮期血圧の上昇を完全に抑制した。pirfenidone もわずかに収縮期血圧の上昇が軽減されていた。pirfenidone には全身血圧を低下させる直接的な作用はないため、これは pirfenidone が腎機能低下を抑制した結果、腎臓による水分調節機構を維持したためであると考えられた。

尿細管上皮細胞の形質変化は CKD の病態進展に影響するとされる (Neilson, 2006; Strutz and Zeisberg 2006; Burns et al., 2007)。尿細管上皮細胞は電解質輸送や酸・塩基平衡、尿濃縮による水分調節など様々な作用を担っており、腎臓の機能低下は尿細管障害と深く関係していることが推測される。上皮細胞から間質系細胞への形質変化である epithelial mesenchymal transition (EMT) は E-cadherin のような上皮特異的なタ

ンパクの発現低下や (Fan et al., 1999; Burns et al., 2007; Liu, 2010)、 $\alpha$ -SMA や vimentin のような間質細胞で発現する因子の上昇で確認される (Jinde et al., 2001; Rastaldi et al., 2002)。腎臓においても EMT に関する研究が行われているが、腎尿細管上皮細胞のうち糸球体近傍にある近位尿細管上皮細胞は E-cadherin を発現していないことが知られている (Kim et al., 2013)。近位尿細管は電解質輸送や酸・塩基平衡、グルコースの再吸収など腎臓にとって重要な機能を担っていることからこの細胞を含めた形質変化を調べることは重要である。したがって本検討では E-cadherin 染色ではなく  $\alpha$ -SMA 染色にて上皮細胞の形質変化を観察した。その結果  $\alpha$ -SMA 発現は尿細管が拡張した上皮細胞に沿って認められ、とくに障害度が強い場所で高かった。さらに尿細管上皮細胞だけでなくボウマン囊上皮周囲でも観察された。糸球体腎炎においてはボウマン囊上皮細胞が半月体形成に関与すると報告されているが (Shimizu et al., 2006)、5/6 腎摘モデルにおいてもボウマン囊上皮細胞の形質変化が起きていることが示唆された。このような  $\alpha$ -SMA 発現変化に対して pirfenidone は作用を示さなかった。このことは尿細管およびボウマン囊上皮の形質変化には pirfenidone は作用せず、pirfenidone が抑制する機構とは別のメカニズムが存在する可能性が推測された。

現在 CKD 治療には enalapril を含む RAS 系阻害薬が使用されている。RAS 系阻害剤は 5/6 腎摘モデルでの投与開始時期を遅らせると有効性が低下することが分かっている (未発表データ)。このことは angiotensin II が糸球体過剰濾過の起きる早期病態に関与し、病態後期には別の機序が CKD に関与していることを示唆している。したがって RAS 系阻害薬とは作用機序が異なり、より進展した病態での効果が期待される抗線維化薬は魅力的な CKD 治療薬の候補になると考えられた。

## 第3章

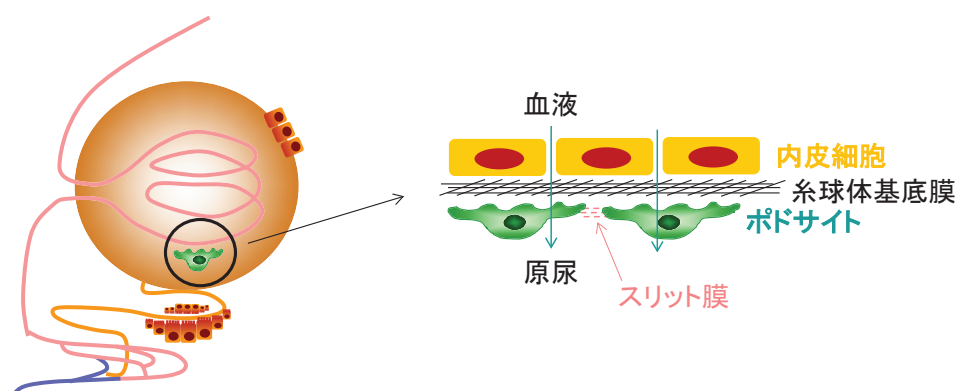
### ラット糸球体腎炎モデルでの pirfenidone の有効性検証

#### 第1節 はじめに

全身血圧の上昇を伴う CKD に対する抗線維化薬の有効性検証を第二章で行なった。本章ではヒトの進行性糸球体腎炎に類似した病態を呈する抗 GBM 腎炎 (GBM : glomerular basement membrane) に対する pirfenidone の有効性を検証した。原因の異なる病態での有効性を検証することで抗線維化薬のヒトでの有効性を外挿した。抗 GBM 腎炎は糸球体基底膜に対する抗体が沈着し補体を活性化することが引き金となり発症するが、病態進展にともない CKD 病態に共通する糸球体内外への細胞外マトリックス蓄積や尿細管障害そして間質線維化が認められ、ヒト CKD への有効性を外挿するうえで有用なモデルである (Neale et al., 1982, Shirato et al., 1996; Zhou et al., 2010)。特に RAS 系阻害薬は本モデルには無効であることから、多様な病態を呈する CKD に対する治療薬を創出する意味において本モデルでの有効性検証は重要と考えられる。臨床においては腎障害が進行してからの投薬も予想されるため、治療効果についても検証を行なった。さらに、タンパク尿への効果は有効性予測を行なう上で有用である。タンパク尿は糸球体や尿細管障害の程度を評価するための信頼できる検査指標であり、糸球体腎炎とそれに関連する一次性・二次性の腎障害において病態進行を評価する重要な手段となっている (KDIGO, 2012)。抗線維化薬がタンパク尿を抑制するかについては統一した見解はなく、pirfenidone についてもタンパク尿に対する抑制作用を明確に示した報告はない (Shimizu et al., 1998; Shimizu et al., 1997; RamanchandraRao et al., 2009)。第二章の 5/6 腎摘においても pirfenidone のタンパク尿抑制効果は明確ではなかった。したがって prfenidone のタンパク尿に対する作用についても精査を行なった。とくに近年、糸球体基底膜を裏打ちする podocyte の障害がタ

ンパク尿原因の一つとして注目されている (Mathieson, 2012; Greka et al., 2012)。本検討ではポドサイトのスリット膜形成に関与している nephrin や podocin の発現変動や、糸球体においてはポドサイトとボウマン嚢上皮細胞に特異的に発現する Wilms' tumor-1 (WT-1) 染色を行ない、タンパク尿とのつながりについて考察した。

**Figure 11.** 糸球体基底膜および podocyte の図



## 第2節 実験方法

### 2.1. 試薬

pirfenidone はアステラス製薬（株）で合成した。ウサギ抗 GBM 血清はアステラス製薬（株）にて作製されたものを使用した。抗 nephrin 抗体は免疫生物学研究所から購入した。抗 podocin 抗体は Sigma から購入した。抗 $\beta$ -Actin 抗体は Cell Signaling Technology から購入した。houseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体は MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES から購入した。抗 CD68 抗体 (ED-1) は Serotec から購入した。抗 Wilms' tumor-1 (WT-1) 抗体は Santa Cruz Biotech から購入した。

### 2.2. 動物

体重約 200 g、8 週齢の雄性 WKY ラットを日本チャールスリバー（株）より

購入して実験に使用した。WKY ラットを使用した理由は、WKY ラットは自己免疫反応性の素因を持ちこの系統でなければウサギ血清を用いた抗 GBM 腎炎を発症させることができないためである。飼育期間中は市販固形飼料及び水道水を自由摂取させた。24 時間の蓄積尿検体は代謝ケージで飼育することにより採取した。動物実験は、国際実験動物ケア評価認証協会（AAALAC International）の指針に準拠し、アステラス製薬（株）動物実験委員会の承認を得て実施した。

### 2.3. 病態モデル作製および群設定

ラットにウサギ抗 GBM 血清を 0.3 mL 静脈内投与することにより糸球体腎炎モデルを作製した。

予防的薬効評価では、16 匹のラットを溶媒コントロール群と薬物投与群に体重により 8 匹ずつに群分けした。抗 GBM 血清を投与しない別の 4 匹を正常群とした。pirfenidone は 100 mg/kg の用量を 1 日 3 回、2 週間経口投与した。溶媒コントロール群には 0.5 % メチルセルロース（SM-400; 信越化学）を 1 日 3 回、2 週間経口投与した。

治療的薬効評価では、抗 GBM 血清投与の 2 週間後に、12 匹のラットを溶媒コントロール群と薬物投与群に、体重および尿中タンパク排泄量（urinary protein-creatinine ratio; UPCR）により 6 匹ずつに群分けした。抗 GBM 血清を投与しない別の同じ週齢の 4 匹を正常群とした。pirfenidone は予防的評価と同じく 100 mg/kg を 1 日 3 回、2 週間経口投与した。溶媒コントロール群には 0.5 % メチルセルロース（SM-400; 信越化学）を 1 日 3 回、2 週間経口投与した。

### 2.4. 生化学的パラメーター測定と検体採取

尿中タンパク排泄量（urinary protein-creatinine ratio; UPCR）は microTP-AR2/PM（Wako Pure Chemical Industries）にて測定した。血清クレアチニン濃度（plasma creatinine; pCr）または血中尿素窒素（blood urea nitrogen; BUN）は Determina-L CRE または

Determina-L UN (Kyowa Medics) にて測定した。plasma chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2 あるいは MCP-1) は mouse/rat CCL2/JE/MCP-1 Quantikine ELISA kit (R&D Systems) で測定した。UPCR、pCr、BUN、クレアチニンクリアランス (creatinine clearance; Ccr) は薬物投与期間中に週 1 回測定した。収縮期血圧はテールカフ法 (BP-98; Softron) により予防的評価の 2 週間目と治療的評価の 4 週目に測定した。評価終了時にはラットをイソフルラン麻酔し腎臓を採取した。腎臓組織の一部分は 10%中性ホルマリンにて固定し病理組織学的評価に供した。残りの腎臓組織は皮質と髄質部分を分け、液体窒素で凍結し mRNA 測定や western blotting に供するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。

## 2.5. 病理組織学的評価

10%中性ホルマリンにて固定した腎臓はパラフィン包埋後に 3~4  $\mu\text{m}$  厚にスライスし、hematoxylin and eosin (HE) 染色、periodic acid-schiff (PAS) 染色、Azan 染色に供した。CD68 (ED-1) 免疫染色および WT-1 染色は、上記で作製したパラフィン包埋切片を使用し、10%の過酸化水素水で内因性のペルオキシダーゼを阻害した後、抗 ED-1 抗体または抗 WT-1 抗体で反応させ、ヘマトキシリンにて核染色を行なった。病理組織評価は盲検にて実施し、次のように格付けした。normal, score 0; minimal, score 1; mild, score 2; moderate, score 3; severe, score 4。Azan 染色の顕微鏡下の画像は DP72 (OLYMPUS) カメラで撮影しデータを取り込んだ。染色された範囲を解析ソフト MetaMorph (Molecular Devices) で解析した。

## 2.6. mRNA 定量

腎臓皮質部分から total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) にて採取した。mRNA 量の測定は TaqMan ABI9700 Sequence Detection System と Power SYBR Green (Applied Biosystems) を使用した定量的 PCR 法にて行なった。個々の遺伝子の発現は内因性コントロールとして  $\beta$ -actin 発現量にて補正した。定量的 PCR に用いた primer の配列を

以下に示す。

Nephrin	forward	5'-CCCAGGTACACAGAGCACAG-3'
	reverse	5'-CTTATGCTGACAACCTTCAG-3'
Podocin	forward	5'-TTCTTCTAAGCAGTCTAGCTCATGTGT-3'
	reverse	5'-GTGCCAAGAGGCGCTTCAT-3'
Podocalyxin	forward	5'-ATCGTCTGCATGGCATCCTT-3'
	reverse	5'-TGTGAGTCGTTGTTGGTCCTTC-3'
CCL2 (MCP-1)	forward	5'-ATGCAGTTAATGCCCCACTC-3'
	reverse	5'-TTCCTTATTGGGGTCAGCAC-3'
TNF- $\alpha$	forward	5'-GGATCTCAAAGACAACCAACTGG-3'
	reverse	5'-CTGGGAGTAGATAAGGTACAGCCC-3'
Interleukin-12 p40 (IL-12b)	forward	5'-CGTGGAGTCATAGGCTCTGGA-3'
	reverse	5'-TCTGTGGCAGGTGTATTGGC-3'

## 2.7. western blotting

腎臓皮質は氷冷した以下組成のバッファーにてホモジナイズした。137 mM NaCl、5 mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) , 1 mM ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA) , 20 mM Tris-Cl (pH 7.9)、1% Triton-X100、protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim)。得られた懸濁液は Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories) にて希釈し sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) に供し、セミドライ法にて polyvinyl difluoride membranes (PVDF) メンブレンに転写した。タンパク転写されたメンブレンは目的とする抗体で 4℃で一晩反応させたのち HRP 標識された二次抗体を結合した後、蛍光基質である Amersham ECL plus (GE Healthcare) で発色させた。得られたバンドは ImageJ ソフトウェア

(National Institutes of Health) にて画像解析を行なった。

## 2.8. 統計解析

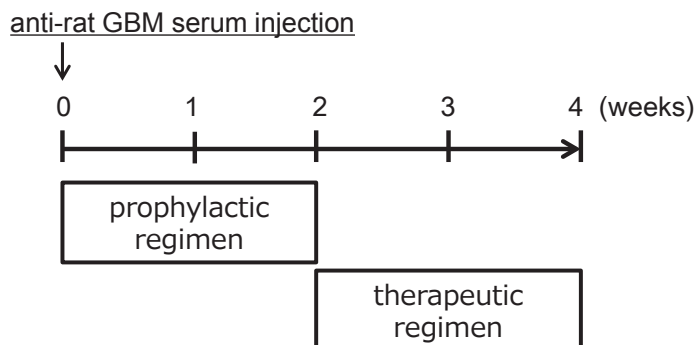
全ての値は平均値±標準誤差で表した。生化学的パラメーターの解析には Dunnett 検定による多重比較を行なった。病理組織の解析には Kruskal-Wallis 検定による多重比較を用いた。P 値が 5%以下の時に有意差ありとした。統計解析は GraphPad Prism 5 (MDF) を用いて解析した。

## 第3節 結果

### 3.1. 実験プロトコール

pirfenidone の抗 GBM 腎炎モデルでの腎保護作用を検討するにあたり 2 つの投薬計画を立てた (Figure 12)。予防的投与試験では、抗 GBM 血清を投与した直後から pirfenidone 投与を開始した。治療的投与試験では、抗 GBM 血清投与の 2 週間後から pirfenidone の投与を開始した。腎炎惹起後 2 週間のタイミングを選択した理由は、予備試験において病理や腎 mRNA 発現を経時的に解析したところ、炎症性の反応がピークであったためである。

**Figure 12.** 抗 GBM 腎炎モデル薬効評価プロトコール



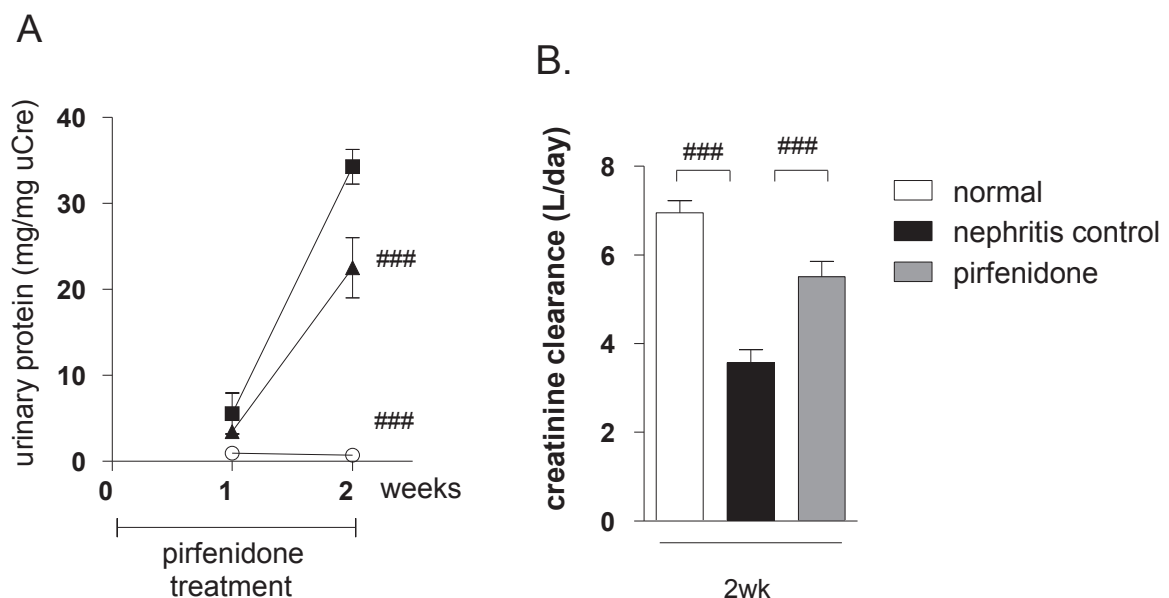
**Figure 12. Experimental protocols.** Pirfenidone treatment from immediately after antiserum injection until the second week (prophylactic regimen), or from the second week after

antiserum injection until the fourth week (therapeutic regimen).

### 3.2. 予防的投与によるタンパク尿および腎機能に対する作用

抗 GBM 腎炎惹起から 2 週間後には尿中タンパク排泄率 (UPCR) は正常動物群に比べて 30 倍以上に増加した ( $P<0.001$ )。pirfenidone の予防的投与は尿中タンパク排泄量の増加を有意に抑制し、その抑制率は約 35%であった ( $P<0.05$ , Figure 13)。腎機能パラメーターである pCr、BUN は糸球体腎炎を発症から 2 週間で上昇し、Ccr は低下した。これに対して pirfenidone 投与群はいずれのパラメーターも改善した (Figure 13, Table 2)。腎機能パラメーターと尿中タンパク排泄率には高い相関が認められた (pCr vs UPCR;  $R = 0.95$ ,  $P<0.001$ )。pirfenidone 投与は体重、収縮期血圧 (SBP) および尿量 (UV) には影響しなかった (Table 2)。以上のことから、pirfenidone の予防的投与は糸球体腎炎によるタンパク尿上昇および腎機能の低下を抑制することが判った。

**Figure 13.** 予防的投与試験における尿中タンパク排泄率 (UPCR、A) および Ccr (B)



**Figure 13.** Time course for urinary protein: creatinine ratio (UPCR) (A) and creatinine

**clearance (B).** (A) Urinary protein-creatinine ratio in normal rats (open circle, n=4), nephritis control rats (closed square, n=8) and nephritis pirfenidone-treated rats (closed triangle, n=8) in the prophylactic regimen. (B) Creatinine clearance at the second week in normal rats (white column, n=4), nephritis control rats (black column, n=8) and nephritis pirfenidone-treated rats (gray column, n=8). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M., ###  $P<0.001$  vs. nephritis control group.

**Table 2. Renal and systemic function at second week of prophylactic regimen**

group	n	BW (g)	SBP (mmHg)	UV (mL)	pCr (mg/dL)	Ccr (L/day)	BUN (mg/dL)
normal	4	265.5 $\pm$ 3.9	136.2 $\pm$ 4.7	15.4 $\pm$ 1.5	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	7.0 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	18.0 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
control	8	256.4 $\pm$ 2.2	137.1 $\pm$ 2.4	20.3 $\pm$ 1.2	0.33 $\pm$ 0.03	3.6 $\pm$ 0.30	28.5 $\pm$ 2.6
pirfenidone	8	259.3 $\pm$ 2.5	130.2 $\pm$ 3.3	17.4 $\pm$ 0.7	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	20.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>

BW, body weight; SBP, systolic blood pressure; UV, urinary volume; pCr, plasma creatinine; Ccr, creatinine clearance; BUN, blood urea nitrogen.

<sup>a</sup> or <sup>b</sup>:  $P<0.01$  or  $0.001$  vs. control by Dunnett's test

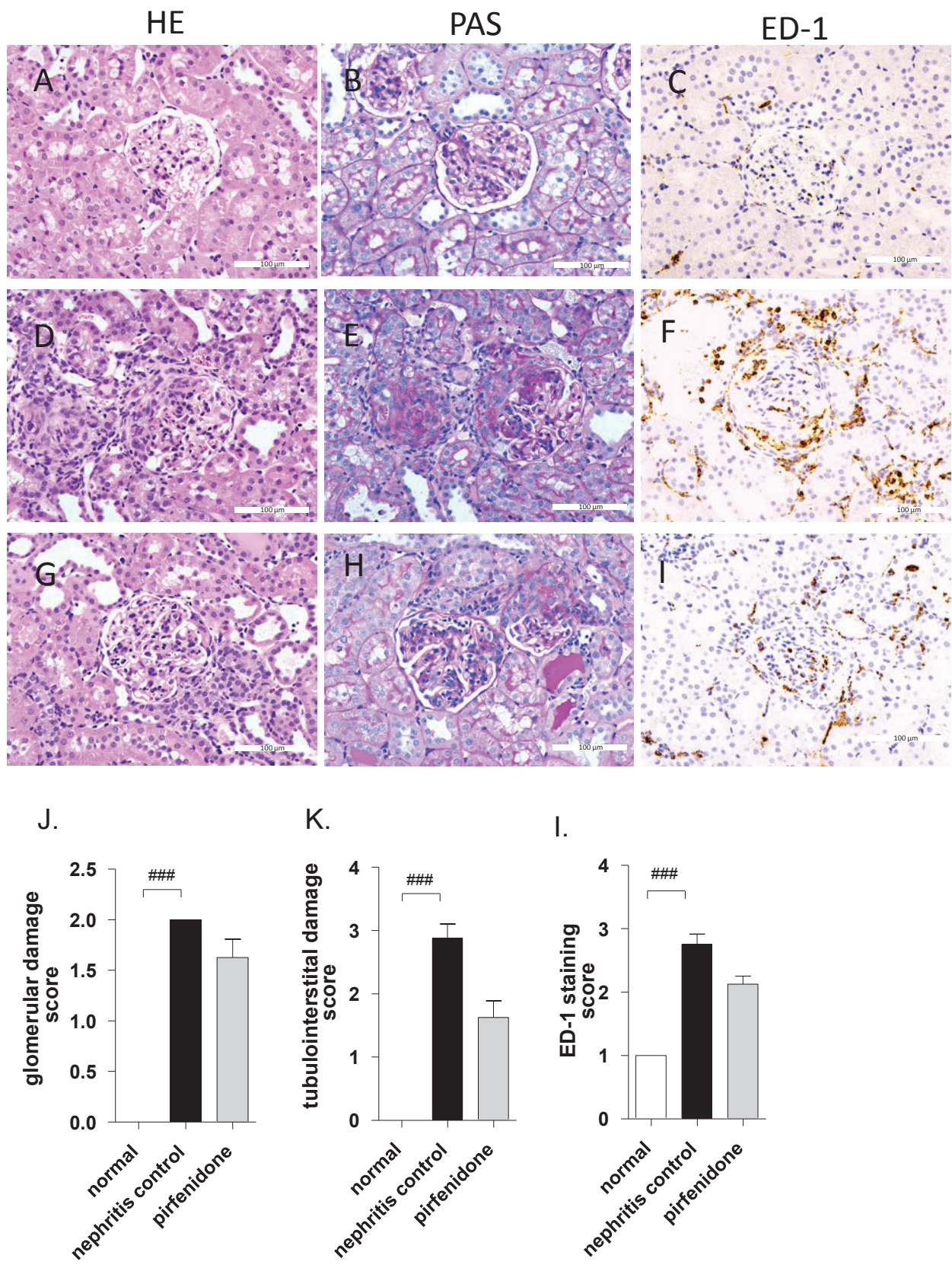
Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean.

### 3.3. 予防的投与試験の病理組織学的検討

pirfenidoneによる腎保護効果を組織学的に確認するために腎臓切片のHE、PAS、ED-1染色を行ない、組織学的変化をスコアリングした (Figure 14)。その結果、腎炎コントロール群の糸球体係蹄壁の構造は壊れ、糸球体への炎症性細胞の浸潤が観察された。糸球体には細胞性の半月体を形成しているものも存在した。尿細管は変性し尿細管内腔は肥大していた。炎症性細胞の浸潤は尿細管周囲間質にも観察された。この

病理変化に対して pirfenidone は糸球体の変性や尿細管の変性、また炎症細胞の浸潤を抑制し、組織学的なスコアも改善傾向であった。以上のことから、病理組織学的な解析からも pirfenidone は抗 GBM 腎炎モデルにおける糸球体障害と尿細管障害の進展を抑制することが判った。

**Figure 14.** 予防的投与試験での病理組織評価

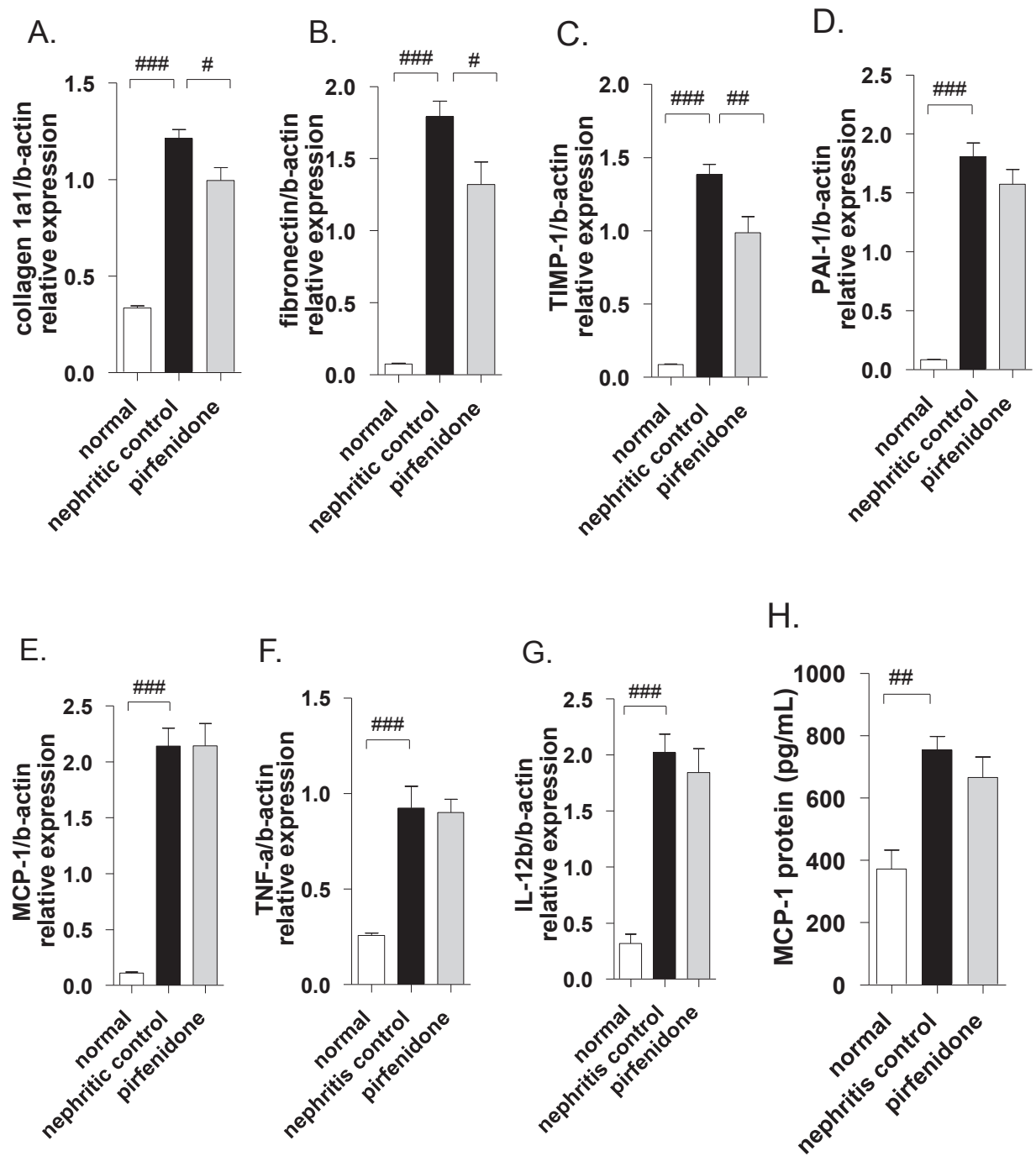


**Figure 14. Representative light micrographs of renal tissues obtained from normal rats (A-C), nephritis control rats (D-F) and pirfenidone-treated rats (G-I) 2 weeks after antiserum injection in the prophylactic regimen.** (A), (D), and (G) are representative of the hematoxylin and eosin staining results. (B), (E), and (H) are representative of the PAS staining results obtained in this study. (C), (F), and (I) are representative of ED-1 immunostaining results. Scale size: 100  $\mu$ m. (J) Glomerular injury or (K) tubulointerstitial disorder was assessed by semi-quantitative grading using HE and PAS staining results. Grades are as follows: 1, none; 2, mild; 3, moderate; or 4, severe change. (L) Infiltration of ED-1-positive-staining cells into glomeruli or tubular interstitium was assessed by semi-quantitative grading using ED-1 immunostaining results. Grades are as follows: 1, none; 2, mild; 3, moderate; or 4, severe infiltration. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M., normal n=4, nephritis control n=8, pirfenidone n=8, ####  $P<0.001$  by Kruskal-Wallis test.

#### 3.4. 予防的投与試験における線維化および炎症性因子の発現

予防的投与試験での腎 mRNA 発現を評価した。抗 GBM 腎炎により細胞外マトリックス (type 1 collagen, fibronectin) および線維化促進因子 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, PAI-1 は顕著に発現上昇した。これに対して pirfenidone は抑制作用を示した(Figure 15A-D)。一方で MCP-1、TNF- $\alpha$ 、または IL-12b の炎症性因子の発現上昇に対して pirfenidone は抑制作用を示さなかった (Figure 15E-G)。同じく血中 MCP-1 レベルに対しても pirfenidone の抑制作用は明確ではなかった (Figure 15H)。このように pirfenidone は線維化関連因子の発現増加を抑制する一方で、炎症性因子の発現に対しての作用は明確ではなかった。

**Figure 15** 予防的投与試験における腎 mRNA の発現



**Figure 15. Regulatory effects of pirfenidone on renal cortical mRNA expression or serum MCP-1 levels in the prophylactic regimen.** mRNA expression at the second week of (A) collagen 1a1, (B) fibronectin, (C) TIMP-1, (D) PAI-1 (E) MCP-1, (F) TNF- $\alpha$  or (G) IL-12b, was assessed via qualitative PCR.  $\beta$ -actin levels were used as a reference. (H) The

concentration of serum MCP-1 in the second week as determined by ELISA. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M., normal n=4, nephritis control n=8, pirfenidone n=8. ## or ### is  $P<0.01$  or  $0.001$  by Dunnett's t-test..

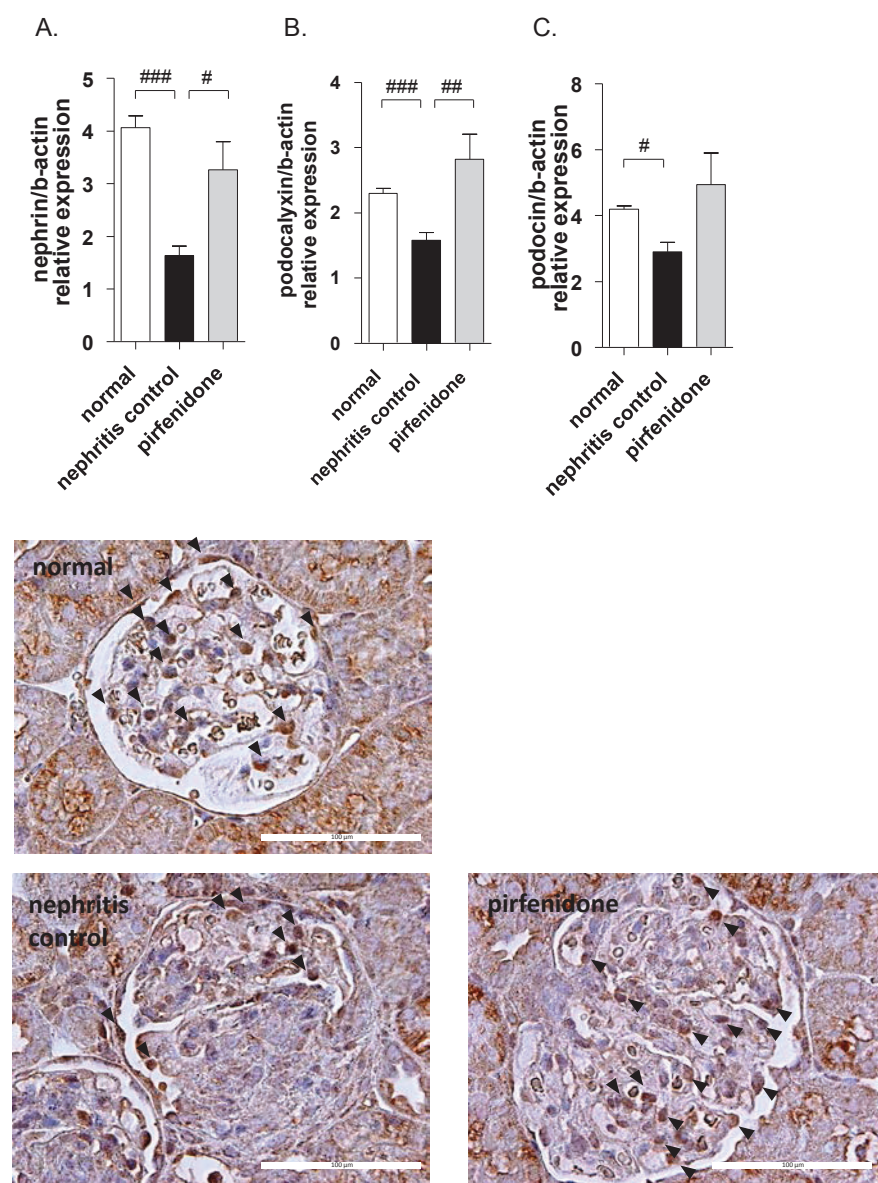
### 3.5. 予防的投与によるポドサイト発現因子に対する作用

抗 GBM 腎炎では糸球体基底膜の障害とともにポドサイト障害が病態に関与している(Thorner et al., 2008)。pirfenidone の投与でタンパク尿が抑制されたことから、ポドサイトに発現している nephrin、podocin および podocalyxin の mRNA 発現量を測定した。その結果これら因子の発現は腎炎コントロール群で低下しており pirfenidone 投与群ではその発現が正常レベルにまで維持されていた (Figure 16A-C)。

pirfenidone によるポドサイト保護作用は WT-1 免疫染色においても確認された (Figure 16D)。WT-1 陽性細胞は正常の腎臓ではポドサイトとボウマン囊上皮細胞の核に認められた。それに対して腎炎コントロール群の障害を受けた糸球体では WT-1 陽性細胞は検出されなかった。このように障害部位ではポドサイトやボウマン囊上皮細胞が変性または消失したか、WT-1 発現が低下したと考えられた。これに対して pirfenidone 投与群では WT-1 発現が維持されている糸球体が多く、HE や Azan 染色の病理像と一致した。

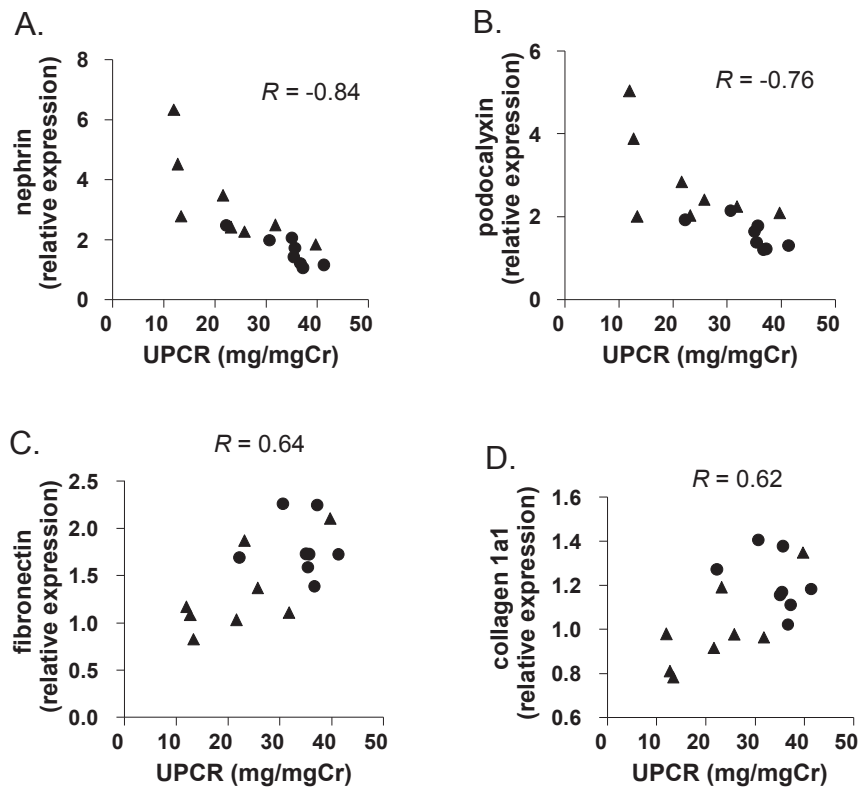
さらに、糸球体スリット膜を形成する nephrin の mRNA 発現量は尿中タンパク排泄量と高度に逆相関していたことから (Figure.17A  $R=-0.84$ ,  $P<0.001$ ,  $R^2=0.70$ )、ポドサイト障害はタンパク尿増加に関係していることが示された。fibronectin や collagen もタンパク尿との相関関係が認められた(Figure. 17C,D)。pirfenidone による nephrin や podocin の発現維持はタンパク質レベルでも確認された (Figure. 18)。以上のことより pirfenidone のタンパク尿抑制はポドサイト保護と深く関係することが示された。

**Figure 16.** ポドサイト関連因子の発現解析



**Figure 16. Regulatory effects of pirfenidone on expression of podocyte-related molecules in the prophylactic regimen.** mRNA expression at the second week of (A) nephrin, (B) podocalyxin, or (C) podocin was assessed via qualitative PCR. β-actin levels were used as a reference. Values are expressed as the mean ± S.E.M., normal n=4, nephritis control n=8, pirfenidone n=8. #, ## or ### is  $P < 0.05$ , 0.01 or 0.001 by Dunnett's test vs control. Immunohistological staining against WT-1 is shown in (D). Arrowheads indicate the positivity for WT-1 expression. Scale size: 100 μm.

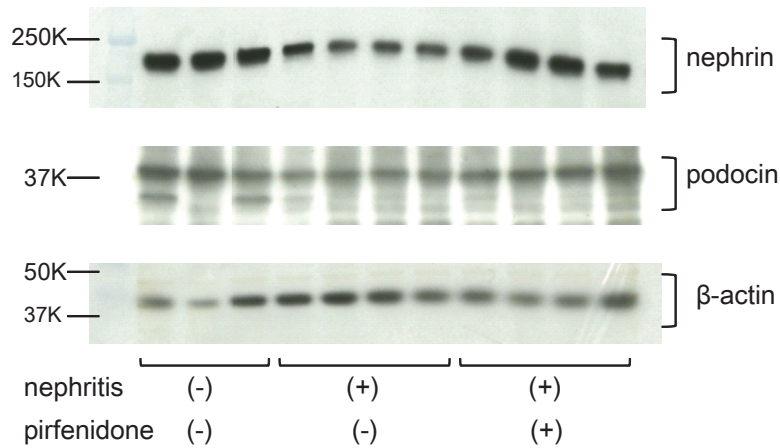
**Figure 17.** ポドサイト関連因子または細胞外マトリックス関連因子とタンパク尿との相関



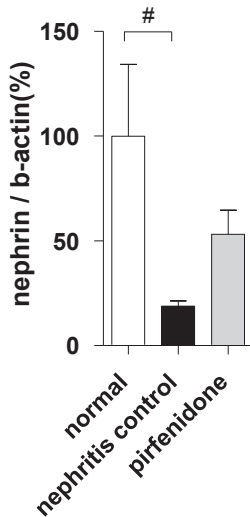
**Figure 17.** Correlation between urine protein: creatinine ratio (UPCR) and mRNA expression of (A) nephrin, (B) podocalyxin, (C) fibronectin, or (D) collagen 1a1 in the prophylactic regimen. Values of UPCR were adopted at the second week, and mRNA values used are from Figure 16 in both nephritis control (closed circles, n=8) and pirfenidone-treated (closed triangles, n=8) rats. Each symbol represents the value for individual rats. Correlation coefficient was analyzed using Pearson's product-moment correlation coefficient.

**Figure 18.** 腎皮質での nephrin および podocin の発現

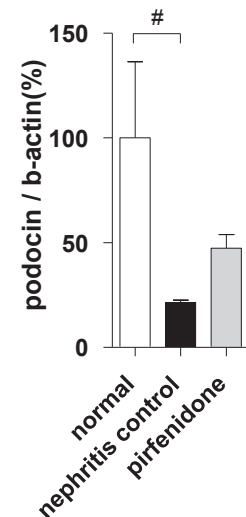
A.



B.



C.

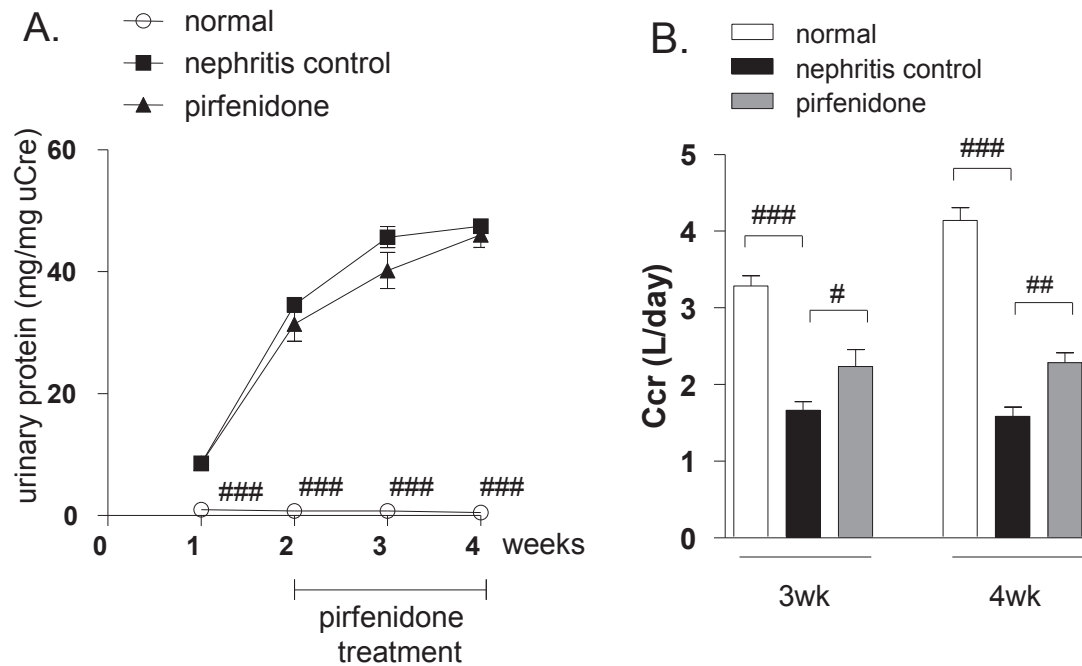


**Figure 18. Effect of pirfenidone on nephrin or podocin expression in the prophylactic regimen.** (A) Aliquots of renal cortex lysate in normal, nephritis control, or nephritis pirfenidone-treated rats were subjected to western blot analysis.  $\beta$ -actin levels were used as a reference. Bands for nephrin, podocin, or  $\beta$ -actin were quantified using ImageJ gel-densitometry analyzer, and the mean  $\pm$  S.E.M. values for (B) nephrin or (C) podocin are expressed relative to  $\beta$ -actin. normal  $n=3$ , nephritis control  $n=4$ , pirfenidone  $n=4$ . #:  $P<0.05$  by Dunnett's test vs nephritis control.

### 3.6. 治療的投与によるタンパク尿および腎機能に対する作用

pirfenidone の治療的効果は腎炎発症の 2 週間目から 4 週間目まで化合物を投与して検証した (Figure 12)。2 週間目から 4 週間目にかけて腎炎コントロール群の尿中タンパク排泄率 (UPCR) は 34.6 から 47.4 mg/mg に増加した ( $P<0.001$ )。これに対して pirfenidone 投与群は UPCR を抑制しなかった (Figure 19A)。治療的投与開始の時点ではすでに腎機能は低下しているが、4 週間目にかけてさらに腎機能は低下した。これに対して pirfenidone 投与群は腎機能低下を有意に抑制した (Figure 19B、Table 3)。pirfenidone 投与群の腎機能パラメーターと UPCR の間には相関関係は認められなかった (pCr vs. proteinuria;  $R=0.01$ ,  $P=0.98$ )。pirfenidone 投与は体重や収縮期血圧、尿量には影響しなかった。以上のように、pirfenidone の治療的投与は腎機能低下を抑制したが、タンパク尿の抑制作用は認められなかった。

**Figure 19.** 治療的投与による尿中タンパク排泄量（UPCR）と Ccr の変動



**Figure 19. Time course for urinary protein: creatinine ratio (UPCR) (A) and creatinine clearance (B).** (A) Time course for urinary protein: creatinine ratio in normal rats (open circle, n=6), nephritis control rats (closed square, n=6), and nephritis pirfenidone-treated rats (closed triangle, n=6) in the therapeutic regimen. (B) Creatinine clearance at the third or fourth week in normal rats (white column, n=6), nephritis control rats (black column, n=6), and nephritis pirfenidone-treated rats (gray column, n=6). Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M., #, ## or ###  $P < 0.001$  vs. control group by Dunnett's test.

**Table 3. Renal and systemic function at fourth week of therapeutic regimen**

group	n	BW (g)	SBP (mmHg)	UV (mL)	pCr (mg/dL)	Ccr (L/day)	BUN (mg/dL)
normal	6	283.0±3.6	139.8±6.8	18.6±0.7	0.23±0.01 <sup>c</sup>	4.1±0.16 <sup>c</sup>	19.2±0.8 <sup>c</sup>
control	6	258.3±5.6 <sup>a</sup>	138.4±5.0	23.7±1.0	0.51±0.03	1.6±0.12	43.7±2.3
pirfenidone	6	261.2±5.8	146.5±5.9	27.0±3.1	0.36±0.02 <sup>c</sup>	2.3±0.13 <sup>b</sup>	37.7±2.8 <sup>a</sup>

BW, body weight; SBP, systolic blood pressure; UV, urinary volume; pCr, plasma creatinine; Ccr, creatinine clearance; BUN, blood urea nitrogen.

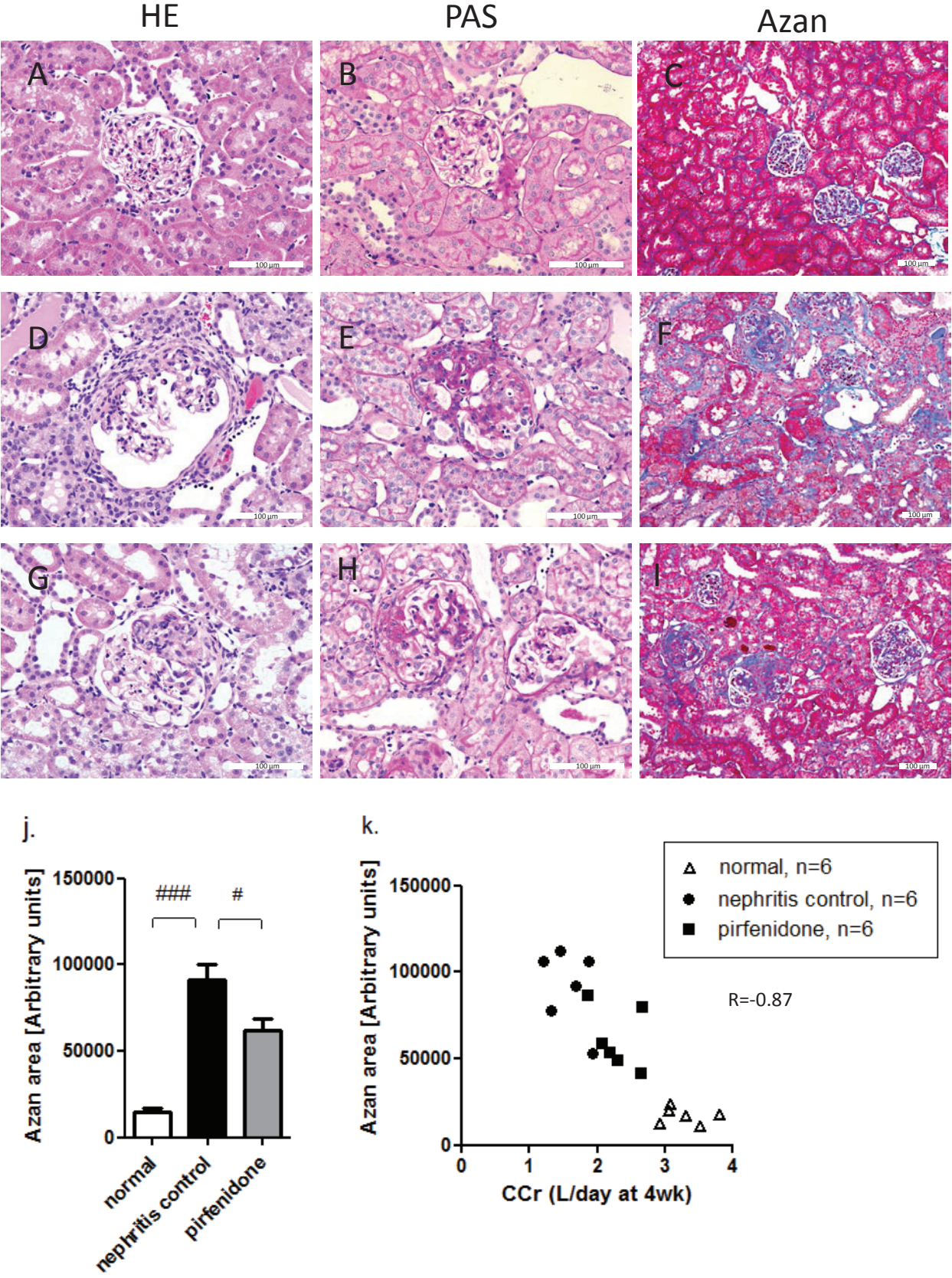
<sup>a</sup>, <sup>b</sup> or <sup>c</sup>  $P < 0.05$ , 0.01 or 0.001 vs. control by Dunnett's t-test

Results are expressed as mean ± standard error of mean.

### 3.7. 治療的投与試験の病理組織学的検討

pirfenidone の治療的投与について HE、PAS および Azan 染色による病理組織学的評価を行なった (Figure 20)。評価終了の 4 週間目の時点での腎炎コントロール群の糸球体変性は 2 週間目に比べて進行し全域にわたり糸球体硬化が認められた。細胞外マトリックスの蓄積は肥大化したボウマン嚢周辺や尿細管間質に認められた。このような変化に対して、pirfenidone 群は糸球体や尿細管の変性を改善する傾向が認められた。Azan 染色の線維化領域の広さを画像解析したところ、pirfenidone 投与群では線維化染色領域が小さく、糸球体硬化を含む線維化が抑制された ( $P < 0.001$ , Figure 20j)。さらに、腎機能パラメーター (Ccr) とのつながりを確認したところ相関関係が認められた (Figure 20k,  $R = -0.87$ )。以上のことより、治療的な処置においても pirfenidone の線維化抑制が病理組織学的に示され、腎機能抑制との関連性が示唆された。

**Figure 20.** 治療的投与試験での腎臓病理組織



**Figure 20. Representative light micrographs of renal tissues obtained from normal rats (a, b, and c), nephritis control rats (d, e, and f), and pirfenidone-treated rats (g, h, and i) 4 weeks after antiserum injection in the therapeutic regimen.** (a), (d), and (g) are representative of the hematoxylin and eosin staining results obtained in this study. (b), (e), and (h) are representative of the PAS staining results obtained in this study. (c), (f), and (i) are representative of Azan staining results obtained in this study. Scale size: 100  $\mu$ m. The renal fibrotic area was assessed using Azan staining, measured using the MetaMorph image analyzer, and depicted in the (j) column graph. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M., normal n=6, nephritis control n=6, pirdfenidone n=6. # or ###;  $P<0.05$  or 0.001 by Dunnett's test. (k) Correlation between Azan staining area and the values of Ccr at 4 weeks. Correlation coefficient was analyzed using Pearson's product-moment correlation coefficient.

#### **第4節 考察**

本章ではヒト進行性糸球体腎炎を外挿するモデルであるラット抗 GBM 腎炎モデルに対する pirfenidone の有効性を検証した。その結果 pirfenidone は予防的投与ではタンパク尿増加および腎機能低下を抑制した。タンパク尿抑制作用にはポドサイト障害の軽減が示唆された。一方で治療的な pirfenidone 投与ではタンパク尿は抑制せず腎機能低下を抑制した。そして線維化と腎機能低下に相関関係が認められた。以上のことから、pirfenidone は予防的にも治療的にも腎機能低下を抑制するが、タンパク尿は予防的にしか抑制しないことが判明した。

抗 GBM 腎炎モデルは糸球体基底膜に対する抗体が糸球体に沈着し、補体を活性化することが引き金となり組織障害を引き起こす。ポドサイトやボウマン嚢上皮の障害に引き続いて糸球体内外に細胞外マトリックスが蓄積し、持続的なタンパク尿増加が起きる。このような病態に対して pirfenidone は予防的にはタンパク尿の増加を抑制した。腎臓での mRNA 発現解析では炎症性サイトカインの増加には影響せず細胞外

マトリックス産生に関連する因子の発現を低下させていたことから、線維化に関連する因子の産生抑制が、糸球体障害の軽減に関係したと考えられる。これに加えて、ポドサイトのスリット膜形成に関与する **nephrin** や **podocin** の発現低下を抑制していたことから、**pirfenidone** は線維化による組織障害を抑制することで間接的にポドサイトスリット膜の構造的変化を軽減したのではないかと考えられた。特にタンパク尿レベルと **nephrin** mRNA の高い相関関係を示したことからこのような機序が推測された。しかしスリット膜構造の保護を検証するためには電子顕微鏡を用いた直接的な観察が必要であり、結論を得るためにはさらに詳細な検討が必要と考えられた。

これに対し治療的投与では **pirfenidone** はタンパク尿を抑制せず腎機能低下を抑制した。タンパク尿を抑制しなかった原因として、発症から2週間目においてはすでに糸球体の構造は破たんしており、線維化抑制による組織障害保護ではこの時点からでは効果が得られない可能性が考えられた。確かに予防的試験では0週間目から2週間目にかけてタンパク尿は10倍以上増加したが、治療的試験の2週間目から4週間目における増加は約2倍であった。**pirfenidone** はタンパク尿を抑制せず腎機能低下を抑制したことから、糸球体以外の組織障害に対する保護効果が推測された。間質への細胞外マトリックスの蓄積は腎臓の正常な構造を破壊し、尿細管での再吸収や分泌あるいは代謝機能に悪影響を及ぼすことが知られている (Okada et al., 1996; Eddy, 2000; Nangaku et al., 2008)。Azan 染色像において糸球体周囲あるいは尿細管周囲の線維化が **pirfenidone** により軽減されていたことから、尿細管周囲の組織障害の軽減が腎機能低下抑制につながったと考えられた。Azan 染色像と腎機能パラメーターとの高い相関関係からこのことが示唆された。本モデルではRAS系阻害薬は治療的処置では無効であり、また臨床においてネフローゼや急速進行性糸球体腎炎治療に用いられている免疫抑制剤である **cyclosporin A** や **cyclophosphamide** も治療的投与では無効である (未発表データ)。このことから本モデルにおいて治療的効果を発揮する線維化抑制薬は臨床においても治療効果が期待される。

以上のことより、pirfenidone は糸球体過剰濾過を原因とする病態に加えて炎症を主体とした原因のモデルにおいても治療的効果を発揮することから、降圧効果のない CKD 治療薬の創出の妥当性が高まった。一方、課題としてタンパク尿を抑制する効果は限定的であるので、タンパク尿に代わる薬効指標（バイオマーカー）の設定が必要と考えられた。

## 第4章

### ラット近位尿細管上皮細胞からの線維化関連因子の発現に対する

#### pirfenidone の作用の検討

##### 第1節 はじめに

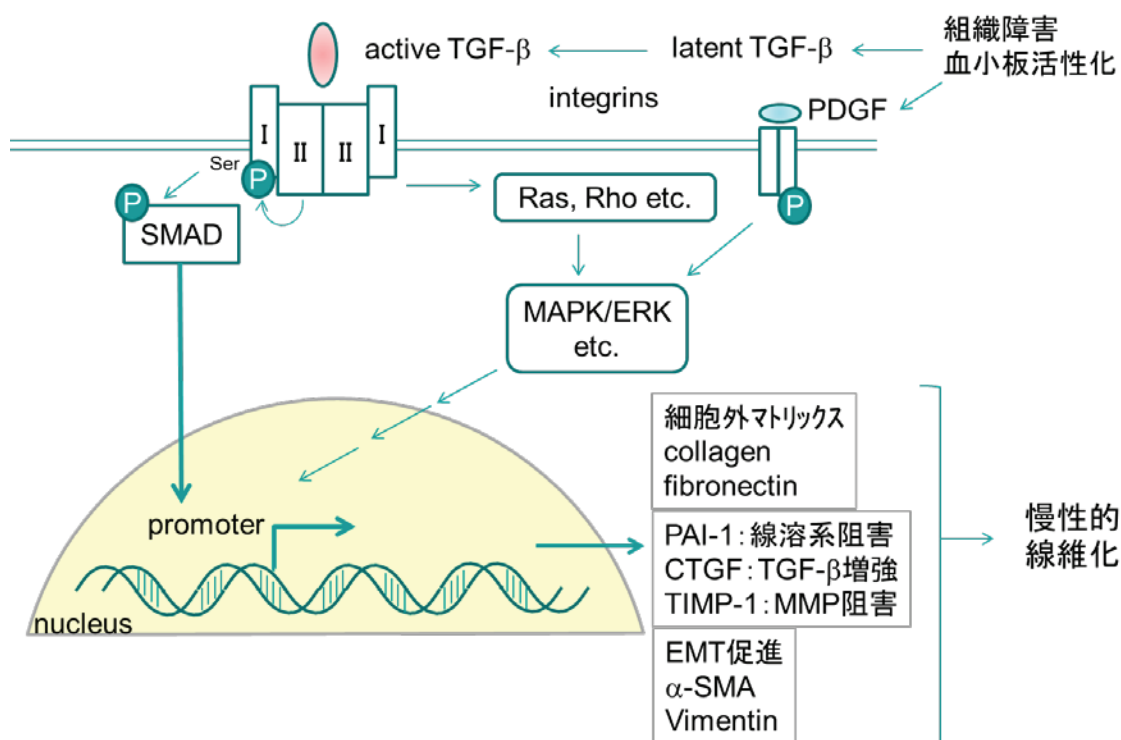
5/6 腎摘モデルおよび抗 GBM 腎炎モデルでの有効性検証の結果、pirfenidone は両モデルにおいて腎線維化を抑制し腎機能低下を抑制することが判った。このことから抗線維化作用による CKD 治療薬の創出の妥当性が示された。本章では抗線維化ツールとして使用した pirfenidone の近位尿細管上皮細胞での抗線維化作用の確認し、*in vivo* モデルの結果と合わせて考察を行なった。

抗 GBM 腎炎モデルでは、pirfenidone の治療的効果はタンパク尿とは無関係に認められたことから、線維化と腎機能低下の関係は糸球体よりもむしろ尿細管側の障害にあることが推測された。尿細管間質を構成する細胞への pirfenidone の検討としてはラット腎臓由来の線維芽細胞での作用が報告されている (Hewitson et al., 2001)。これによると pirfenidone は血清刺激による細胞増殖を抑制し、 $\alpha$ -SMA および connective tissue growth factor (CTGF) の発現を抑制すると報告されている。一方で尿細管上皮細胞に対する pirfenidone の研究は報告されていない。尿細管は腎障害時には肥厚・変性・脱落・管腔内拡張の所見が認められ、炎症細胞浸潤や細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) の蓄積に重要であることが指摘されている (Liu, 2011)。特に、近位尿細管上皮細胞は糸球体の直下に存在し、生体維持に必要な酸/塩基、グルコース、リン/カルシウムなどの再吸収やホルモン代謝に関与し、腎機能に重要な役割を果たしている。このことから近位尿細管上皮細胞を検証に用いることとした。

今日の理解では transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は、ECM 産生を促進させ腎線維化に中心的な役割を果たしていると考えられている (Sharma and Ziyadeh, 1994; Gagliardini and Benigni, 2007)。ECM 産生以外にも、TGF- $\beta$ は線維化促進因子であ

る plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)、CTGF、tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP) などの産生を増加させる (Mar and Fogo, 2009; Eddy, 2009)。さらには TGF- $\beta$  は尿細管上皮細胞が間質細胞様に変化する上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) に関与している (Fan et al., 1999; Burns et al., 2007; Liu 2010)。このように TGF- $\beta$  は腎線維化進展に重要な役割を果たしている (Figure 20)。TGF- $\beta$  には 1、2、3 の 3 種類の isoform が知られているが、なかでも TGF- $\beta$ 1 は炎症、線維化、癌などともなって発現誘導され、腎臓での尿細管周囲の間質線維化において鍵となる因子とされている (Fan et al., 1999; Burns et al., 2007; Liu, 2010)。したがって近位尿細管上皮細胞への刺激因子としては TGF- $\beta$ 1 を用いることとした。

**Figure 21.** TGF- $\beta$  シグナルによる線維化促進



TGF- $\beta$ に加えて platelet derived growth factor (PDGF)も細胞増殖や ECM 産生作用を有し腎線維化への関与が報告されている (Floege et al., 2008; Ostendorf et al., 2001)。特に PDGF-B と PDGF-D はメサンギウム増殖性の変化や糸球体硬化の進展に関与して

いることが示されている (Ostendorf et al., 2011)。加えて PDGF-B は TGF- $\beta$  に相乗的に作用し腎上皮細胞の EMT を誘導するとされている (Yamate, 2005)。このようなことから PDGF-B を刺激因子として用いる検討を追加した。

pirfenidone の作用機序は ECM 産生および ECM 産生促進の成長因子の産生阻害作用を含む複合的な作用 (ピレスパ錠®添付文書、Osman et al., 2006、Nakazato et al., 2002)) とされている。このことから本検討では、細胞外マトリックス (collagen 1 $\alpha$ 1 や fibronectin) および線維化を促進する因子 (PAI-1 および CTGF)、さらには腎線維化において尿細管の変性マーカーとして使用されている  $\alpha$ -SMA および vimentin (Jinde et al., 2001; Rastaldi et al., 2002) の発現変動を解析した。

## 第 2 節 実験方法

### 2.1. 試薬

pirfenidone はアステラス製薬株式会社で合成された。ラット由来近位尿細管上皮細胞である NRK-52E は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。組み換えヒト TGF- $\beta$ 1 および PDGF-BB は R&D Systems 社から購入した。抗  $\alpha$ -SMA 抗体は DAKO 社より、抗 Fibronectin 抗体は CHEMICON 社より購入した。horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体は Medical & Biological Laboratories 社から購入した。

### 2.2. 細胞培養

NRK-52E 細胞は 5% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で 5% CO<sub>2</sub>、37°C で維持培養した。アッセイ時には 12well plate で semiconfluent になった細胞を 0.5% FBS を含む DMEM で 24 時間培養し、その後 TGF- $\beta$  (3 ng/mL) または PDGF-BB (5 ng/mL) 存在下で 24 時間培養し、mRNA の定量に使用した。培養上清のタンパク質の検出には 48 時間培養のサンプルを使用した。fibronectin、および  $\alpha$ -SMA の検出には 72 時間培養のサンプルを使用した。被験薬物の

評価には TGF- $\beta$ 1 および PDGF-BB 添加の 30 分前に pirfenidone を添加した。評価サンプルは $-80^{\circ}\text{C}$ で保存され、mRNA 定量、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、および western blotting に供した。

### 2.3. mRNA の定量

12well plate で培養した培養細胞は培養上清を除いた後 QIAGEN 社の RNeasy mini kit にて RNA を抽出した。その後 Applied Biosystems 社の High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit で相補的 DNA に逆転写した。定量的 PCR は各因子特異的プライマーと Applied Biosystems 社の Power SYBR Green PCR master mix を使用して Applied Biosystems 社の TaqMan ABI 7900 で実施した。各遺伝子の発現量は $\beta$ -actin をコントロールとして補正した。primer 配列を以下に示す。

plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1)	forward	5'-GACAATGGAAGAGCAACATG-3'
	reverse	5'-ACCTCGATCTTGACCTTTTG-3'
connective tissue growth factor (CTGF)	forward	5'-TCTTCGGTGGGTCCGTGT-3'
	reverse	5'-TGGTATTTGCAACTGCTTTGGA-3'
fibronectin	forward	5'-CATGGCTTTAGGCGAACCAC-3'
	reverse	5'-ATCTACATTCGGCAGGTATGGTC-3'
type I collagen $\alpha$ 1	forward	5'-CAACAATTCCTGGCGTTACCTT-3'
	reverse	5'-AAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT-3'
$\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)	forward	5'-CGACATGGAAAAGATCTGGC-3'
	reverse	5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCG-3'
vimentin	forward	5'-GGGCGACCTCTACGAGGAG-3'
	reverse	5'-TGTCATTGGTGAGCTGATCCA-3'
$\beta$ -actin	forward	5'-TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA-3',

	reverse	5'-CATCGTACTCCTGCTTGCTGATC-3'
--	---------	-------------------------------

#### 2.4. 培養上清中の PAI-1 タンパク測定

培養上清中の PAI-1 量は Molecular Innovations 社の rat PAI-1total antigen ELISA kit を用いて添付文書に従って測定した。

#### 2.5. western blotting

12well plate で培養した NRK-52E の上清を除き phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後、氷冷した以下の組成の lysis buffer で細胞を溶解した (137 mM NaCl, 5 mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), 1 mM ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA), 20 mM Tris-Cl (pH 7.9), 1% Triton-X100, protease inhibitor cocktail (Boeringer Mannheim))。溶解した細胞は Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories) で希釈し sodium dodesyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 電気泳動に供し、polyvinyl difluoride membranes (PVDF).膜に転写した。その後各一次抗体および HRP 標識二次抗体で反応させた後 Amersham ECL plus (GE healthcare) を基質としてバンドを検出した。結果は ImageJ ソフトにより解析を行なった。

#### 2.6. 統計解析

全ての値は平均値±標準誤差で表した。有意差検定には Dunnett 検定による多重比較を行なった。*P* 値が 5%以下の時に有意差ありとした。統計解析は GraphPad Prism 5 (MDF) を用いて解析した。

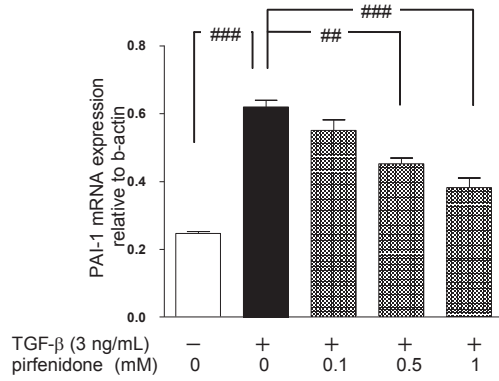
### 第3節 結果

#### 3.1. TGF- $\beta$ 1 刺激による線維化関連因子発現に対する pirfenidone の作用

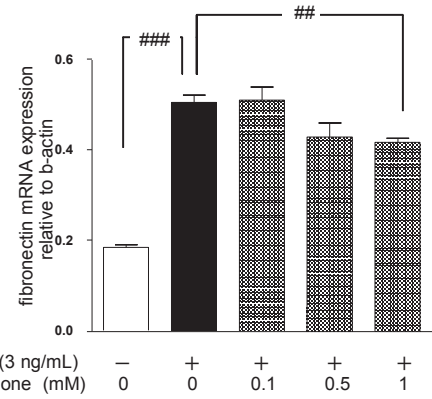
予備検討として 0.1、0.3、1、3、10 ng/mL の濃度の TGF- $\beta$ 1 刺激による NRK-52E 細胞からの線維化関連因子の mRNA 発現を測定した。その結果 0.3 ng/mL から PAI-1、type 1 collagen、fibronectin、CTGF の発現が上昇し 3 ng/mL で最大活性に達した (data not shown)。したがって以降の検討には 3 ng/mL の TGF- $\beta$ 1 を使用した。TGF- $\beta$ 1 による刺激に対して 0.1~1 mM の pirfenidone は濃度依存的に PAI-1、type 1 collagen、fibronectin、CTGF の発現を抑制した (Figure 22A-D)。PAI-1 の抑制が最も明確であったが完全阻害には至らなかった (1 mM で 62%阻害)。pirfenidone による PAI-1 産生阻害はタンパク質レベルでも確認された (Figure 23; 1 mM で 44%抑制)。TGF- $\beta$ 1 刺激により  $\alpha$ -SMA や vimentin も発現上昇した。この発現上昇を pirfenidone は抑制しなかった (Figure 22. E, F)。fibronectin および  $\alpha$ -SMA についてタンパクレベルでも pirfenidone の作用を確認したところ、TGF- $\beta$ 1 による fibronectin と  $\alpha$ -SMA の発現上昇に対して、pirfenidone は fibronectin 発現を濃度依存的に抑制したが、 $\alpha$ -SMA 発現は抑制しなかった (Figure 24)。このように pirfenidone は TGF- $\beta$ 1 による PAI-1、fibronectin、type 1 collagen、CTGF の発現上昇を抑制したが、 $\alpha$ -SMA や vimentin の発現は抑制しなかった。

**Figure 22.** TGF- $\beta$ 1 刺激による mRNA 発現に対する pirfenidone の作用

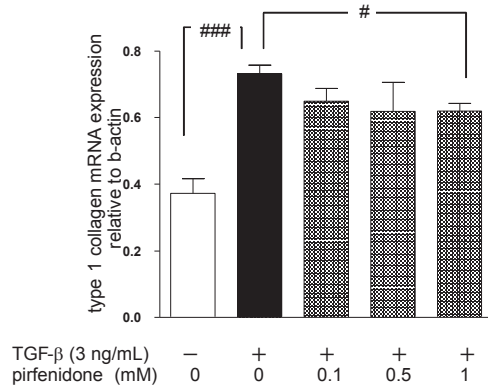
**A. PAI-1**



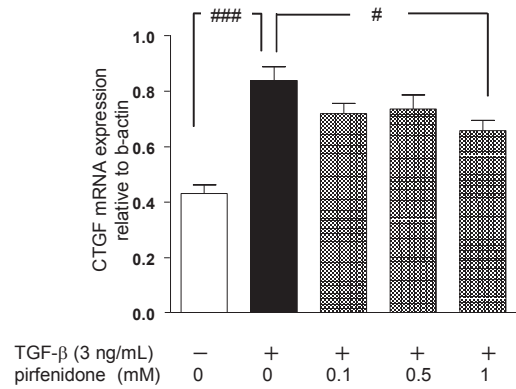
**B. fibronectin**



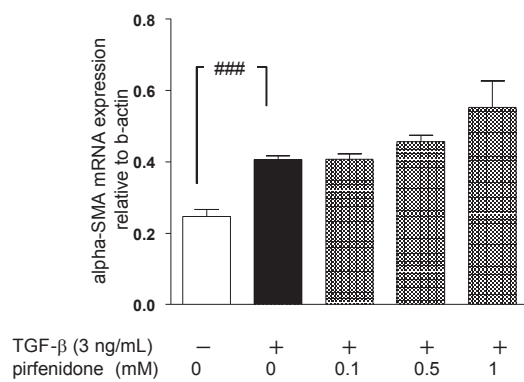
**C. typeI collagen**



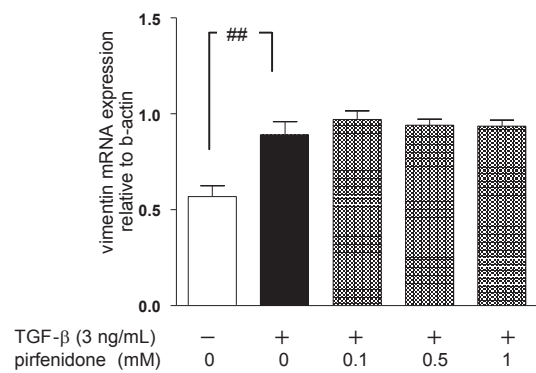
**D. CTGF**



**E.  $\alpha$ -SMA**

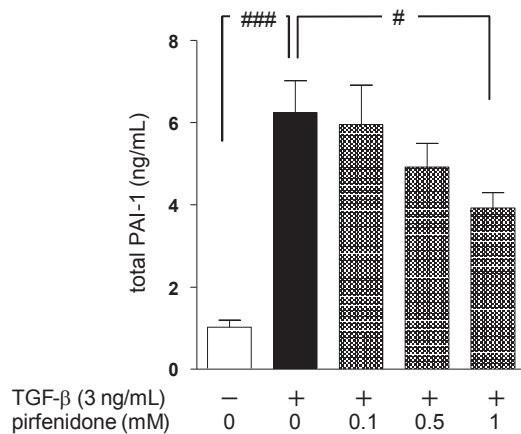


**F. vimentin**



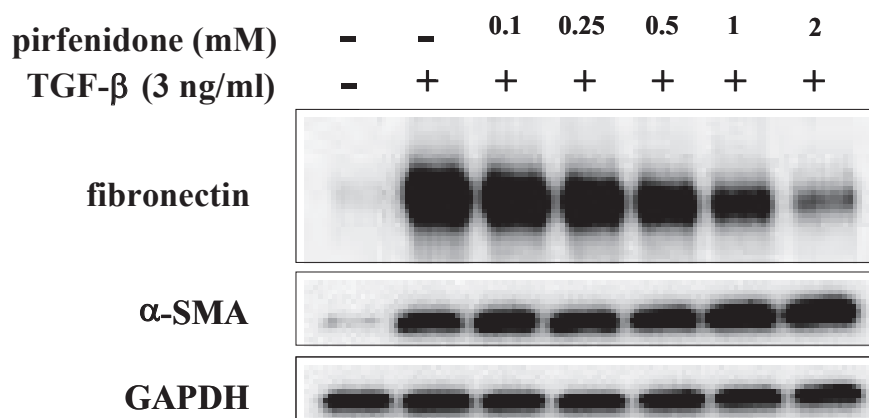
**Figure 22** Effect of pirfenidone on TGF- $\beta$ 1-induced mRNA expression of PAI-1(A), fibronectin(B), type I collagen  $\alpha$ 1(C), CTGF(D),  $\alpha$ -SMA(E), and vimentin(F) in NRK-52E cells. Cells were treated with TGF- $\beta$ 1 (3 ng/mL) for 24 h with or without pirfenidone (0.1-1 mM). Values are mean  $\pm$  standard error of four independent experiments (n=4). ## or ###;  $P < 0.01$  or 0.001 vs. TGF- $\beta$ 1-treated group.

**Figure 23.** TGF- $\beta$ 1 刺激による PAI-1 タンパク産生に対する pirfenidone の作用



**Figure 23.** Effect of pirfenidone on TGF- $\beta$ 1-induced PAI-1 production in NRK-52E cells. Cells were treated with TGF- $\beta$ 1 (3 ng/mL) for 48 h with or without pirfenidone (0.1-1 mM). Values are mean  $\pm$  standard error of four independent experiments (n=4). # or ###;  $P < 0.05$  or 0.001 vs. TGF- $\beta$ 1-treated group.

**Figure 24.** fibronectin および $\alpha$ -SMA 発現に対する pirfenidone の作用



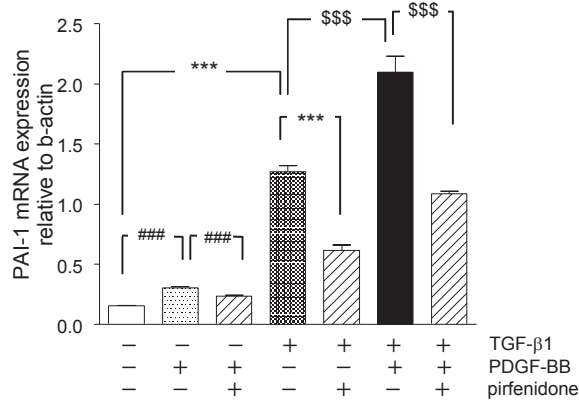
**Figure 24.** Effect of pirfenidone on the TGF- $\beta$ 1-induced expression of fibronectin or  $\alpha$ -SMA in NRK-52E cells. After incubation of NRK-52E cells under different experimental conditions, aliquots of cell lysate were subjected to western blot analysis. pirfenidone was treated 0.5 h before the addition of TGF- $\beta$ 1.

### 3.2. TGF- $\beta$ 1 と PDGF-BB の共刺激での pirfenidone の作用

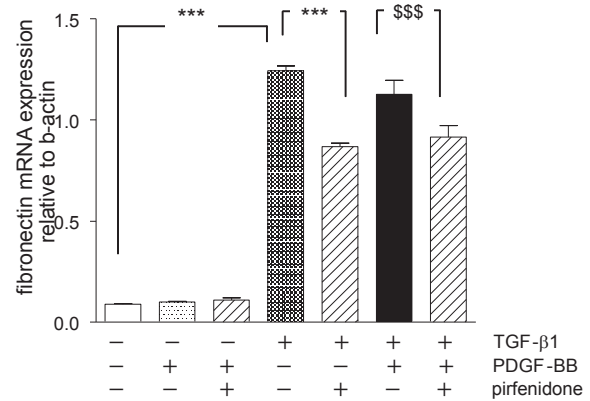
NRK-52E を PDGF-BB (5 ng/mL) で刺激すると、PAI-1 や type I collagen の産生がわずかに増加するのみで、fibronectin、CTGF、 $\alpha$ -SMA、vimentin の発現は増加しなかった。ところが TGF- $\beta$ 1 (3 ng/mL) に PDGF-BB (5 ng/mL) を併用すると、PAI-1 mRNA の発現は顕著に増加した (Figure 25A)。この増加に対して、pirfenidone (0.5 mM) は有意な抑制作用を示した。type I collagen や CTGF の発現も TGF- $\beta$ 1 に PDGF-BB を追加することで発現が増加する傾向が認められ、pirfenidone はこれを阻害する傾向を示した (Figure 25C, D)。一方で、TGF- $\beta$ 1 に PDGF-BB を併用しても  $\alpha$ -SMA の発現上昇は認められず pirfenidone による抑制作用も認められなかった (Figure 25E)。vimentin は TGF- $\beta$ 1 に PDGF-BB を加えることで発現上昇が認められたが、pirfenidone による抑制作用は認められなかった (Figure 25F)。

**Figure 25.** TGF- $\beta$ 1 と PDGF-BB 併用に対する作用

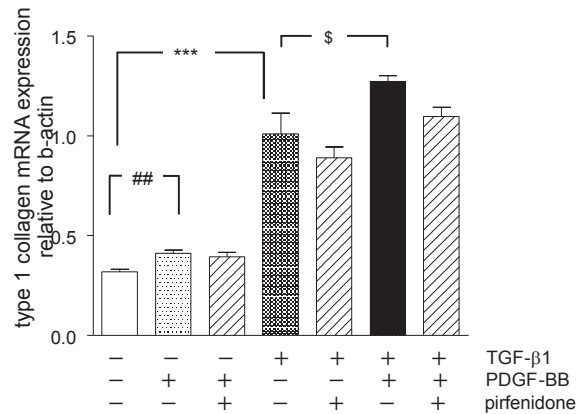
**A. PAI-1**



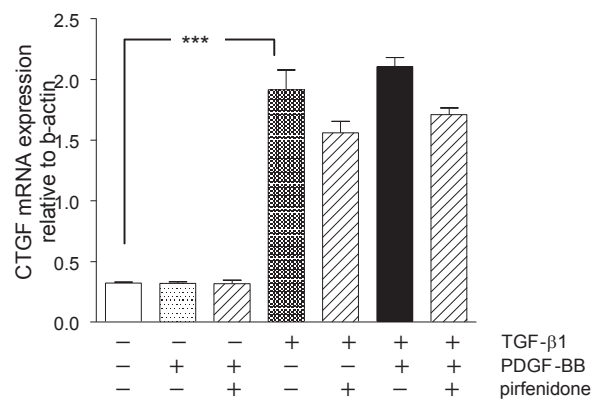
**B. fibronectin**



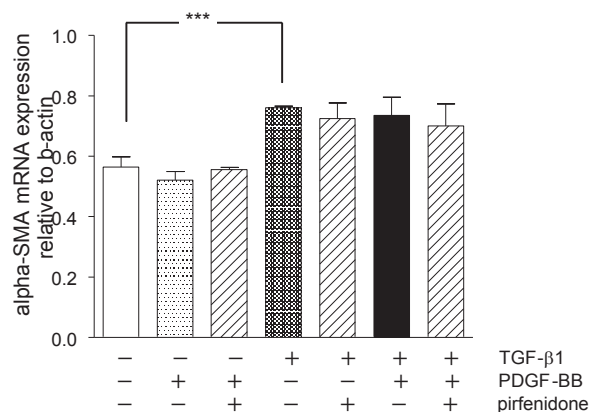
**C. type I collagen**



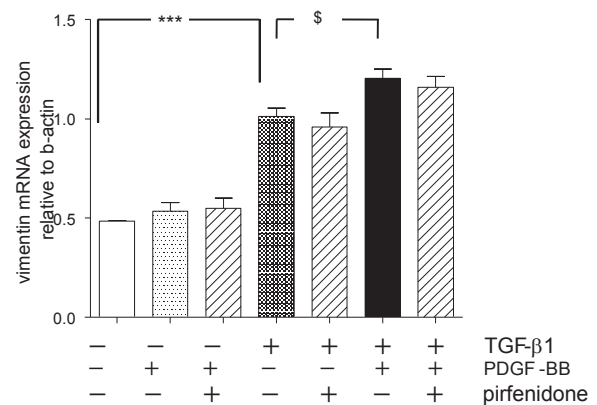
**D. CTGF**



**E.  $\alpha$ -SMA**



**F. vimentin**



**Figure 25.** Effect of pirfenidone on TGF- $\beta$ 1 and PDGF-BB-induced mRNA expression of (A) PAI-1, (B) fibronectin, (C) type I collagen  $\alpha$ 1, (D) CTGF, (E)  $\alpha$ -SMA and (F)

**vimentin in NRK-52E cells.** Cells were treated with TGF- $\beta$ 1 (3 ng/mL) or PDGF-BB or both (5 ng/mL) for 24 h with or without pirfenidone (0.5 mM). Values are mean  $\pm$  standard error of four independent experiments (n=4). ###;  $P < 0.001$  vs PDGF-BB, \*\*\*;  $P < 0.001$  vs TGF- $\beta$ , \$ or \$\$\$;  $P < 0.05$  or  $0.001$  vs TGF- $\beta$  + PDGF-BB by Dunnett's test.

#### 第4節 考察

本章ではラット近位尿細管上皮細胞である NRK-52E を用いて、pirfenidone の細胞外マトリックス、線維化促進因子、および間質系細胞マーカーの発現に対する作用を検討した。その結果 pirfenidone は type I collagen、fibronectin、PAI-1、CTGF の発現上昇を濃度依存的に抑制した。しかしながら  $\alpha$ -SMA や vimentin の発現は阻害しなかった。

TGF- $\beta$ 1 による type I collagen、fibronectin、PAI-1、CTGF の発現に対して pirfenidone は濃度依存的な抑制作用を示した。ただし抑制を示すには 0.5~2 mM と高濃度を必要とした。過去の報告においても pirfenidone は培養細胞からのコラーゲン産生を 0.3~1 mM の濃度で阻害し、本検討結果と近い値であった (Hewitson et al., 2001; Nakazato et al., 2002)。またピレスパ錠の医薬品インタビューフォームによると、ヒト単核球である THP-1 での TGF- $\beta$ 刺激による細胞増殖に対して、pirfenidone は 10  $\mu$ g/mL (0.054 mM) で統計的有意な作用を示しているが、明確な阻害作用を示しているのは 100  $\mu$ g/mL (0.54 mM) 付近である。ヒト線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生に対しても同様である。一方で、成人への 600 mg の経口投与における血中濃度は、単回および反復投与のどちらにおいても  $C_{max}$  は約 10  $\mu$ g/mL (0.054 mM)、 $AUC_{0-24hr}$  は約 80  $\mu$ g $\cdot$ hr/mL とされている。マウスへの 33 mg/kg の経口投与での血中濃度は  $C_{max}$  が約 18  $\mu$ g/mL (0.1 mM)、 $AUC_{0-6hr}$  は 7  $\mu$ g $\cdot$ hr/mL とされている。マウスのブレオマイシン肺線維化モデルでの有効用量は 30~100 mg/kg とされている (Oku et al., 2008)。今回の検討では血中濃度測定は行っていないが、これらの外部情報を参考にと培養細胞

での有効濃度と血中濃度に乖離があるように見受けられる。このことから pirfenidone には従来の培養細胞系では検出できない生体内での作用があるかもしれない。もしくは複合的な作用の結果、線維化抑制作用を発揮していることが考えられる。なお pirfenidone の生体内での代謝は肝臓で行われ主代謝産物は腎臓から排出される。血中に比べて組織濃度が特に高い部位はなく、代謝産物には細胞外マトリックス産生阻害作用や細胞増殖阻害作用は認められていない（ピレスパ錠、医薬品情報）。

CKD の病態進展には尿細管障害が関与しており、尿細管細胞の変性を抑制することは CKD 進行を抑制する可能性がある。抗 GBM 腎炎モデルでの治療的評価の結果からも、pirfenidone は尿細管障害から保護することで腎機能低下を抑制する可能性が示された。尿細管上皮細胞の変性のうち、EMT は腎疾患での間質線維化による病態進展に関与するとされる（Liu 2010; García-Sánchez et al., 2010）。EMT は上皮細胞が本来もつ基底膜側と管腔側の極性が失われ、間質系因子の上昇や上皮系因子の低下を基準として判断される。本検討では $\alpha$ -SMA と vimentin を間質系マーカーとして使用し、NRK-52E 細胞での発現上昇を観察した。しかし pirfenidone はこれを抑制せず、5/6 腎摘モデルの $\alpha$ -SMA 染色と一致する結果であった。したがって pirfenidone は尿細管上皮細胞の変性には直接的には影響しないことが推測されたが、これらの結果のみでは pirfenidone が EMT を抑制するかどうかは判断できない。NRK-52E 以外の細胞での検証や、snail など EMT に関与する複数の因子の変動を確認することが必要である。pirfenidone が EMT を抑制するのか、あるいは抗線維化薬に EMT 抑制が必要であるかを判断するためには、更なる検証が必要と考えられた。

以上、pirfenidone は NRK-52E からの collagen, fibronectin, PAI-1, CTGF の産生を抑制し、これが腎疾患モデルでの抗線維化作用の一部分を表していると考えられた。本研究の目的は pirfenidone の作用機序解明ではないため追加検討は行わなかったが、細胞外マトリックス産生阻害以外の作用機序の存在も疑われた。

## 第5章 総括

CKD は慢性的に腎臓の機能が低下するすべての腎臓病をさし、糸球体腎炎、ネフローゼ、巣状糸球体硬化症などの原発性のもの、高血圧、糖尿病、脂質異常症などに起因する二次性のものがある。CKD には血圧上昇による糸球体過剰濾過や、血流低下による低酸素、血糖上昇による酸化ストレス、原発性の炎症など様々な原因が関係しているが、いずれの原因においても線維化を伴う。線維化により障害された腎機能は別のネフロンにより代償されるため残存ネフロンには通常よりも大きな負荷がかかり腎障害を促進する。このように CKD では一旦障害が始まると悪化サイクルに陥り、持続的に腎機能が低下し続けるが線維化を抑制することにより CKD 進展を抑制することができると考えらる。したがって、抗線維化薬は高血糖、炎症、高血圧など原因によらず使用できる CKD 治療薬になる可能性がある。この様な仮説のもと、本研究では pirfenidone をツール化合物とし線維化抑制による CKD 進行抑制薬のコンセプト検証を行なった。その結果、CKD 治療の創薬ターゲットとして、抗線維化薬の妥当性が確認された。以下、抗線維化薬の臨床応用への可能性について考察する。

5/6 腎摘モデルは腎臓のネフロン数を強制的に少なくすることで単位糸球体当たりの濾過量を増やし腎臓に持続的な負荷を掛けるモデルである。過剰濾過ストレスは内皮細胞・糸球体基底膜障害、炎症細胞浸潤、メサンギウム基質増加、ボウマン嚢構造破綻などにより糸球体構造を破壊する。糸球体の下流の尿細管も炎症細胞浸潤、虚血・低酸素、間質線維化などで組織障害を受ける。これはヒト CKD と共通した発症メカニズムであり、この臨床を反映したモデルで pirfenidone は腎線維化を抑制し腎機能低下を抑制した。pirfenidone の作用点は線維化の抑制であり、糸球体への圧負荷を軽減する RAS 系阻害薬とは作用点が異なる。また尿細管障害および間質線維化は病態の進行した患者で顕著であるため、病態後期の患者への有効性も期待できる。このことから抗線維化薬は RAS 系阻害薬との併用による相乗効果が期待され、CKD 進行

抑制薬として有望である。

抗 GBM 腎炎モデルでの評価結果からは抗線維化薬の有効性の高さと課題が明確となった。pirfenidone は予防的にはタンパク尿増加を抑制し腎機能低下を抑制した。一方で治療的な処置においてはタンパク尿には影響せず腎機能低下を抑制した。抗線維化薬のタンパク尿に対する作用にはこれまで統一した見解がなかったが、糸球体障害を起因とする病態の初期において抗線維化薬は糸球体の構造の破壊を軽減しタンパク尿増加を抑制することが判明した。しかし病態が進行すると糸球体の破壊は進行しており、線維化抑制ではタンパク尿に無効になると考えられる。降圧薬のタンパク尿抑制作用は糸球体への圧力を下げることで見かけ上タンパク尿を減らす、組織構造上の改善はないと考えられる。一方で、タンパク尿自体が尿細管障害や血管障害の原因であるとの理論もあり、タンパク尿は臨床においては病態進行度の診断指標として利用されている (Currie and Delles, 2014)。また CKD 患者の病態進展スピードは個人差があり、腎機能パラメーターの上昇に数年かかることもある。このためタンパク尿は腎障害度を評価するサロゲートマーカーとして重視されている。今回の結果から抗線維化薬がタンパク尿抑制作用を発揮するのは糸球体障害の病態初期であるため、タンパク尿を薬効評価の指標にしにくいことが判った。一方で治療的評価において認められた腎機能低下抑制作用は非常に魅力的な薬効であった。抗 GBM 腎炎モデルでは ACE 阻害薬は治療的な効果はなく、また免疫抑制剤である cyclosporin A や cyclophosphamide も治療的評価では無効である (未発表データ)。このことから、抗線維化薬は腎機能低下を指標にした場合には魅力的な CKD 治療薬となりうると考えられる。

以上より抗線維化薬の課題はいかに早期に薬効を検出できるかが鍵と考えられる。線維化抑制作用を生体内で検出する方法として MRI によるイメージング技術が報告されている (Togao et al., 2010)。その原理は線維化を受けた組織は他の組織より水分含量が少ないことを利用する方法である。イメージングによる線維化可視化が可

能となれば、非侵襲的であり患者負担を軽減できる。その他、尿中 collagen type IV (Furumatsu et al., 2011; Morita et al., 2011) や血中 7S コラーゲン (Inomata et al., 1996) も生体内での線維化を検出する方法として有望であり、臨床応用可能であるのか検証が必要である。別の観点からは、抗線維化薬の生体内での作用証明のために CKD 以外の線維化性疾患で臨床試験を進める戦略が考えられる。過去の臨床試験を参照すると CKD での有効性を示すには大規模で長期的な治験を実施する必要がある (Lewis et al., 2001, Brenner et al., 2001)。これに対して特発性肺線維症は 6 か月程度で CT によるイメージングや肺活量による機能評価で薬効を見極めることが可能である。pirfenidone は本疾患の治療薬として承認されていることから抗線維化薬の gate indication として有望である。

以上、本研究で得られた結果をまとめると、以下のことが明らかとなった。①抗線維化は CKD の治療薬として魅力的な機序であった。特に腎機能低下を抑制する効果に優れている。②抗線維化薬のタンパク尿抑制作用は限定的であるため薬効指標 (サロゲートマーカー) とすることはできない。早期に薬効を検出するための別の指標が必要である。

以下、線維化抑制を機序とした新規創薬ターゲットについて考察を加えた。TGF- $\beta$ は線維化のマスター因子として注目されるが、正常組織にも発現していることから、これを完全に抑制することは副作用が懸念される。したがって組織特異的や病態特異的にその活性を阻害するような機序が望ましい。例えば、TGF- $\beta$ の 3 つのサブタイプのうち TGF- $\beta$ 1 は組織障害に伴って発現誘導されることから、これを選択的に中和する抗体が考えられる。TGF- $\beta$ 1 選択的中和抗体である LY2382770 (Eli Lilly) は糖尿病性腎症を対象に現在臨床試験が行われている (Clinical Trials gov.; NCT01113801)。その他 CTGF は TGF- $\beta$ の作用を増強するとの報告がある (Burns et al., 2007)。この中和抗体は TGF- $\beta$ の活性を阻害する可能性があるため線維化を阻害する効果が期待される。また TGF- $\beta$ は血中では潜在型として存在するが、潜在型を活性化

するレセプターとして integrin  $\alpha V\beta 5$  や  $\alpha V\beta 6$  が報告されている (Hahm et al., 2007; Zhou et al., 2010; Tatler and Jenkins, 2012.)。これらに対する阻害薬は、組織に特異的に TGF- $\beta$  の活性を阻害できる可能性がある。

以上、抗線維化機序の薬剤は CKD 治療においてこれまでになく強い有効性が期待でき、標的分子を特定することにより高い安全性を兼ね備えた候補品の創出も可能と考えられ、CKD 治療薬を創出するうえで魅力的な創薬ターゲットと考えられた。

## 謝辞

本論文の作成にあたり、多大なる御指導、御鞭撻を賜りました東京理科大学薬学部 田沼靖一 教授に深く御礼申し上げます。また有益な御助言を頂きました同大学薬学部 花輪剛久 教授、同大学薬学部 廣田孝司 教授、同大学薬学部 磯濱洋一 教授、同大学薬学部 秋本和憲 准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の機会を賜るとともに、御便宜、御支援を賜りましたアステラス製薬株式会社研究本部専任理事 宮田桂司 博士、同研究本部 TS 研究所所長 須藤勝美 博士、同研究本部 伊東洋行 博士、同研究本部 RPS 腎研究ユニット長 戸村裕一 博士、同研究本部 藤森明 博士、帝人ファーマ株式会社 山本眞則 博士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有益な御助言、御指導並びに実験にご協力いただきましたアステラス製薬株式会社 岩月義行 博士、田原敦生 博士、能登貴久 博士、見鳥光 博士、帝人ファーマ株式会社 近西俊洋 博士、田野倉章 博士を始めとする多くの皆様にご心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- Benigni, A., Zoja, C., Campana, M., Corna, D., Sangalli, F., Rottoli, D., Gagliardini, E., Conti, S., Ledbetter, S., Remuzzi, G., 2006. Beneficial effect of TGFbeta antagonism in treating diabetic nephropathy depends on when treatment is started. *Nephron Exp Nephrol* 104, e158-e168.
- Boor P., Ostendorf T., Floege J., 2010. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol.* 6, 643-656.
- Brenner B.M., Cooper M.E., de Zeeuw D., Keane W.F., Mitch W.E., Parving H.H., Remuzzi G., Snapinn S.M., Zhang Z., Shahinfar S.; RENAAL Study Investigators. 2001. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 345, 861-869.
- Burns, W.C., Kantharidis, P., Thomas, M.C., 2007. The role of tubular epithelial-mesenchymal transision in progressive kidney disease. *Cells Tissues Organs.* 185, 222-231.
- Cain, W.C., Stuart, R.W., Lefkowitz, D.L., Starnes, J.D., Margolin, S., Lefkowitz, S.S., 1998. Inhibition of tumor necrosis factor and subsequent endotoxin shock by pirfenidone. *Int J Immunopharmacol* 20, 685-695.
- Cho, M.E., Smith, D.C., Branton, M.H., Penzak, S.R., Kopp, J.B., 2007. Pirfenidone slows renal function decline in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2, 906-913.
- Cirit M., Wang C.C., Haugh J.M., 2010. Systematic quantification of negative feedback mechanisms in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling network. *J Biol Chem.* 285, 36736-36744.

- Currie G., Delles C., 2014. Proteinuria and its relation to cardiovascular disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 21, 13-24.
- Declèves A.E., Sharma K., 2010. New pharmacological treatments for improving renal outcomes in diabetes. *Nat Rev Nephrol.* 6. 371-380.
- Eddy, A.A., 2000. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol* 15, 290-301.
- Eddy, A.A., 2005. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 12, 353-365.
- Eddy A.A., 2009. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis. *Thromb Haemost.* 101, 656-664.
- Fan, J.M., Ng, Y.Y., Hill, P.A., Paterson, D.J.N., Mu, W., Atkins, R.C., Lan, H.Y., 1999. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int.* 56, 1455-1467.
- Feng, J.X., Hou, F.F., Liang, M., Wang, G.B., Zhang, X., Li, H.Y., Xie, D., Tian, J.W., Liu, Z.Q., 2007. Restricted intake of dietary advanced glycation end products retards renal progression in the remnant kidney model. *Kidney Int.* 71, 901-911.
- Floege J., Eitner F., Alpers C.E., 2008. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 19, 12-23.
- Frazier K.S., Paredes A., Dube P., Styer E., 2000. Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation. *Vet Pathol.* 37, 328-35.
- Fukawsawa H., Yamamoto T., Suzuki H., 2004. Treatment with anti-TGF- $\beta$  antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF- $\beta$  signaling. *Kidney Int.* 65, 63-74.
- Furumatsu Y., Nagasawa Y., Shoji T., Yamamoto R., Iio K., Matsui I., Takabatake Y.,

- Kaimori J.Y., Iwatani H., Kaneko T., Tsubakihara Y., Imai E., Isaka Y., Rakugi H., 2011. Urinary type IV collagen in nondiabetic kidney disease. *Nephron Clin Pract.* 117, :c160-166.
- Gagliardini, E., Benigni, A., 2007. Therapeutic potential of TGF-beta inhibition in chronic renal failure. *Expert Opin. Biol. Ther.* 7, 293-304.
- García-Sánchez O., López-Hernández F.J., López-Novoa J.M., 2010. An integrative view on the role of TGF-beta in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 77, 950-955.
- Ghayur A., Margetts P.J., 2013. Transforming growth factor-beta and the glomerular filtration barrier. *Kidney Res Clin Pract.* 32, 3-10.
- Gilbert, R.E., Wu, L.L., Kelly, D.J., Cox, A., Wilkinson-Berka, J.L., Johnston, C.I., Cooper, M.E., 1999. Pathological expression of renin and angiotensin II in the renal tubule after subtotal nephrectomy. Implications for the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 155, 429-440.
- Greka, A., Mundel, P., 2012. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol* 74, 299-323.
- Guan, Q., Li, S., Gao, S., Chen, H., Nguan, C.Y., Du, C., 2013. Reduction of chronic rejection of renal allografts by anti-transforming growth factor- $\beta$  antibody therapy in a rat model. *Am J Physiol Renal Physiol* 305, F199-F207.
- Hahm K., Lukashev M.E., Luo Y., Yang W.J., Dolinski B.M., Weinreb P.H., Simon K.J., Chun Wang L., Leone D.R., Lobb R.R., McCrann D.J., Allaire N.E., Horan G.S., Fogo A., Kalluri R., Shield C.F. 3rd, Sheppard D., Gardner H.A., Violette S.M., 2008. Alpha<sub>v</sub>beta<sub>6</sub> integrin regulates renal fibrosis and inflammation in Alport mouse. *Am J Pathol.* 170, 110-125.
- Hewitson T.D., Kelynack K.J., Tait M.G., Martic M., Jones C.L., Margolin S.B., Becker G.J.,

2001. *J Nephrol.* 14, 453-460.
- Herman-Edelstein, M., Weinstein, T., Gafter, U., 2013. TGF $\beta$ 1-dependent podocyte dysfunction. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22, 93-99.
- Ikushima, H., Komuro, A., Isogaya, K., Shinozaki, M., Hellman, U., Miyazawa, K., Miyazono, K., 2008. An Id-like molecule, HHK, is a synexpression group-restricted regulator of TGF- $\beta$  signaling. *EMBO J.* 27, 2955-2965.
- Inomata S., Itoh M., Sato T., 1996. Difference of serum levels of type IV collagen 7S between early or overt nephropathy and nondiabetic renal disease in diabetic patients with micro- or macroalbuminuria. *Nephron.* 73, 601-605.
- Iyer, S.N., Wild, J.S., Schiedt, M.J., Hyde, D.M., Margolin, S.B., Giri, S.N., 1995. Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters. *J Lab Clin Med* 125, 779-785.
- Iyer, S.N., Gurujeyalakshmi, G., Giri, S.N., 1999. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 367-373.
- Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. 2002. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut.* 51. 579-584.
- Jinde K., Nikolic-Paterson D.J., Huang X.R., Sakai H., Kurokawa K., Atkins R.C., Lan H.Y., 2001. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 38, 761-769.
- KDIGO 2012., Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. 2013. *Kidney Int. Supplements*

- Kim M.K., Maeng Y.I., Sung W.J., Oh H.K., Park J.B., Yoon G.S., Cho C.H., Park K.K., 2013. The differential expression of TGF- $\beta$ 1, ILK and wnt signaling inducing epithelial to mesenchymal transition in human renal fibrogenesis: an immunohistochemical study. *Int J Clin Exp Pathol.* 6, 1747-1758.
- Lewis, A., Steadman, R., Manley, P., Craig, K., de la Motte, C., Hascall, V., Phillips, A.O., 2008. Diabetic nephropathy, inflammation, hyaluronan and interstitial fibrosis. *Histol Histopathol* 23, 731-739.
- Lee, H.S., 2012. Mechanisms and consequences of TGF- $\beta$  overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Res* 347, 129-140.
- Lewis E.J., Hunsicker L.G., Clarke W.R., Berl T., Pohl M.A., Lewis J.B., Ritz E., Atkins R.C., Rohde R., Raz I. Collaborative Study Group. 2001. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 345, 851-860.
- Liu Y., 2010. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 21,:212-222.
- Liu Y., 2011. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 18, 684-696.
- Maher T.M., 2010. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs Today.* 46. 473-482.
- Ma L.J., Fogo A.B., 2009. PAI-1 and kidney fibrosis. *Front Biosci.*14. 2028-2041.
- M.A., Sharma, K., 2009. Pirfenidone is renoprotective in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 20, 1765-1775.
- Mathieson, P.W., 2011. The podocyte as a target for therapies--new and old. *Nat Rev Nephrol* 8, 52-56.
- Morita M., Uchigata Y., Hanai K., Ogawa Y., Iwamoto Y., 2011. Association of urinary type

- IV collagen with GFR decline in young patients with type 1 diabetes. *Am J Kidney Dis.* 58, 915-920
- Nakayama S., Mukae H., Sakamoto N., Kakugawa T., Yoshioka S., Soda H., Oku H., Urata Y., Kondo T., Kubota H., Nagata K., Kohno S., 2008. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts. *Life Sci.* 82, 210-217.
- Nakazato H., Oku H., Yamane S., Tsuruta Y., Suzuki R., 2002. A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha at the translational level. *Eur J Pharmacol.* 446. 177-185.
- Nangaku, M., Fujita, T., 2008. Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertens Res* 31, 175-184.
- Neale, T.J., Wilson, C.B., 1982. Glomerular antigens in glomerulonephritis. *Springer Semin Immunopathol* 5, 221-249.
- Negri, A.L., 2004. Prevention of progressive fibrosis in chronic renal diseases: antifibrotic agents. *J. Nephrol.* 17, 496-503.
- Neilson, E.G., 2006. Mechanisms of disease: Fibroblasts--a new look at an old problem. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2, 101-108.
- Oh S.A., Li M.O., 2013, TGF- $\beta$ : guardian of T cell function. *J Immunol.* 15, 3973-3979.
- Okada, H., Strutz, F., Danoff, T.M., Kalluri, R., Neilson E.G., 1996. Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contrib Nephrol* 118, 147-154.
- Oku, H., Shimizu, T., Kawabata, T., Nagira, M., Hikita, I., Ueyama, A., Matsushima, S., Torii, M., Arimura, A. 2008. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.* 590, 400-408.
- Osman N.O., Sarah K., Stevens M.S., Roderick J.P., Lawrence M.B., 2006 Pirfenidone

attenuates transforming growth factor beta induced activation of P38-alpha and P38-gamma mitogen-activated protein kinases in human lung fibroblasts. Chest Abstract.

Ostendorf T., Kunter U., Gröne H.J., Bahlmann F., Kawachi H., Shimizu F., Koch K.M., Janjic N., Floege J., 2001. Specific antagonism of PDGF prevents renal scarring in experimental glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol. 12, 909-918.

Ostendorf T., Eitner F., Floege J., 2011. The PDGF family in renal fibrosis. Pediatr Nephrol May 21.

RamachandraRao, S.P., Zhu, Y., Ravasi, T., McGowan, T.A., Toh, I., Dunn, S.R., Okada, S., Shaw, M.A., Sharma, K., 2009. Pirfenidone is renoprotective in diabetic kidney disease. J Am Soc Nephrol 20, 1765-1775.

Rastaldi M.P., Ferrario F., Giardino L., Dell'Antonio G., Grillo C., Grillo P., Strutz F., Müller G.A., Colasanti G., D'Amico G., 2002. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. Kidney Int. 62, 137-146.

Schiller M., Dennler S., Andereg U., Kokot A., Simon J.C., Luger T.A., Mauviel A., Böhm M., 2010. Increased cAMP levels modulate transforming growth factor-beta/Smad-induced expression of extracellular matrix components and other key fibroblast effector functions. J Biol Chem. 285, 409-421.

Sommer M., Eismann U., Deuther-Conrad W., Wendt T., Mohorn T., Fünfstück R., Stein G., 2000. Time course of cytokine mRNA expression in kidneys of rats with unilateral ureteral obstruction. Nephron. 84, 49-57.

Sharma, K., Ziyadeh, F.N., 1994. The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases. Am. J. Physiol. 266, F829-F842.

Sharma K., Ix J.H., Mathew A.V., Cho M., Pflueger A., Dunn S.R., Francos B., Sharma S.,

- Falkner B., McGowan T.A., Donohue M., Ramachandrarao S., Xu R., Fervenza F.C., Kopp J.B., 2011. Pirfenidone for diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 22, 1144-1151.
- Shimizu M., Kondo S., Urushihara M., Takamatsu M., Kanemoto K., Nagata M., Kagami S., 2006. Role of integrin-linked kinase in epithelial-mesenchymal transition in crescent formation of experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 21, 2380-2390.
- Shimizu, T., Fukagawa, M., Kuroda, T., Hata, S., Iwasaki, Y., Nemoto, M., Shirai, K., Yamauchi, S., Margolin, S.B., Shimizu, F., Kurokawa, K., 1997. Pirfenidone prevents collagen accumulation in the remnant kidney in rats with partial nephrectomy. *Kidney Int Suppl* 63, S239-S243.
- Shimizu, T., Kuroda, T., Hata, S., Fukagawa, M., Margolin, S.B., Kurokawa, K. 1998. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney. *Kidney Int* 54, 99-109.
- Shirato, I., Sakai, T., Kimura, K., Tomino, Y., Kriz, W., 1996. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am J Pathol* 148, 1283-1296.
- Strutz, F., Zeisberg, M., 2006. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2992-2998.
- Tangkijvanich P, Santiskulvong C, Melton AC, Rozengurt E, Yee HF Jr. 2002. p38 MAP kinase mediates platelet-derived growth factor-stimulated migration of hepatic myofibroblasts. *J Cell Physiol.* 191, 351-361.

- Tatler A.L., Jenkins G., 2012. TGF- $\beta$  activation and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 9, 130-136.
- Thorner, P.S., Ho, M., Eremina, V., Sado, Y., Quaggin, S., 2008. Podocytes contribute to the formation of glomerular crescents. *J Am Soc Nephrol* 19, 495-502.
- Togao O, Doi S, Kuro-o M, Masaki T, Yorioka N, Takahashi M. 2010. Assessment of renal fibrosis with diffusion-weighted MR imaging: study with murine model of unilateral ureteral obstruction. *Radiology* 255, 772-780.
- Yamate J., Kuribayashi M., Kuwamura M., Kotani T., Ogihara K., 2005. Differential immunoexpressions of cytoskeletons in renal epithelial and interstitial cells in rat and canine fibrotic kidneys, and in kidney-related cell lines under fibrogenic stimuli. *Exp Toxicol Pathol.* 57, 135-147.
- Yanagita, M., 2012. Inhibitors/antagonists of TGF- $\beta$  system in kidney fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 27, 3686-3691.
- Zhang Y., Feng X.H., Derynck R., 1998. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 27, 394, 909-913.
- Zhou, C., Wu, J., Torres, L., Hicks, J.M., Bartkowiak, T., Parker, K., Lou, Y.H., 2010. Blockade of osteopontin inhibits glomerular fibrosis in a model of anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 32, 324-331.
- Zhou Y., Hagood J.S., Lu B., Merryman W.D., Murphy-Ullrich J.E., 2010. Thy-1-integrin  $\alpha$ v  $\beta$ 5 interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent transforming growth factor- $\beta$ 1 activation and myofibroblast differentiation. *J Biol Chem.* 285, 22382-22393.