



Title	尿管上皮細胞の上皮間葉転換を抑制する化合物AM251の同定と作用機構の解明
Author(s)	吉永, 知世
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第12742号
Issue Date	2017-03-23
DOI	10.14943/doctoral.k12742
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/65272
Type	theses (doctoral)
File Information	Tomoyo_Yoshinaga.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

尿細管上皮細胞の上皮間葉転換を抑制する
化合物 AM251 の同定と作用機構の解明

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
生化学研究室

吉永 知世

平成 29 年 3 月

目次

1. 序論	5
1-1. 慢性腎臓病	5
1-1-1. 慢性腎臓病	5
1-1-2. CKD と腎線維化	6
1-1-3. 腎線維化の発生機序	6
1-2. 上皮間葉転換	10
1-2-1. 上皮間葉転換	10
1-2-2. EMT と TGF- β シグナル	11
1-2-3. EMT と CKD	12
2. 研究目的	14
2-1. EMT を抑制できる脂溶性化合物の探索による AM251 の同定	14
2-2. AM251 が EMT を抑制する作用機序の解明	14
3. 結果	15
3-1. EMT を抑制できる脂溶性化合物の探索による AM251 の同定	15
3-1-1. EMT を抑制できる脂溶性化合物の探索を目的としたスクリーニング	15
3-1-2. プライマリー細胞を用いた二次評価による AM251 の同定	16
3-1-3. AM251 は長期間培養後や EMT を誘導した後でも EMT を抑制する	18
3-1-4. AM251 は E カドヘリンの発現を上昇させる	20

3-2. AM251 が EMT を抑制する作用機序の解明.....	22
3-2-1. AM251 は既知作用点 (CB1, GPR55) を介さずに EMT を抑制する	22
3-2-2. AM251 は TGF-β1 刺激時の <i>SNAIL1</i> , <i>FOSB</i> , <i>JUNB</i> の遺伝子発現誘導 を抑制する	25
3-2-3. AM251 は TGF-β1 刺激時の SMAD, p38 MAPK のリン酸化を抑制する	31
4. 考察.....	33
4-1. EMT を抑制できる脂溶性化合物の探索による AM251 の同定.....	33
4-2. AM251 による EMT 抑制作用機序の解明.....	33
5. 材料と方法.....	36
5-1. 細胞培養.....	36
5-2. EMT を抑制するためのスクリーニング	36
5-3. 遺伝子発現抑制.....	36
5-4. リアルタイム PCR 法	37
5-5. 遺伝子発現マイクロアレイ解析.....	37
5-6. ウェスタンブロッティング法.....	38
表 1. 本研究に使用したプライマー	40
6. 参考文献.....	41

索引

2-AG	2-arachidonoylglycerol
α SMA	α -smooth muscle actin
AKI	acute kidney injury
ANA	anandamide
AP-1	activator protein 1
ATF	activating transcription factor
BMP	bone morphogenetic protein
CA	carbaprostacyclin
CB1	cannabinoid receptor type 1
CD31	cluster of differentiation 31
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CI	ciglitazone
CKD	chronic kidney disease
CTGF	connective tissue growth factor
DHVD3	24, 25-dihydroxyvitamin D ₃
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTA	docosatrienoic acid
EMT	epithelial-mesenchymal transition
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EndoMT	endothelial-mesenchymal transition
FGF	fibroblast growth factor
FGF2	fibroblast growth factor 2
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFR	glomerular filtration rate
GPR	G protein-coupled receptor
IGF	insulin-like growth factor
IL-6	interleukin-6
ILK	integrin-linked kinase
JNK	Jun N-terminal kinase
MAG	myelin-associated glycoprotein

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	myelin basic protein
MMP2	matrix metalloproteinase 2
NADA	<i>N</i> -arachidonoyl dopamine
ODA	<i>N</i> -oleoyl dopamine
PALDA	<i>N</i> -palmitoyl dopamine
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PPIA	peptidylprolyl isomerase
REGM	renal epithelial growth media
RNA	ribonucleic acid
SAG	1-stearoyl-2-arachidonoyl-glycerol
siRNA	small interfering RNA
SMAD	SMAD family member
SNAIL1	snail family zinc finger 1
SNAIL2	snail family zinc finger 2
TBS-T	tris-buffered saline with tween 20
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TWIST1	twist family bHLH transcription factor 1
UO	unilateral ureteral obstruction

1. 序論

1-1. 慢性腎臓病

1-1-1. 慢性腎臓病

腎臓は、体内の血液をろ過することで、不要な老廃物や毒素、塩分、水分を対外に排出し、血液を浄化する。同時に体内の水分量・電解質バランスを整える機能も担う重要な臓器である。腎臓は糸球体と近位尿細管、ヘンレのループ、遠位尿細管、集合管からなるネフロンという単位で構成されており、ネフロンの周囲には非常に微細な毛細血管（傍尿細管毛細血管）が張り巡らされている。ネフロンは1個の腎臓に100万個程度存在している。腎臓に到達した血液はまず、糸球体と近接した血管を通じて糸球体に流れ込み、糸球体を通過することでタンパク質以外の血中成分と水分がろ過され、近位尿細管に流れ込む。その後、流れ込んだろ過溶液は尿細管やヘンレのループを通過する間に水分や糖分、塩分、アミノ酸など人体に必要な成分が再吸収され、その後の残存分が尿として体外へ排出されることになる。この一連の流れにより、生体内の血液は浄化される。また、再吸収の際に水分、塩分量が調節されることで、体内の血圧が調節される。これらの機能以外にも、腎臓は血圧の調節を担うレニン-アンジオテンシン系のホルモンであるレニンや造血作用と関連するエリスロポエチンといった人体に必要なホルモンを生成する機能も担っている。このため、腎機能が障害される腎不全では、有害な老廃物の蓄積による尿毒症、水分が蓄積することによる浮腫、ホルモンが生成されないことによる腎性貧血などが起こり、症状が悪化した末期腎不全では人工透析が必要不可欠となる。

慢性腎臓病（CKD; chronic kidney disease）とは腎機能低下あるいは腎障害を示す所見が慢性的（3か月以上）に持続する病態の総称である。慢性腎臓病が進行すると共通して腎臓の線維化が起こり、末期腎不全に至る。CKDを発症する主な原疾患としては糖尿病や高血圧症などの生活習慣病が挙げられるが、日本で最も多い原疾患は糖尿病であるとされる(1)。日本では成人の8人に1人がCKDであると考えられており、新たな国民病とも言われている(2)。CKDの定義は以下のとおりである(2)。

- ① 尿異常，画像診断，血液，病理で腎障害の存在が明らか。特に蛋白尿の存在が重要
- ② 糸球体濾過量（glomerular filtration rate : GFR） $< 60 \text{ mL}/\text{分}/1.73 \text{ m}^2$

①，②のいずれか，または両方が3か月以上持続する。

CKD の初期症状はほとんどないため、早期発見が難しく、自覚症状が出た時点では病態がかなり進行した状態であることも多い。CKD の初期段階における治療法は生活習慣の改善を中心とした対症療法によって腎機能の低下を遅延させることであり、腎機能を改善できる治療薬は存在していない。CKD 患者は最終的に末期腎不全を発症し、人工透析が必要となるが、この人工透析を受ける患者数も増加の一途をたどっており、2014 年末時点で 32 万人を超えている(3)。人工透析は患者の QOL を著しく低下させ、高額な医療費を要するため、社会的にも大きく問題視されている。また、CKD 患者は人工透析のリスクだけでなく、心血管疾患を発症するリスクもきわめて高くなることが知られており、この点も問題視されている(3, 4)。一般的に高齢化とともに腎機能は低下していくため、高齢者のほうが CKD を発症し、末期腎不全に至るリスクが増大する。このため、特に高齢化社会が進む日本では、CKD 患者、特に末期腎不全による新たな透析患者を増大させないための施策が課題となっている(3)。

1-1-2. CKD と腎線維化

CKD の特徴の 1 つであり、末期腎不全に至るまでの共通の過程であるとされるのが腎臓の線維化である。線維化はコラーゲンやフィブロネクチンを構成タンパク質とする細胞外マトリックスが過剰に蓄積した状態である。腎臓の場合、線維化が発生すると正常な場合には非常に狭い空間である腎間質(ネフロン間に張り巡らされた傍尿細管毛細血管の基底膜と尿細管上皮細胞の基底膜に挟まれた空間)に細胞外マトリックスが蓄積し、腎間質が肥大する(5, 6)。腎線維化によるこの腎間質の肥大は尿細管の圧迫や傍尿細管毛細血管の萎縮などを引き起こし、正常な腎臓の組織や機能を障害する。その後、尿細管硬化や腎皮質硬化を経て、最終的には末期腎不全に至る(7, 8)。このため、末期腎不全に至るまでの共通過程である腎線維化を抑制することにより、CKD の病態進展、ひいては末期腎不全発症を抑制することができると考えられる。しかしながら、線維化の進行を抑制できる治療薬は存在せず、有効な治療法も見出されていないのが現状である(3)。

1-1-3. 腎線維化の発生機序

腎線維化の要因である細胞外マトリックスの蓄積は、腎間質内に筋線維芽細胞が増殖・活性化し、細胞外マトリックスを過剰産生することで発生する(9-11)。しかし、筋線維芽細胞は正常な腎臓内にはほとんど存在していない。この筋線維芽細胞が腎臓内で

増殖・活性化する要因は複数存在しており、その主な要因を以下に挙げる(11) (図 1)。

① 線維芽細胞や周皮細胞の形質転換

腎間質には線維芽細胞が存在しており、正常な腎臓内に必要な細胞外マトリックスを産生し、適切に維持している。しかし、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β ; transforming growth factor- β)、血小板由来成長因子 (PDGF; platelet-derived growth factor)、線維芽細胞増殖因子 2 (FGF2; fibroblast growth factor 2)、結合組織増殖因子 (CTGF; connective tissue growth factor) などの線維化促進因子によって形質転換し、 α 平滑筋アクチン (α SMA; α -smooth muscle actin) やフィブロネクチンといった通常の線維芽細胞には存在しない筋線維芽細胞特有のマーカーを発現し、過剰量の細胞外マトリックスを産生するようになる(12, 13)。腎間質に存在する血管周皮細胞も通常は血管に密着して存在するが、腎臓が障害を受けると TGF- β や CTGF といったサイトカインシグナルによって筋線維芽細胞に形質転換し、血管から離れて腎間質内に浸潤する(14)。

② 上皮間葉転換

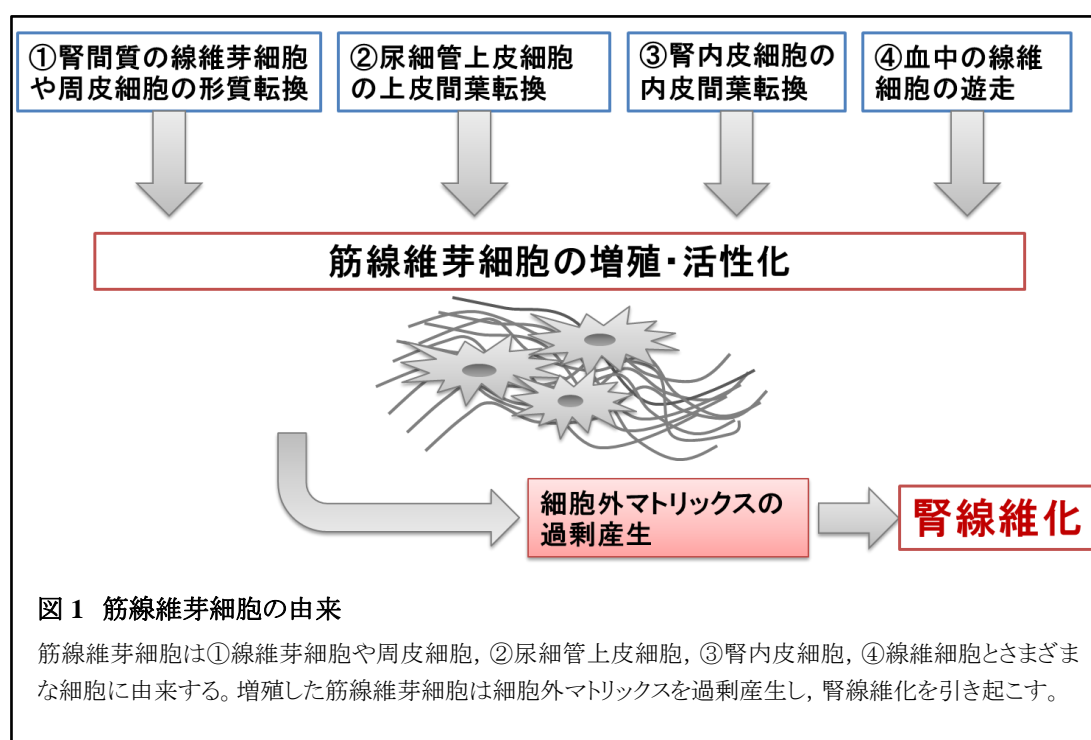
尿細管に存在する尿細管上皮細胞は TGF- β などのサイトカイン刺激や酸化ストレスを受けると間葉系細胞 (筋線維芽細胞) に形質転換する。この現象が上皮間葉転換 (EMT; epithelial-mesenchymal transition) である。詳細は序論 2 章に記載する。

③ 内皮間葉転換

腎内皮細胞は TGF- β や腫瘍壊死因子 (TNF- α ; tumor necrosis factor- α)、骨形成タンパク質 (BMP; bone morphogenetic protein) などのサイトカインの刺激の刺激を受けると間葉系細胞 (筋線維芽細胞) に形質転換する(15-17)。この現象が内皮間葉転換 (EndoMT; endothelial-mesenchymal transition) である。EndoMT が起こると内皮細胞のマーカーであり、細胞接着タンパク質である cluster of differentiation 31 (CD31) や VE-カドヘリンの発現が低下し、筋線維芽細胞マーカーとなるタンパク質 (I 型及び III 型のコラーゲンやビメンチン、フィブロネクチン) の発現が上昇する。EndoMT による筋線維芽細胞の増殖は、腎間質の線維化の要因となるだけでなく、糸球体硬化も引き起こす(17)。

④ 線維細胞の遊走

末梢血管中に存在する骨髄由来の細胞群の中には、線維芽細胞に似た特徴をもつ線維細胞が存在している(18)。線維細胞は CTGF や TGF- β といったサイトカイン刺激によって筋線維芽細胞に形質転換し、腎間質内に遊走する(19)。また、腎臓のレニン-アンジオテンシン系も線維細胞の筋線維芽細胞への形質転換や腎間質内への細胞遊走を誘導することで、腎線維化に寄与しているとされる(20)。



上述したように、複数の細胞が筋線維芽細胞の由来となり、その増殖に寄与していることが報告されたため、どの細胞に由来する筋線維芽細胞が最も多いのかという議論が続いた。しかし、近年では、最も多いのは腎間質内に存在する線維芽細胞由来のものであり、次に多いのは線維細胞などの骨髄由来細胞を由来とするものであるという結論に達しつつある(21, 22)。一方で、線維芽細胞や周皮細胞が形質転換するためには引き金となる線維化促進因子 (TGF- β , PDGF, FGF2, CTGF など) が必要である。この線維化促進因子の発生源については、炎症により浸潤・活性化したマクロファージや樹状細胞といった免疫細胞が由来であるという説、EMT や EndoMT により形質転換した細胞が由来であるという説などが報告されており、線維芽細胞などの腎間質内に存在する細

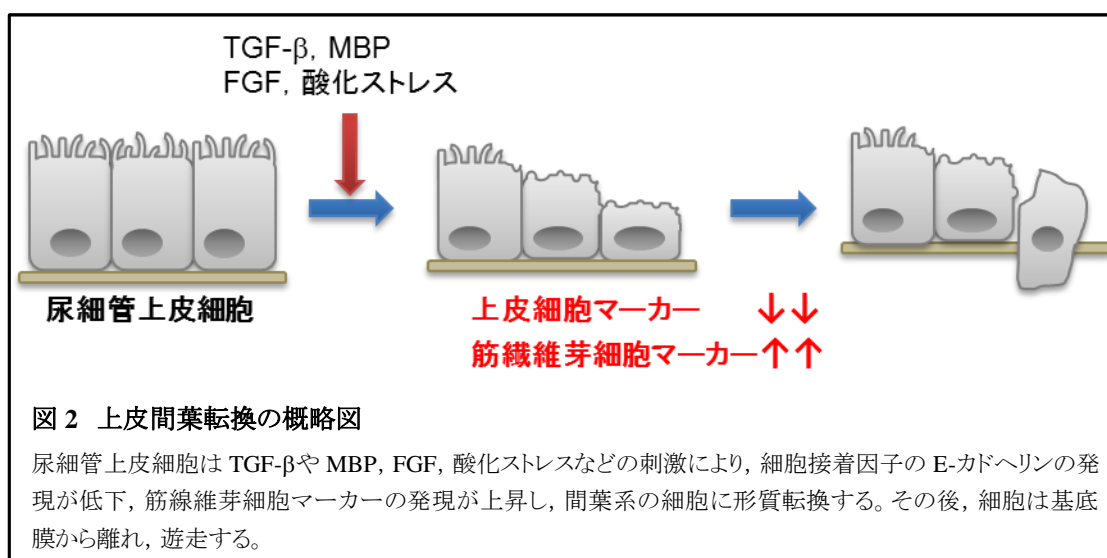
胞だけではなく、他の細胞群の寄与が必要であると考えられている(5, 23, 24)。

特に近位尿細管に存在する尿細管上皮細胞の EMT は腎臓内で最初に変化が生じ、単独でも線維化促進因子の分泌を促進することで、線維芽細胞や周皮細胞による筋線維芽細胞の増殖・活性化を引き起こすことが報告されている(5, 25)。このため、本研究では線維化の起点となる可能性があるこの EMT に着目することとした。

1-2. 上皮間葉転換

1-2-1. 上皮間葉転換

上皮間葉転換 (EMT) は上皮細胞が間葉系細胞 (筋線維芽細胞) に形質転換する現象であり, TGF- β ファミリー, ミエリン塩基性タンパク質 (MBP; myelin basic protein), 線維芽細胞増殖因子 (FGF; fibroblast growth factor) などのサイトカインによる刺激や酸化ストレスなどを受けることによって誘導される(26, 27) (図 2)。腎臓の場合には尿細管上皮細胞 (特に近位尿細管上皮細胞) が EMT を起こす。また, 近年では, 尿細管上皮細胞の EMT は腎臓の血圧調節機能を担うレニン-アンジオテンシン系のホルモンの一つであるアンジオテンシン II によっても引き起こされることが報告されている(28)。尿細管上皮細胞は, 正常な状態では基底膜上に規則正しく並び, その細胞間にはオクルディンやクローディン, トリセルリンなどの膜タンパク質によるタイトジャンクション, カドヘリンなどの細胞接着分子を用いたアドヘレンスジャンクション, デスモコリンやデスモグレインなどにより形成されるデスモソームといった多くの細胞接合様式により強く結合している(29)。しかし, EMT が誘導されると上皮細胞マーカーであり, 細胞接着因子の 1 つである E-カドヘリンの発現が低下し, 筋線維芽細胞のマーカーである細胞外マトリックスタンパク質 (コラーゲンやフィブロネクチンなど) や細胞骨格タンパク質 (α SMA, ビメンチンなど) の発現が上昇する。最終的に, その強い細胞結合は失われ, 細胞は基底膜から離れる。その後, 細胞は筋線維芽細胞として腎間質に遊走し, 細胞外マトリックスの過剰産生を起こす(27)。



1-2-2. EMT と TGF-βシグナル

EMT の中心的なシグナル伝達経路は TGF-βシグナルである(27, 30)。TGF-βファミリーには3つのサブタイプ (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3) が含まれ, TGF-βファミリーが TGF-β レセプター

(TGF-βR1-3) に結合することで EMT が誘導される(31, 32)。TGF-βシグナルの中でも最も EMT に対する寄与が大きいと考えられているのは TGF-βレセプター1/2 複合体から始まるシグナルである (図 3)。このシグナルでは, TGF-βレセプター1/2 複合体のうち, TGF-βレセプター2 に TGF-βが結合することで, TGF-βレセプター1 の下流に存在する SMAD family member (SMAD) 2/3 と細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK; extracellular signal-regulated kinase), p38 MAP キナーゼ (MAPK; mitogen-activated protein kinase), Jun N 末端キナーゼ (JNK; Jun N-terminal kinase) を含む MAP キナーゼファミ

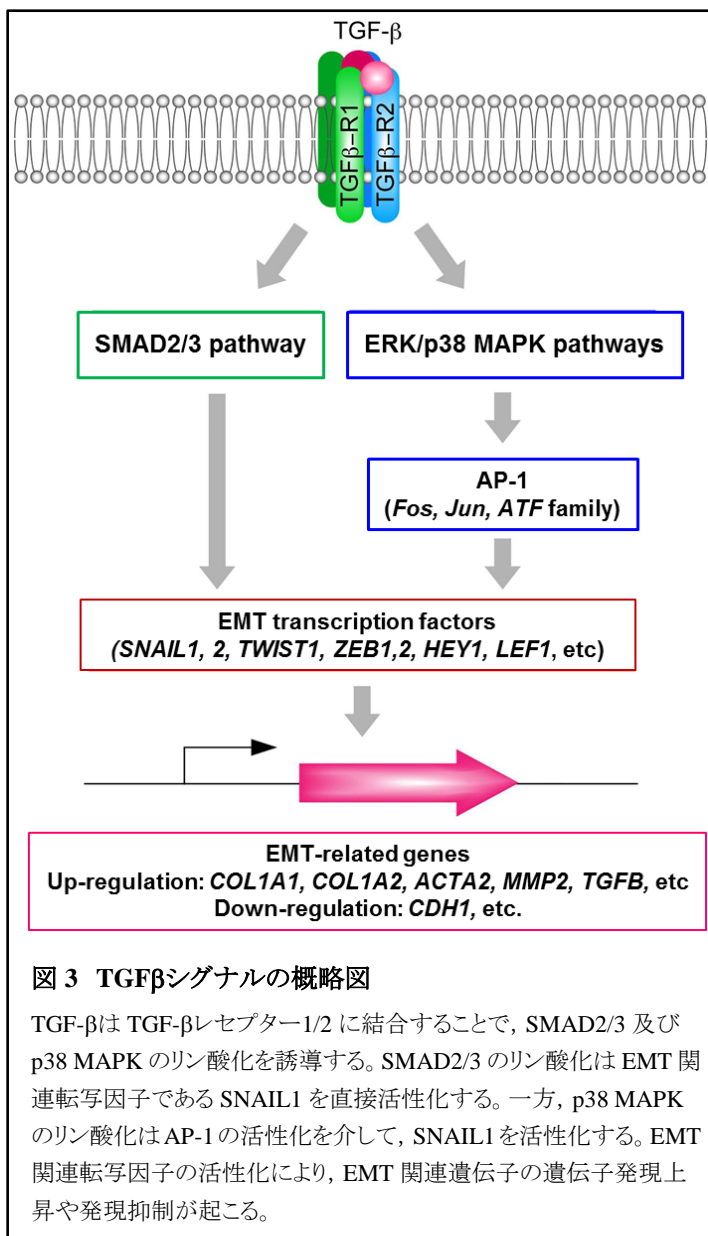


図 3 TGFβシグナルの概略図

TGF-βは TGF-βレセプター1/2 に結合することで, SMAD2/3 及び p38 MAPK のリン酸化を誘導する。SMAD2/3 のリン酸化は EMT 関連転写因子である SNAIL1 を直接活性化する。一方, p38 MAPK のリン酸化は AP-1 の活性化を介して, SNAIL1 を活性化する。EMT 関連転写因子の活性化により, EMT 関連遺伝子の遺伝子発現上昇や発現抑制が起こる。

リー (MAPKs) といった複数のタンパク質が活性化され, シグナルが伝達される(33-37)。これらのシグナル伝達タンパク質は最終的には snail family zinc finger 1 (SNAIL1), snail family zinc finger 2 (SNAIL2), twist family bHLH transcription factor 1 (TWIST1), zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1), zinc finger E-box binding homeobox 2 (ZEB2), hes-related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1 (HEY1), lymphoid enhancer

binding factor 1 (LEF1), transcription factor 3 (TCF3) などの EMT 関連転写因子を活性化する。その後、これらの転写因子により、I 及びIV型コラーゲン (コラーゲン 1A1 (COL1A1), コラーゲン 1A2 (COL1A2), コラーゲン 4A1 (COL4A1)), α SMA, マトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP2; matrix metalloproteinase 2), E-カドヘリンといった EMT に関連する遺伝子群の発現誘導や発現抑制が調節される(27, 38, 39)。EMT 関連転写因子群の中でも特に EMT の鍵となる転写因子は SNAIL1 であり, SMAD2/3 によって直接活性化される(39)。一方で SNAIL1 は c-Fos, c-Jun, 及び activating transcription factor (ATF) ファミリーからなる 2 量体型の転写因子である activator protein 1 (AP-1) を介して, p38 MAPK 経路によっても活性化を受ける(40)。

1-2-3. EMT と CKD

腎線維化に対する EMT の寄与/役割については議論が続いたが, 近年では尿細管上皮細胞が EMT を起こした後, 腎間質内に遊走し, 筋線維芽細胞の由来として寄与する寄与度は低いことが示されている(21, 22, 41)。一方で近年, 部分的 EMT (partial EMT) が CKD の病態進展に重要であることが示された(24, 42, 43) (図 4)。部分的 EMT は細胞に EMT が誘導され, 細胞の形質転換は起こっているものの, 細胞はまだ基底膜にとどまっている状態のことである。この過程で特に重要なのは TGF- β 刺激によって誘導される 2 つの転写因子, SNAIL1 と TWIST1 の発現である。これらの因子が誘導されると, TGF- β などの線維化促進因子の分泌が促進され, 筋線維芽細胞の増殖・活性化による腎臓の線維化が引き起こされる。同時に, 部分的 EMT を起こした細胞の一部は細胞周期停止に至り, 腎機能障害や慢性的な炎症を引き起こす。これらの効果により, 最終的に CKD の病態が進展する。

近年, CKD 患者において急性腎障害 (AKI; acute kidney injury) が発生すると比較的短期間に末期腎不全に至る危険性が高いことが明らかとなった(44)。このことは AKI の症状の中に CKD の病態進展に大きく寄与するものがあることを示唆している。AKI は近位尿細管に障害が発生することを特徴とする病態であるため, 近位尿細管の障害が CKD の病態進展に関連している可能性がある。さらに AKI を発症することが引き金となり, CKD を発症する場合もあることが明らかとされた。この場合, 近位尿細管上皮細胞が障害された後, 通常であれば正常状態に戻るはずの近位尿細管上皮細胞が元の状態に戻らず, 尿細管組織が修復できないためであると考えられている(45)。この際のメカニズムにも部分的 EMT が関与している。AKI 発症時に部分的 EMT が起こると, 上

記した筋線維芽細胞の増殖, 尿細管上皮細胞の細胞周期停止による腎機能障害や慢性的な炎症が発生する。このために, 障害を受けた尿細管上皮細胞は元の状態に回復することができず, CKD 発症にいたると考えられている(44, 46, 47)。このような知見から, EMT による尿細管上皮細胞の形質転換は CKD の病態進展に重要な役割を果たしていることが示唆されており, EMT を抑制することは CKD の病態進展を抑制するために有効な治療戦略であると考えられる。

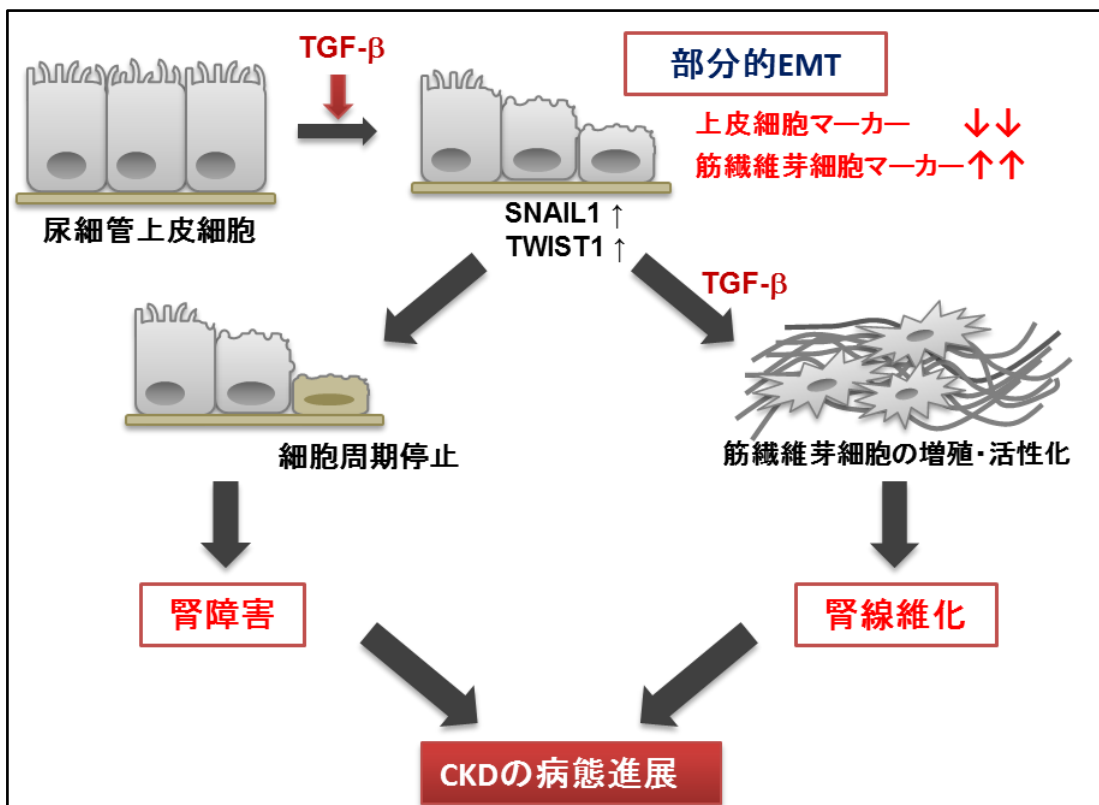


図 4 CKD における EMT の役割

尿細管上皮細胞は TGF-β の刺激により, 部分的 EMT (細胞はまだ基底膜にとどまっているものの EMT が誘導された状態) となる。この時, 2 つの転写因子, *SNAIL1* と *TWIST1* の発現が誘導されることにより, TGF-β など線維化促進因子の分泌が促進され, 筋線維芽細胞の増殖・活性化による腎線維化が起こる。一方, 一部の細胞は細胞周期停止に至り, 腎機能障害や慢性的な炎症を引き起こす。これらの効果は最終的に CKD の病態進展に寄与する。

2. 研究背景・目的

2-1. EMT を抑制できる脂溶性化合物の探索による AM251 の同定

序論でも述べたように、CKD は重篤な国民病であるにもかかわらず、その病態を改善できる治療薬が存在しない。尿細管上皮細胞によって引き起こされる EMT は CKD の病態進展に大きく寄与するが、EMT を抑制できる治療薬も存在しない。このため、EMT を抑制可能な化合物を見出し、その作用機序を明らかとすることは創薬の観点から有用である。本研究では特に脂質に着目し、EMT を抑制可能な脂溶性化合物を見出すことを目的とした。

2-2. AM251 が EMT を抑制する作用機序の解明

EMT を抑制できる化合物の EMT 抑制作用機序を明らかとすることは、より強力な EMT 抑制作用を持つ化合物の創出のために有用であると期待される。そこで本研究で同定した化合物 AM251 が尿細管上皮細胞の EMT を抑制するメカニズムを明らかにすることを旨として解析を行った。

上述したように、CKD の病態進展に EMT は重要な役割を果たしており、EMT を抑制する化合物を見出し、その抑制作用機序を解明することは創薬の観点から有益であると考えられる。そこで本研究では、これらの解析を通じて CKD 創薬につながる新たな知見を得ることを目的とした。

3. 結果

3-1. EMT を抑制できる脂溶性化合物の探索による AM251 の同定

3-1-1. EMT を抑制できる脂溶性化合物の探索を目的としたスクリーニング

まず、ヒト尿管上皮細胞の株化細胞である HK-2 細胞を用いて EMT を抑制できる化合物のスクリーニングを実施した。本研究では EMT を誘導するために、TGF- β 1 (2 ng/ml) による刺激を行った。EMT が誘導されると間葉系細胞マーカーである I 型及び IV 型コラーゲンや α SMA の発現が上昇する(27)。これらの中で、スクリーニングでは I 型コラーゲンの 1 種、*Collagen1A1* (*COL1A1*) の遺伝子発現量を指標に用いた。スクリーニングは HK-2 細胞を播種し、24 時間培養した後に TGF- β 1 (2 ng/ml) による刺激と化合物を作用させ、その 24 時間後に HK-2 細胞の *COL1A1* の遺伝子発現量を指標として化合物の EMT 抑制効果を評価した。脂質は生体内で重要なメディエーターとして機能することが知られている。そこで、本研究では脂質に着目し、市販の脂質ライブラリを使用した。このライブラリには酸化脂肪酸、ロイコトリエン類、プロスタグランジン類を始めとしたさまざまな天然及び合成脂質、計 196 種類が含まれている。評価する化合物の作用濃度は、ライブラリの元濃度の 1/100 倍である 10 μ M あるいは 1 μ M とした。化合物を添加しない状態 (コントロール群) で、HK-2 細胞を TGF- β 1 で刺激し、EMT を誘導すると、その 24 時間後の *COL1A1* の遺伝子発現量は 10 倍程度に発現上昇した。スクリーニングにおける化合物のヒットクライテリアは、この *COL1A1* の遺伝子発現上昇を 50% 以上抑制できるものとした。また、内部標準遺伝子として使用した *Peptidylprolyl Isomerase A* (*PPIA*) の遺伝子発現量が脂質を添加しない群と比較して 4 倍以上低下した化合物に関しては、毒性の懸念が示唆されるため、評価対象から外した。その結果、9 種 (1-ステアリル-2-アラキドノイル-グリセロール (SAG), ドコサトリエン酸 (DTA), カルバスタサイクリン (CA), シグリタゾン (CI), 24, 25-ジヒドロキシビタミン D3 (DHVD3), *N*-パルミトイルドパミン (PALDA), *N*-アラキドニルドパミン (NADA), *N*-オレイルドパミン (ODA), AM251) が、ヒット化合物として同定された (図 5A)。

次にこの 9 種の脂質について、再現性試験を実施した。その結果、SAG はコントロールである DMSO 群の *COL1A1* の遺伝子発現上昇を 20% 程度しか抑制できなかったため、EMT 抑制効果はそれほど高くないと結論付けた。残り 8 種の化合物 (DTA, CA, CI, DHVD3, PALDA, NADA, ODA, AM251) については再現性が確認されたため、

一次評価のヒット化合物とした (図 5B)。

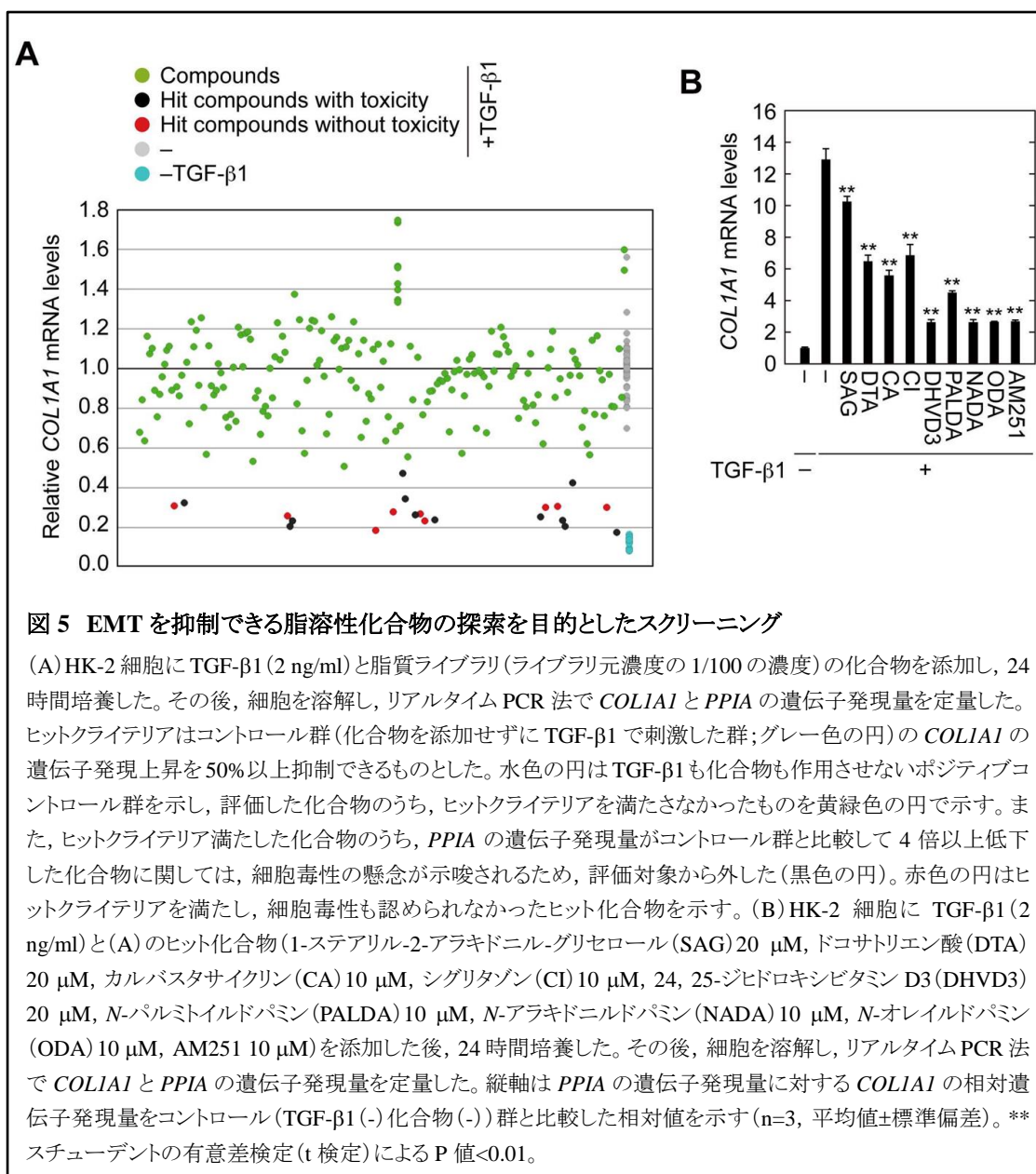


図 5 EMT を抑制できる脂溶性化合物の探索を目的としたスクリーニング

(A) HK-2 細胞に TGF-β1 (2 ng/ml) と脂質ライブラリ (ライブラリ元濃度の 1/100 の濃度) の化合物を添加し, 24 時間培養した。その後, 細胞を溶解し, リアルタイム PCR 法で *COL1A1* と *PPIA* の遺伝子発現量を定量した。ヒットクライテリアはコントロール群 (化合物を添加せずに TGF-β1 で刺激した群; グレー色の円) の *COL1A1* の遺伝子発現上昇を 50% 以上抑制できるものとした。水色の円は TGF-β1 も化合物も作用させないポジティブコントロール群を示し, 評価した化合物のうち, ヒットクライテリアを満たさなかったものを黄緑色の円で示す。また, ヒットクライテリアを満たした化合物のうち, *PPIA* の遺伝子発現量がコントロール群と比較して 4 倍以上低下した化合物に関しては, 細胞毒性の懸念が示唆されるため, 評価対象から外した (黒色の円)。赤色の円はヒットクライテリアを満たし, 細胞毒性も認められなかったヒット化合物を示す。(B) HK-2 細胞に TGF-β1 (2 ng/ml) と (A) のヒット化合物 (1-ステアシル-2-アラキドニルグリセロール (SAG) 20 μM, ドコサトリエン酸 (DTA) 20 μM, カルバスタサイクリン (CA) 10 μM, シグリタゾン (CI) 10 μM, 24, 25-ジヒドロキシビタミン D3 (DHVD3) 20 μM, *N*-パルミトイルドパミン (PALDA) 10 μM, *N*-アラキドニルドパミン (NADA) 10 μM, *N*-オレイルドパミン (ODA) 10 μM, AM251 10 μM) を添加した後, 24 時間培養した。その後, 細胞を溶解し, リアルタイム PCR 法で *COL1A1* と *PPIA* の遺伝子発現量を定量した。縦軸は *PPIA* の遺伝子発現量に対する *COL1A1* の相対遺伝子発現量をコントロール (TGF-β1 (-) 化合物 (-) 群) と比較した相対値を示す (n=3, 平均値±標準偏差)。** スチューデントの有意差検定 (t 検定) による P 値 < 0.01。

3-1-2. プライマリー細胞を用いた二次評価による AM251 の同定

次に二次評価として, 一次評価をクリアした 8 種の化合物 (DTA, CA, CI, DHVD3, PALDA, NADA, ODA, AM251) が, ヒト尿細管上皮細胞のプライマリー細胞である RPTEC 細胞においても EMT を抑制可能であるかどうか検証した。なお, EMT はスク

リーニング時と同様に TGF-β1 刺激時の *COL1A1* の遺伝子発現上昇を指標として評価した (図 6A)。また、このときの細胞毒性は内部標準遺伝子である *PPIA* の遺伝子発現量を指標に評価した (図 6B)。その結果、4 種の化合物 (DTA, CA, CI, DHVD3) では EMT 抑制効果がほぼ消失したが、残り 4 種の化合物 (PALDA, NADA, ODA, AM251) については EMT 抑制効果が認められた。しかし、この 4 種の化合物のうち、3 種の化合物 (PALDA, NADA, ODA) では強い細胞毒性が認められたため、ヒット化合物から外すことにした。以上の結果より、RPTEC 細胞においても EMT を有意に抑制可能であったのは AM251 のみであった。RPTEC 細胞を用いた場合、コントロール群では TGF-β1 で刺激すると *COL1A1* の遺伝子発現は 100 倍程度発現上昇した。AM251 を作用させた場合には、TGF-β1 刺激による *COL1A1* の遺伝子発現上昇を 90% 程度抑制することができた。以上の結果より、以降の解析は AM251 に着目して実施することにした。なお、AM251 の構造は図 6C に示す。

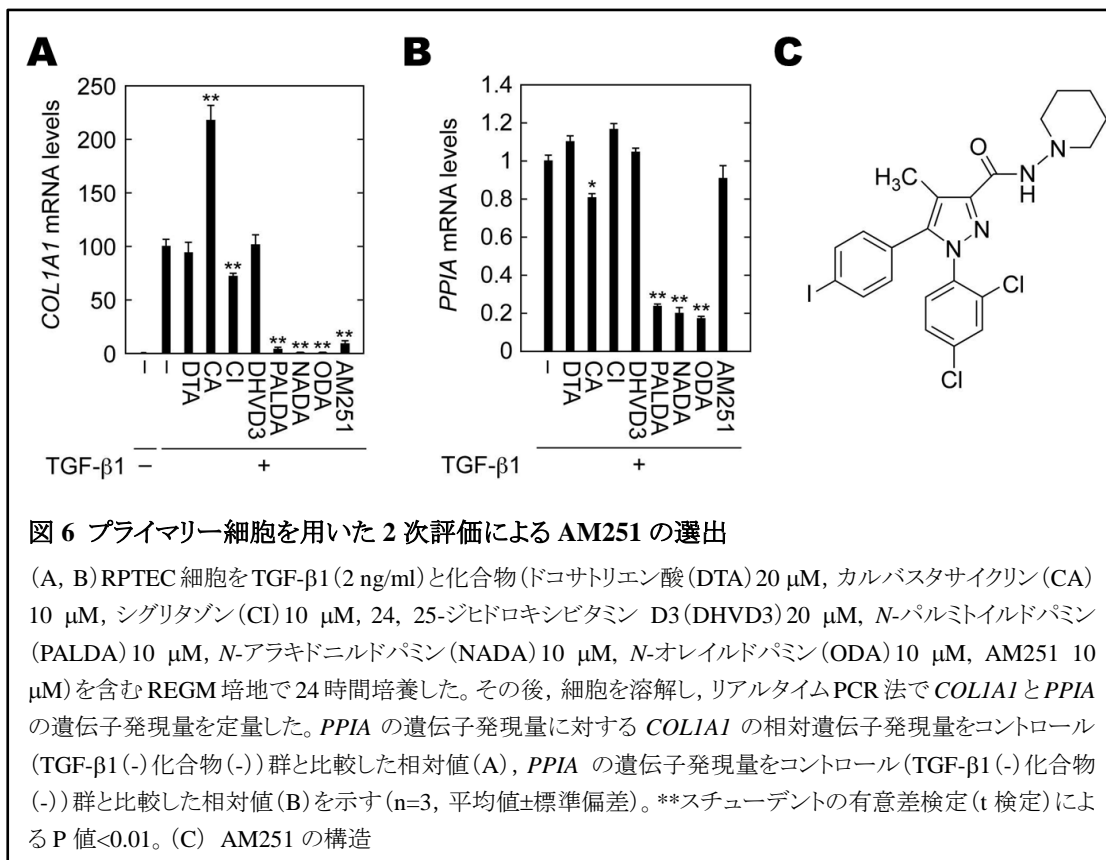


図 6 プライマリー細胞を用いた 2 次評価による AM251 の選出

(A, B) RPTEC 細胞を TGF-β1 (2 ng/ml) と化合物 (ドコサトリエン酸 (DTA) 20 μM, カルバスタサイクリン (CA) 10 μM, シグリタズン (CI) 10 μM, 24, 25-ジヒドロキシビタミン D3 (DHVD3) 20 μM, N-パルミトイルドパミン (PALDA) 10 μM, N-アラキドニルドパミン (NADA) 10 μM, N-オレイルドパミン (ODA) 10 μM, AM251 10 μM) を含む REGM 培地で 24 時間培養した。その後、細胞を溶解し、リアルタイム PCR 法で *COL1A1* と *PPIA* の遺伝子発現量を定量した。*PPIA* の遺伝子発現量に対する *COL1A1* の相対遺伝子発現量をコントロール (TGF-β1 (-) 化合物 (-) 群と比較した相対値 (A), *PPIA* の遺伝子発現量をコントロール (TGF-β1 (-) 化合物 (-) 群と比較した相対値 (B) を示す (n=3, 平均値±標準偏差)。**スチューデントの有意差検定 (t 検定) による P 値<0.01。(C) AM251 の構造

3-1-3. AM251 は長期間培養後や EMT を誘導した後でも EMT を抑制する

株化細胞である HK-2 細胞を用いたスクリーニングとプライマリー細胞である RPTEC 細胞を用いた評価は全て TGF- β 1 と化合物を含む培地で 24 時間培養した時点の EMT について評価していた。そこで次に、AM251 が 24 時間以上の長期間（48, 72, 96 時間）培養した後でも EMT 抑制効果を発揮するのかを RPTEC 細胞を用いて検証した（図 7A）。EMT の評価はスクリーニング時と同様に TGF- β 1 刺激時の *COL1A1* の遺伝子発現上昇の抑制を指標として行い、そのときの細胞毒性は内部標準遺伝子である *PPIA* の遺伝子発現量を指標に評価した（図 7B）。その結果、72, 96 時間時点では細胞毒性が認められた。しかしながら、この細胞毒性は AM251 作用群だけでなく、TGF- β 1 刺激のみを行った群においても同様に認められており、AM251 作用と TGF- β 1 刺激の両方を行った群でも同程度の細胞毒性が認められたため、これらの群を比較評価することは可能と考えられた。TGF- β 1 刺激のみを行った群では 24, 48 時間後だけでなく細胞毒性が認められた 72, 96 時間後であっても、EMT は誘導されたが、どの時点であっても AM251 を作用させることで TGF- β 1 刺激により誘導された EMT は 90%以上抑制された。以上の結果より、AM251 は比較的長期間にわたって、EMT を抑制できる可能性が示唆された。

次に、前刺激として RPTEC 細胞に 96 時間の TGF- β 1 刺激を行い、EMT を誘導した後、AM251 を作用させることで、誘導後の EMT を抑制できるか検証を行った。検証は上記同様に、TGF- β 1 刺激時の *COL1A1* の遺伝子発現上昇の抑制を指標として行い、そのときの細胞毒性は内部標準遺伝子である *PPIA* の遺伝子発現量を指標に評価した。その結果、TGF- β 1 による 96 時間の前刺激を行うことで事前に EMT を誘導した場合であっても、AM251 は TGF- β 1 刺激により遺伝子発現上昇する *COL1A1* の発現上昇を 90%以上抑制できることが示された（図 7C, D）。

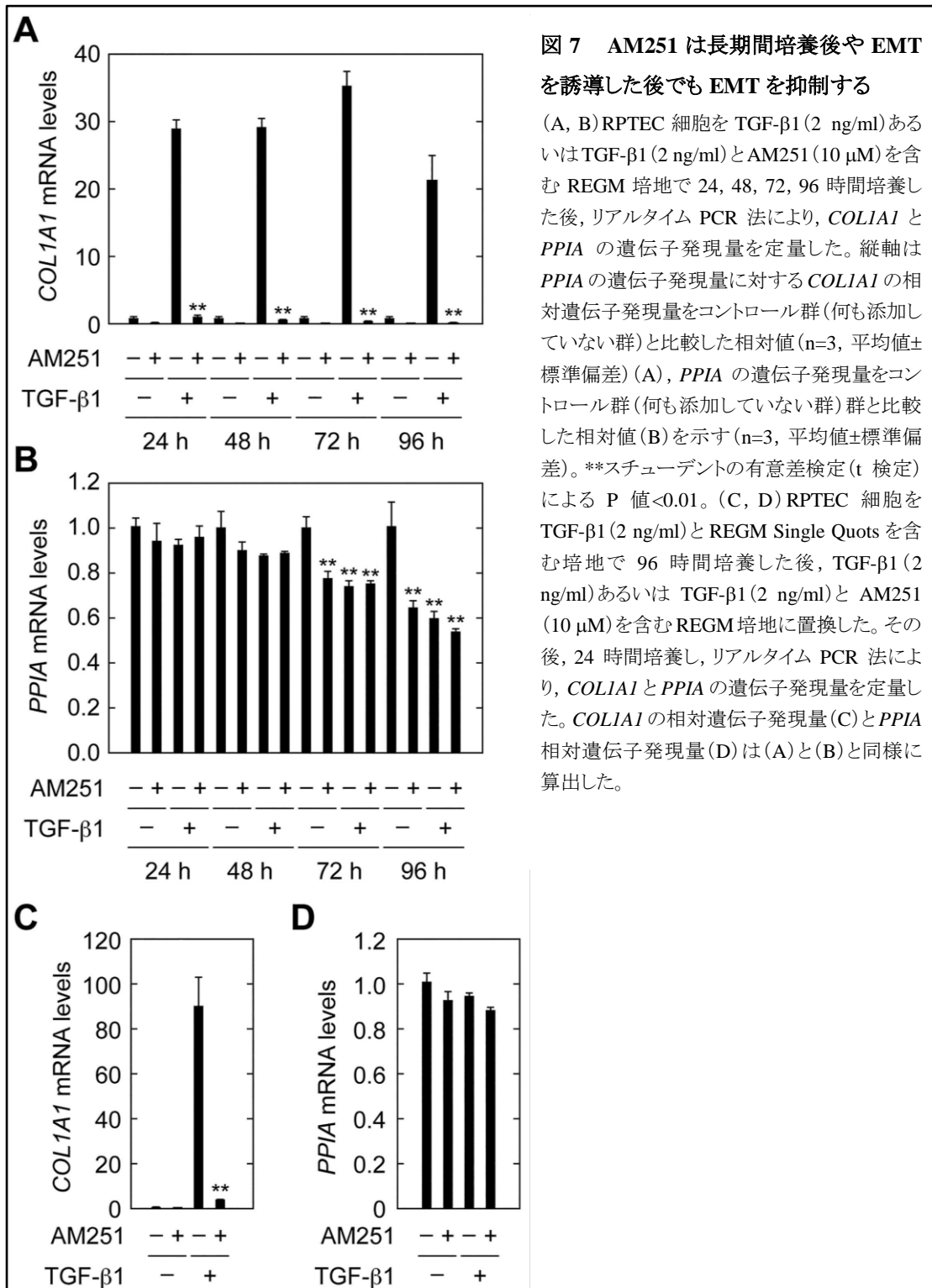


図7 AM251 は長期間培養後や EMT を誘導した後でも EMT を抑制する

(A, B) RPTEC 細胞を TGF-β1 (2 ng/ml) あるいは TGF-β1 (2 ng/ml) と AM251 (10 μM) を含む REGM 培地で 24, 48, 72, 96 時間培養した後, リアルタイム PCR 法により, *COL1A1* と *PPIA* の遺伝子発現量を定量した。縦軸は *PPIA* の遺伝子発現量に対する *COL1A1* の相対遺伝子発現量をコントロール群 (何も添加していない群) と比較した相対値 (n=3, 平均値±標準偏差) (A), *PPIA* の遺伝子発現量をコントロール群 (何も添加していない群) と比較した相対値 (B) を示す (n=3, 平均値±標準偏差)。** スチューデントの有意差検定 (t 検定) による P 値 < 0.01。(C, D) RPTEC 細胞を TGF-β1 (2 ng/ml) と REGM Single Quots を含む培地で 96 時間培養した後, TGF-β1 (2 ng/ml) あるいは TGF-β1 (2 ng/ml) と AM251 (10 μM) を含む REGM 培地に置換した。その後, 24 時間培養し, リアルタイム PCR 法により, *COL1A1* と *PPIA* の遺伝子発現量を定量した。*COL1A1* の相対遺伝子発現量 (C) と *PPIA* 相対遺伝子発現量 (D) は (A) と (B) と同様に算出した。

3-1-4. AM251 は E カドヘリンの発現を上昇させる

EMT が誘導されると *COL1A1* を始めとした筋線維芽細胞マーカーの発現が上昇するだけでなく、上皮細胞マーカーである E-カドヘリンの発現が低下する(26, 27)。そこで RPTEC 細胞に AM251 を作用させた場合の E-カドヘリンのタンパク質発現量をウェスタンブロッティング法で評価した。その結果、AM251 が不在状態で TGF- β 1 を作用させると E-カドヘリンのタンパク質量は 35%程度に減少したが、AM251 を作用させると E-カドヘリンのタンパク質量は 4 倍程度上昇し、TGF- β 1 刺激による E-カドヘリンの発現減少は回復した。(図 8A, B)。次に、E-カドヘリン (*CDHI*) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で評価した。その結果、AM251 非存在下で TGF- β 1 を作用させると *CDHI* の遺伝子発現量は 11%に減少したが、AM251 を作用させると TGF- β 1 刺激によるこの遺伝子発現減少は回復した (図 8C)。以上の結果より、AM251 は TGF- β 1 刺激による E-カドヘリンの発現低下を抑制する作用を有することが示された。

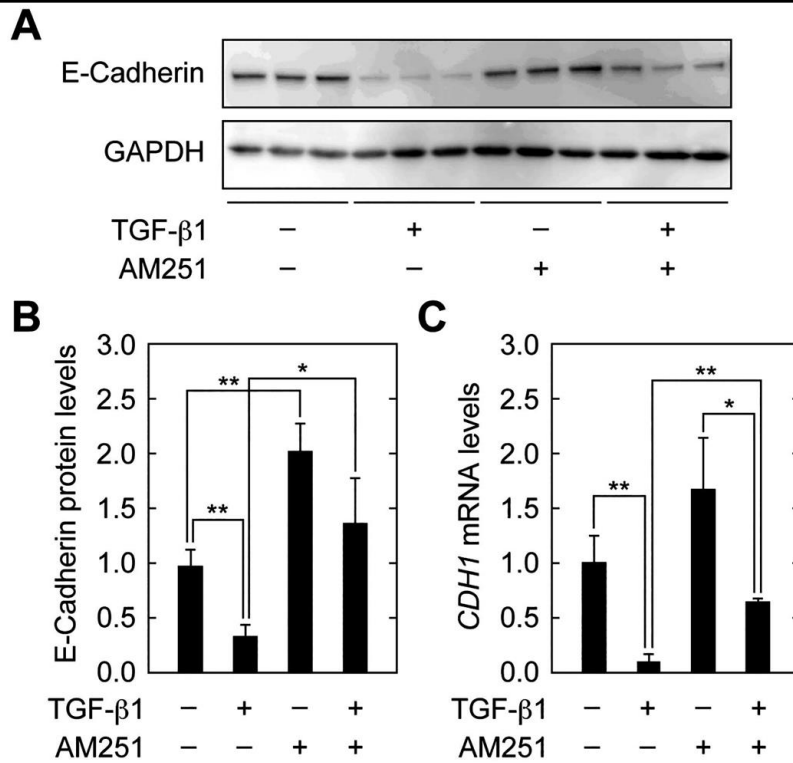


図 8 AM251 は上皮マーカー、E-カドヘリンの発現を上昇させる

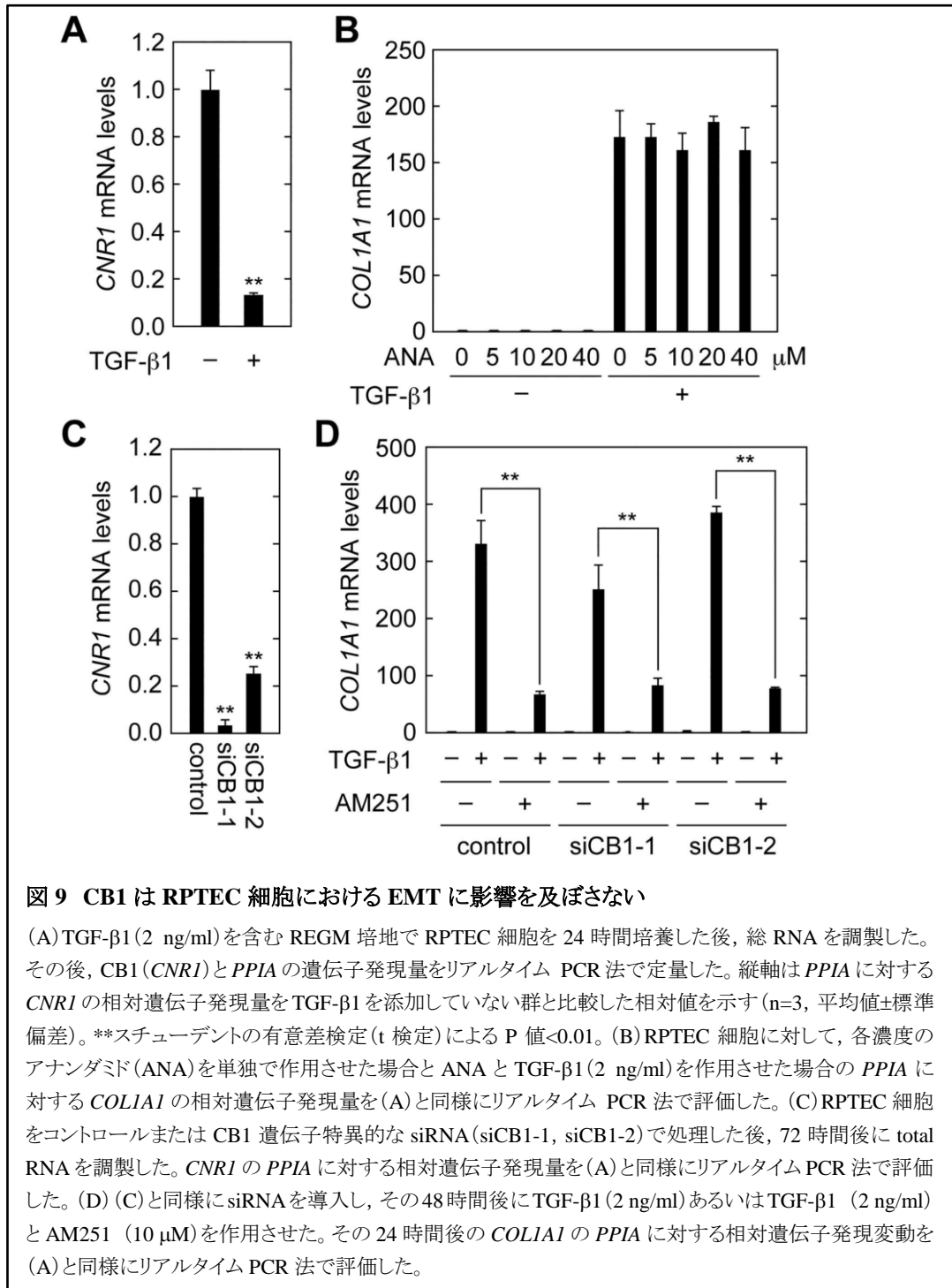
(A-C) RPTEC 細胞に図に記載の通りに AM251 (10 μ M) あるいは TGF- β 1 (2 ng/ml) を 24 時間作用させた。(A) 総タンパク質抽出液を調製し、5 μ g のタンパク質を SDS-PAGE で分離後、E-カドヘリンのタンパク質発現量をウェスタンブロットング法で評価した。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。(B) (A) の結果を何も添加していない群 (AM251 (-) TGF- β 1 (-) 群) の E-カドヘリンのタンパク質発現量を 1 として数値化した (n=3, 平均値 \pm 標準偏差)。(C) 総 RNA を調製し、リアルタイム PCR 法により、E-カドヘリン (CDH1) と PPIA の遺伝子発現量を定量した。縦軸は CDH1 の PPIA に対する相対遺伝子発現量を何も添加していない群 (AM251 (-) TGF- β 1 (-) 群) と比較した相対値を示す (n=3, 平均値 \pm 標準偏差)。* スチューデントの有意差検定 (t 検定) による P 値 < 0.05, ** t 検定による P 値 < 0.01。

3-2. AM251 が EMT を抑制する作用機序の解明

3-2-1. AM251 は既知作用点 (CB1, GPR55) を介さずに EMT を抑制する

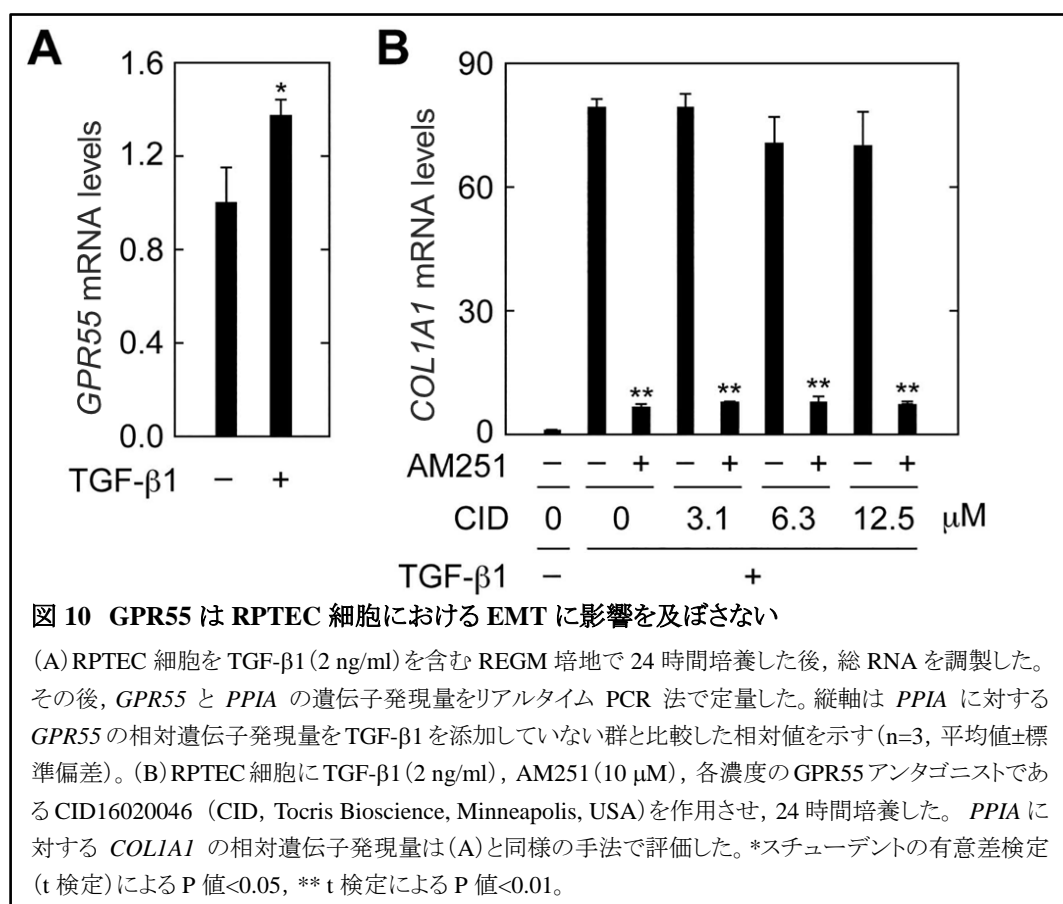
AM251 はカンナビノイドレセプタータイプ 1 (CB1; *CNR1*) に対するアンタゴニスト作用と G タンパク質共役型受容体 55 (GPR55) に対するアゴニスト作用を持つことが知られる(48, 49)。CB1 と GPR55 はいずれもカンナビノイドレセプターの 1 種である(49-51)。カンナビノイドレセプターは大麻由来のカンナビノイド類と結合し、シグナルを伝達する受容体である(49-51)。中でも CB1 は古典的カンナビノイドレセプターともいわれ、主に中枢神経系に作用する。生体内では、2-アラキドニルグリセロール (2-AG) やアナンダミド (ANA) などの内因性のカンナビノイドとも結合することが知られている(50, 51)。GPR55 は第三のカンナビノイドレセプターともいわれ、中枢神経系の他に炎症やガンなどとも関連しており、内因性のリゾホスファチジルイノシトールが代表的なリガンドとして知られている(52, 53)。そこで、我々は AM251 の既知作用である CB1 アンタゴニスト作用及び GPR55 アゴニスト作用が AM251 による EMT 抑制効果に寄与している可能性を検証した。

始めに、CB1 アンタゴニスト効果について検証した。RPTEC 細胞に対して TGF- β 1 刺激を行った場合の *CNR1* の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により評価したところ、*CNR1* の遺伝子発現は TGF- β 1 刺激時に顕著に低下した (図 9A)。CB1 アゴニストである ANA を RPTEC 細胞に作用させた場合の EMT 誘導効果を評価した結果、RPTEC 細胞には EMT は全く誘導されず、TGF- β 1 と共刺激した場合の相乗効果も認められなかった (図 9B)。さらに、CB1 の siRNA を用いて *CNR1* の遺伝子発現を抑制した際の EMT 抑制効果を評価した。2 つの独立した配列の siRNA (siCB1-1, siCB1-2) の遺伝子発現抑制効果を検証した結果、配列 siCB1-1 は *CNR1* の遺伝子発現を 97%、配列 siCB1-2 は *CNR1* の遺伝子発現を 75%程度抑制していた (図 9C)。この際、TGF- β 1 刺激によって誘導される EMT に対する抑制効果、及び TGF- β 1 刺激と共に AM251 作用させた時の AM251 による EMT 抑制効果への影響も評価した。その結果、*CNR1* の遺伝子発現を抑制した場合でも TGF- β 1 刺激によって EMT は誘導され、AM251 による EMT 抑制効果には影響しなかった (図 9D)。以上の結果から、CB1 アンタゴニスト効果は EMT 抑制作用とは直接的には関係しないことが示唆された。



次に、RPTEC 細胞における *GPR55* の遺伝子発現を評価したところ、TGF- β 1 で刺激した場合には遺伝子発現が 1.4 倍に発現上昇した (図 10A)。*GPR55* アゴニスト効果による影響を検証するために、*GPR55* アンタゴニスト (CID16020046) を用いて検証を行った結果、RPTEC 細胞に *GPR55* アンタゴニストを作用させた場合においても AM251 による EMT 抑制効果に影響は認められなかった (図 10B)。このため、AM251 の *GPR55* アゴニスト作用は AM251 による EMT 抑制効果に寄与していないことが示唆された。

以上の結果より、AM251 は既知作用である CB1 アンタゴニスト作用及び *GPR55* アゴニスト作用以外の作用によって尿細管上皮細胞の EMT を抑制している可能性が示唆された。



3-2-2. AM251 は TGF-β1 刺激時の *SNAIL1*, *FOSB*, *JUNB* の遺伝子発現誘導を抑制する

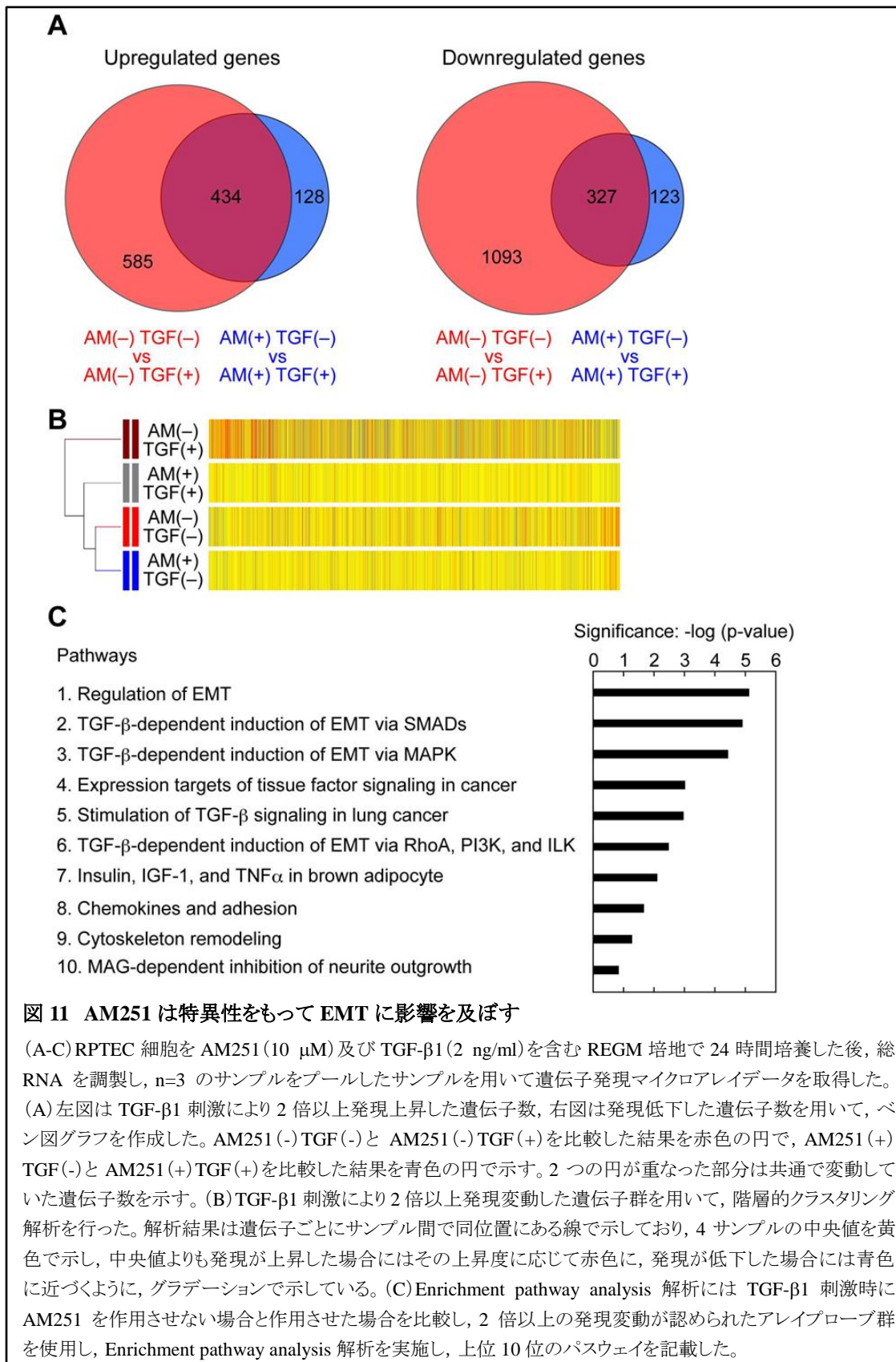
AM251 による EMT 抑制メカニズムを解析するために、遺伝子発現マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施した。遺伝子発現マイクロアレイ解析には、RPTEC 細胞に対して何も作用させずに培養したコントロール群 (AM251 (-) TGF (-)), TGF-β1 刺激のみを行った群 (AM251 (-) TGF (+)), TGF-β1 刺激を行わず、AM251 のみを作用させた群 (AM251 (+) TGF (-)), TGF-β1 で刺激すると共に AM251 を作用させた群 (AM251 (+) TGF (+)) の 4 条件の総 RNA サンプルを使用した。なお、TGF-β1 刺激及び AM251 の作用時間は 24 時間とし、細胞アッセイは n=3 で実施した。その後、総 RNA を調製し、n=3 の総 RNA サンプルをプールして遺伝子発現マイクロアレイ解析に供した。

AM251 (-) TGF (-) と AM251 (-) TGF (+) 及び AM251 (+) TGF (-) と AM251 (+) TGF (+) の条件を比較した場合に 2 倍以上の遺伝子発現変動が認められた遺伝子数について比較を行った (図 11A)。その結果、AM251 を作用させない条件で TGF-β1 刺激により 2 倍以上発現上昇した遺伝子は 1019 遺伝子、逆に 2 倍以上発現低下した遺伝子は 1420 遺伝子であった (図 11A, 赤い円)。一方、AM251 を作用させた場合には TGF-β1 刺激により 2 倍以上発現上昇したのは 562 遺伝子、2 倍以上発現低下したのは 450 遺伝子となった (図 11A, 青い円)。以上の結果より、AM251 は TGF-β1 刺激により発現上昇した 1019 遺伝子のうちの 585 遺伝子、2 倍以上発現低下した 1420 遺伝子のうちの 1093 遺伝子、合わせて 68.8% の TGF-β1 刺激による遺伝子発現変動を抑制していることが判明した。

次に、TGF-β1 刺激により発現変動する遺伝子群の遺伝子発現パターンを各サンプル間で比較するため、AM251 (-) 条件下において TGF-β1 で刺激した場合に 2 倍以上遺伝子発現変動した遺伝子群を用いて、階層的クラスタリング解析を行った (図 11B)。階層的クラスタリング解析では、類似したサンプルから順にクラスターが形成されるため、最も小さなクラスターを形成したサンプル群が最も類似した遺伝子発現パターンを示す。階層的クラスタリング解析を行った結果、最も類似した遺伝子発現パターンを示したのは何も作用させていない条件 (AM251 (-) TGF (-) 群) と AM251 のみを作用させた条件 (AM251 (+) TGF (-)) 群であった。このことから、AM251 添加が広範囲な遺伝子発現に影響を及ぼすわけではないことがわかる。また、AM251 (-) TGF (-) 群と最も遺伝子発現パターンが異なるのは AM251 (-) TGF (+) 群であったが、AM251

添加によって (AM251 (+) TGF (+) 群) 遺伝子発現パターンは, AM251 (-) TGF (-) 群に類似する方向へシフトした。これらのことから, TGF- β 1 刺激による遺伝子変動の多くを AM251 が抑制していることが示唆された。

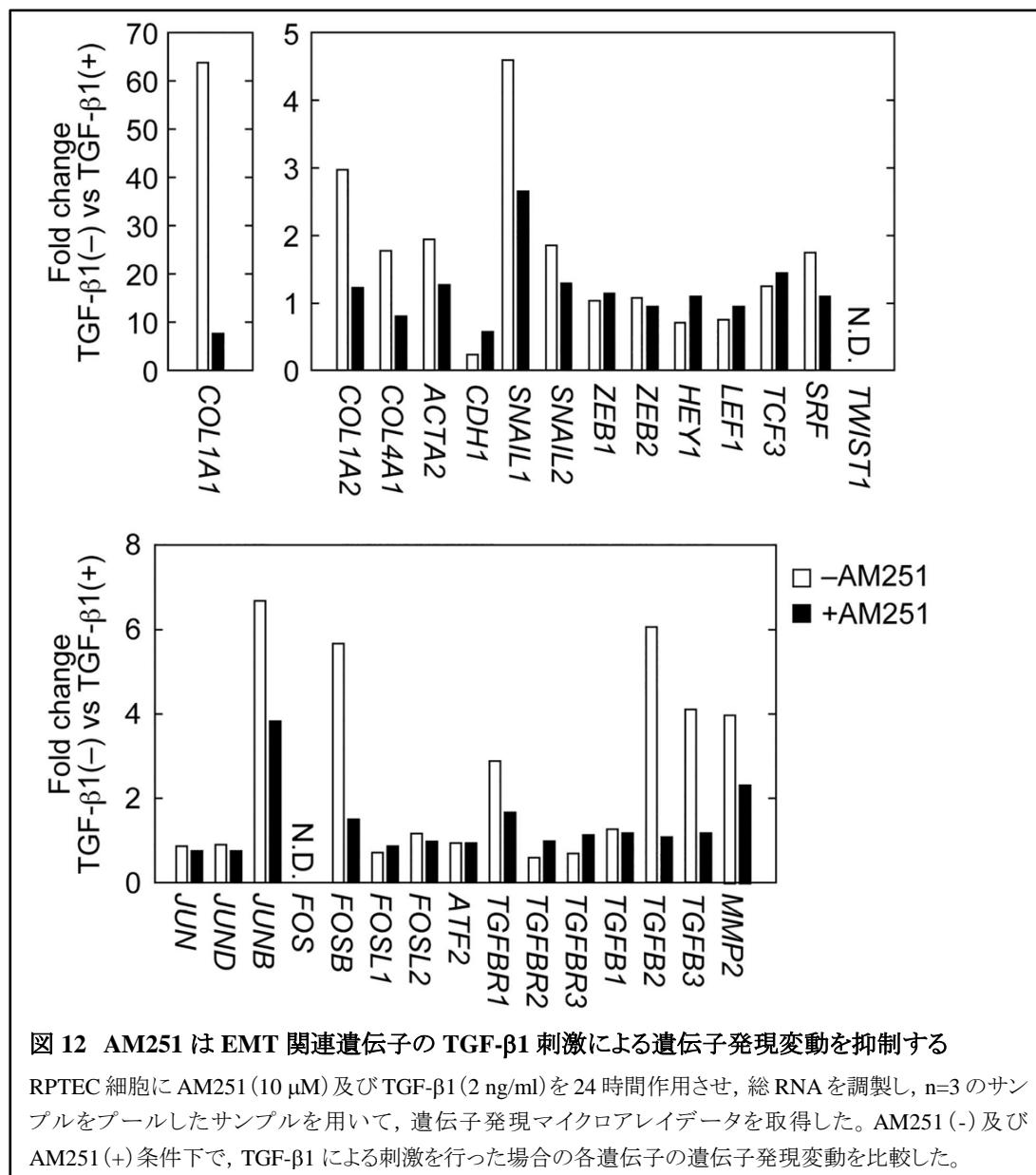
更に, これらの遺伝子発現変動がどのようなパスウェイに大きく寄与しているのかを解析するために, パスウェイ解析ソフトである Metacore を用いて, Enrichment Pathway Analysis を実施した。Metacore にはおよそ 1,500 種類のカノニカルパスウェイが搭載されており, Enrichment Pathway Analysis により解析対象の変動遺伝子群による影響が大きいパスウェイから順位化することができる。AM251 (-) TGF (+) 群と AM251 (+) TGF (+) 群を比較した場合に 2 倍以上発現変動した遺伝子群を用いて, この解析手法で解析を行った (図 11C)。その結果, 影響の大きい上位 10 個のカノニカルパスウェイのうち 5 個 (1, 2, 3, 5, 6 位) が EMT や TGF- β シグナルに関連するパスウェイであった。他に, 8 位には細胞接着に関わるパスウェイ, 9 位には細胞骨格に関わるパスウェイといずれも EMT が誘導された場合にも起こる細胞の形態変化に関わるパスウェイが含まれていた。このことから, AM251 は幅広く多くのパスウェイに対して影響しているのではなく, EMT 及び EMT に関連するパスウェイに対して比較的特異的に作用していることが明らかになった。



マイクロアレイのデータの中で、EMTに関連性が深い遺伝子の結果を図12に示す。1型及び4型コラーゲン (*COL1A1*, *Collagen1A2 (COL1A2)*, *Collagen4A1 (COL4A1)*), α SMA (*ACTA2*), E-カドヘリン (*CDH1*) は EMT の指標となる遺伝子群である。これらの遺伝子発現変動を評価したところ、*COL1A1* と *CDH1* については、図6Aと図8CにおいてリアルタイムPCR法で評価した結果と同様に、TGF- β 1刺激による発現変動をAM251が抑制する結果が得られ、他のEMTの指標となる遺伝子 (*COL1A2*, *COL4A1*, *ACTA2*) の TGF- β 1刺激による発現変動もAM251を作用させることにより抑制されていた。その他の遺伝子群はEMTに重要とされる主要な転写因子 (*SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZEB1*, *ZEB2*, *HEY1*, *LEF1*, *TCF3*, *SRF*, *TWIST1*), その上流に存在するAP-1転写因子 (*JUN*, *JUND*, *JUNB*, *FOS*, *FOSB*, *FOSL1*, *FOSL2*, *ATF2*), TGF- β レセプター (*TGFBR1*, *TGFBR2*, *TGFBR3*), TGF- β ファミリー (*TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*), マトリックスメタロプロテアーゼ *MMP2* である。主要な転写因子 (*SNAIL1*, *SNAIL2*, *ZEB1*, *ZEB2*, *HEY1*, *LEF1*, *TCF3*, *SRF*, *TWIST1*) のうち、TGF- β 1刺激により最も大きく遺伝子発現上昇する遺伝子は *SNAIL1* であり、その遺伝子発現は TGF- β 1刺激によって4.6倍に発現上昇したが、AM251を作用させた場合には発現上昇が2.7倍程度に抑制されていた。*SNAIL1* に影響する上位因子であるAP-1転写因子 (*JUN*, *JUND*, *JUNB*, *FOS*, *FOSB*, *FOSL1*, *FOSL2*, *ATF2*) の中で、TGF- β 1刺激時に *JUNB* の遺伝子発現が6.7倍、*FOSB* の遺伝子発現が5.7倍と大きく発現上昇していた。一方、AM251を作用させると *JUNB* は3.8倍、*FOSB* は1.5倍へと遺伝子発現上昇が抑制された。以上の結果より、AM251はTGF- β 1刺激時の *SNAIL1* や *JUNB*, *FOSB* の遺伝子発現上昇を抑制することでEMTを抑制していることが示唆された。

一方、TGF- β レセプター (*TGFBR1*, *TGFBR2*, *TGFBR3*) や TGF- β ファミリー (*TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB3*) の中では、TGF- β レセプター1 (*TGFBR1*) の遺伝子発現がTGF- β 1刺激によって2.9倍発現上昇したが、AM251を作用させると1.6倍へと抑制された。また、TGF- β レセプター2 (*TGFBR2*) と TGF- β レセプター3 (*TGFBR3*) はTGF- β 1刺激により50%程度に遺伝子発現が低下したが、AM251を作用させた場合にはその遺伝子発現低下が抑制された。TGF- β 1刺激を行った場合、*TGFB1* の遺伝子発現はほぼ変動しなかったが、*TGFB2* は6.0倍、*TGFB3* は4.1倍に発現上昇した。AM251を作用させた場合には、*TGFB2*, *TGFB3* 共に発現上昇が抑制された。他に、細胞外マトリックスの分解作用を持つマトリックスメタロプロテアーゼの1つである *MMP2* の遺伝子発現は、TGF- β 1刺激時に4.0倍発現上昇したが、AM251を作用させると2.3倍へと遺伝子発現上昇が抑

制された。



遺伝子発現マイクロアレイ解析により遺伝子発現変動を見出した遺伝子群のうち、特に着目するいくつかの遺伝子の発現量については、リアルタイム PCR 法によっても定量し、同様の結果が得られるか検討した (図 13)。SNAIL1 の遺伝子発現量は AM251 を作用させない場合、TGF-β1 刺激により 6.5 倍に発現上昇したが、AM251 を作用させた場合には、TGF-β1 刺激時の遺伝子発現は 20%程度に抑制された。一方、AM251 を作用させた場合には、TGF-β1 で刺激を行わない時の SNAIL1 の遺伝子発現量は 50%程度に

抑制された。また、*SNAIL2* の遺伝子発現量は TGF- β 1 刺激時に AM251 を作用させると 52.3%に抑制された。*JUNB*, *FOSB* については、AM251 を作用させない場合、TGF- β 1 刺激により、*JUNB* の遺伝子発現は 5.9 倍に、*FOSB* の遺伝子発現は 5.3 倍に上昇したが、AM251 を作用させた場合には、TGF- β 1 刺激時の遺伝子発現がいずれも 50%程度に抑制された。また、*TGFB1* は TGF- β 1 刺激により 2.9 倍に遺伝子発現上昇したが、AM251 を同時に作用させた場合には 70%程度に抑制された。AM251 を作用させない場合、TGF- β 1 で刺激すると *TGFB2* は 5.7 倍、*TGFB3* は 4.4 倍の遺伝子発現上昇が認められたが、AM251 を作用させると TGF- β 1 で刺激しても発現上昇は認められなくなった。以上の結果より、リアルタイム PCR 法によっても、遺伝子発現マイクロアレイ解析結果とほぼ同様の結果が得られることを確認した。

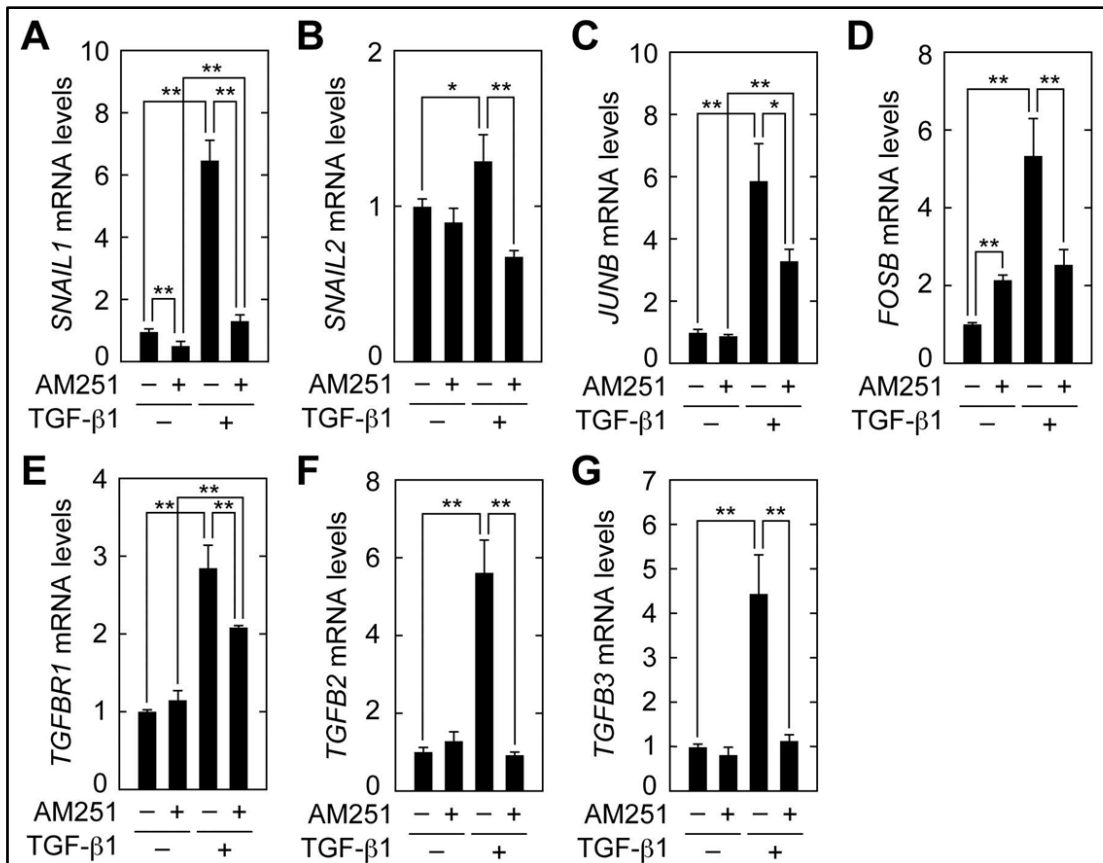
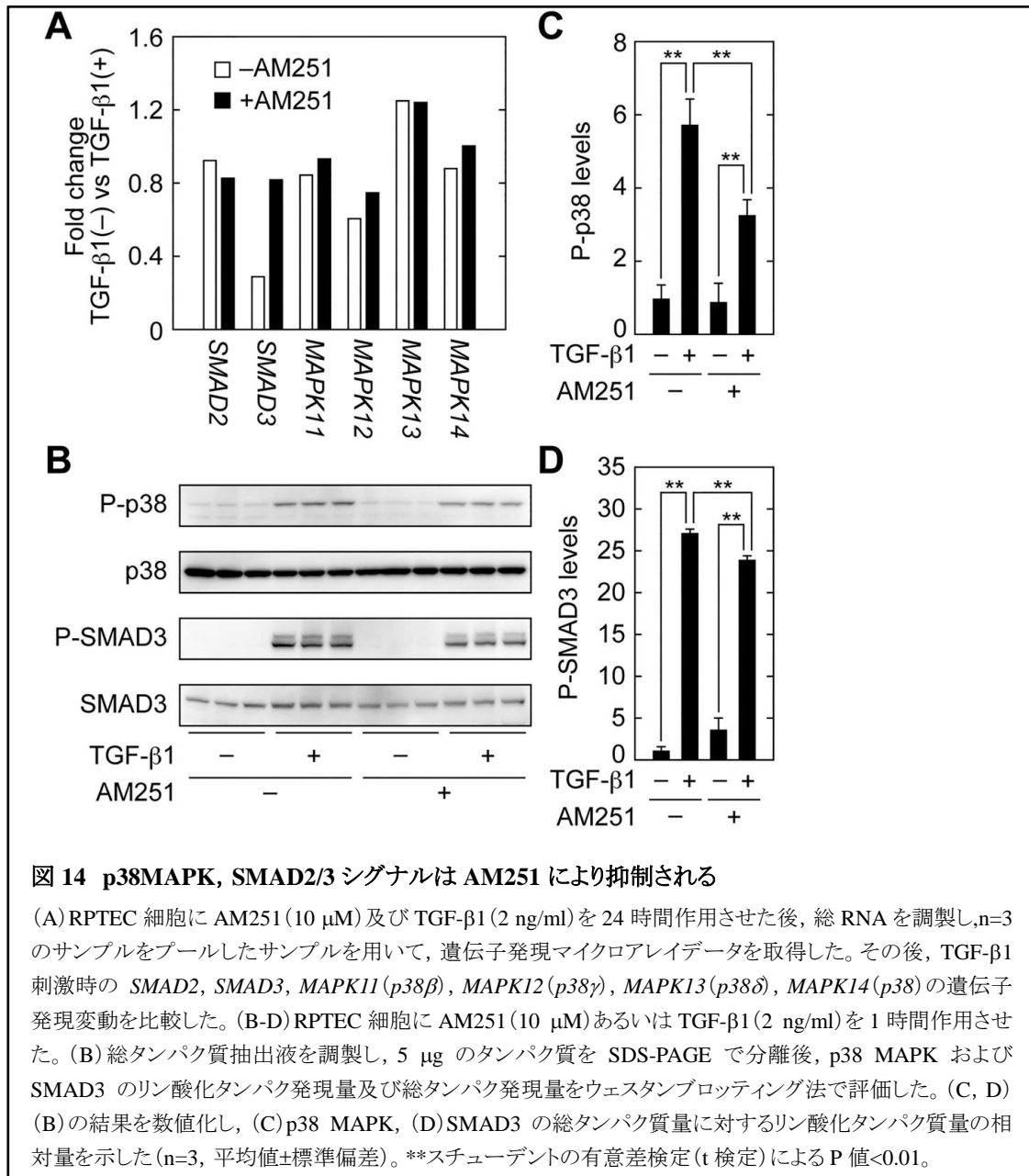


図 13 AM251 は *SNAIL1*, *JUNB*, *FOSB*, *TGFB1*, *TGFB2*, 3 の遺伝子発現誘導を抑制する
 RPTEC 細胞に AM251 (10 μ M) 及び TGF- β 1 (2 ng/ml) を 24 時間作用させた後、総 RNA を調製し、リアルタイム PCR 法により *PPIA*, *SNAIL1* (A), *SNAIL2* (B), *JUNB* (C), *FOSB* (D), *TGFB1* (E), *TGFB2* (F), *TGFB3* (G) の遺伝子発現量を定量した。縦軸は各遺伝子の *PPIA* に対する相対遺伝子発現量をコントロール群 (何も添加していない群) と比較した相対値を示す (n=3, 平均値 \pm 標準偏差)。* スチューデントの有意差検定 (t 検定) による P 値 < 0.05, ** t 検定による P 値 < 0.01。

3-2-3. AM251 は TGF- β 1 刺激時の SMAD, p38 MAPK のリン酸化を抑制する

次に TGF- β シグナルの最上流のシグナル伝達に対する AM251 の影響を検証した。TGF- β 1 刺激によって TGF- β シグナルが活性化すると最初に SMAD2/3 及び p38 MAPK ファミリーのリン酸化が亢進する (図 3)。マイクロアレイ解析の結果では SMAD2, SMAD3, MAPK11 (p38 β), MAPK12 (p38 γ), MAPK13 (p38 δ), MAPK14 (p38) の遺伝子発現に対して AM251 による抑制効果は認められなかった (図 14A)。SMAD2/3 や p38 MAPK は遺伝子発現量よりもタンパク質のリン酸化による活性化によって調節される場合が多いため、AM251 がこれらのタンパク質のリン酸化に影響を及ぼしているのかどうかを検証した。SMAD3 と p38 MAPK のリン酸化をウェスタンブロッティング法によって評価した結果、AM251 を作用させない場合には、TGF- β 1 で刺激すると p38 MAPK に対するリン酸化 p38 MAPK の割合は 5.7 倍に増加したが、AM251 を作用させると、TGF- β 1 で刺激した場合のリン酸化 p38 MAPK の割合は 3.3 倍と約半分程度の増加率へ抑制された (図 14B, C)。一方、SMAD3 に対するリン酸化 SMAD3 の割合は AM251 を作用させない場合に、TGF- β 1 で刺激すると 27 倍に増加したが、AM251 を同時に作用させると 24 倍へと増加率が 10%程度抑制された (図 14B, D)。以上の結果より、AM251 は TGF- β 1 刺激時の SMAD2/3, p38 MAPK リン酸化シグナルを抑制することが示された。また、その抑制率は MAPK の方が高かったため、AM251 は TGF- β 1 シグナルのうち、MAPK を介するシグナルの方をより強く抑制している可能性が示唆された。



4. 考察

4-1. EMT を抑制できる脂溶性化合物の探索による AM251 の同定

本研究では、まず尿細管上皮細胞において、TGF- β 1 刺激により誘導した EMT を抑制できる脂溶性化合物を同定するために、スクリーニングを実施した。その結果、尿細管上皮細胞のプライマリー細胞においても EMT を抑制できる化合物として、CB1 アンタゴニスト及び GPR55 アゴニスト作用を持つ AM251 を同定した。尿細管上皮細胞の EMT に AM251 が影響を及ぼすことはこれまでに報告のない新規知見である。一方で、ストレプトゾシン誘導糖尿病ラットモデルにおいて、AM251 が高血糖により誘導された腎尿細管肥大と線維化に対する保護作用を持つことが報告されている(54)。この報告では、AM251 が TGF- β 1, TNF- α , IL-6, フィブロネクチンの増加を抑制し、PPAR γ を活性化することが示されている。一方、肥満モデルを用いた検証では AM251 を投与してもアルブミン尿や尿細管障害に対する改善作用は認められるものの腎線維化は抑制されなかったと報告されている(55)。このことから、AM251 の効果が腎線維化モデルの種類によって異なる可能性が示唆されている。序論でも述べたように腎線維化の要因である筋線維芽細胞はさまざまな由来（線維芽細胞の形質転換や EMT, EndoMT など）をもつ。腎線維化モデルの種類により、これらの線維化に対する筋線維芽細胞の由来の程度が異なり、AM251 のこれらの細胞群に及ぼす影響が異なるためにこのような差異が生じているのかもしれない。一方で、本研究の結果より、AM251 は EMT を介した腎線維化の抑制作用を示す可能性が示唆された。

4-2. AM251 が EMT を抑制する作用機序の解明

AM251 は CB1 (*CNR1*) アンタゴニスト作用と GPR55 アゴニスト作用を持つ。CB1 と腎線維化の関連性に関しては、*CNR1* ノックアウトマウスを用い、腎線維化モデルの一つである尿細管結索 (UUO; unilateral ureteral obstruction) モデルを作成した場合に、その腎線維化が 2/3 程度に抑制されたという報告がある(56)。UUO モデルにおいては *TGF β 1* の発現上昇の他に、*CNR1* の発現上昇や生体内で CB1 の主なりガンドである 2-AG や ANA の増加が認められた。このため、UUO モデルでは CB1 へ伝達されるシグナルが増強しており、*CNR1* ノックアウトマウスではこの CB1 伝達シグナルが遮断されていると予測される。筋線維芽細胞に対して、TGF- β 1 刺激を行うことで *CNR1*

の発現が上昇することも示されており、筋線維芽細胞が形質転換すると CB1 シグナルが活性化することが示唆されている(56)。また、上述したストレプトゾシン誘導糖尿病ラットモデルにおける AM251 の効果に関しても、アンチセンスを用いて *CNR1* の遺伝子発現を抑制した場合と同様に腎線維化の指標の一つであるフィブロネクチンの増加を抑制する効果が認められたことから、CB1 シグナル抑制による効果であると考えられる(54)。一方で、尿細管上皮細胞の EMT と CB1 との関連性を評価した研究例はこれまでにない。

本研究の結果より、尿細管上皮細胞に対して ANA による CB1 アゴニスト刺激や siRNA を用いた *CNR1* の遺伝子発現抑制を行っても、TGF- β 1 刺激による *COL1A1* の遺伝子発現上昇に影響を及ぼさないことが明らかとなった (図 9B-C)。さらに、尿細管上皮細胞を TGF- β 1 で刺激すると *CNR1* の遺伝子発現量自体も低下することも示した (図 9A)。以上の結果より、尿細管上皮細胞の EMT に対しては、CB1 シグナルは寄与しないと考えられる。一方で、CB1 は EMT ではなく、筋線維芽細胞の形質転換といった腎線維化の他のメカニズムに寄与している可能性があると考えられる。

さらに本研究では、AM251 の明確な作用点は明らかとできなかったものの、TGF- β シグナルの上流に位置する SMAD2/3 や p38 MAPK のリン酸化シグナルに対して AM251 が影響を及ぼすことを明らかとした (図 14)。AM251 は SMAD2/3 リン酸化シグナルよりも p38 MAPK リン酸化シグナルに対して大きな抑制効果を発揮していた。網羅的遺伝子発現解析の結果においても、p38 MAPK の下流に存在する AP-1 転写調節因子のうち、TGF- β 1 刺激により発現誘導が認められた *JUNB* と *FOSB* の遺伝子発現を AM251 が抑制する効果が認められた (図 12, 13)。さらに AP-1 によって転写調節される *SNAIL1* も AM251 によって発現誘導が抑制された (図 12, 13)。以上の結果より、AM251 による尿細管上皮細胞の EMT 抑制効果は p38 MAPK リン酸化シグナルを抑制する効果による寄与が大きいと考えられる。一方で、AM251 は単独で作用させた場合にも、尿細管上皮細胞の定常状態の *SNAIL1* の遺伝子発現量を 50%程度に抑制した(図 13)。この結果は AM251 が TGF- β シグナル伝達の抑制以外の作用機序によっても *SNAIL1* の遺伝子発現を抑制している可能性を示唆している。*SNAIL1* はノックアウトマウスを用いた検証で、UUOモデルを作製した場合に、*SNAIL1* 遺伝子欠損が腎線維化を抑制することが報告されている(42)。このことは、*SNAIL1* が重要な EMT 関連転写因子であることを示しており、本研究において見られた AM251 による *SNAIL1* の

遺伝子発現低下が尿細管上皮細胞の EMT 抑制効果に大きく寄与していることを示唆している。

EMT が誘導された状態である部分的 EMT は TGF- β などの線維化促進因子の分泌を促進することで筋線維芽細胞の増殖・活性化に寄与する(24, 47)。このため、EMT による線維化促進因子の分泌促進を抑制することも腎線維化の抑制に寄与できると考えられる。本研究では AM251 が TGF- β 1 で刺激した場合の *TGFBR1* の遺伝子発現上昇や *TGFB2*, *TGFB3* の遺伝子発現上昇を抑制することを明らかにした (図 12, 13)。この結果から、AM251 は EMT による TGF- β の分泌を抑制することができる可能性も示唆された。

現在、尿細管の線維化を抑制することができる治療薬は存在していない。一方、本研究において AM251 は既に誘導された *COL1A1* の遺伝子発現上昇に対しても抑制効果を持つことが明らかとなった (図 7)。このことから、AM251 は線維化の進行を抑制する効果と線維化の症状を緩和する効果の双方を持つ可能性が示唆された。

臓器の線維化が生じるのは腎臓だけではなく、肺や肝臓など他の組織でも起こる現象である。EMT は肺や肝臓など腎臓以外の組織の線維化も引き起こすことが知られている(27, 38)。肝臓における検証では、肝線維化時に *SNAIL1* が活性化された。また、*SNAIL1* ノックアウトマウスを用いた肝線維化モデル(4 塩化炭素誘導モデル)では肝線維化が抑制された(57)。このため、*SNAIL1* は CKD に限らず EMT 全般を抑制でき、腎臓に限らず組織線維化を抑制できる可能性がある。今回我々が示した AM251 による *SNAIL1* 発現抑制作用のメカニズムをさらに解明することで、組織線維化を抑制するための有用な知見が得られることが期待される。

5. 材料と方法

5-1. 細胞培養

ヒト尿細管上皮細胞株である HK-2 細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) は, keratinocyte-serum free medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) に 5 ng/ml のリコンビナントヒト上皮成長因子 (Thermo Fisher Scientific) と 0.05 mg/ml のウシ脳下垂体抽出物 (Thermo Fisher Scientific), 100 U/ml ペニシリン (Thermo Fisher Scientific), 100 µg/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を添加したものをを用いて培養し, 継代 5~7 回目のもので実験に使用した。EMT を誘導する場合には TGF-β1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を最終濃度 2 ng/ml となるように添加した。ヒトプライマリー尿細管上皮細胞である RPTEC 細胞 (Lonza, Basel, Switzerland) は, renal epithelial growth media (REGM; Lonza) に REGM Single Quots (Lonza) を添加したものをを用いて培養した。REGM Single Quots には ヒドロコルチゾン, ヒト上皮成長因子, ウシ胎児血清, エピネフリン, インスリン, トリヨードサイロニン, トランスフェリン, ゲンタマイシン, アムホテリシン B といった栄養成分および成長促進因子が含まれている。RPTEC 細胞は継代 3~4 回目のもので使用した。EMT を誘導する場合には REGM Single Quots を含まない REGM 培地に TGF-β1 を最終濃度 2 ng/ml となるように添加した。ただし, TGF-β1 で 96 時間の前刺激を行う場合には, 評価前に細胞毒性の影響を生じさせないために, REGM Single Quots を含む REGM 培地を用いた。

5-2. EMT を抑制する化合物を探索するためのスクリーニング

HK-2 細胞を 2×10^4 cells/well となるように Poly-D-Lysine (PDL) でコーティングした 96 well plate に播種し, 1 晩培養した。その後, TGF-β1 を最終濃度 2 ng/ml, lipid library (Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA) の脂質及び DMSO 溶液を最終濃度が 10 µM あるいは 1 µM (DMSO 1%) となるように添加し, 24 時間培養した。Fastlane Cell SYBR Green Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて, 以下のリアルタイム PCR 法に記載するプロトコルに従い, *collagen1A1* (*COL1A1*) 及び内部標準遺伝子である *peptidylprolyl isomerase A* (*PPIA*) の遺伝子発現量を定量した。

5-3. 遺伝子発現抑制

siRNA による遺伝子発現抑制は RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用い, 製品の

プロトコルに従ったリバーストランスフェクション法により実施した。siRNA は Silencer select siRNA Select Negative Control No. 1 siRNA (Thermo Fisher Scientific) と Silencer select siRNAs for CNR1 (Thermo Fisher Scientific, s3260 (siCB1-1) 及び s3262 (siCB1-2)) を用い、最終濃度が 20 nM となるように RPTEC 細胞に導入した。EMT を誘導する場合には、RPTEC 細胞に siRNA を導入した後、48 時間培養し、その後、TGF- β 1 を最終濃度 2 ng/ml となるように添加した。

5-4. リアルタイム PCR 法

EMT を抑制する化合物の探索を実施した場合には Fastlane Cell SYBR Green Kit (Qiagen) を用いて、キットのプロトコルに従い、細胞を直接溶解してサンプルを調製した。その後、QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) とプライマー (*COL1A1* の検出には COL1A1-F と COL1A1-R, *PPIA* の検出には PPIA-F と PPIA-R を用いた; 表 1) を用いたリアルタイム PCR 法により遺伝子発現量を評価した。

それ以外の場合には、RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) を用いて、キットのプロトコルに従い、総 RNA を調製した。その後、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写を行い、cDNA を調製した。各遺伝子の遺伝子発現量は SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Shiga, Japan) を用いたリアルタイム PCR 法により評価した。遺伝子発現量の定量には 7500 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用いた。遺伝子発現量の補正には全て内部標準遺伝子である *PPIA* を使用した。各プライマーの配列は表 1 (-F, forward primer; -R, reverse primer) に示す。

5-5. 遺伝子発現マイクロアレイ解析

解析に用いた総 RNA は RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) により調製した。調製した総 RNA はアジレント 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) で RNA Integrity Number (RIN) (58, 59) によって RNA 品質を定量的に評価し、RIN 値が 8 以上のサンプルを解析に供した。

Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Agilent Technologies) を用いて 100 ng 総 RNA の逆転写反応を行い、2 本鎖 cDNA を合成した後、T7 RNA ポリメラーゼを用いた転写反応により Cy3 標識 cRNA を合成した。その後、Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を用いて、Agilent Expression Array (SurePrint G3 Human GE (G4851B) (Agilent Technologies)) に 65°C で 17 時間、ハイブリダイズした。マイクロ

アレイスライドを洗浄，乾燥させた後，SureScan マイクロアレイスキャナ G2600D (Agilent Technologies) で画像データを取得し，Feature Extraction 11.5.1.1 (Agilent Technologies) で Quality Control (QC) Report, 数値化データ (シグナル値) を算出した。データ解析は主に GeneSpring12.5 (Agilent Technologies) を用いて行った。シグナル値はサンプル間での実験誤差の影響をなくすため，アレイ全体でのシグナルレベルが同程度になるように 95 percentile shift 法による補正を行った後，サンプル間での比較解析を行った。

階層的クラスタリング解析は TGF- β 1 刺激により 2 倍以上遺伝子発現変動する遺伝子群を用いて，重心的距離法の解析アルゴリズムに基づき，実施した。Enrichment Pathway Analysis によるパスウェイ解析は，TGF- β 1 刺激のみを行った群と AM251 を作用させ，TGF- β 1 刺激を行った群を比較した場合に 2 倍以上遺伝子発現変動する遺伝子群を用いて，Metacore (Thomson Reuters, New York, USA) を用いて実施した。

5-6. ウェスタンブロットティング法

細胞は氷冷した PBS で 3 回洗浄した後，RIPA Buffer (25 mM Tris/HCl-pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) で細胞を溶解し，調製した。RIPA Buffer には，E-カドヘリンと GAPDH を検出する場合は Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (ThermoFisher Scientific), p38 MAPK と SMAD3 のリン酸化を検出する場合は Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (ThermoFisher Scientific) をいずれも製品のプロトコルに従って添加した。サンプルは Lane Marker Reducing Sample Buffer (ThermoFisher Scientific) により，60 mM Tris/HCl-pH 6.8, 1% SDS, 10% glycerol, 20 mM dithiothreitol (DTT) を含むように調製し，95°C で 5 分間加熱することでタンパク変性，還元処理を行った。タンパク質 5 μ g を SDS-PAGE で分離後，iBlot ドライブロットティングシステム (ThermoFisher Scientific) を用いてタンパク質を PVDF 転写メンブレン (ThermoFisher Scientific) にブロットティングし，ECL Prime Blocking Reagent (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England) を用いて室温で 2 時間，ブロッキングを行った。1/1000 倍に希釈した各 1 次抗体 (抗 E-カドヘリン抗体，抗 GAPDH 抗体，抗 SMAD3 抗体，抗リン酸化 SMAD3 抗体，抗 p38 MAPK 抗体，抗リン酸化 p38 MAPK 抗体 (いずれも Cell Signaling, Danvers, MA, USA)) を 4°C で一晩反応させた後，TBS-T (50 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で洗浄した。2 次抗体である horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (GE Healthcare) を

1/2000 倍に希釈し, 室温で 2 時間反応させ, TBS-T で 3 回洗浄した後, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて, ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) により検出した。定量は MultiGauge (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて行った。

表 1. 本研究に使用したプライマー

Primer	Nucleotide sequence
PPIA-F	5'-ATCTGCACTGCCAAGACTGAG-3'
PPIA-R	5'-GAAGGAATGATCTGGTGGTTAAGA-3'
COL1A1-F	5'-AAGCTTGGTCCACTTGCTTGAA-3'
COL1A1-R	5'-GAGCATTGCCTTTGATTGCTG-3'
CDH1-F	5'-GCCCATTTCTAAAAACCTGG-3'
CDH1-R	5'-TTGGATGACACAGCGTGAGAG-3'
CNR1-F	5'-CTGAGGATGATGTACTTGCCCTGA-3'
CNR1-R	5'-CTCTTGGAGGCAGCCCTACTTG-3'
GPR55-F	5'-CCAGGAGCTGCATGGCTGTA-3'
GPR55-R	5'-GGCACACCCACAGGTCCATA-3'
SNAI1-F	5'-ACTATGCCGCGCTCTTTCCT-3'
SNAI1-R	5'-AGTCCTGTGGGGCTGATGTG-3'
SNAI2-F	5'-GCTGTAGGAACCGCCGTGTC-3'
SNAI2-R	5'-ATTTGTCATTTGGCTTCGGAGTG-3'
JUNB-F	5'-CATACACAGCTACGGGATACG-3'
JUNB-R	5'-GCTCGGTTTCAGGAGTTTG-3'
FOSB-F	5'-CTCGGCCTAGGTCACGTT-3'
FOSB-R	5'-GCCAGAGTTTCTAGAAGCAGTTT-3'
TGFBR1-F	5'-AACCTGCCTAGTGCAAGTTACAA-3'
TGFBR1-R	5'-GACTAACAATGTGCTGACCCAAAG-3'
TGFB2-F	5'-GCTGAGCCAGCCAGATATAACAAGA-3'
TGFB2-R	5'-ACAGGCAAGTAGCTGATCCCAAAC-3'
TGFB3-F	5'-GGCTACTATGCCAACTTCTGCTCA -3'
TGFB3-R	5'-AGGCAGATGCTTCAGGGTTCA-3'

6. 参考文献

1. Prasad GV. (2014) Metabolic syndrome and chronic kidney disease: Current status and future directions. *World J Nephrol.* 6, 210-219
2. 一般社団法人日本腎臓学会 (2012) CKD 診療ガイド 2012, 日本腎臓学会誌 54 巻 8 号
3. 一般社団法人日本腎臓学会 (2016) 生活習慣病からの新規透析導入患者の減少に向けた提言～CKD (慢性腎臓病) の発症予防・早期発見・重症化予防～, 日本腎臓学会誌 58 巻 4 号
4. Ohtake T, Kobayashi S, Moriya H, Negishi K, Okamoto K, Maesato K, Saito S. (2005) High prevalence of occult coronary artery stenosis in patients with chronic kidney disease at the initiation of renal replacement therapy: an angiographic examination. *J Am Soc Nephrol.* 16, 1141-1148
5. Vega G, Alarcón S, San Martín R. (2016) The cellular and signalling alterations conducted by TGF- β contributing to renal fibrosis. *Cytokine.* 88, 115-125
6. Kaissling B, Le Hir M. (2008) The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects. *Histochem Cell Biol.* 130, 247-262
7. Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, Karsdal MA, Boor P. (2014) The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair.* 7, 4-17
8. Bonnans C, Chou J, Werb Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15, 786-801
9. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 349-363
10. Hinz B, Gabbiani G. (2003) Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost.* 90, 993-1002
11. Liu, Y. (2011) Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 7, 684-696
12. Grande MT, Lopez-Novoa JM. (2009) Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 5, 319-328

13. Meran S, Steadman R. (2011) Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 92, 158-167
14. Pan SY, Chang YT, Lin SL. (2014) Microvascular pericytes in healthy and diseased kidneys. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 7, 39–48
15. Curci C, Castellano G, Stasi A, Divella C, Loverre A, Gigante M, Simone S, Cariello M, Montinaro V, Lucarelli G, Ditunno P, Battaglia M, Crovace A, Staffieri F, Oortwijn B, van Amersfoort E, Gesualdo L, Grandaliano G. (2014) Endothelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis in ischaemia/reperfusion injury are mediated by complement anaphylatoxins and Akt pathway. *Nephrol Dial Transplant.* 29, 799-808
16. Piera-Velazquez S, Mendoza FA, Jimenez SA. (2016) Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *J Clin Med.* 5, 45-67
17. He J, Xu Y, Koya D, Kanasaki K. (2013) Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 17, 488-497
18. Herzog EL, Bucala R. (2010) Fibrocytes in health and disease. *Exp Hematol.* 38, 548-556
19. Bellini A, Mattoli S. (2007) The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Laboratory Investigation.* 87, 858–870
20. Sakai N, Wada T, Matsushima K, Bucala R, Iwai M, Horiuchi M, Kaneko S. (2008) The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *J Hypertens.* 26, 780-790
21. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med.* 19, 1047-1053
22. Mack M, Yanagita M. (2015) Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int.* 87, 297-307
23. Kanasaki K, Taduri G, Koya D. (2013) Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4, 7
24. Ovadya Y, Krizhanovsky V. (2015) A new *Twist* in kidney fibrosis. *Nat Med.* 21, 975-977

25. Wu CF, Chiang WC, Lai CF, Chang FC, Chen YT, Chou YH, Wu TH, Linn GR, Ling H, Wu KD, Tsai TJ, Chen YM, Duffield JS, Lin SL. (2013) Transforming growth factor β -1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am. J. Pathol.* 182, 118–131
26. Kalluri R, Neilson EG. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 112, 1776-1784
27. Lamouille S, Xu J, Derynck R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15, 178-196
28. Ruster C, Wolf G. (2011) Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 22, 1189-1199
29. Huang RY, Guilford P, Thiery JP. (2012) Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 125, 4417-4422
30. Hills CE, Squires PE. (2011) The role of TGF- β and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 131–139
31. Gao J, Zhu Y, Nilsson M, Sundfeldt K. (2014) TGF- β isoforms induce EMT independent migration of ovarian cancer cells. *Cancer Cell Int.* 14, 72
32. Derynck R, Lindquist PB, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ. (1988) A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3. *EMBO J.* 7, 3737-3743
33. Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, Lee HB. (2005) Role of reactive oxygen species in TGF- β 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 16, 667-675
34. Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A. (2005) TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell.* 16, 1987-2002
35. Phanish MK, Wahab NA, Colville-Nash P, Hendry BM, Dockrell ME. (2006) The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGF β 1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *Biochem J.* 393, 601-607
36. Sebe A, Leivonen SK, Fintha A, Masszi A, Rosivall L, Kähäri VM, Mucsi I. (2008) Transforming growth factor- β -induced α -smooth muscle cell actin expression in renal

- proximal tubular cells is regulated by p38 β mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1, 2 and the Smad signalling during epithelial-myofibroblast transdifferentiation. *Nephrol Dial Transplant*. 23, 1537-1545
37. Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM. (2012) Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res*. 347, 141-154
 38. Kalluri R, Weinberg RA. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 119, 1420-1428
 39. Xu J, Lamouille S, Derynck R. (2009) TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 19, 156-172
 40. Lv ZM, Wang Q, Wan Q, Lin JG, Hu MS, Liu YX, Wang R. (2011) The role of the p38 MAPK signaling pathway in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human renal tubular epithelial cells. *PLoS One*. 6, e22806
 41. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. (2010) Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol*. 176, 85-97
 42. Grande MT, Sanchez-Laorden B, Lopez-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arévalo M, Rowe RG, Weiss SJ, López-Novoa JM, Nieto MA. (2015) Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med*. 21, 989-997
 43. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T, Nischal H, Allison JP, Zeisberg M, Kalluri R. (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med*. 21, 998-1009
 44. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, Eggers PW, Kimmel PL, Molitoris BA, Collins AJ. (2009) Acute Kidney Injury Increases Risk of ESRD among Elderly. *J Am Soc Nephrol*. 20, 223–228
 45. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. (2015) Failed tubule recovery, AKI-CKD transition, and kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol*. 26, 1765–1776
 46. Canaud G, Bonventre JV. (2015) Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney

- disease from acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 30, 575–583
47. Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R. (2016) Partial epithelial-to-mesenchymal transition and other new mechanisms of kidney fibrosis. *Trends Endocrinol Metab*. 27, 681–695
 48. Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. (1996) 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol*. 307, 331-338
 49. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 152, 1092-1101
 50. Pacher P, Batkai S, Kunos G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 58, 389-462
 51. Skaper SD, Di Marzo V. (2012) Endocannabinoids in nervous system health and disease: the big picture in a nutshell. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 367, 3193-3200
 52. Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. (2007) Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 362, 928-934
 53. Henstridge CM, Balenga NA, Kargl J, Andradas C, Brown AJ, Irving A, Sanchez C, Waldhoer M. (2011) Minireview: recent developments in the physiology and pathology of the lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55. *Mol Endocrinol*. 25, 1835-1848
 54. Lin CL, Hsu YC, Lee PH, Lei CC, Wang JY, Huang YT, Wang SY, Wang FS. (2014) Cannabinoid receptor 1 disturbance of PPAR γ 2 augments hyperglycemia induction of mesangial inflammation and fibrosis in renal glomeruli. *J Mol Med (Berl)*. 92, 779-792
 55. Jenkin KA, O'Keefe L, Simcocks AC, Grinfeld E, Mathai ML, McAinch AJ, Hryciw DH. (2015) Chronic administration of AM251 improves albuminuria and renal tubular structure in obese rats. *J Endocrinol*. 225, 113-124
 56. Lecru L, Desterke C, Grassin-Delyle S, Chatziantoniou C, Vandermeersch S, Devocelle A, Vernochet A, Ivanovski N, Ledent C, Ferlicot S, Dalia M, Saïd M, Beaudreuil S, Charpentier B, Vazquez A, Giron-Michel J, Azzarone B, Durrbach A, François H. (2015) Cannabinoid receptor 1 is a major mediator of renal fibrosis. *Kidney Int*. 88,

72-84

57. Rowe RG, Lin Y, Shimizu-Hirota R, Hanada S, Neilson EG, Greenson JK, Weiss SJ. (2011) Hepatocyte-derived Snail1 propagates liver fibrosis progression. *Mol Cell Biol.* 31, 2392-2403
58. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* 33, e56
59. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 7, 3