HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Transforming growth factor-betal抑制を介したTJN-331の抗腎炎効果に関する基礎研究
Author(s)	三枝, 弥生
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	乙第6894号
Issue Date	2013-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6894
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53959
Type	doctoral thesis
File Information	Yayoi_Saegusa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

Transforming growth factor-beta1 抑制を介した TJN-331 の抗腎炎効果に関する基礎研究

三枝　弥生

目次

略語表 4

序章 5

第 1 章　TJN-331 の IgA 腎症モデルに対する効果の解析 8

1-1　緒言 8

1-2　材料・実験方法 10

(1)　試薬 10

(2)　IgA 腎症モデルマウスの作製および試験薬投与 10

(3)　尿中タンパク排泄量および血清クレアチニンの測定 12

(4)　血清 IgA の測定 12

(5)　IgA 腎症モデルに対する TGF-β1 中和抗体の効果 13

(6)　病理学的評価 13

(7)　免疫組織学的解析 14

(8)　*In vitro* 試験 15

(9)　統計解析 15

1-3　実験結果 16

1-4　考察 23

第 2 章　TJN-331 の抗 Thy-1 腎炎モデルに対する効果の解析 25

2-1　緒言 25

2-2　材料・実験方法 27

(1)　試薬 27

(2)　抗 Thy-1 腎炎モデルラットの作製および試験薬投与 27

(3)　尿中タンパク排泄量の測定 28

(4)　病理学的評価 29

(5)　免疫組織学的評価 29

(6)　TGF-β1 産生に対する *ex vivo* 試験 29

(7)　統計解析 30

2-3　実験結果 31

2-4　考察 39

第 3 章　TJN-331 の抗 GBM 腎炎モデルに対する効果の解析 42

3-1　緒言 42

3-2　材料・実験方法 43

(1)　試薬 43

(2)　抗 GBM 腎炎モデルラットの作製および試験薬投与 43

(3)　尿中タンパク排泄量および血清クレアチニンの測定 44

(4)　病理学的評価 45

(5) 免疫組織学的評価 45

(6) TGF-β1 産生に対する *ex vivo* 試験 46

(7) *In vitro* 試験 47

(8) TGF-β1 および TGF-β1 シグナル伝達関連遺伝子発現に関する検討 48

(9) 統計解析 49

3-4 考察 59

総括 62

関連論文 63

参考文献 64

謝辞 68

略語表

α- SMA	α- smooth muscle actin（α-平滑筋アクチン）
CMC	carboxymethylcellulose（カルボキシメチルセルロース）
ConA	concanavalin A（コンカナバリン A）
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GBM	glomerular basement membrane（糸球体基底膜）
HIGA	hyperserum IgA（高 IgA 血症）
IgA	immunoglobulin A（免疫グロブリン A）
IL-1β	interleukin-1β（インターロイキン 1β）
PAS	periodic acid Schiff（過ヨウ素酸シッフ）
PCNA	proliferating cell nuclear antigen（核内増殖抗原）
PCR	polymerase chain reaction （ポリメラーゼ連鎖反応）
TNF-α	tumor necrosis factor-α（腫瘍壊死因子）
TGF-β	transforming growth factor-β（トランスフォーミング増殖因子 β）
TGF-βRII	II 型 transforming growth factor-β 受容体（II 型 TGF-β 受容体）

序章

2002 年に米国にて慢性腎臓病の概念が提唱されてから 10 年以上が経過し、医療現場においては腎不全移行を阻止するための早期発見、早期治療の試みがなされている。しかし、未だに腎不全患者数は増加し続けており、2011 年 12 月末時点における日本の慢性透析患者数は 30 万人を超えた[1]。透析医療は患者の QOL を著しく低下させる上、医療経済を圧迫する原因の一つとして考えられており、患者救済は無論こと、医療経済学的圧迫を改善するためにも、腎機能低下にブレーキをかける腎臓疾患をターゲットとした薬剤の開発が切に望まれている。

慢性糸球体腎炎は、糸球体の炎症により、タンパク尿や血尿などの異常な尿所見や全身血圧の上昇を 1 年以上併発する病態であり、放置することで糸球体が硬化し、腎機能の低下が進行する[2]。病理像から分類される腎炎は多種にわたっており、メサンギウム増殖性糸球体腎炎（IgA 腎症、非 IgA 腎症）、膜性腎症、膜性増殖性腎炎、急速進行性糸球体腎炎など、複雑に分類されていることが治療を困難にしている要因の一つとなっている。その中でもわが国では、IgA 腎症が最も頻度が高いことが知られている[3,4]。

糸球体腎炎では、腎病変の発症と進展において免疫機序が深く関係していると考えられている。一つは、IgA 腎症のように腎糸球体成分とは直接関係のない抗原と、それに対する抗体との免疫複合体が形成されて糸球体などに沈着し炎症が起こす疾患群である。もう一つは、グッドパスチャー症候群、急速進行性糸球体腎炎などのように腎基底膜（glomerular

basement membrane : GBM）に対する自己抗体が腎に結合して病変を起こす疾患群である[2]。この免疫反応の後に生じる炎症過程が、腎炎発症の引き金を引くと考えられている。

腎メサンギウム細胞は、糸球体血管周辺に存在する線維芽細胞様の細胞であり、炎症等の刺激により増殖し、コラーゲンやファイブロネクチン等のメサンギウムマトリックスを産生する。メサンギウム細胞によるメサンギウムマトリックスの産生・蓄積、およびその結果生じるメサンギウム領域の拡大は、腎疾患における糸球体病理像の典型的な所見であり、増殖性腎炎において多く認められる[5]。Transforming growth factor-beta1（TGF-β1）は組織の線維化において重要な役割を担っており、細胞外マトリックスの産生・蓄積を促進する代表的因子である。糸球体腎炎においては、糸球体や尿細管・間質の不可逆的な線維化・硬化によって腎機能低下が進展するが、メサンギウム細胞自身や糸球体に浸潤した炎症細胞から産生される TGF-β1 によるメサンギウムマトリックスの産生・蓄積が病態の進展過程に重要な役割を果たしている[6,7]。

アクテオサイドは、チョロギ、フジテンニンソウならびに生薬の地黄に含有される化合物で、カフェ酸とフェネチルアルコールが 2 つの糖を介して結合した構造である[8]。これまでに、アクテオサイドの経口投与によりラットを用いた各種腎炎モデルにおける尿中タンパク排泄量の増加や糸球体組織病変を顕著に改善することが証明されている[8-10]。ツムラ研究所の定金らは、アクテオサイドを糸球体腎炎治療薬のシード化合物として合成展開を行い、尿中タンパク排泄量を指標にした *in vivo* スクリーニングと単離糸球体による TGF-β1

の産生量を指標とした *in vitro* スクリーニングを組み合わせて実施し、ピリジルアクリルアミド骨格を有する新規活性化合物 TJN-331（MW 326.4）を見出した[11]。

本研究は、アクテオサイド誘導体 TJN-331 の抗腎炎効果を明らかにすることを目的とした。第 1 章では日本人の罹患率が最も高い IgA 腎症に対する実験モデルを用いて、TJN-331 の効果を検証し、TJN-331 の臨床応用の可能性について考察した。続いて第 2 章では、メサンギウム増殖性腎炎の病理像の特徴であるメサンギウム細胞の増殖とマトリックス蓄積を短期間で発症させることができる抗 Thy-1 腎炎モデルラットを用いて、TJN-331 のメサンギウム領域拡大に対する直接的な作用を検証した。最後に第 3 章では、短期間で腎不全に移行する急速進行性糸球体腎炎のモデルである抗 GBM 腎炎モデルラットに対する TJN-331 の効果を検証し、本被験物質が腎炎から腎不全移行を阻止できるか否かを明確にした。

第 1 章　TJN-331 の IgA 腎症モデルに対する効果の解析

1-1　緒言

IgA腎症とは、糸球体腎炎のうちメサンギウム領域へのimmunoglobulin A（IgA）沈着を特徴とする疾患であり、メサンギウム細胞とメサンギウムマトリックスの増殖性変化がびまん性に認められる[12]。

従来、IgA腎症の実験的動物モデルとしては、高IgA 血症（hyperserum IgA：HIGA）マウス[6]やddYマウス[7]が用いられてきた。しかしながら、これら自然発症型IgA腎症モデルの病変の進行は遅く、発症機序の解明が進みにくいことが、IgA腎症に対する画期的な治療薬が開発されない原因の一つとなっている。

Satoらは[13]、ddY系マウスに食物抗原による経口免疫感作、細網内皮系の阻害により、速やかにIgA腎症を惹起する動物モデルを作成した。またKusanoらは、片側腎切除高IgA 血症（HIGA）マウスで糸球体硬化が加速することを報告している[14]。ツムラ研究所の定金らは、これらのモデルを参考にして、ddY系マウスを用い、片腎摘出、細網内皮系阻害、そして経口免疫感作の3手法を組み合わせた加速型IgA腎炎モデルを報告している[15]。この加速型IgA腎症モデルは、これまでの自然発症型のモデルと比較して、速やかにIgA沈着ならびに糸球体の病理学的変化を引き起こすことから、IgA腎症に対する薬物の有効性評価を簡便にした。

近年の研究から、ヒトのIgA腎症の進展に、TGF-β1が重要な役割を演じていることが示されてきている[16,17]。たとえば、ヒトIgA腎症の腎生検において、TGF-β1の遺伝子発現レベル

が病理学的損傷と有意に相関していること[16]、腎組織におけるTGF-β1を介した細胞外マトリックス産生がIgA腎症の進展に寄与すること[16,17]が知られている。また、培養ヒトメサンギウム細胞への、IgA腎症患者由来のIgA complexの添加により、TGF-β1 mRNA発現の増加および細胞外マトリックスの産生が誘導されることも報告されている[18]。これらの知見から、メサンギウム領域におけるTGF-β1の増加が、IgA腎症の発症・増悪に重要な役割を果たしていると考えられ、TGF-β1がIgA腎症の治療ターゲットとなりうる可能性を示している。

TJN-331 はマウスの抗 GBM 腎炎の尿中タンパク排泄抑制効果と単離糸球体を用いた TGF-β1 の産生抑制を指標に見出された合成化合物である。本章では、加速型 IgA 腎症モデル（以下、IgA 腎症モデル）に対する TJN-331 の治療効果について検討し、あわせて同腎症モデル由来の糸球体における TGF-β1 産生亢進に対する効果を確認した。

1-2 材料・実験方法

(1) 試薬

ピリジルアクリル酸誘導体の一種である(E)-N-[(3,4-dimethoxyphenethyl)]-N-methyl -3-(3-pyridyl)-2-propenamide （TJN-331, MW 326.4）は、株式会社ツムラ（Tokyo, Japan）において合成された[11]（図 1）。本化合物をリード化合物として合成された類縁体には、既にTGF-β1 産生阻害作用が報告されている[15]。本研究では、ツムラ研究所で実施した予備検討の結果から、臨床効果を判断する指標として captopril（Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA）を用いた。薬物の投与には、0.5% カルボキシメチルセルロース（CMC）-Na 懸濁液を用いた。

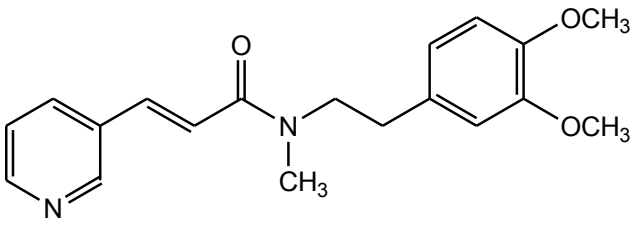

図 1　TJN-331 の構造式

(2) IgA 腎症モデルマウスの作製および試験薬投与

IgA 腎症モデルの作製には、7 週齢の雄性 ddY マウス（Japan SLC, Shizuoka, Japan）を用い、1 週間馴化後に試験に供した。全体の実験スケジュールは図 2 に示した。マウスをエーテル麻酔下にて右背部を切開し、手術用糸で右腎動脈を結紮し、縫合した。1 週間後、カー

ボン（Pilot Corp., Tokyo, Japan,）を 1%ゼラチンに懸濁して 4 mg/100 g body weight の用量で計 3 回（1 回/週）、同量のカーボンを静脈内投与した。同時に、ウシγグロブリン（Seikagaku Corp., Tokyo, Japan）を 1 g/L の濃度で飲水に添加し、実験終了まで自由に摂取させた。また 3 回目のコロイドカーボン投与から 10 週後に眼底採血を行い、血中 IgA 濃度が各群でほぼ均一になるように群分けを行なった（溶媒投与 IgA 腎症群、TJN-331（0.2 mg/kg/day）投与 IgA 腎症群、TJN-331（0.5 mg/kg/day）投与 IgA 腎症群、TJN-331（2.0 mg/kg/day）投与 IgA 腎症群、captopril（10 mg/kg/day）投与 IgA 腎症群、captopril（50 mg/kg/day）投与 IgA 腎症群、n=8）。

上記の処置を行わなかった群を非処置群（n=3）、さらに、被験物質投与前の病態を明確にする目的で、腎炎惹起 10 週目に採血ならびに解剖した Pre 群 (n=3) をそれぞれ設けた（図 2）。TJN-331（0.1, 0.5 または 2.0 mg/kg/day）あるいは captopril（10 または 50 mg/kg/day）は、IgA 腎症惹起後、10 週目から 15 週目まで 1 日 1 回経口投与した。非処置群あるいは溶媒投与 IgA 腎症モデル群には、被験物質の代わりに 0.5% CMC-Na のみを投与した（図 2）。

10 週目（Pre 群）および 15 週目（薬物投与群および非処置群）に採血ならびに左腎摘出を行い、血清クレアチニン値測定および光顕観察に供した。すべての実験プロトコールは株式会社ツムラの動物実験審査会の動物実験指針に準拠して行った。

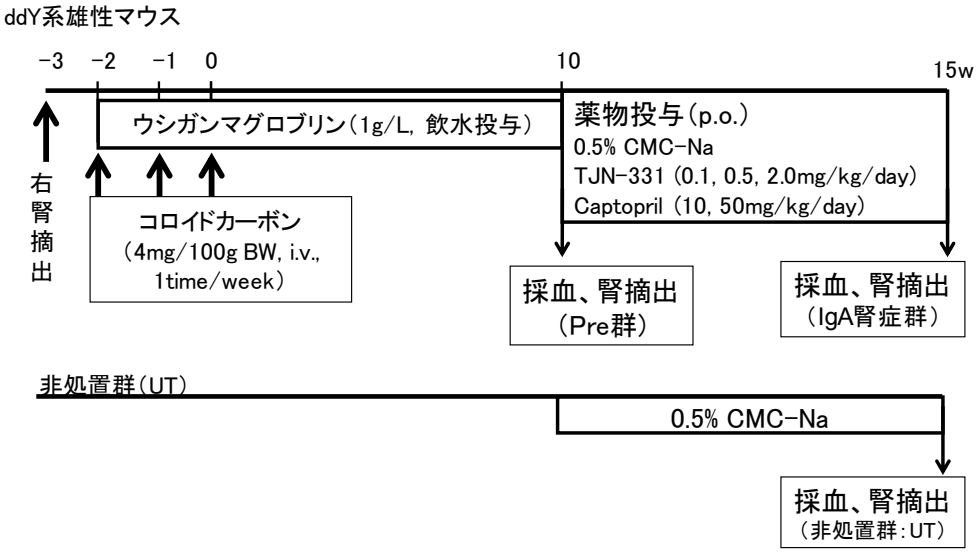

図 2　IgA 腎症モデルマウスを用いた実験スケジュール

(3) 尿中タンパク排泄量および血清クレアチニンの測定

マウス用採尿ケージを用いて 24 時間尿を採取し、遠心分離後、上清の尿タンパク量をタンパク質検出試薬トネイン TP-II（Otsuka Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan）により測定した。血液は 1 時間放置後、遠心分離し、上清を血清クレアチニンおよび IgA レベル測定のサンプルとした。血清クレアチニンレベルは TBA 20FR 自動分析装置（Toshiba, Tokyo, Japan）を用いて測定した。

(4)血清 IgA の測定

血清IgAレベルはMouse IgA ELISA Quantitation Set（Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA）を用いて測定した。ウシγグロブリンに対する特異的IgAは、0.5%ウシγグロブリンを

コートしたプレートに試料を添加し、上記kitを用いて測定した。スタンダードと1000倍希釈したサンプルを96穴プレートに添加し、4℃で一晩コートした。ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgA抗体（Cappel Co.,MA,USA）を各ウェルに加え、FL312e Bio-Kinetics multiplate reader（Bio-tek Instruments, Highland Park, Winooski,VT,USA）を用いて490nmの吸光度を測定した。

(5)IgA 腎症モデルに対する TGF-β1 中和抗体の効果

3回目のコロイドカーボン投与後、各群の体重がほぼ同等の平均値となるように、2群に群分けした（n=5）。一方の群には、マウス免疫グロブリン（BioGenesis Co.,WA, USA）を生理食塩水に溶解して7日間投与した。もう一方の群は、TGF-β1中和抗体（50μg/mouse/day）（Genzyme, Cambridge, MA, USA）を7日間静脈内投与した。腎臓は、病理学的評価のため、7日目の薬物最終投与1時間後に摘出した。

(6)病理学的評価

マウスから摘出した腎は、皮質部に切れ目を入れ、カルノア固定液（MeOH：クロロホルム：酢酸＝6:3:1）にて5時間固定後パラフィンで包埋した後、ミクロトームにて3 μmの切片とし過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色を施した。病理組織評価の際は、本研究に関わっていない観察者1名により、プレパラート標本のIDを伏せたブラインドで行なった。無作為に50個の血管極を含む糸球体を観察し、糸球体断面あたりの核数、メサンギウム領域の拡大を評

価した。メサンギウム領域拡大指数は、Rajiらの報告[19]に従い、PAS染色を施した切片を観察し、メサンギウム領域拡大の程度を0-4段階に分けて点数化し総加算した。

(7)免疫組織学的解析

糸球体における TGF-β1およびIgAの陽性領域は、既報[15]と同様に、TGF-β1および IgAに対する抗体を用いた方法を用いた。キシレンで脱パラフィンした組織切片を3%の過酸化水素メタノール溶液で5分間インキュベートし、phosphate buffered saline（PBS）で洗浄した。ヤギ血清を蒸留水に添加し、組織切片にアプライした。一次抗体（抗TGF-β1抗体 ; Genzyme, Cambridge, MA, USA、抗マウスIgA抗体 ; Cappel Laboratories, MA, USA）を100倍希釈して添加し、４℃で一晩インキュベートした。洗浄後、ビオチン化抗マウスIgG抗体（Jackson Immunoresearch）を添加し、Vectastain ABC Elite Kit（Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）で発色させ、ヘマトキシリン染色により核染色を行った。免疫染色スコアは、Kagamiらの報告[20]を改変して糸球体染色の拡大を指標により行った。本評価も、本研究に携わらない1名の観察者によるブラインド評価を行った。免疫染色スコアの判定基準は以下のとおりである。

糸球体染色陰性；0

糸球体染色弱陽性；1

糸球体の部分的染色；2

糸球体の全般的染色（50%以下）；3

糸球体の全般的染色（50%以上）；4

Score=[∑（各スコア×糸球体数）] /50

(8)*In vitro* 試験

マウスより脾臓細胞を単離し 0.5%ウシ胎児血清含有 Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 培地 1mL 中に 6 x 10^6 個で撒種した。脾臓細胞は、concanavalin A（ConA,1μg/mL, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA）存在下、TJN-331（10, 30 または 100 μmol/L）と共に 48 時間培養した。コントロールとして、溶媒は 0.7% dimethyl sulfoxide（DMSO）を用いた。また、上清中の total および成熟型 TGF-β1 濃度を Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（ELISA）法（Amersham Pharmacia Biotech, MA, USA）で測定した。

(9)統計解析

データはmean ± standard error として表記した。統計学的有意差は、one-way ANOVA後、Dunnett検定を行って算出し、p値5 %未満を有意とした。

1-3 実験結果

加速型 IgA 腎症モデルマウスに対する TJN-331 の効果について検討した。右腎動脈結紮、ならびにコロイドカーボンおよびウシ γ グロブリン投与により IgA 腎症を誘発したマウスに、溶媒もしくは TJN-331（0.1, 0.5 または 2.0 mg/kg/day）および captopril（10, 50 mg/kg/day）を投与し、解析した。

溶媒投与 IgA 腎症群の体重は、非処置群に比べて減少傾向であった（データ未掲載)。また、溶媒投与 IgA 腎症群の尿量は、非処置群と同程度で、かつ薬物投与による影響はなかった（データ未掲載)。溶媒投与 IgA 腎症群の尿中タンパク排泄量は、非処置群と比較して増加傾向であり、TJN-331 の経口投与はその増加を抑制した[非処置群: 86.2 ± 5.6 mg/dL, 溶媒投与 IgA 腎症群: 162.2 ± 5.5 mg/dL, TJN-331（2.0 mg/kg/day）投与 IgA 腎症群: 73.4 ± 9.7 mg/dL]。図 3 に示すように、溶媒投与 IgA 腎症の血清クレアチニン濃度は、非処置群のマウスや Pre 群のマウスと比較して増加傾向を示し、TJN-331 投与（2.0 mg/kg/day）はこの血清クレアチニン濃度の上昇を有意に抑制した。Captopril は 10 mg/kg/day の投与のみで有意な低下が確認された（図 3)。

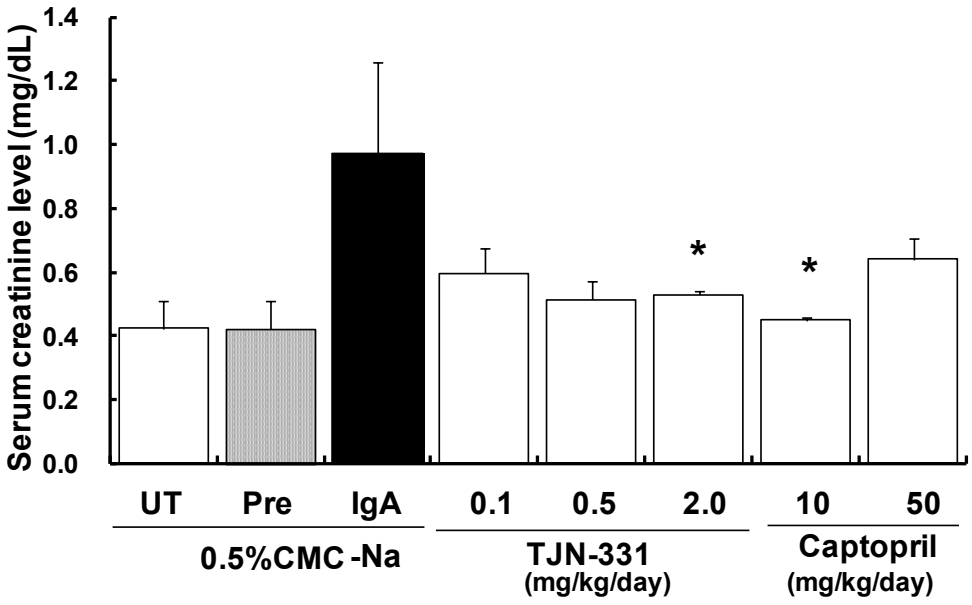

図 3　IgA 腎症モデルマウスの血清クレアチニン値に対する TJN-331 の効果

＊； *P*<0.05 vs. IgA （Dunnett test）　　Mean±S.E.M.（n=3-8）

UT；非処置群、Pre；Pre 群、IgA；溶媒投与 IgA 腎症群

TJN-331；TJN-331（0.1, 0.5 または 2.0 mg/kg）投与 IgA 腎症群

Captopril；captopril（10 または 50 mg/kg）投与 IgA 腎症群

次に、メサンギウム領域拡大と糸球体細胞数に対する TJN-331 の効果について解析した（図 4,5)。溶媒投与 IgA 腎症群は、非処置群に比べてメサンギウム領域拡大を示した（図 4AB, 5A)。一方、TJN-331（2.0 mg/kg/day）の投与は、このメサンギウム領域の拡大を有意に抑制した（図 4C, 5A）が、captopril 投与は効果が見られなかった。また、Pre 群ならびに溶媒投与 IgA 腎症群のマウスにおいては、糸球体細胞数が有意に増加した（それぞれ *P*<0.001, *t*-test, 図 5B には未掲載)。TJN-331（2.0 mg/day）の投与はその増加を有意に抑制したが、captopril の投与は効果が見られなかった（図 5B)。

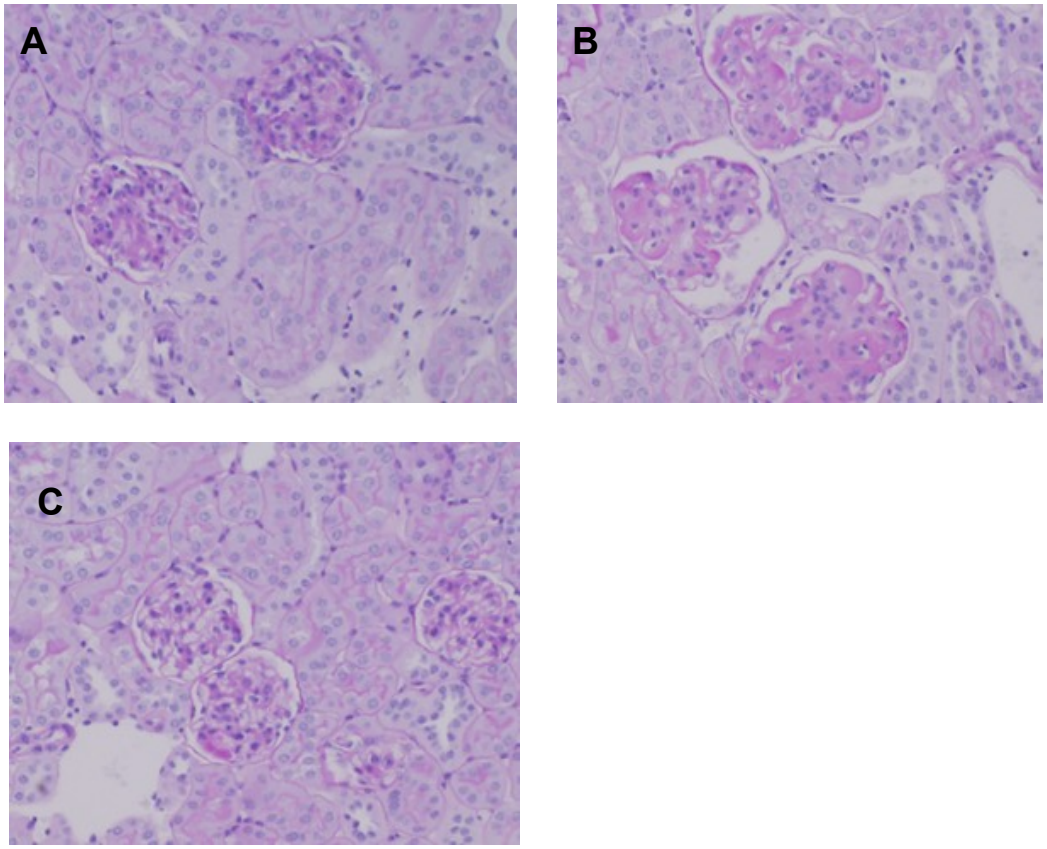

図 4　IgA 腎症モデルマウスにおける腎組織の PAS 染色像

(A)非処置群　(B) 溶媒投与 IgA 腎症群　(C) TJN-331(2.0mg/kg/day)投与 IgA 腎症群 (x200)　(B)では PAS 陽性のメサンギウム領域の拡大が認められる。

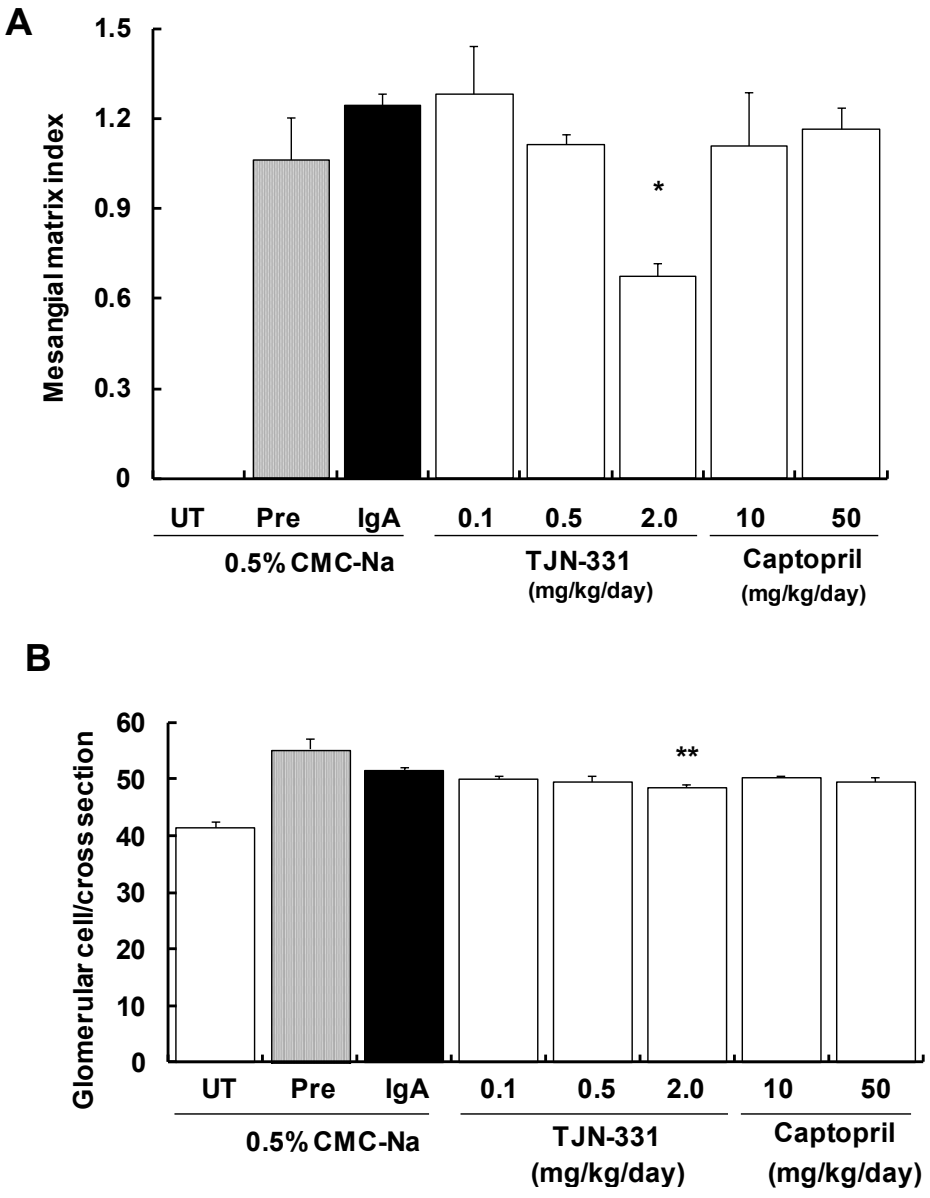

図 5　IgA 腎症モデルマウスにおけるメサンギウム領域の拡大ならびに糸球体細胞数に対する TJN-331 の効果

*, **；$P<0.05$, 0.01 vs. IgA（Dunnett test）Mean±S.E.M.（n=3-8）

UT；非処置群、Pre；Pre 群、IgA；溶媒投与 IgA 腎症群

TJN-331；TJN-331（0.1, 0.5 または 2.0 mg/kg）投与 IgA 腎症群

Captopril；captopril（10 または 50 mg/kg）投与 IgA 腎症群

次に血中 IgA レベルならびに糸球体における IgA 沈着について解析した。Pre 群のマウスは、非処置群のマウスに比べて血中 IgA レベルが高かった（Pre 群; 0.581 ± 0.06, 非処置群; 0.237 ± 0.01 OD, P<0.01）。TJN-331 および captopril の投与はこの血中 IgA レベルには影響しなかった（データ未掲載）。また、溶媒投与 IgA 腎症群では IgA 沈着が認められたが、TJN-331 および captopril の投与はその IgA 沈着には効果がなかった（表 1）。

表 1　IgA 腎症モデルマウスにおける IgA 沈着に対する TJN-331 の効果

Group	IgA staining index
Untreated ddY mice	0.100 ± 0.04
Pre treatment ddY mice	0.210 ± 0.03
Mice with IgA nephropathy	0.492 ± 0.03
＋TJN-331(0.1mg/kg/day)	0.560 ± 0.02
＋TJN-331(0.5mg/kg/day)	0.508 ± 0.03
＋TJN-331(2.0mg/kg/day)	0.464 ± 0.02
＋Captopril (10 mg/kg/day)	0.480 ± 0.02
＋Captopril (50 mg/kg/day)	0.484 ± 0.03

Untreated ddY mice；非処置群、
Pretreatment ddY mice；Pre 群
Mice with IgA nephropathy；溶媒投与 IgA 腎症群
TJN-331；TJN-331（0.1, 0.5 または 2.0 mg/kg）投与 IgA 腎症群
Captopril；captopril（10 または 50 mg/kg）投与 IgA 腎症群

次に、糸球体における TGF-β1 発現を免疫染色法により解析した。溶媒投与 IgA 腎症群と TJN-331（2.0 mg/kg/day）投与群の典型像を図 6 に示す。その結果、糸球体 TGF-β1 染色スコアは、溶媒投与 IgA 腎症群で顕著な増加を示し、TJN-331（2.0 mg/kg/day）の投与は有意にその増加を抑制したが、captopril は抑制傾向を示すのみであった（図 7）。

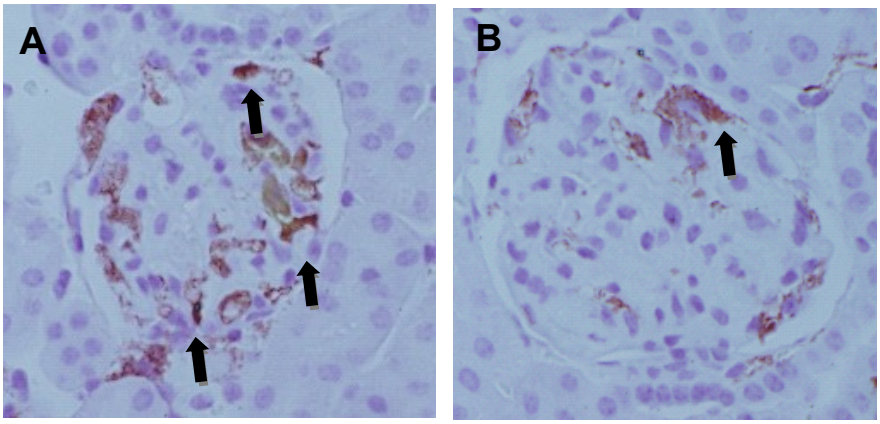

図 6　TGF-β1 の免疫染色像

（A）溶媒投与 IgA 腎症群（x300）（B）TJN-331（2.0 mg/kg/day）投与 IgA 腎症群（x300）　　矢印；TGF-β 1 陽性部位を示す。

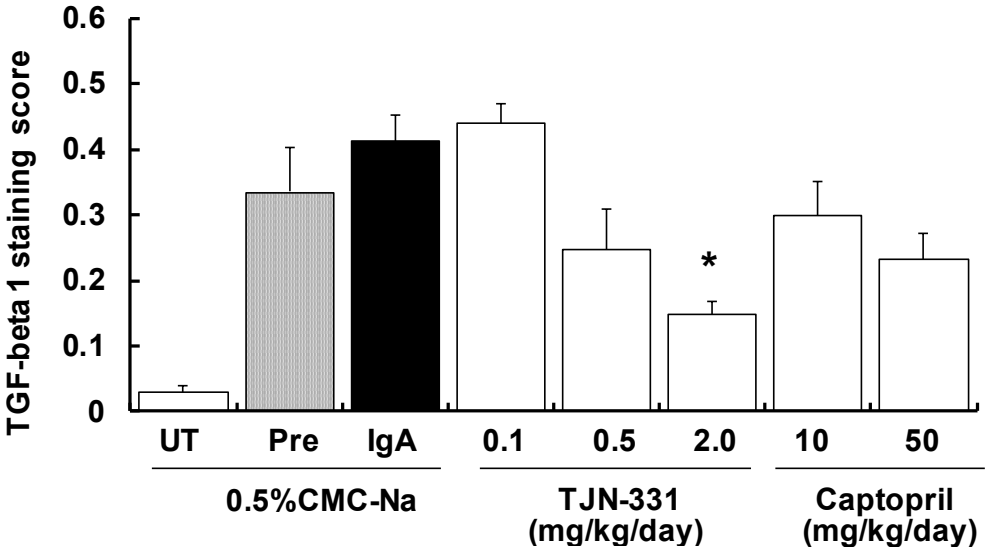

図 7　糸球体 TGF-β1 染色スコアの増加に対する TJN-331 の効果

＊；$P < 0.05$　vs.　IgA（Dunnett test）　Mean±S.E.M. (n=3-8)

UT；非処置群、Pre　；Pre 群、IgA　；溶媒投与 IgA 腎症群

TJN-331；TJN-331（0.1、0.5 または 2.0 mg/kg）投与 IgA 腎症群

Captopril；captopril（10 または 50 mg/kg）投与 IgA 腎症群

次に、TGF-β1 産生に対するTJN-331の効果を*in vitro*で検証した。TJN-331は、ConA刺激した脾臓細胞からのTGF-β1の産生を、添加濃度依存的に抑制した［溶媒処置: 90 ± 5 pg/mL; TJN-331（10 μmol/L）; 91.0 ±21 pg/mL, TJN-331（30 μmol/L）; 76.5 ± 2 pg/mL, TJN-331（100 μmol/L）; 51.3 ± 8 pg/mL］。

最後に、メサンギウム領域拡大に対するTGF-β1中和抗体の効果について検証した。TGF-β1中和抗体（50 μg/mouse/day）を投与したIgA腎症群は、コントロールIgGを投与したIgA腎症群と比較してメサンギウム領域拡大を有意に抑制した（図8）。

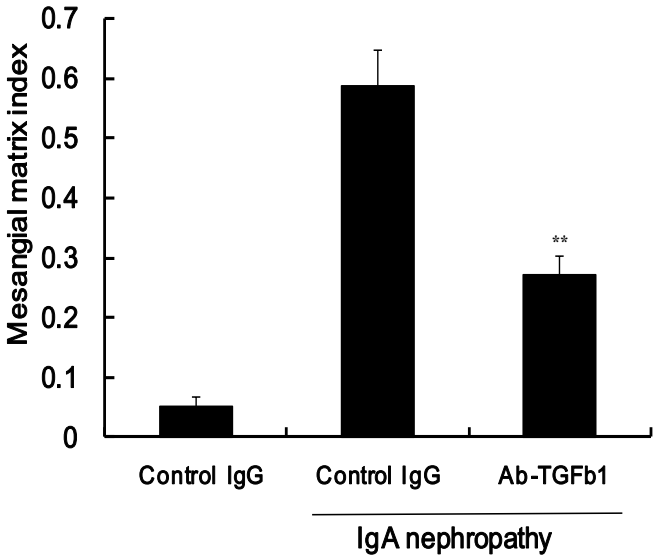

図 8　メサンギウム領域拡大に対する TGF-β1 中和抗体の効果

** ; $P < 0.01$ vs. IgA 腎症群 + Control IgG　Mean±S.E.M.（n=5）

1-4　考察

本研究において、TJN-331 は、IgA 腎症モデルマウスにおける糸球体メサンギウム領域拡大や糸球体細胞数の増加などの病理学的変化を抑制し、TGF-β1 染色スコアならびに腎組織中 TGF-β1 タンパク濃度を低下することを示した。TJN-331 の投与は、組織病変の変化は抑制したが、IgA の沈着を抑制しなかったことから、TJN-331 の作用は免疫抑制作用ではないことが考えられる。

本研究で用いた IgA モデルマウスは片腎を摘出しているため、糸球体高血圧が糸球体の組織病変の形成に寄与すると考え、本研究では、糸球体腎炎治療に広く使われている angiotensin-converting enzyme 阻害薬 captopril を対照薬物として用いた。その結果、captopril（10 mg/kg/day）は、クレアチニンレベルを低下させたが、メサンギウム領域拡大や糸球体細胞増殖は抑制しなかった。HIGA マウスを用いた検討においても、captopril は組織障害を改善しない[15]ことから、IgA 腎症の組織の障害は、糸球体高血圧のみに由来しているのではないと考えられる。

TGF-β1 は、種々の組織において、細胞外マトリックスの蓄積を促進すること知られている。本研究では、TGF-β1 中和抗体の投与は、IgA 腎症モデルマウスのメサンギウム領域拡大を抑制した。この結果は、糸球体における TGF-β1 の過剰な産生が、加速型 IgA 腎症モデルマウスの組織変化に寄与している可能性を示している。Oyama らは、IgA 腎症モデルマウスの脾臓 T 細胞や腎臓の TGF-β1 mRNA 発現上昇を報告している[21]。また、過去の報告で

は、片腎摘出は、TGF-β1 タンパク産生を介してメサンギウムマトリックスの蓄積を起こすことが示されている [22]。本研究では、TJN-331 は、ConA 刺激脾臓細胞由来の TGF-β1 産生を抑制し、IgA 腎症マウスの糸球体 TGF-β1 発現亢進を抑制したものの、TJN-331 の TGF-β1 産生阻害効果と、本モデルにおけるメサンギウム領域拡大を含めた組織病変に対する改善作用の直接的な根拠を提供できなかった。しかしながら、TJN-331 の治療的投与は、IgA 腎症モデルに有効であり、臨床効果が期待できるとともに、本化合物による TGF-β1 産生抑制効果は、抗腎炎作用メカニズムの一端を担う可能性が示唆された。

第 2 章　TJN-331 の抗 Thy-1 腎炎モデルに対する効果の解析

2-1　緒言

第 1 章の結果から TJN-331 は、TGF-β1 の産生を抑制する事により、IgA 腎症の組織病変を抑制する可能性が示唆された。本章では、TJN-331 の腎炎治療効果の作用機序をより明確にするために、より TGF-β1 に依存してメサンギウム領域拡大が発症する抗 Thy-1 腎炎[23,24]を用い、TJN-331 のメサンギウム領域拡大に対する直接的な作用を検証した。

ラット抗 Thy-1 腎炎モデルは、短期間でメサンギウム細胞の増殖とメサンギウム領域拡大を評価できうるため、薬理学的な評価に最も広く用いられている腎炎モデルである[25]。抗 Thy-1 抗体の投与により、1－2 日後に生じるメサンギウム細胞の融解に続いて、新たな細胞増殖と細胞外マトリックスの蓄積が観察され、メサンギウム増殖性腎炎様の形態を示す。このプロセスは、炎症細胞から放出されるサイトカインを始めとする様々な炎症性メディエーターによって仲介される。その中でも特に、メサンギウム細胞または浸潤細胞から分泌される TGF-β1 が、メサンギウムにおける細胞外マトリックスの蓄積に重要な役割を担っていることが知られている[23,24]。Yu らは、これまでに、TGF-β1 の中和抗体が、フィブリノーゲンあるいは I 型コラーゲンなどの細胞外マトリックスの沈着を抑制することを報告している[23]。それゆえ、抗線維化作用を有する薬剤は、糸球体腎炎の治療における新しいアプローチとなると期待され、多くの候補化合物が本モデルで評価されてきたが、今のところ臨床応用に至る化合物は見出されていない。

本章では、抗 Thy-1 腎炎モデルラットを用いて、メサンギウム細胞増殖や領域拡大に対する TJN-331 の直接作用を検証した。

2-2　材料・実験方法

(1) 試薬

TJN-331(MW 326.40) は、株式会社ツムラにおいて合成された[11]（図1）。

n-(3,4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid（Tranilast, WAKO, Tokyo, Japan）はTGF-β1の産生を抑制することが報告されている[26]ことから対照薬として用いた。薬物の投与には、0.5% CMC-Na懸濁液を用いた。

(2) 抗 Thy-1 腎炎モデルラットの作製および試験薬投与

雄性Wistarラット（Charles River Laboratories Japan, Yokohama, Japan）を用いた。実験スケジュールは図9に示した。ラットに抗Thy-1血清を0.3 ml/ratで尾静脈内投与することにより抗Thy-1腎炎を惹起した。抗Thy-1血清は、既報[10]に従い調製した。非処置群には生理食塩水を尾静脈内投与した。

抗 Thy-1 血清を静脈内投与した翌日（day1）に、尿中タンパク排泄量の平均値が各群で一定になるように、群分けした［溶媒投与抗 GBM 腎炎群、TJN-331（0.5 mg/kg/day）投与抗 GBM 腎炎群、TJN-331（2.0 mg/kg/day）投与抗 GBM 腎炎群、tranilast（300 mg/kg/day）投与抗 GBM 腎炎群、それぞれ day1,2,4,8 の計 4 点で解剖、n=7］。

Day1 から試験終了日（day8）まで、TJN-331（0.5, 2.0 mg/kg）ならびに tranilast（300 mg/kg）

を 1 日 1 回経口投与した。非処置群あるいは抗 Thy-1 腎炎モデル群には被験物質の代わりに溶媒として 0.5% CMC-Na のみを経口投与した。被験物質投与後、尿中タンパク排泄量を経時的（day 2, 4, 8）に測定した。Day1、2、4、8 に腎を摘出し、病理学的評価、免疫組織学的スコアの算出ならびに単離糸球体からの TGF-β1 濃度の測定を行った。メサンギウム領域の拡大に対する TJN-331 の直接的な作用を検証するため、糸球体のマトリックススコアならびに proliferating cell nuclear antigen（PCNA）陽性細胞の数を算出した。すべての実験プロトコールは株式会社ツムラの動物実験審査会の動物実験指針に準拠して行った。

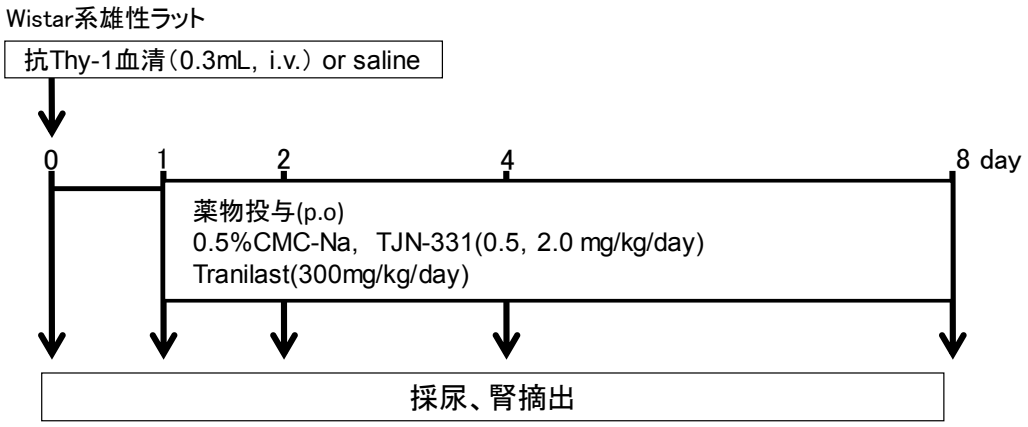

図 9　抗 Thy-1 腎炎モデルラットを用いた実験スケジュール

(3) 尿中タンパク排泄量の測定

ラットを採尿ケージに入れ、8 mL の蒸留水を負荷後、24 時間絶食絶水下の尿検体を採取した。尿中タンパク質濃度は、タンパク質検出試薬トネイン TP II（Otsuka Pharmaceutical

Co., Tokyo, Japan）を用い、595 nm の吸光度を測定することにより算出した。

(4) 病理学的評価

摘出腎は、前章1-2-(6)の方法に従って固定・包埋してパラフィン切片を作製し、PAS染色を行った。PAS染色における糸球体断面あたりのマトリックススコアは、既報[21]に従い、血管極を持つ50個の糸球体を無作為に選択し、ブラインドで半定量的に0から4点までスコア化することにより解析した。

(5) 免疫組織学的評価

TGF-β1、PCNA、TGF-β typeⅡ受容体（TGF-βRⅡ）の免疫組織学的評価を行った。前章1-2-(7)に準じて一次抗体（抗TGF-β1抗体 ; Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA,　PCNA ; Medic, Wedel, Germany,　抗TGF-β RII　抗体; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA）を用いて発色させた。免疫染色スコアは、1-2-(7)同様、Kagamiらの報告[20]を改変して行った。

(6) TGF-β1 産生に対する *ex vivo* 試験

抗Thy-1腎炎モデルラットにおける単離糸球体のTGF-β1産生に対する効果については、既報に準じて評価した[15]。抗Thy-1腎炎惹起後1, 2, 4, 8日後にペントバルビタール麻酔下にて両腎を摘出し、糸球体を単離した。糸球体の単離は、ラット各個体から摘出した腎をRPMI-1640

培地（4℃）で洗浄後、手術用ハサミで細断し、目開き212、150および75 μmメッシュの篩を順に通し、75 μm篩の上に残った糸球体をスポイトで採取することにより行った。Total および成熟TGF-β1タンパク濃度の定量はRat TGF-β1 ELISA kit（Amersham Biosciences KK, Tokyo, Japan）を用いて行った。

(7) 統計解析

データは mean ± standard error として表記した。統計学的有意差は、one-way ANOVA 後 Dunnett 検定を行って算出し、p 値 5 %未満を有意とした。

2-3　実験結果

腎炎惹起 8 日後（day8)、非処置群に比べて抗 Thy-1 腎炎群の体重は顕著に減少した（データ未掲載)。尿量は抗 Thy-1 腎炎群で減少傾向であり、薬物投与による効果は認められなかった（データ未掲載)。尿中タンパク排泄量は腎炎惹起 2 日後（day2）までに明確に増加し、day8 にはピークを迎えた。TJN-331（2.0 mg/kg/day）の投与は、day8 における尿中タンパク排泄量を減少させたが、tranilast の投与は実験期間を通じて効果が認められなかった(図 10)。

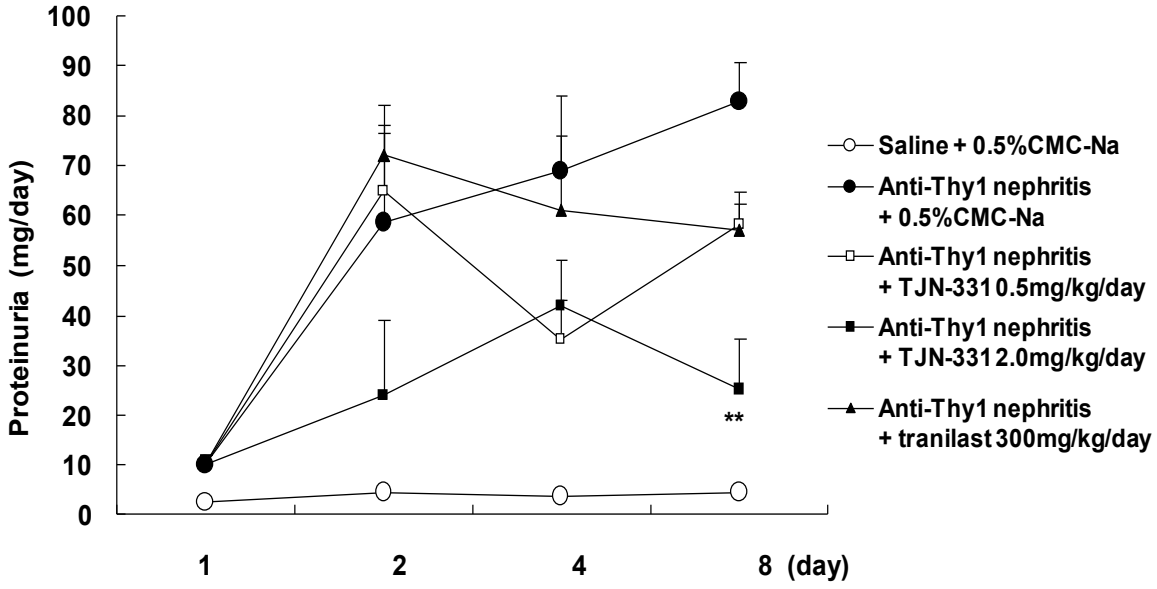

図 10　　抗 Thy-1 腎炎モデルラットの尿中タンパク排泄量に対する TJN-331 の効果

**；$P<0.01$　vs.　anti –Thy1 nephritis　（Dunnett test）　　Mean±S.E.M. (n=7)

Saline+0.5%CMC-Na；非処置群

Anti-Thy1 nephritis + 0.5%CMC-Na　；　溶媒投与抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + TJN-331；TJN-331 投与抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + tranilast；tranilast 投与抗 Thy-1 腎炎群

次に、メサンギウム領域拡大と糸球体細胞数に対する TJN-331 の効果について解析した。抗 Thy-1 腎炎群の糸球体では非処置群と比較してメサンギウム領域の拡大と糸球体細胞が増加した（図 11)。一方、TJN-331（2.0 mg/kg/day）の投与により、このメサンギウム領域の拡大は抑制されたが、tranilast 投与では効果が認められなかった。図 12A に示すように、抗 Thy-1 腎炎群の糸球体細胞数は、day2 において一旦減少したが、その後 day4 から day8 まで高い値を示した。TJN-331（2.0 mg/kg/day）投与は、抗 Thy-1 腎炎群で観察された day2 の糸球体細胞数減少および day8 の細胞数増加の両者をともに抑制した。また、図 12B に示すように、抗 Thy-1 腎炎群における糸球体 PCNA 陽性細胞数は、非処置群に比べて day4 あるいは day8 において有意に増加した（$P < 0.001$, 図 12B には表示なし)。TJN-331（2.0 mg/kg/day）の投与は、day4 ならびに day8 における PCNA 陽性細胞数の増加を抑制した（図 12B, 13)。一方、tranilast は、day4 においてのみ、糸球体細胞数および PCNA 陽性細胞数の増加を抑制した。

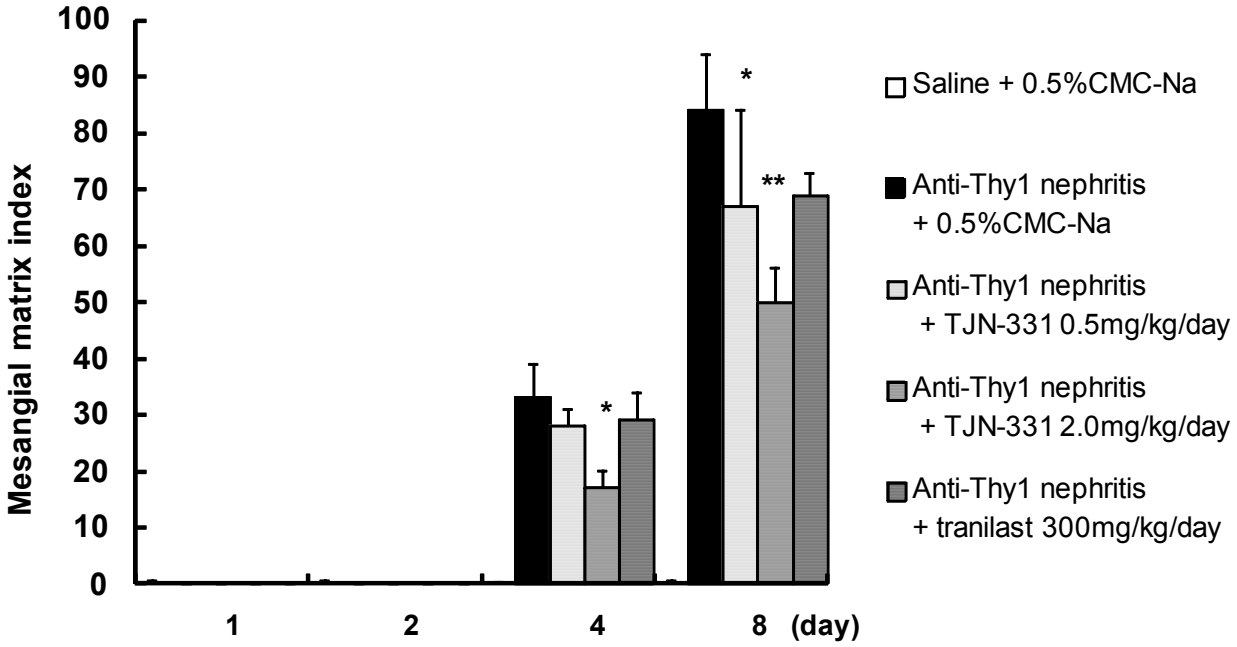

図 11　　抗 Thy-1 腎炎モデルラットのメサンギウム領域拡大に対する TJN-331 の効果

*, **；$P<0.05$,　0.01 vs. anti –Thy1 nephritis (Dunnett test) , Mean±S.E.M. (n=7)

Saline + 0.5%CMC-Na；非処置群

Anti-Thy1 nephritis + 0.5%CMC-Na　；溶媒投与抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + TJN-331；TJN-331 投与抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + tranilast；tranilast 投与抗 Thy-1 腎炎群

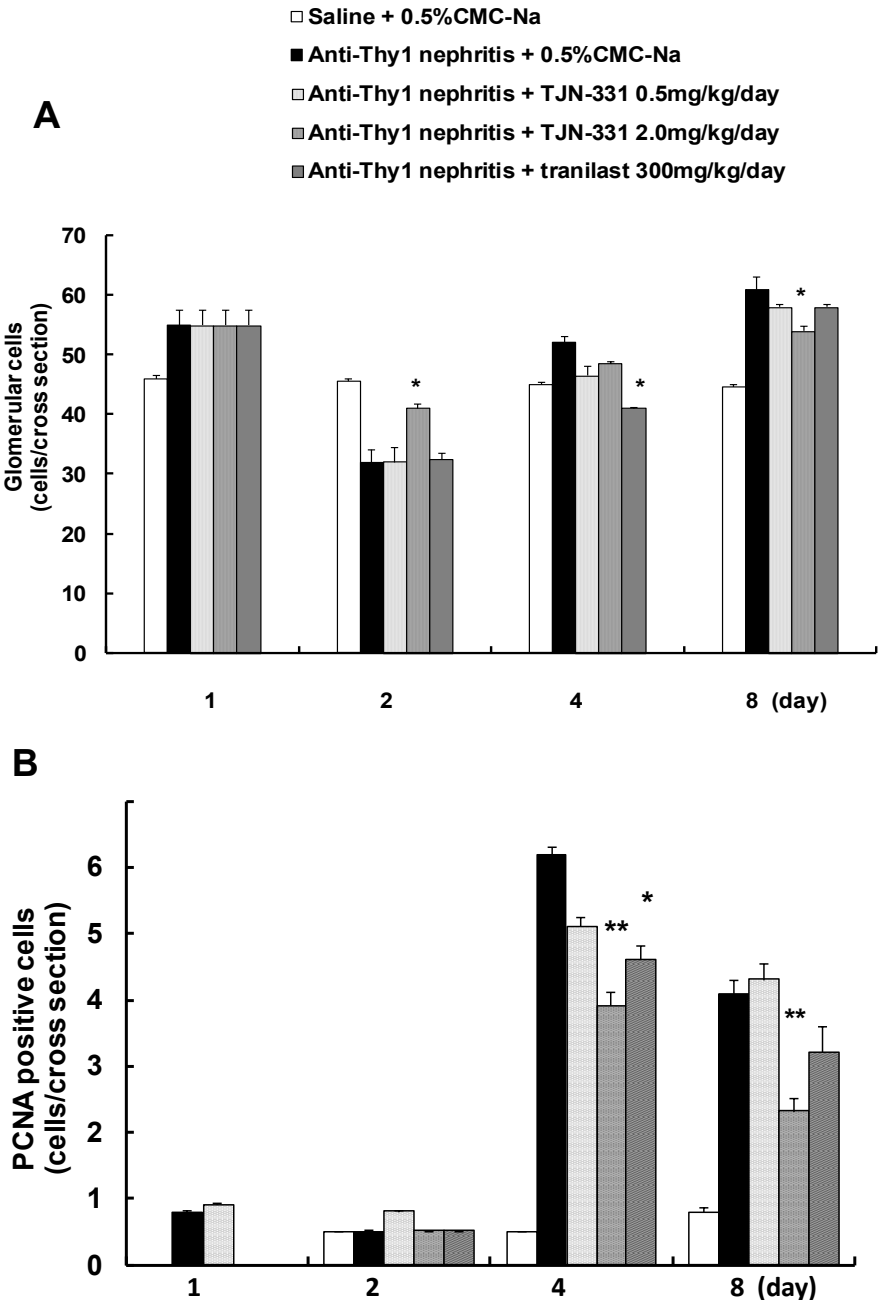

図 12　抗 Thy-1 腎炎モデルラットの糸球体細胞数および PCNA 陽性細胞数に対する TJN-331 の効果

（A）糸球体細胞数　および（B）PCNA 陽性細胞数

*,　** ; $P < 0.05, 0.01$ vs. anti –Thy1 nephritis (Dunnett test) , Mean±S.E.M. (n=7)

Anti-Thy1 nephritis + 0.5%CMC-Na　; 溶媒投与抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + TJN-331 ; TJN-331 投与抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + tranilast ; tranilast 投与抗 Thy-1 腎炎群

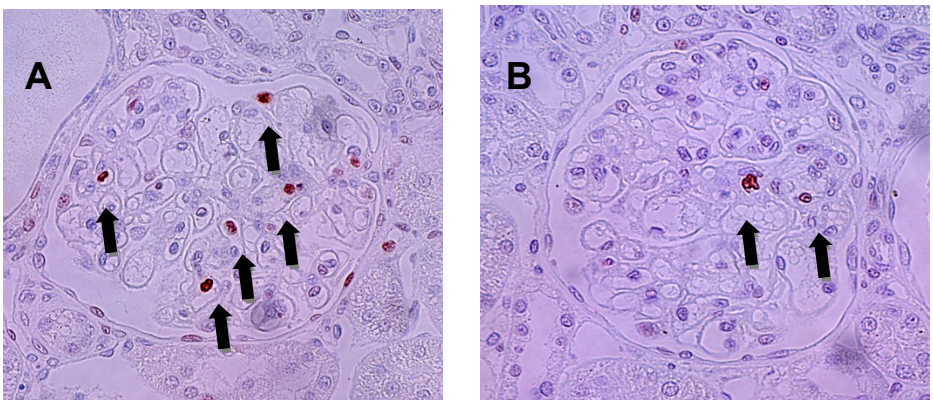

図 13　抗 Thy-1 腎炎モデルラットの PCNA 陽性細胞に対する TJN-331 の効果
（A）溶媒投与抗 Thy-1 腎炎群　（B）　TJN-331（2.0 mg/kg/day）投与抗 Thy-1 腎炎群の PCNA 陽性細胞像（Day8, x400）　矢印；PCNA 陽性細胞を示す。

次に、TGF-β1 陽性細胞数ならびに TGF-β1、TGF-βRⅡの免疫染色スコアに対する効果を算出した。

Day4、ならびにday8における抗Thy-1腎炎ラットでは、糸球体におけるTGF-β1の陽性域が増加した（図14A）。TJN-331（0.5または2.0 mg/kg/day）の投与により、day8 におけるTGF-β1陽性域は、顕著に減少した。腎炎惹起後、溶媒投与抗Thy-1腎炎群では糸球体におけるTGF-β1陽性細胞数はday8まで増加し続けたが、TJN-331およびtranilastは、day4ならびにday8においてTGF-β1陽性細胞数の増加を抑制した（図14B）。さらに、非処置群においてはTGF-βRⅡ陽性領域は認められなかったが、day8の溶媒投与抗Thy-1腎炎群においては増加した（データ未掲載）。また、TJN-331ならびにtranilast投与では、TGF-βRⅡ陽性域の増加には効果がなかった（データ未掲載）。

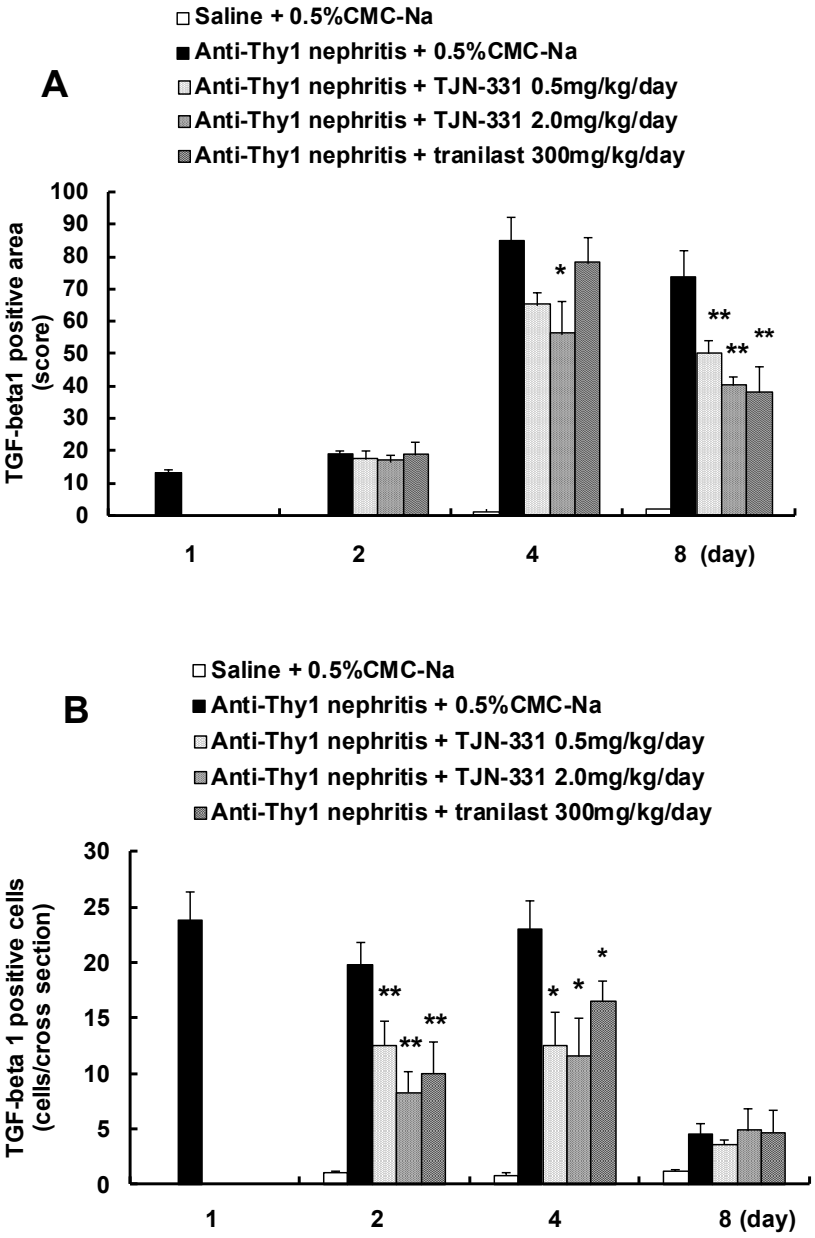

図 14　抗 Thy-1 腎炎モデルラットの TGF-β1 陽性域および TGF-β1 陽性細胞数に対する TJN-331 の効果

（A）TGF-β1 陽性域　および（B）TGF-β1 陽性細胞数

*,　** ; $P < 0.05$,　0.01　vs.　anti -Thy1 nephritis (Dunnett test) , Mean±S.E.M. (n=7)

Saline+0.5%CMC-Na　:非処置ラット

Anti-Thy1 nephritis + 0.5%CMC-Na　；溶媒投与 抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + TJN-331；TJN-331 投与 抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + tranilast；tranilast 投与 抗 Thy-1 腎炎群

最後に、ラット腎臓より単離した糸球体における TGF-β1 産生に関する検討を行った。非処置群の糸球体においては、total TGF-β1 濃度は約 500 pg/mg protein であったのに対し、抗 Thy-1 腎炎群の糸球体においては、day2 から 8 まで、約 3000 pg/mg protein と高値であった（図 15A）。TJN-331（2.0 mg/kg/day）の投与は、試験期間を通して TGF-β1 濃度の上昇を顕著に抑制した。Tranilast は、day4 においてのみ TGF-β1 濃度を低下させた（図 15A）。

また、非処置群の糸球体における成熟 TGF-β1 濃度は、約 70 pg/mg protein であったのに対し、溶媒投与 抗 Thy-1 腎炎群由来の糸球体においては、day2 から day8 まで高値を示し、day8 には約 1000 pg/mg protein に達した（図 15B）。TJN-331 および tranilast は、この成熟 TGF-β1 濃度の上昇を抑制した（図 15B）。

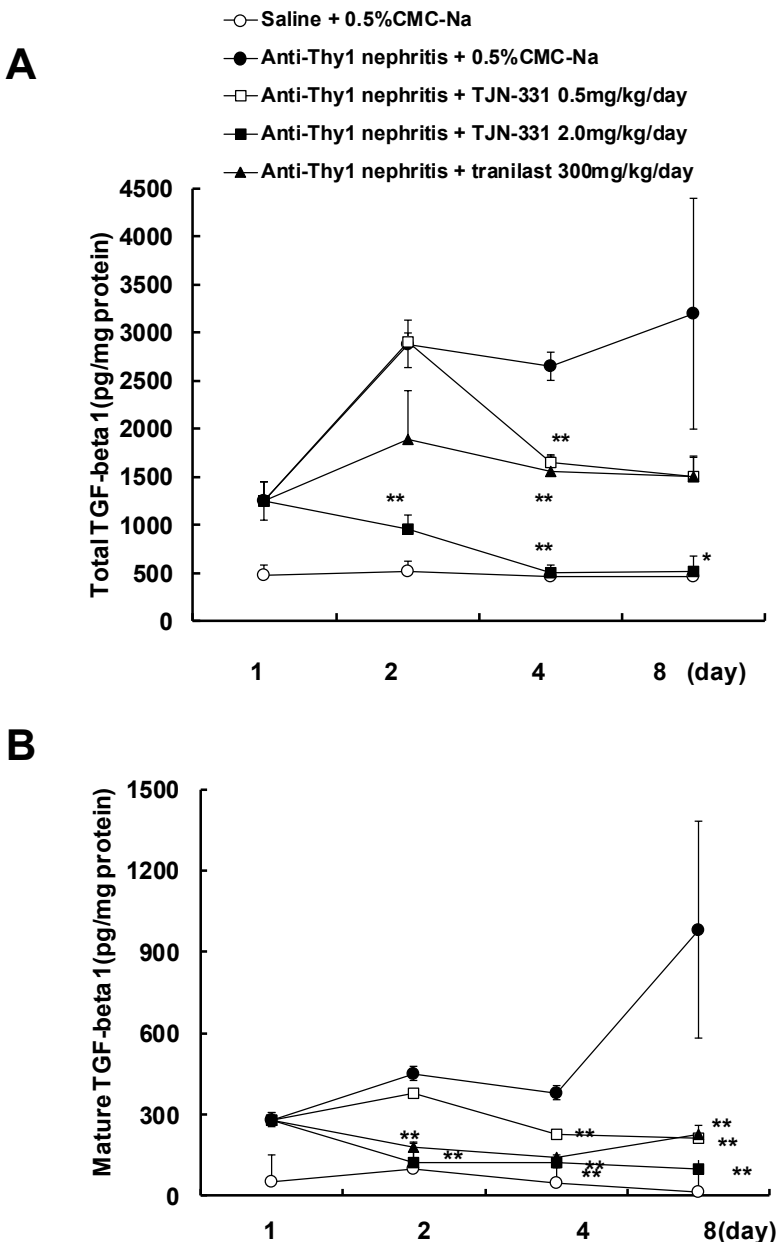

図 15　抗 Thy-1 腎炎モデルラットの糸球体由来 TGF-β1 タンパク産生に対する TJN-331 の効果

（A）　Total TGF-β1 濃度　および（B）成熟 TGF-β1 濃度

*,　** ; $P < 0.05, 0.01$ vs. anti –Thy1 nephritis (Dunnett test) , Mean±S.E.M. (n=7)

Saline+0.5%CMC-Na　；非処置群

Anti-Thy1 nephritis + 0.5%CMC-Na；溶媒投与 抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + TJN-331；TJN-331 投与 抗 Thy-1 腎炎群

Anti-Thy1 nephritis + tranilast；tranilast 投与 抗 Thy-1 腎炎群

2-4　考察

本研究において、TJN-331 は、抗 Thy-1 腎炎モデルラットにおける糸球体細胞数およびメサンギウム領域拡大を抑制することが示された。また、TGF-β1 陽性領域、陽性細胞数ならびに腎組織中の TGF-β1 タンパク濃度の増加を低下させた。さらに、TJN-331 は *ex vivo* における検討で、単離糸球体からの total および成熟型 TGF-β1 の産生増加を有意に抑制させた。

本研究で用いた抗 Thy-1 腎炎モデルラットは、抗 Thy-1 血清の投与により、メサンギウム細胞の融解と、その後の増殖およびメサンギウムマトリックスの蓄積が生じることから、腎機能低下に至るカスケードの初期段階を再現できるモデルである。特にメサンギウムマトリックスの蓄積においては、TGF-β1 の産生亢進が主要な機序であることが報告されている [23,24]。Tranilast は、抗 Thy-1 腎炎モデルラットにおいて、TGF-β1 合成を阻害し、メサンギウム領域の細胞増殖および白血球の蓄積を抑制することが報告されている [26,27]。そのため、今回の実験では tranilast を対照薬として用いた。Tranilast は、抗 Thy-1 腎炎モデルラットにおいて増加した PCNA ならびに TGF-β1 陽性細胞数を抑制したが、尿中タンパク排泄量やメサンギウム領域の拡大には効果がなかった。しかし、より高用量の tranilast（400 mg/kg/day）を投与した報告 [27] では、尿中タンパク排泄量や病理組織の改善が認められていたことから、本研究での投与量が治療域に達していなかった可能性は否定できない。

一方、TJN-331 は、抗 Thy-1 腎炎極初期に起こる糸球体細胞減少に加え、メサンギウム

領域拡大、糸球体細胞数増加のほか、メサンギウム細胞増殖の指標である PCNA 陽性細胞の増加も抑制した。これらの結果は、TJN-331 の投与が、メサンギウム領域の拡大ばかりではなく、糸球体細胞増殖や、炎症性細胞の浸潤を抑制する可能性が示唆され、炎症過程に作用を有する可能性は捨てきれなかった。しかし今回の検討では、すでに炎症反応が終息した抗 Thy-1 腎炎惹起 4 日後から TJN-331 を投与した場合でも、今回の結果と同様にメサンギウム領域拡大抑制作用が認められた（データ未掲載）。このことから、TJN-331 は、メサンギウムマトリックスの増加を直接阻害することは十分に考えられた。

今回、抗 Thy-1 腎炎モデルラットの糸球体において、TGF-β1 陽性領域および TGF-βRⅡの染色スコアならびに TGF-β1 陽性細胞数の増加が認められた。これらの結果から、本モデルにおいては TGF-β1 のシグナル亢進が起こっていることが推察される。Tranilast は、ケミカルメディエーター遊離抑制作用を有しており、白血球蓄積を阻害する [26]。両薬物は、TGF-β1 陽性細胞の糸球体への浸潤を抑制し、あるいは浸潤細胞あるいはメサンギウム細胞の TGF-β1 合成を直接阻害するかもしれない。

TJN-331のTGF-β1に対する直接作用は、単離糸球体を用いた*ex vivo*試験にて評価した。腎炎惹起後、経時的にtotal および成熟TGF-β1濃度が増加したが、これらは単球などの炎症細胞およびメサンギウム細胞に由来すると考えられる。腎炎惹起後4日以降、メサンギウム細胞増殖とTGF-β1陽性細胞増加がほぼ同時に起こっていることから、TGF-β1の産生源は、炎症細胞からメサンギウム細胞由来へとシフトすると推察できるかもしれない。なお、抗

Thy-1腎炎モデルに対するTJN-331の投与は、トータルおよび成熟TGF-β1濃度を抑制し、tranilastでも同様の結果が得られた。このことから、TJN-331は腎炎糸球体で産生される過剰なTGF-β1産生を確実に抑制する作用があることは間違いないであろう。本モデルのメサンギウム領域の拡大がTGF-β1依存的に生じることから、TJN-331の抗腎炎作用にはTGF-β1産生阻害が重要な役割を演じているかもしれない。

Tranilastは、TGF-β1 mRNAの発現を阻害することにより、TGF-β1タンパク産生を抑制することが報告されている[26]。TJN-331の抗Thy-1腎炎群の腎TGF-β1mRNA発現に対する作用について*in situ hybridization*法を用いて予備的に検証したところ、TJN-331は、抗Thy-1腎炎群のTGF-β1 mRNA発現増加を抑制しなかった（データ未掲載）。そのことから、TJN-331とtranilastの作用点は異なる可能性があると考えている。

第 3 章　TJN-331 の抗 GBM 腎炎モデルに対する効果の解析

3-1 緒言

抗GBM腎炎モデル[28]は、ヒトの急速進行性糸球体腎炎ならびにグッドパスチャー症候群に類似した進行性の重篤な腎炎のモデルである。このモデルは、GBMに対する抗体を投与することによりGBMの破壊が惹起され、多量の尿中タンパクの発現とともに糸球体における半月体形成や係締壁とボウマン嚢との癒着等の管外性増殖変化により、腎機能が破綻することが特徴である。メサンギウム細胞または炎症性細胞から分泌されたTGF-β1は、炎症反応や細胞外マトリックスの蓄積に重要であること[29,30]、TGF-β1の過剰発現により、腎線維化が亢進することが報告されている[31]。また、抗GBM腎炎モデルにおいて、TGF-β1の中和抗体の投与により腎のマトリックス蓄積が抑制されることが知られている[32]。これらの知見は、糸球体腎炎から腎不全へ移行期に生じる糸球体の管外性病変にTGF-β1が重要な役割を演じている可能性を示唆している。

本研究では、糸球体で産生されるTGF-β1が抗GBM腎炎モデルにおける尿中タンパク排泄量の増加や糸球体の管外性増殖性病態変化を引き起こすのではないかとの仮説に基づき、TJN-331が尿中タンパク排泄の増加や糸球体の特徴的な増殖像に対し、有効性を示しうるか否かを検討した。

3-2 材料・実験方法

(1) 試薬

本モデルの評価を実施する際に用いた対照薬物として、ツムラ研究所において本モデルに対する多くの使用実績があり、抗腎炎効果が報告されている[33] dipyridamole（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を用いた。*In vivo* 試験においては、溶媒として 0.5% CMC-Na に懸濁して投与し、*in vitro* 試験においては 0.7% DMSO を用いた。

(2) 抗 GBM 腎炎モデルラットの作製および試験薬投与

抗 GBM 腎炎モデルラットは既報[34]に従い作成した。実験スケジュールは図 16 に示した。すなわち、Sprague-Dawley 系雄性ラット（Charls River Laboratories Japan, Yokohama, Japan）に、0.75 mL のヤギ抗ラット GBM 血清を静脈内投与した後、6.5 mg のヤギ γ グロブリン /0.25mL のフロイント完全アジュバンドをラットの footpad に投与した。非処置群は、生理食塩水を静脈内投与した。抗 GBM 腎炎を惹起した 20 日経過後に、各群で尿中タンパク排泄量がほぼ一定になるように 6 群［溶媒投与抗 GBM 腎炎群、TJN-331（0.2 mg/kg/day）投与抗 GBM 腎炎群、TJN-331（0.5 mg/kg/day）投与抗 GBM 腎炎群、TJN-331（2.0 mg/kg/day）投与抗 GBM 腎炎群、dipyridamole（50mg/kg/day）投与抗 GBM 腎炎群、dipyridamole（300mg/kg/day）投与抗 GBM 腎炎群、n=7］に群わけした。Day21 から試験最終日（day41）まで TJN-331（0.2, 0.5 または 2.0 mg/kg）ならびに dipyridamole（50 または 300 mg/kg）を

経口投与した。非処置群あるいは溶媒投与抗 GBM 腎炎群には、被験物質の代わりに 0.5% CMC-Na のみを投与した。試験最終日（day41）に腎を摘出し、光顕観察に供した。すべての実験プロトコールは株式会社ツムラの動物実験審査会の動物実験指針に準拠して行った。

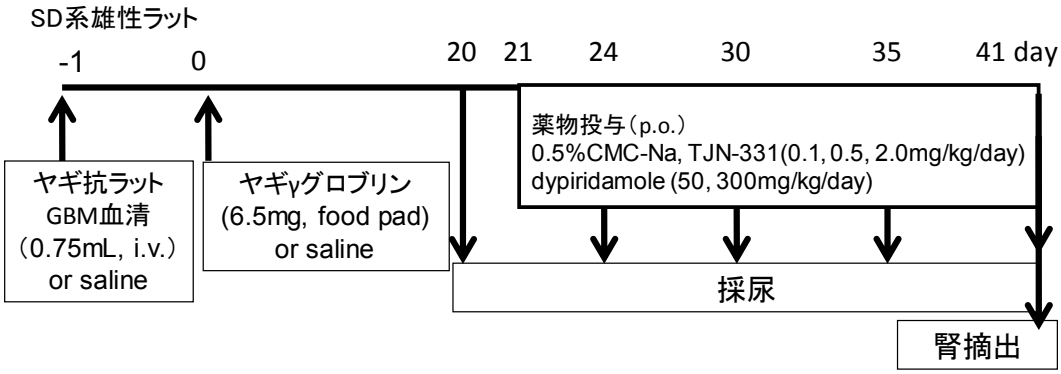

図 16　抗 GBM 腎炎モデルラットを用いた実験スケジュール（*in vivo* 試験）

(3) 尿中タンパク排泄量および血清クレアチニンの測定

尿タンパク量は前章 2-2-(3)、血清クレアチニン値は 1-2-(3)に従って測定した。すなわち、day20, 24, 30, 35 および 41 において、24 時間絶食下の尿および day41 の血液サンプルを採取した。尿は、遠心分離後、上清のタンパク質濃度をタンパク質検出試薬トネイン TP-II（Otsuka Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan）を用い、595nm の吸光度を測定することにより算出した（Beckman DU640 spectrophotometer）。血液は遠心分離し、上清を血清クレアチニンおよび IgA レベル測定のサンプルとした。血清クレアチニンレベルは、TBA 20FR 自動分析

装置（Toshiba, Tokyo, Japan）を用いて測定した。

(4) 病理学的評価

ラットから摘出した腎は、前章 1-2-(6)に従って切片を作成し、PAS 染色を施した。無作為に 50 個の糸球体を観察して半月体形成と糸球体係蹄壁とボウマン嚢との癒着（癒着）の程度については、既報 [34] に従い評価した。すなわち、典型的な 3 段階の病変の程度に従ってブラインドでその数を計測しスコア化した。スコアの判定基準は以下のとおりである。

1(mild)　：糸球体の 25%までが病変で覆われているもの

2(moderate)　：糸球体の 25-50%までが病変で覆われているもの

3(severe)　：糸球体の 50%以上が病変で覆われているもの

Score=[∑（各スコア×糸球体数）] /50

(5) 免疫組織学的評価

免疫染色は、前章 1-2-(7)の方法に準じて実施した。一次抗体（抗 TGF-β1 抗体 ; Austral Biologicals Co,CA, USA , 抗 α-SMA 抗体 ; Medic , Humburg, Germany）を 100 倍希釈して添加し、４℃で一晩インキュベートした。洗浄後、ビオチン化抗マウス IgG 抗体（Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA）を添加し、Vectastain ABC Elite Kit（Vector Laboratories,

Burlingame, CA, USA）で発色した。TGF-β1 陽性領域および α-平滑筋アクチン（SMA）陽性域の評価は Yoshimura らの方法 [35] に従いブラインドで 1 名の観察者がスコア化した。スコアの判定基準は以下のとおりである。

糸球体係蹄の染色陰性；0

糸球体係蹄の染色弱陽性(1-25%)；1

糸球体係蹄の部分的(25-50%)染色；2

糸球体係蹄の部分的(50-75%)染色；3

糸球体係蹄の全般的(75%以上)染色；4

Score=[∑（各スコア×糸球体数）] /50

(6) TGF-β1 産生に対する *ex vivo* 試験

実験スケジュールを図 17 に示した。抗 GBM 腎炎を誘発したラットに、腎炎惹起後 day1 から 41 まで TJN-331(0.1, 0.5 または 2.0 mg/kg) あるいは dipyridamole（50 または 300 mg/kg）を経口投与した。非処置群は溶媒として 0.5%CMC-Na のみを経口投与した。実験最終日、薬物投与 1 時間後に腎を摘出し、前章 2-2-(6)に従い糸球体を単離した。トータルおよび成熟 TGF-β1 タンパク濃度の定量は Rat TGF-β1 ELISA kit（Amersham Biosciences KK,Tokyo, Japan）を用いて行った。

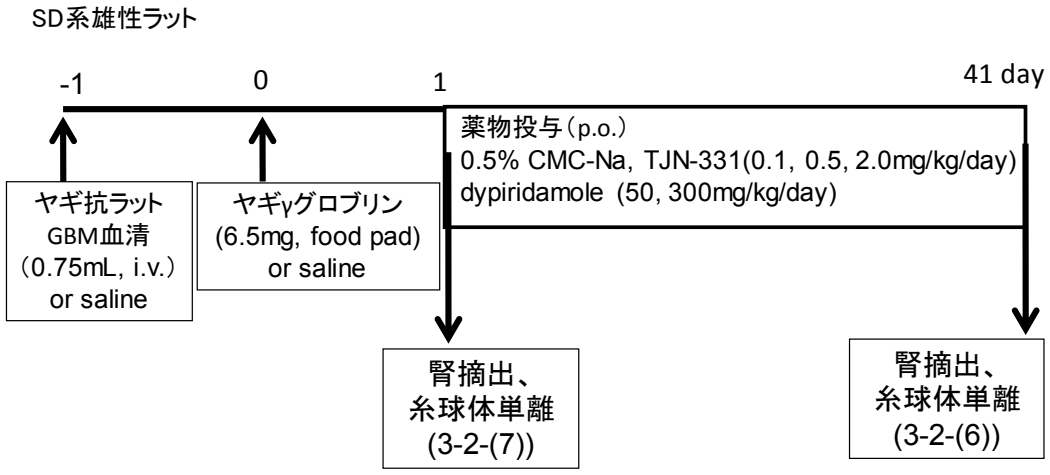

図 17　抗 GBM 腎炎モデルラットを用いた実験スケジュール（*ex vivo, in vitro* 試験）

(7) *In vitro* 試験

TGF-β1 タンパク産生ならびに TGF-β1 シグナル伝達関連遺伝子（TGF-β1, Smad2, 3）の発現に対する TJN-331 の直接作用を検証するため、単離した糸球体の培養上清に各濃度の TJN-331 を添加した。実験スケジュールを図 17 に示した。すなわち、抗 GBM 腎炎を惹起した 1 日後に腎を摘出し、前章 2-2-(6) の方法に従って糸球体を単離した。糸球体は RPMI-1640 培地で洗浄後、2000 cells/ml の密度で、被験物質（TJN-331 ; 1, 5, 10, 50 μmol/L, 終濃度）と共に 37℃、5%炭酸ガス含有大気下で 48 時間培養した。コントロールには、溶媒（RPMI-1640, 0.7% DMSO）を添加した。培養後の糸球体は、-80℃で 1 時間凍結後融解し、TGF-β1 測定に供した。TGF-β1 の定量は、Rat TGF-β1 ELISA kit（Amersham Biosciences

KK,Tokyo, Japan）を用いて行った。

(8)TGF-β1 および TGF-β1 シグナル伝達関連遺伝子発現に関する検討

単離糸球体から RNeasy Universal Tissue kit （Qiagen,Valencia, CA, USA）を用いて、total RNA を抽出した。Total RNA の濃度は、ND-1000（NanoDrop Ltd., Wilmington, DE, USA）を用いて吸光度を測定することにより算出した。それぞれのサンプルは、100 ng/μL に希釈した後、70℃5 分インキュベートし、その後氷冷した。Total RNA（1000 ng）は、TaqMan Reverse Transcription reagents（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて、逆転写した。Quantitative polymerase chain reaction（PCR）は、TaqMan Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）および Prism 7900HT Sequence Detection System（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて行った。mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子である ribosomal protein S29（Rps29）を内部標準とし、d*C*t 値で表した。

$$dCt=2^{(-|A-B|)}$$

ただし、*A* は、Rps29 の PCR 増幅産物量が閾値に達したときのサイクル数、*B* は、ターゲット遺伝子のサイクル数である。TaqMan real-time PCR 用の全てのオリゴヌクレオチドプライマー、および発蛍光性プローブセットについては、Applied Biosystems（Foster City, CA, USA）から購入した（TGF-b1:Rn00572010_m1,Smad2:Rn00569900_m1,Smad3:Rn00565331_m1）。

(9) 統計解析

データは mean ± standard error として表記した。統計学的有意差は、one-way ANOVA 後、Dunnett 検定または Steel 検定を行って算出し、p 値 5 %未満を有意とした。

3-3 実験結果

試験期間を通して、抗 GBM 腎炎群の体重および尿量は、非処置群に比べて低下したのに対し、薬物投与群との間には明らかな差は認められなかった（データ未掲載)。また、試験期間を通して、抗 GBM 腎炎群の尿中タンパク排泄量は、300-350mg/day であった（図 18)。TJN-331（2.0mg/kg/day）の経口投与は、day30 から day41 にかけて尿中タンパク排泄量の増加を抑制した。また、TJN-331（0.5mg/kg/day）投与群は day35 のみに一過性の抑制が認められた。Dipyridamole 投与群では、試験期間を通じて、尿中タンパク排泄量に影響が認められなかった（図 18)。抗 GBM 腎炎惹起後 41 日後、溶媒投与抗 GBM 腎炎群の血清クレアチニンレベルは非処置群に比べて増加したが、TJN-331 および dipyridamole のすべての群は、血清クレアチニン値に対して統計学的に有意な抑制を示さなかった（データ未掲載)。

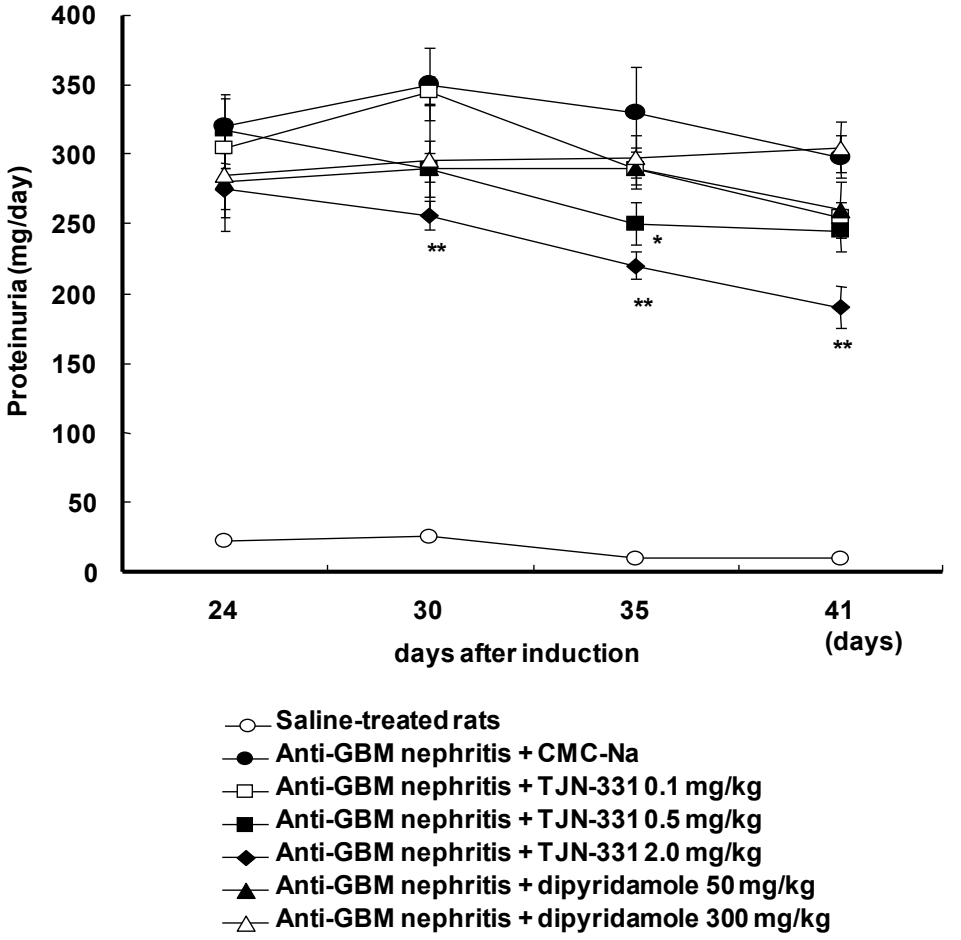

図 18　抗 GMB 腎炎ラットにおける尿中タンパク排泄量に対する TJN-331 の作用

*,　** ; $P<0.05$,　0.01　vs.　anti - GBM nephritis (Dunnett test) , Mean±S.E.M. (n=7)

Saline-treated rats; 非処置群

Anti-GBM nephritis + CMC-Na;　溶媒投与抗 GBM 腎炎群

Anti-GBM nephritis + TJN-331;　TJN-331 投与抗 GBM 腎炎群

Anti-GBM nephritis + dipyridamole;　dypyridamole 投与抗 GBM 腎炎群

次に、day 41 の糸球体組織の PAS 染色像を観察したところ、溶媒投与抗 GBM 腎炎群では半月体形成ならび癒着が認められた（図 19A, 20）。一方、TJN-331 の 2.0 mg/kg/day 投与は、半月体形成ならびに癒着指数の増加を有意に抑制した（図 19B, 20）。TJN-331 の 0.1、0.5

mg/kg/day および dipyridamole 投与群では、同様の効果は認められなかった（図 20）。

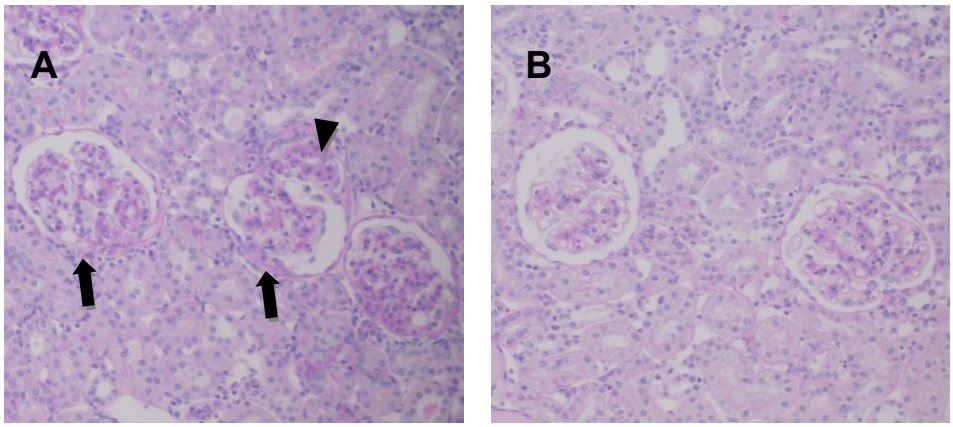

図 19　抗 GBM 腎炎モデルラットの糸球体 PAS 染色像

（A）溶媒投与抗 GBM 腎炎群　（B）TJN-331（2.0 mg/kg/day）投与抗 GBM 腎炎群（x200）

矢印；半月体形成、矢頭；癒着 を示す。

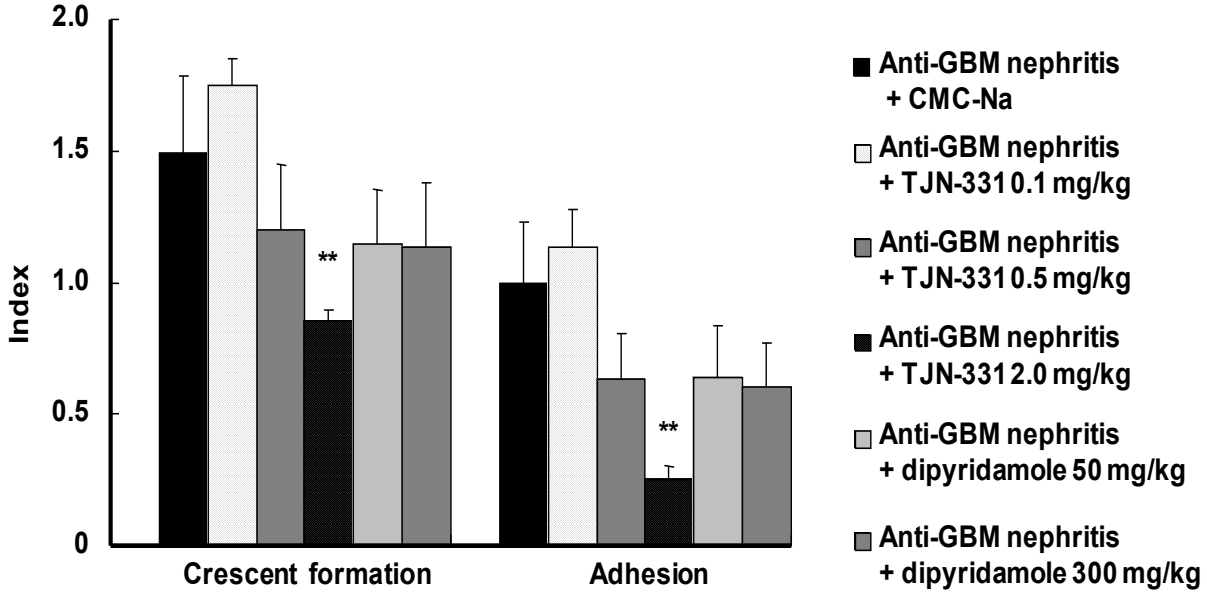

図 20　抗 GBM 腎炎モデルラットにおける半月体形成と癒着に対する TJN-331 の効果

**；$P<0.01$　vs.anti - GBM nephritis (Dunnett test) , Mean±S.E.M. (n=7)

Crescent formation; 半月体形成,　Adhesion; 癒着

Anti-GBM nephritis + CMC-Na; 溶媒投与抗 GBM 腎炎群

Anti-GBM nephritis + TJN-331; TJN-331 投与抗 GBM 腎炎群

Anti-GBM nephritis + dipyridamole; dypyridamole 投与抗 GBM 腎炎群

次に、活性化したメサンギウム細胞のマーカーである α- SMA の発現および TGF-β1 陽性領域に対する TJN-331 の作用について検討した（図 21A, B)。非処置群においては α-SMA の発現はほとんど観察されなかった。溶媒投与抗 GBM 腎炎群においては α-SMA 陽性領域が顕著に増加したが、TJN-331（2.0 mg/kg/day）および dipyridamole（300 mg/kg/day）は、α-SMA 陽性領域の増加を有意に抑制した（図 21A)。また、溶媒投与抗

GBM 腎炎群では高い TGF-β1 陽性領域スコアを示し、TJN-331（0.5, 2.0 mg/kg/day）の投与により顕著に低下したが、dipyridamol 投与群にはその効果は認められなかった（図 21B）。

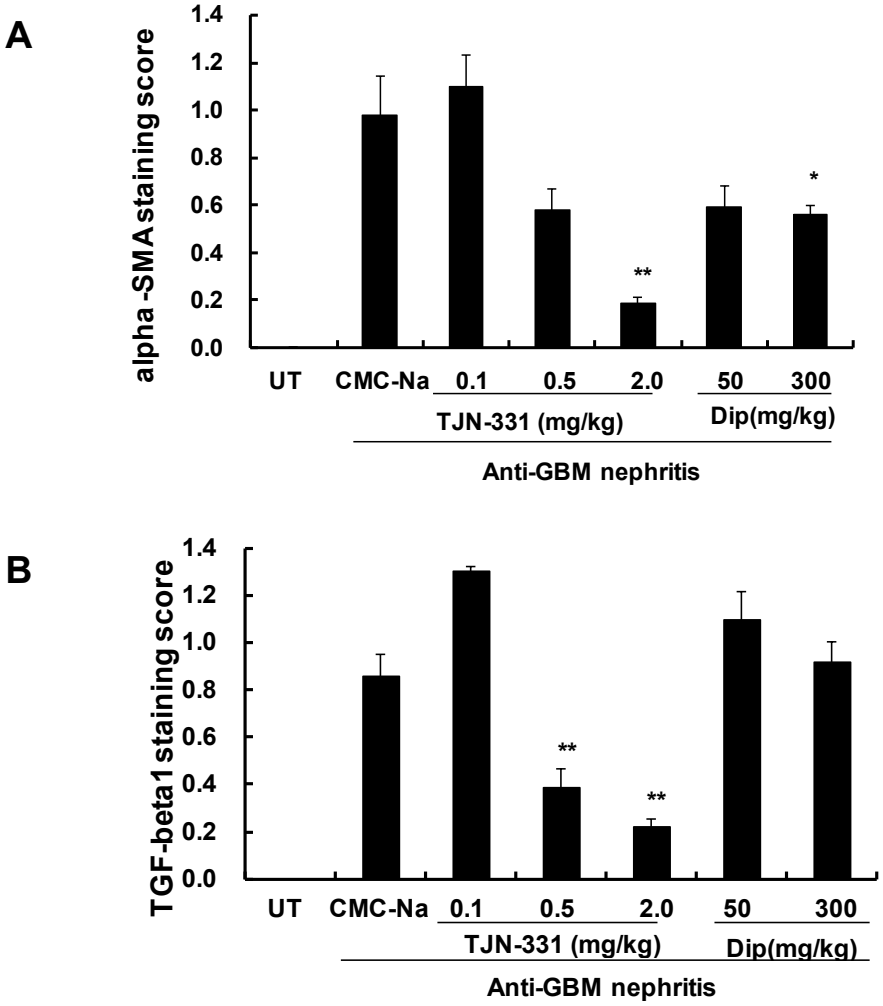

図 21　抗 GMB 腎炎ラットの α−平滑筋アクチンおよび TGF-β1 陽性領域に対する TJN-331 の効果

(A)α-平滑筋アクチン（SMA）染色スコア　(B)糸球体 TGF-β1 染色スコア

*, ** ; $P < 0.05, 0.01$　vs.　anti - GBM nephritis (Dunnet test) , Mean±S.E.M. (n=7)

UT; 非処置群 , Anti-GBM nephritis + CMC; 溶媒投与抗 GBM 腎炎群

Anti-GBM nephritis + TJN-331; TJN-331 投与抗 GBM 腎炎群

Anti-GBM nephritis + Dip; dypyridamole 投与抗 GBM 腎炎群

次に、糸球体の TGF-β1 産生に対する TJN-331 の効果について検証するため、*ex vivo* 試験を行った。非処置群の糸球体におけるトータル TGF-β1 産生は約 1200 pg/mL であったのに対し、溶媒投与抗 GBM 腎炎群の糸球体では約 3000 pg/mL と高値であり、TJN-331 のすべての投与群の糸球体で減少傾向を示した（図 22A）。一方、非処置群の糸球体における成熟 TGF-β1 産生は約 500 pg/mL であったのに対し、溶媒投与抗 GBM 腎炎群の糸球体では、成熟 TGF-β1 産生が増加し約 1000 pg/mL を示した。TJN-331 2.0 mg/kg/day 投与群では、糸球体の成熟 TGF-β1 産生増加に対する抑制が観察されたが、dipyridamol の投与は、成熟 TGF-β1 産生増加を抑制しなかった（図 22B）。また、抗 GBM 腎炎群の糸球体細胞を用いた *in vitro* 試験においては、培養上清中への TJN-331（終濃度; 10, 50 μmol/L）の添加は、トータルおよび成熟 TGF-β1 産生を濃度依存的に抑制した（図 23）。

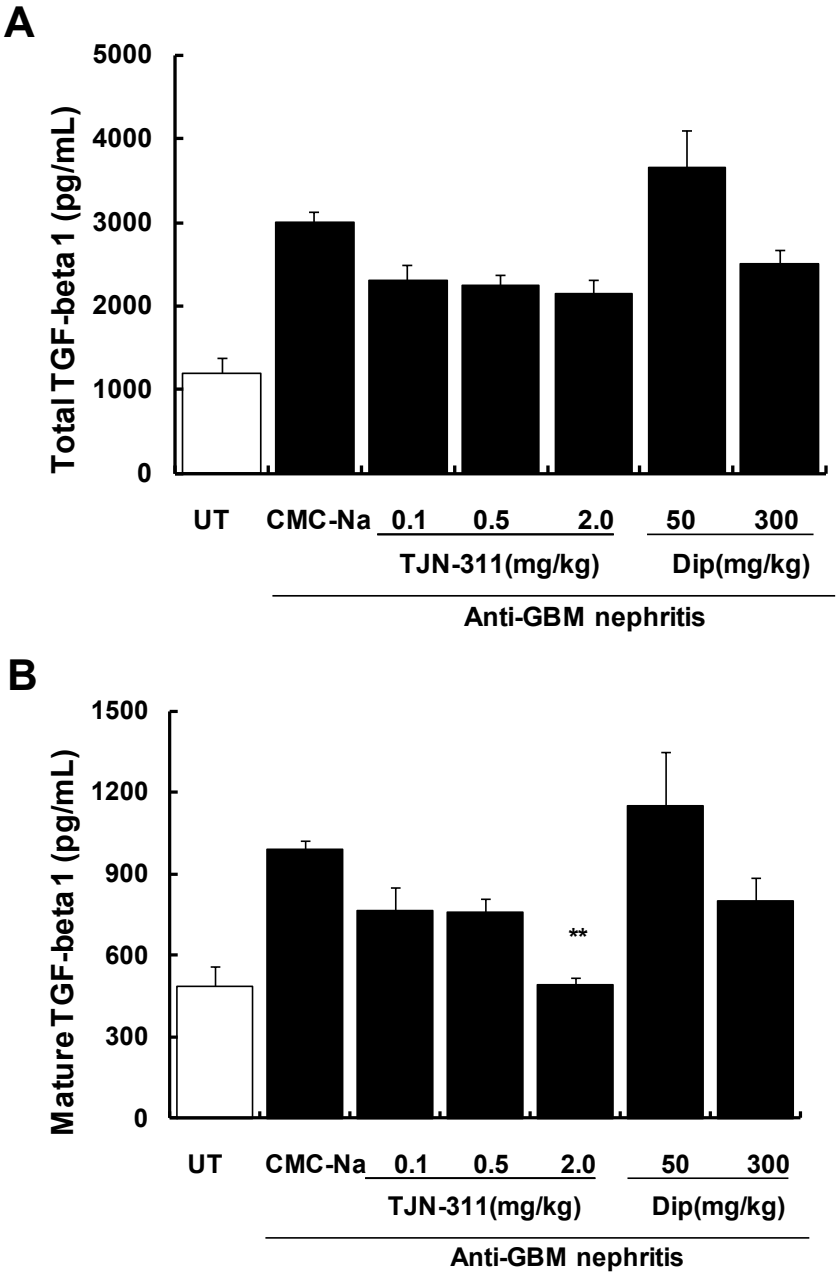

図 22　抗 GBM 腎炎モデルラットの糸球体における TGF-β1 タンパク産生に対する TJN-331 の効果

（A）　Total TGF-β1 濃度　および（B）成熟 TGF-β1 濃度

**；$P < 0.01$　vs.　anti –GBM nephritis (Dunnett test) , Mean±S.E.M. (n=7)

UT :非処置群

Anti-GBM nephritis + CMC-Na; 溶媒投与抗 GBM 腎炎群

Anti-GBM nephritis + TJN-331; TJN-331 投与抗 GBM 腎炎群

Anti-GBM nephritis + Dip; dypyridamole 投与抗 GBM 腎炎群

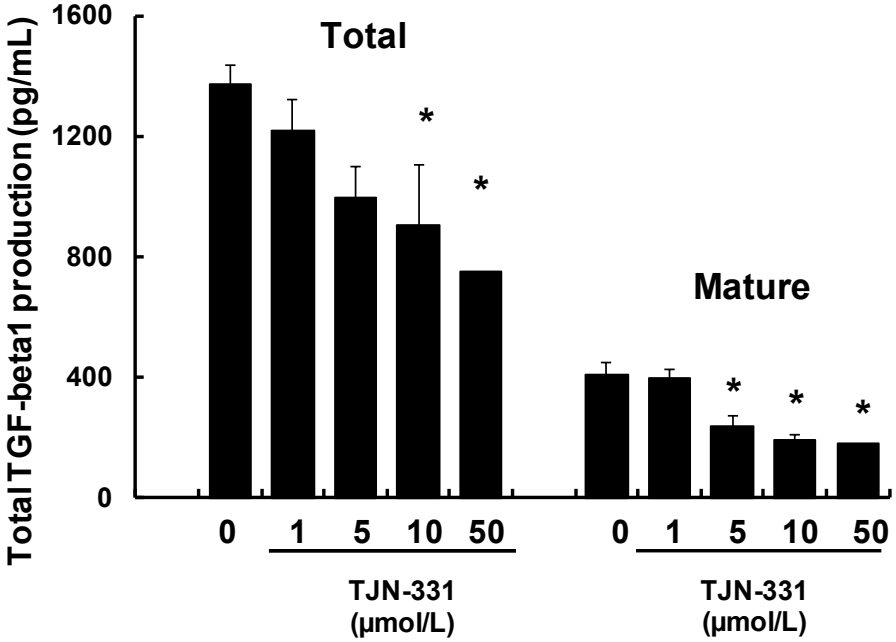

図 23　抗 GBM 腎炎モデルラット単離糸球体細胞における TGF-β1 タンパク産生に対する TJN-331 の効果

**P*<0.05 by Dunnett test.　Mean±S.E.M. (n=7)

最後に、TJN-331 の TGF-β1 産生抑制作用に関するより詳細な検討を実施する目的で、TGF-β1 および TGF-β1 シグナル伝達関連遺伝子発現に関する検討を行った。抗 GBM 腎炎群由来単離糸球体細胞の TGF-β1 mRNA 発現は、非処置群に比べて顕著に増加していた（図 24A）。TJN-331 の添加（50 μmol/L）は、その mRNA 発現増加を抑制できなかった。加えて抗 GBM 腎炎群の糸球体における Smad2 または Smad3 の mRNA 発現は、非処置群に比べて減少したが、TJN-331 の添加（50 μmol/L）はその低下を有意に抑制した（図 24B）。

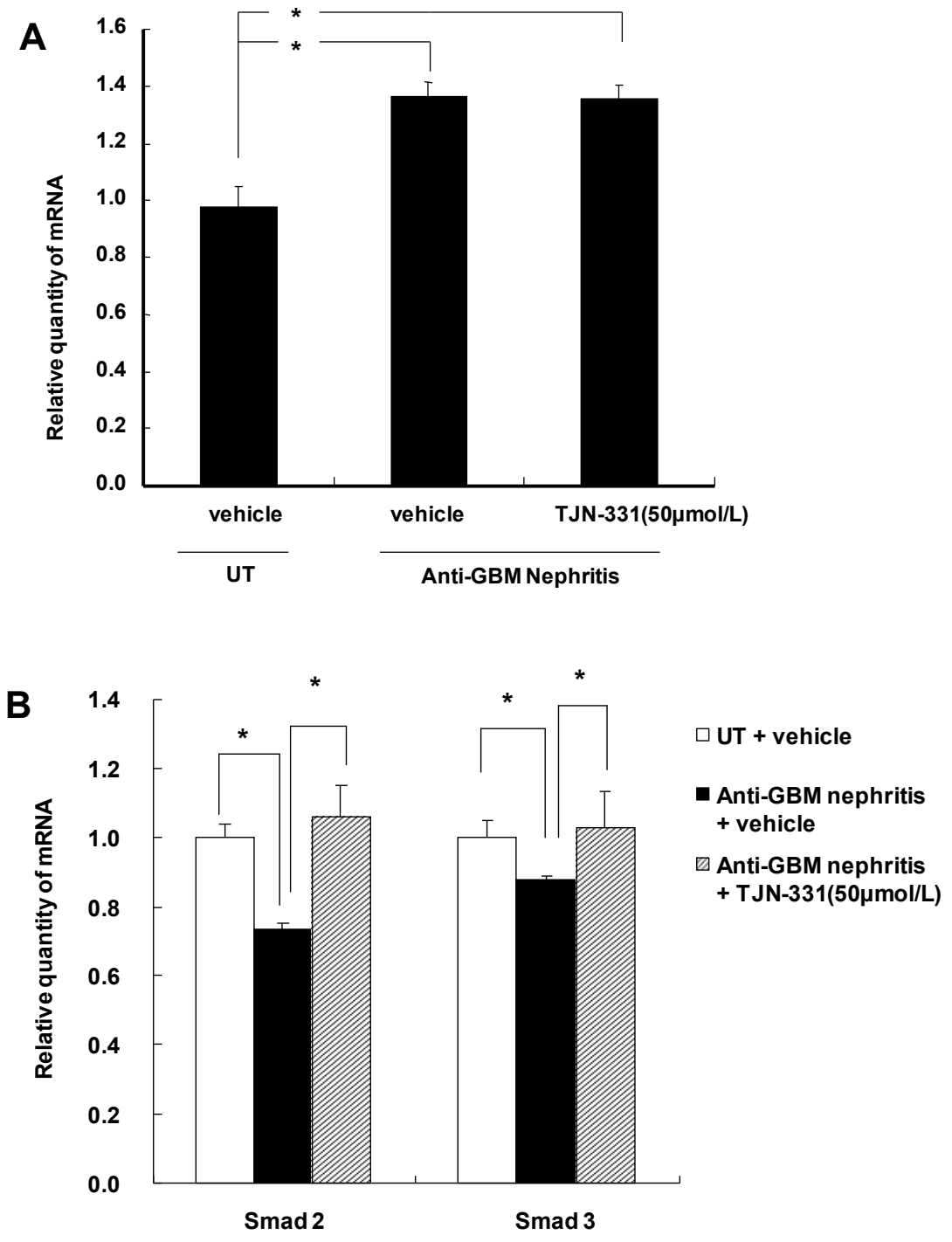

図 24　抗 GBM 腎炎モデルラットの TGF-β1 ,Smad 2/3 mRNA 発現に対する TJN-331 の効果

(A) TGF-β1 mRNA,　(B)Smad2/3 mRNA 発現　* P<0.05 by Steel test. Mean±S.E.M. (n=7)
UT（非処置群）または Anti-GBM nephritis （抗 GBM 腎炎群）から得られた糸球体細胞に、 vehicle または TJN-331（50 μmol/ L）を培養上清中に添加した。

3-4 考察

本研究において、TJN-331 は、抗 GBM 腎炎モデルラットにおける尿中タンパク排泄と典型的な糸球体の管外性病理学的変化の発現を抑制し、TGF-β1 タンパクの産生または活性化を抑制した。

TJN-331 はこのモデルの典型的な組織病変である半月体形成や癒着の発症を有意に抑制した。抗 GBM 腎炎における糸球体の管外性変化は、増殖病変に細胞外マトリックスの蓄積が生じ、不可逆的に固定される。さらにマトリックスの蓄積が線維化、硬化へと進展することで、腎機能は破綻を来す。糸球体への細胞外マトリックスの蓄積には TGF-β1 が重要な役割を演じている [32] ことから、TJN-331 の病理変化改善効果は TGF-β1 の産生阻害に起因する可能性は十分に考えられる。また、本研究では TJN-331 は血清クレアチニン値に影響しなかった。TJN-331 による病理学的改善の程度が、血清クレアチニン値に対して有意性を持って低下させるまでには至らなかったと考えられ、さらなる投与期間や高用量での評価が必要であったかもしれない。

In vitro 試験において、TJN-331 は、抗 GBM 腎炎モデルラット由来の培養糸球体中の TGF-β1 タンパク産生の増加を抑制したが、TGF-β1 mRNA 発現上昇は抑制しなかった。この結果は TJN-331 が TGF-β1 の転写レベルでの合成過程には影響しないことを示唆するものである。TGF-β1 は、生体内においてはほぼ潜在型として存在し、プロセシングにより活性を持った成熟型に変換される [36]。不活性型 TGF-β1 を過剰発現させたマウスでは、抗 GBM

腎炎で認められる尿中タンパク排泄量の増加や半月体形成などの病態変化が抑制されると報告されている[37]。今回の実験ではTGF-β1のノックアウトマウスや不活性型TGF-β1過剰発現マウスを用いて腎炎を惹起しTJN-331の効果の有無を検証していないため、TJN-331の作用メカニズムがTGF-β1の阻害作用に起因するかどうかを検証できなかった。しかしながら、興味あることに、*ex vivo*試験において抗GBM腎炎モデルラットへのTJN-331の20日間の投与は、糸球体の成熟型TGF-β1産生に対して効果を示した。TJN-331の*in vivo*投与では糸球体におけるTGF-β1の産生だけではなく、成熟化の過程を抑制した可能性が考えられる。今回の実験ではTGF-β1の活性化を引き起こすタンパク分解酵素に対するTJN-331の作用は未検証であり、十分に追求できなかったため、明らかにすべき研究課題として残された。

Smad2ならびにSmad3はTGF-β受容体の下流に位置し、受容体によりリン酸化されて活性化され、核内に移行して転写因子として機能することによりTGF-βシグナルを伝達する[38]。Poncletらは、培養ヒトメサンギウム細胞中にTGF-β1を作用させることにより、24-48時間後のSmad2ならびにSmad3のmRNA発現が低下することを報告している[39]。本研究においても、抗GBM腎炎群においてSmad2, 3のmRNA発現は低下しており、彼らの結果と一致する。Poncelet らの知見と合わせて考察すると、腎炎由来の糸球体における Smad2, 3 mRNA遺伝子発現の減少は、おそらくTGF-β1のシグナル活性化を介したネガティブフィードバックによるものではないかと考えられた。TJN-331は、Smad2, 3 mRNAの発現低下を抑

制したことから、TJN-331 は TGF-β1 シグナル伝達に対して、抑制的に働いていることが推察できた。

本研究では、TJN-331 投与開始 10 日後にすでに尿中タンパク排泄量の増加を抑制した。腎炎による尿中タンパク排泄に関する腎の TGF-β1 の役割は未だ十分に解明されていないが、尿中タンパク排泄量の増加は、尿細管上皮細胞における TGF-β1 遺伝子発現と密接な関係があることが報告されている[17]。本研究における TJN-331 の尿中タンパク排泄への顕著な効果は、TGF-β1 の活性化や産生の阻害を介して尿細管細胞の機能が保持された結果である可能性があるが、現時点では TGF-β1 阻害とは異なるメカニズムが介在することも否定できない。

Dipyridamole は抗血小板作用を有する薬剤で、わが国では糸球体腎炎治療において広く使われてきた。Dipyridamole は先行研究[34]や株式会社ツムラで実施してきた同モデルに対する予防的な投与においては抗腎炎効果が認められているが、本研究では効果がみられなかった。本実験のプロトコールでは、抗 GBM 腎炎を惹起させた 21 日目から被験物質の投与を開始しており、すでにこのステージでは糸球体への血小板凝集によって引き起こされる組織障害が終息している可能性が高い。少なくとも、本モデルに対する TJN-331 の抗腎炎効果は dipyridamole よりも強力である可能性が示唆された。

総括

本研究より TJN-331 は、IgA 腎症モデル、抗 Thy-1 腎炎モデル、ならびに抗 GBM 腎炎モデルにおいて、その病態の改善に有効性を示し、糸球体での TGF-β1 産生、あるいは活性化を抑制した。これらの結果から、TJN-331 は TGF-β1 阻害作用を有した抗腎炎化合物である可能性が示唆され、臨床応用が期待される。

関連論文

本論文の内容は以下の原著論文に発表した。

1. Saegusa Y, Sadakane C, Koseki J, Hasegawa Y, Shindo S, Takeda S, Takeda H, Hattori T.: (E)-N- [(3,4-dimethoxyphenethyl)] -N- methyl- 3- (3-pyridyl)-2-propenamide (TJN-331) inhibits mesangial expansion in experimental IgA nephropathy in ddY mice (2010). Clin Exp Nephrol. 14, 528-535.

2. Saegusa Y, Sadakane C, Koseki J, Hasegawa Y, Shindo S, Maruyama H, Kase Y, Takeda S, Takeda H, Hattori T.: Effect of TJN-331 on anti-Thy1 nephritis in rats via inhibition of transforming growth factor-β1 production (2010). Biol Pharm Bull. 33, 1710-1715.

3. Saegusa Y, Sadakane C, Koseki J, Hasegawa Y, Shindo S, Maruyama H, Takeda S, Takeda H, Hattori T.: TJN-331 improves anti-glomerular basement membrane nephritis by inhibiting the production of intraglomerular transforming growth factor-beta1 (2010). Biol Pharm Bull. 33, 1349-1354.

参考文献

1. 日本透析医学会. わが国の慢性透析療法の現況（2011.12.31）. 2011;.

2. 高久　史麿. COMMON DISEASE SERIES 5 腎炎・ネフローゼ. 南江堂 1988;.

3. 日本腎臓学会. CKD 治療ガイド 2012. 日腎会誌 2012;54（8）:1031-1189.

4. Sugiyama H, Yokoyama H, Sato H, et al. Japan Renal Biopsy Registry: the first nationwide, web-based, and prospective registry system of renal biopsies in Japan. Clin.Exp.Nephrol. 2011;15:493-503.

5. Haas M. Histologic subclassification of IgA nephropathy: a clinicopathologic study of 244 cases. Am.J.Kidney Dis. 1997;29:829-842.

6. Niemir ZI, Stein H, Noronha IL, et al. PDGF and TGF-beta contribute to the natural course of human IgA glomerulonephritis. Kidney Int. 1995;48:1530-1541.

7. Lee HS. Paracrine role for TGF-beta-induced CTGF and VEGF in mesangial matrix expansion in progressive glomerular disease. Histol.Histopathol. 2012;27:1131-1141.

8. Hayashi K, Nagamatsu T, Ito M, Hattori T, Suzuki Y. Acetoside, a component of Stachys sieboldii MIQ, may be a promising antinephritic agent: effect of acteoside on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. Jpn.J.Pharmacol. 1994;65:143-151.

9. Hayashi K, Nagamatsu T, Ito M, Yagita H, Suzuki Y. Acteoside, a component of Stachys sieboldii MIQ, may be a promising antinephritic agent (3): effect of aceteoside on expression of intercellular adhesion molecule-1 in experimental nephritic glomeruli in rats and cultured endothelial cells. Jpn.J.Pharmacol. 1996;70:157-168.

10. Hattori T, Fujitsuka N, Shindo S. Effect of acteoside on mesangial proliferation in rat anti-Thy 1 nephritis. Jpn J Nephrol 1996;38:202-212.

11. Hasegawa Y, Shindou S, Hattori T, et al. US Patent 2001;6313153:.

12. Ebefors K, Granqvist A, Ingelsten M, Molne J, Haraldsson B, Nystrom J. Role of glomerular proteoglycans in IgA nephropathy. PLoS One 2011;6:e18575.

13. Nogaki F, Oida E, Kamata T, et al. Chromosomal mapping of hyperserum IgA and glomerular IgA deposition in a high IgA (HIGA) strain of DdY mice. Kidney Int. 2005;68:2517-2525.

14. Tomino Y. IgA nephropathy: lessons from an animal model, the ddY mouse. J.Nephrol. 2008;21:463-467.

15. Sadakane C, Hattori T, Koseki J, et al. TJN-259 improves mesangial lesions in experimental immunoglobulin A nephropathy in ddY mice. Biol.Pharm.Bull. 2009;32:1728-1733.

16. Chihara Y, Ono H, Ishimitsu T, et al. Roles of TGF-beta1 and apoptosis in the progression of glomerulosclerosis in human IgA nephropathy. Clin.Nephrol. 2006;65:385-392.

17. Nonaka Takahashi S, Fujita T, Takahashi T, et al. TGF-beta1 and CTGF mRNAs are correlated with urinary protein level in IgA nephropathy. J.Nephrol. 2008;21:53-63.

18. Wang Y, Zhao MH, Zhang YK, Li XM, Wang HY. Binding capacity and pathophysiological effects of IgA1 from patients with IgA nephropathy on human glomerular mesangial cells. Clin.Exp.Immunol. 2004;136:168-175.

19. Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. Kidney Int. 1984;26:137-143.

20. Kagami S, Border WA, Ruoslahti E, Noble NA. Coordinated expression of beta 1 integrins and transforming growth factor-beta-induced matrix proteins in glomerulonephritis. Lab.Invest. 1993;69:68-76.

21. Oyama A, Muso E, Ono T, et al. Up-regulated TGF-beta mRNA expression in splenic T cells of high IgA-prone mice: a murine model of IgA nephropathy with glomerulosclerosis. Nephron 2001;88:368-375.

22. Kusano H, Muso E, Ono T, et al. Heminephrectomy causes the progression of glomerulosclerosis and apoptosis in high IgA strain ddY mice. Nephron 2002;92:389-398.

23. Yu L, Border WA, Anderson I, McCourt M, Huang Y, Noble NA. Combining TGF-beta inhibition and angiotensin II blockade results in enhanced antifibrotic effect. Kidney Int. 2004;66:1774-1784.

24. Martini S, Kramer S, Loof T, et al. S1P modulator FTY720 limits matrix expansion in acute anti-thy1 mesangioproliferative glomerulonephritis. Am.J.Physiol.Renal Physiol. 2007;292:F1761-70.

25. Bagchus WM, Hoedemaeker PJ, Rozing J, Bakker WW. Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy 1.1 antibodies. A sequential histological and ultrastructural study in the rat. Lab.Invest. 1986;55:680-687.

26. Ward MR, Agrotis A, Kanellakis P, Hall J, Jennings G, Bobik A. Tranilast prevents activation of transforming growth factor-beta system, leukocyte accumulation, and neointimal growth in porcine coronary arteries after stenting. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2002;22:940-948.

27. Tokuyama H, Kelly DJ, Cox A, et al. Tranilast ameliorates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. Nephron Exp.Nephrol. 2008;109:e1-7.

28. Suzuki Y, Ito M, Ogawa Y, Nagamatsu T. Pharmacological studies on experimental nephritic rats (6). Antinephritic effects of sodium chondroitin sulfate and other drugs on modified type of Masugi's nephritis. Nihon Yakurigaku Zasshi. 1979;75:585-599.

29. Onbe T, Kashihara N, Yamasaki Y, Makino H, Ota Z. Expression of mRNA's of cytokines and growth factors in experimental glomerulonephritis. Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol. 1994;86:131-138.

30. Khan SB, Cook HT, Bhangal G, Smith J, Tam FW, Pusey CD. Antibody blockade of TNF-alpha reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis. Kidney Int. 2005;67:1812-1820.

31. Kopp JB, Factor VM, Mozes M, et al. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. Lab.Invest. 1996;74:991-1003.

32. Coimbra T, Wiggins R, Noh JW, Merritt S, Phan SH. Transforming growth factor-beta production in anti-glomerular basement membrane disease in the rabbit. Am.J.Pathol. 1991;138:223-234.

33. Suzuki Y, Ito M. Studies on antinephritic action of dipyridamole (1). The effect of dipyridamole on anti-GBM induced nephritis in rats (author's transl). Nihon Jinzo Gakkai.Shi 1981;23:323-332.

34. Hattori T, Ito M, Nagamatsu T, Suzuki Y. Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine (3): Effects on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. Jpn.J.Pharmacol. 1990;52:131-140.

35. Yoshimura A, Inui K, Nemoto T, et al. Simvastatin suppresses glomerular cell proliferation and macrophage infiltration in rats with mesangial proliferative nephritis. J.Am.Soc.Nephrol. 1998;9:2027-2039.

36. Massague J. The transforming growth factor-beta family. Annu.Rev.Cell Biol. 1990;6:597-641.

37. Huang XR, Chung AC, Zhou L, Wang XJ, Lan HY. Latent TGF-beta1 protects against crescentic glomerulonephritis. J.Am.Soc.Nephrol. 2008;19:233-242.

38. Massagué J. TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem. 1998;67:753-91.

39. Poncelet AC, de Caestecker MP, Schnaper HW. The transforming growth factor-beta/SMAD signaling pathway is present and functional in human mesangial cells. Kidney Int. 1999;56:1354-1365.

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました　北海道大学大学院薬学研究院 医療薬学部門 医療薬学分野臨床病態解析学 武田 宏司教授、薬理学研究室 南 雅文教授　に深く謝意を申し上げます。また、研究発表ならびに本論文の作成にあたり、有益なご助言ならびにご校閲をいただきました北海道大学大学院薬学研究院 医療薬学部門 医療薬学分野 臨床病態解析学 中川 宏治講師に感謝申し上げます。

また、本論文の審査過程において、貴重なご指導とご助言を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 医療薬学部門 医療薬学分野 薬剤分子設計学 原島 秀吉教授に感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、有益なご指導、ご助言を賜りました北海道大学大学院医学研究科 がん予防内科学 浅香 正博教授ならびに特任助教 細野 秀崇博士、北海道大学大学院薬学研究院 臨床病態解析学研究室 大久保 直登博士に深謝申し上げます。

本研究における試験の実施や学位の申請にあたって、終始多大なる御尽力ならびにご指導を賜りました株式会社ツムラ ツムラ研究所長 加瀬 義夫博士、育薬１グループ長 服部 智久博士に心より感謝申し上げます。また、化合

物の合成提供ならびに情報提供に関してご協力頂きました株式会社ツムラ　長谷川 賀洋博士、小幡 竜弘氏に感謝申し上げます。

最後に、本研究の実施ならびに論文作成にあたり、ご協力頂きました皆様に心より感謝申し上げます。