

- 3) 小寺 亮、四方 賢一：糖尿病性腎症—病態の解明と最新治療戦略—糖尿病性腎症の最新治療戦略. 医学のあゆみ, 2011 年
- 4) 松下裕一、四方賢一：糖尿病性腎症：晩期糖尿病の管理と注意点. 腎疾患・透析 最新の治療 2011-2013
- 5) 四方賢一：生活習慣病治療のパラダイムシフト—慢性炎症を標的とした治療戦略—. 岡山医学会雑誌 第 123 巻 pp. 197-206, 2011
- 6) 小寺亮、四方賢一：糖尿病性腎症治療薬開発の動向 細胞 42(4), 2010
- 7) 廣田大昌、四方賢一：腎症の寛解は可能か？ —最近のエビデンスより— 「糖尿病診療マスター」8(4), 2010
- 8) 廣田大昌、四方賢一：糖尿病における CKD の成因と治療『プラクティス』27(3), 2010
- 9) 小寺亮、四方賢一：II. 糖尿病性腎症 糖尿病性腎症の病理. 日本臨床 68(9), 2010
- 10) 梶谷展生、四方賢一：糖尿病性細小血管症の発症・進展の分子メカニズム Microinflammation の関与. 日本臨床 68(9), 2010
- 11) 四方賢一、槇野博史：慢性合併症の臨床 2(腎症)1. 腎症の成因. 糖尿病学の進歩 2010, 日本糖尿病学会編
- 12) 四方賢一、南條輝志男、羽田勝計、高木均、中村二郎：病期から見た糖尿病合併症対策. 糖尿病学の進歩 2010, 日本糖尿病学会編
- 13) 四方賢一：腎不全期 糖尿病最新の治療, 南江堂, 2010
- 14) 宮本聡、四方賢一：脂質異常症・セミナー 実地診療で遭遇する問題点の対応 腎疾患患者に合併する脂質異常症—管理の意義と方法— MedicalPractice 27(3), 2010.
- 15) 小寺亮、四方賢一：DPP-4 阻害薬の登場で薬物療法はどう変わるか. 月刊薬事 52(3), 2010.
- 16) 四方賢一、槇野博史：全身疾患と腎障害 1. 糖尿病性腎症. メディカルノート腎臓がわかる腎・尿路疾患水・電解質代謝異常 p. 78-82, 2010
- 17) 梶谷展生、宮本聡、小寺亮、四方賢一、槇野博史：糖尿病性腎症の理解と予防 外来看護最前線生活習慣病& 外来がん看護 日総研, 2009
- 18) 小寺亮、四方賢一、槇野博史：糖尿病が引き起こす細小血管症③糖尿病性腎症 からだの科学 261 号糖尿病のすべて, 2009
- 19) 小寺亮、四方賢一、槇野博史：腎臓専門医での診断とかかりつけ医への逆紹介の要点 4. 糖尿病腎症の確定診断はどのように行うのですか？かかりつけ医と専門医のための CKD 診療ガイド, 2009
- 20) 小寺亮、四方賢一：糖尿病性腎症 第 24 回免疫抑制薬の臨床応用実践論『炎症と免疫』17(6), 2009
- 21) 四方賢一、宮本聡：糖尿病性腎症の成因としての microinflammation. 月刊糖尿病 1(5)p43-49, 2009
- 22) Ogawa D, Asanuma M, Miyazaki I, Tachibana H, Wada J, Sogawa N, Sugaya T, Kitamura S, Maeshima Y, Shikata K, Makino H. High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. Exp Diabetes Res. 2011. 534872, 2011.
- 23) Watanabe N, Shikata K, Shikata Y, Sarai K, Omori K, Kodera R, Sato C, Wada J, Makino H. Involvement of MAPKs in ICAM-1 expression in glomerular endothelial cells

- indiabetic nephropathy. *Acta Med Okayama* 65:247-257, 2011.
- 24) Sasaki M, Shikata K, Okada S, Miyamoto S, Nishishita S, Kataoka HU, Sato C, Wada J, Ogawa D, Makino H. The macrophage is a key factor in renal injuries caused by glomerular hyperfiltration. *Acta Med Okayama*. 2011 Apr; 65:81-89, 2011.
- 25) Matsushita Y, Ogawa D, Wada J, Yamamoto N, Shikata K, Sato C, Tachibana H, Toyota N, Makino H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta inhibits streptozotocin-induced diabetic nephropathy through anti-inflammatory mechanisms in mice. *Diabetes*. 60:960-968, 2011
- 26) Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, Kajitani N, Nishishita S, Sarai K, Hirota D, Sato C, Ogawa D, Makino H. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 54:965-978, 2011.
- 27) Sato C, Shikata K, Hirota D, Sasaki M, Nishishita S, Miyamoto S, Kodera R, Ogawa D, Tone A, Kataoka HU, Wada J, Kajitani N, Makino H. *Diabetes*. 60:189-199, 2011.
- 28) Kido Y, Ogawa D, Shikata K, Sasaki M, Nagase R, Okada S, Usui Kataoka HU, Wada J, Makino H. Intercellular adhesion molecule-1 plays a critical role in glomerulosclerosis after subtotal nephrectomy. *Clin Exp Nephrol*. 15:212-219, 2011.
- 29) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Decreasing Abdominal Circumference Is Associated with Improving Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) with Lifestyle Modification in Japanese Men: A Pilot Study. *Acta Med Okayama*. 65:363-367, 2011.
- 30) Tone A, Shikata K, Nakagawa K, Hashimoto M, Makino H. Renoprotective effects of clarithromycin via reduction of urinary MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. *Clin Exp Nephrol*. 15:79-85, 2011.
- 31) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T: The Relation between estimated glomerular filtration rate (eGFR) and proteinuria in Okayama prefecture, Japan. *Environ Health Prev Med* 16: 191-195, 2011.
- 32) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T: Comparison of ventilatory threshold between subjects with and without proteinuria in Japanese. *Health* 3: 394-399, 2011.
- 33) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T: Decreasing serum uric acid levels might be associated with improving estimated glomerular filtration rate (eGFR) in Japanese men. *Health* 3: 498-503, 2011.
- 34) Miyatake N, Nishii K, Numata T:

- Relationship between work style and cigarette smoking in Japanese workers. *Health 3*: 537-541, 2011.
- 35) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T: The relation between estimated glomerular filtration rate (eGFR) and coffee consumption in the Japanese. *Health 3*: 549-552, 2011.
- 36) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T: Comparison of muscle strength between subjects with and without proteinuria. *Health 3*: 698-702, 2011.
- 37) Shikata K, Haneda M, Koya D, Suzuki Y, Tomino Y, Yamada K, Maeda S, Kawakami N, Uzu T, Nishimura M, Sato C, Ogawa D, Makino H; DNETT-Japan Study Group. Diabetic Nephropathy Remission and Regression Team Trial in Japan (DNETT-Japan): Rationale and study design. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Feb;87(2):228-232.
- 38) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T: Relationship between estimated glomerular filtration rate (eGFR) and metabolic syndrome in Japanese. *Acta Med Okayama 64*: 203-206, 2010.
- 39) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T: Relation between estimated glomerular filtration rate and pulse wave velocity in Japanese. *Intern Med 49*: 1315-1320, 2010.
- 40) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T: Decreasing systolic blood pressure is associated with improving estimated glomerular filtration rate (eGFR) with lifestyle modification in Japanese healthy women. *Acta Med Okayama 64*: 339-343, 2010.
- 41) Kajitani N, Shikata K, Nakamura A, Nakatou T, Hiramatsu M, Makino H. Microinflammation is a common risk factor for progression of nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 88: 171-176, 2010. 2010
- 42) Tone A, Iseda I, Higuchi C, Tsukamoto K, Katayama A, Matsushita Y, Hida K, Wada J, Shikata K. Comparison of insulin detemir and insulin glargine on glycemic variability in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 18:320-324. 2010
- 43) Sarai K, Shikata K, Shikata Y, Omori K, Watanabe N, Sasaki M, Nishishita S, Wada J, Goda N, Kataoka N, Makino H: Endothelial barrier protection of FTY720 under hyperglycemic condition: Involvement of focal adhesion kinase, small GTPases and adherens junction proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009
2. 学会発表
- 1) 松下裕一、小川大輔、橘洋美、豊田智子、佐藤千景、和田淳、四方賢一、槇野博史: PPAR δ アゴニストは抗炎症効果により糖尿病性腎症の進展を抑制する. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. さっぽろ芸術文化の館 (札幌市), 2011

- 2) 梶谷展生、四方賢一、小寺亮、宮本聡、廣田大昌、佐藤千景、小川大輔、和田淳、槇野博史: Telmisartan は PPAR・活性化を介した抗炎症効果により糖尿病性腎症の進展を抑制する. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. さっぽろ芸術文化の館 (札幌市), 2011
- 3) 高塚哲全、四方賢一、小寺亮、片岡仁美、宮本聡、廣田大昌、梶谷展生、佐藤千景、小川大輔、和田淳、槇野博史: 糖尿病性腎症の病態進展に関連する microRNA の網羅的解析. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. さっぽろ芸術文化の館 (札幌市), 2011
- 4) 小川大輔、松下裕一、四方賢一、和田淳、佐藤千景、橘洋美、豊田智子、槇野博史: 糖尿病性腎症における PPAR δ アゴニストの腎保護効果. 第54回日本腎臓病学会学術集会. パシフィコ横浜 (横浜市), 2011
- 5) 四方賢一: 腎症の成因. 第44回糖尿病学の進歩. 大阪国際会議場, 2010年
- 6) 四方賢一: 糖尿病性腎症の成因としての Microinflammation. 第53回日本糖尿病学会. ホテルグランヴィア岡山, 2010
- 7) 四方賢一: 糖尿病血管合併症の病態としての Microinflammation. 第53回日本歯周病学会. サポート高松 (高松市), 2010
- 8) 四方賢一: Microinflammation の新しい展開. 第25回糖尿病合併症学会シンポジウム「糖尿病性腎症の新しい展開」. 大津プリンスホテル (大津市), 2010
- 9) 松下裕一、小川大輔、佐藤千景、和田淳、四方賢一、槇野博史: 糖尿病マウスにおける PPAR δ アゴニストの腎保護効果. 第25回日本糖尿病合併症学会. ピアザ淡海滋賀県立県民交流センター (大津), 2010
- 10) 小川大輔、松下裕一、四方賢一、和田淳、佐藤千景、槇野博史: 糖尿病性腎症の進展における PPAR δ アゴニストの有効性の検討. 第24回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会. ホテルコスモスクエア国際交流センター (大阪), 2010
- 11) 松下裕一、小川大輔、佐藤千景、和田淳、四方賢一、槇野博史: 糖尿病性腎症における PPAR δ アゴニストの有効性の検討. 第53回日本糖尿病学会. ターミナルスクエア (岡山市), 2010
- 12) 小寺亮、四方賢一、片岡仁美、高塚哲全、佐々木基史、宮本聡、廣田大昌、梶谷展生、佐藤千景、小川大輔、和田淳、槇野博史: Exendin-4 の抗酸化作用と抗炎症作用を介した腎保護効果の解析-1 型糖尿病モデルラットを用いた検討-. 第53回日本糖尿病学会. 岡山全日空ホテル (岡山市), 2010
- 13) 小川大輔、松下裕一、四方賢一、和田淳、佐藤千景、槇野博史: 糖尿病性腎症の進展における核内受容体 PPAR δ の役割の検討. 第53回日本腎臓学会学術総会. 神戸ポートピアホテル (神戸市), 2010
- 14) 四方賢一: 遺伝子改変動物を用いた糖尿病性腎症の成因の解明 第23回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会シンポジウム1 岡山国際交流センター (岡山市), 2009
- 15) 四方賢一: 糖尿病と CKD ~管理の面から~チーム医療による集約的治療の意義. 日本糖尿病学会年次学術集会ジョイントシンポジウム 4. 大阪国際会議場 (大阪市), 2009
- 16) 宮本聡、四方賢一、佐々木基史、西下伸吾、佐藤千景、片岡仁美、小寺亮、廣田大昌、梶谷展生、槇野博史: Cholecystokinin は抗炎症作用を

- 介し糖尿病性腎症の進展を抑制する. 第23回日本糖尿病・肥満動物学会. 岡山国際交流センター (岡山市), 2009
- 17) 小寺亮、片岡仁美、四方賢一、佐藤千景、佐々木基史、西下伸吾、宮本聡、廣田大昌、梶谷展生、槇野博史: Exendin4による抗炎症作用を介した腎保護作用. 第23回日本糖尿病肥満動物学会. 岡山国際交流センター, 2009
- 18) 小寺亮、片岡仁美、四方賢一、佐藤千景、佐々木基史、西下伸吾、宮本聡、廣田大昌、梶谷展生、小川大輔、槇野博史: Exendin4の1型糖尿病ラットに対する抗炎症作用を介した腎保護作用. 第52回日本糖尿病学会. 大阪国際会議場 (大阪市), 2009
- 19) 梶谷展生、四方賢一、永瀬亮、佐々木基史、宮本聡、小寺亮、廣田大昌、佐藤千景、西下伸吾、小川大輔、和田淳、槇野博史: 糖尿病性腎症の発症・進展におけるシアロアドヘジン陽性マクロファージの役割の検討. 第52回日本糖尿病総会. 大阪国際会議場 (大阪市), 2009
- 20) 宮本聡、四方賢一、佐々木基史、西下伸吾、佐藤千景、片岡仁美、小寺亮、廣田大昌、梶谷展生、槇野博史: Cholecystokininは抗炎症作用を介し糖尿病性腎症の進展を抑制する. 第52回日本糖尿病学会. 大阪国際会議場 (大阪市), 2009
- 21) 更井啓、四方賢一、四方泰史、大森一慶、渡辺直美、和田淳、槇野博史: 糖尿病性血管障害におけるedaravoneの腎保護作用についての検討. 第52回日本糖尿病学会. 大阪国際会議場 (大阪市), 2009
- 22) 宮本聡、四方賢一、佐々木基史、西下伸吾、佐藤千景、片岡仁美、小寺亮、廣田大昌、梶谷展生、槇野博史: Cholecystokininは抗炎症作用を介し糖尿病性腎症の進展を抑制する. 第24回日本糖尿病合併症学会. 岡山コンベンションセンター (岡山市), 2009
- 23) 小寺亮、片岡仁美、四方賢一、佐藤千景、佐々木基史、宮本聡、廣田大昌、梶谷展生、高塚哲全、槇野博史. 1型糖尿病モデルラットにおけるexendin4の抗酸化ストレス、抗炎症作用を介した腎保護効果. 第24回日本糖尿病合併症学会. 岡山コンベンションセンター (岡山市), 2009
- 24) 小川大輔、松下裕一、四方賢一、佐藤千景、和田淳、槇野博史: 糖尿病性腎症の進展におけるPPAR α アゴニストの有効性の検討. 第21回日本糖尿病性腎症研究会 (東京). 2009
- 25) Koderar, KataokaH, ShikataK, MakinoH: Exendin-4 ameliorates renal injuries through anti-inflammatory effects in type 1 diabetic rats. Asia Islet Biology and Incretin Symposium (AIBIS). August 1-2, 2009
- 26) MiyamotoS, ShikataK, SasakiM, NishishitaS, SatoC, KataokaH, Koderar, HirotaDKajitaniN, MakinoH : Cholecystokinin ameliorates diabetic renal injuries via anti-inflammatory effects. 45th EASD Annual Meeting, September 29-October 2, 2009
- 27) Koderar, KataokaH, ShikataK, SatoC, SasakiM, NishishitaS, MiyamotoS, HirotaD, KajitaniN, OgawaD, MakinoH : Exendin-4 ameliorates renal injuries through anti-oxidative and anti-inflammatory effects in type 1 diabetic

- rats. 45th EASD Annual Meeting, September 30–October 2, 2009.
- 28) Kodera R, Kataoka H, Shikata K, Sato C, Sasaki M, Nishishita S, Miyamoto S, Hirota D, Kajitani N, Ogawa O, Makino H: Exendin-4 ameliorates renal injuries through anti-oxidative and anti-inflammatory effects in type 1 diabetic rats. 46th EASD Annual Meeting, Stockholm, Sweden, September 21–24, 2010
- 29) Ogawa D, Matsushita Y, Shikata K, Wada J, Sato C, Makino H: PPAR δ -mediated anti-inflammatory mechanisms inhibit streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Keystone Symposia, Banff, Alberta, Canada. February 12–17, 2010
- 30) Ogawa D, Matsushita Y, Shikata K, Wada J, Sato C, Makino H. PPAR δ -mediated anti-inflammatory mechanisms inhibit streptozotocin-induced diabetic nephropathy. ISN-NEXUS Kyoto in 2010. Kyoto, April 15–18, 2010
- 31) Ogawa D, Matsushita Y, Shikata K, Wada J, Sato C, Makino H. PPAR δ -mediated anti-inflammatory mechanisms inhibit streptozotocin-induced diabetic nephropathy. The 2nd Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes. May 29, 2010.
- 32) Kajitani N, Shikata K, Kodera R, Miyamoto S, Hirota D, Sato C, Wada J, Ogawa D, and Makino H: Helmsartan attenuates diabetic nephropathy through anti-oxidative and anti-inflammatory actions via activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Lisbon, Portugal, 12–16 September 2011.
- 33) Ogawa D, Wada J, Matsushita Y, Nakatsuka A, Murakami K, Kanzaki M, Shikata K, Makino H. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ Inhibits Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Through Anti-inflammatory Mechanisms in Mice. Keystone Symposia (Keystone, Colorado, USA) 2011. 1. 12–1. 17
- 34) Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Yamamoto N, Toyota N, Sato C, Wada J, Shikata K, Makino H. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ Inhibits Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Through Anti-inflammatory Mechanisms in Mice. American Diabetes Association 71st Scientific Sessions (San Diego, California, USA) 2011. 6. 24–6. 28

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）

総合研究報告書

研究分担者

和田隆志 金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学

研究協力者

原章規 金沢大学附属病院腎臓内科・救急部

研究要旨

臓器線維化と密接に関連する骨髄由来細胞、CD45/type1 collagen (Col1) 二重陽性 (CD45+/Col1+) 細胞がケモカイン・ケモカイン受容体を介して腎線維化に関与することから、CCR2 阻害薬を使用し、CD45+/Col1+細胞の制御による腎症の治療の可能性を検討した。1 型および 2 型糖尿病性腎症モデルマウスの検討では、CCR2 阻害薬の投与により、浸潤 CD45+/Col1+細胞数の減少とともに、糸球体硬化ならびに間質線維化の程度が減少した。また、CCR2 阻害薬の投与により、尿中アルブミン排泄量が低下した。正常ヒト末梢血より分離培養した CD45+/Col1+細胞を用いた試験管内での検討では、CCR2 阻害薬の添加により高糖下の CD45+/Col1+細胞における 1 型コラーゲンおよび TGF- β の産生が抑制された。以上から、CCR2 阻害薬は CD45+/Col1+細胞の制御により糖尿病性腎症の進展を抑制することが示唆された。以上の基礎的知見が得られたことを受け、現在糖尿病性腎症に対する CCR2 阻害薬の臨床試験を開始した。今後の本臨床試験の結果が待たれる。

A. 研究目的

糖尿病性腎症の成因に炎症が関与することが判明しつつある。病理学的には単球・マクロファージに代表される炎症・免疫担当細胞の浸潤を認める。一方、臓器線維化と密接に関連する新規細胞成分として骨髄由来細胞、CD45/1 型コラーゲン (Col1) 二重陽性 (CD45+/Col1+) 細胞が注目されている。CD45+/Col1+細胞はケモカイン・ケモカイン受容体を介して腎に浸潤し、マウス腎線維化に重要な役割を果たすことが報告されている。また、ヒト糖尿病性腎症の腎生検組織においても CD45/COLI 二重陽性細胞を認め、その細胞数は腎機能および間質線維化

と相関することから、同細胞の線維化への関与が示唆されている。ケモカインの代表である MCP-1/CCL2 はその受容体 CCR2 を介して炎症・免疫担当細胞の浸潤に関与する重要な腎臓病の進展因子である。そこで本研究では、1 型および 2 型糖尿病性腎症モデルマウスならびに培養ヒト CD45+/Col1+細胞を用いて、CCR2 を介した CD45+/Col1+細胞ならびにマクロファージの制御による糖尿病性腎症の治療の可能性を検討した。

B. 研究方法

1) 動物実験

CCR2 ノックアウトマウス (CCR2^{-/-}群) および対照マウスにストレプトゾトシンを

投与し 1 型糖尿病性腎症モデルを作成した。作成後、対照マウスには CCR2 阻害薬であるプロパゲルマニウム (PG+群) または対照薬 (PG-群) を投与した。投与 16 週後にと殺し腎組織を得た。検討項目として、腎における骨髄由来細胞、特に、CD45+/Col1+細胞ならびに F4/80 陽性マクロファージ数を評価した。また、糸球体硬化・間質線維化およびそれに関連する分子群を評価した。臨床的指標として腎機能およびアルブミン尿を検討した。

一方、2 型糖尿病モデルにおける検討では、自然発症 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用い、対照マウスとして db/+マウスを用いた。1 型糖尿病性腎症モデルと同様に、CCR2 阻害薬として PG を用いた。PG または対照薬投与 16 週後にと殺し腎組織を得た。検討項目として、1 型糖尿病性腎症モデルと同様に、腎における CD45+/Col1+細胞ならびに F4/80 陽性マクロファージ数に加え、糸球体硬化・間質線維化およびそれに関連する分子群を評価した。さらに、腎機能およびアルブミン尿を検討した。

2) 細胞実験

健常成人末梢血の単核球分画より CD45+/Col1+細胞を分離・採取し、グルコースによる高糖濃度あるいは浸透圧コントロールとしてマンニトールによる刺激培養を行った。刺激 12 または 24 時間後に CD45+/Col1+細胞を回収し、1 型プロコラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (pro-COL1A1)、TGF- $\beta 1$ ならびに MCP-1 の mRNA 発現を real-time RT-PCR で検討した。また、同様の実験系を用い、ヒト CD45+/Col1+細胞を高糖かつ MCP-1 の添加した条件下で培養した。この系に MCP-1/CCR2 シグナリングを阻害する目的で CCR2 阻害作用を有する PG または RS-504393 を添加し、pro-COL1A1 ならびに TGF- $\beta 1$ 発現に及ぼす影響を検討した。

(倫理面への配慮)

金沢大学動物実験規定ならびに動物実験等に関わる飼養保管施設及び実験室の設置と運用に関する細則を遵守した。また、本研究で使用した薬剤である PG については、提供される三和化学研究所と覚書 (MTA) を締結のうえで使用した。

C. 研究結果

1) 動物実験

1 型糖尿病性腎症モデルにおいて、コンピュータ画像解析により算出した糸球体硬化率および間質線維化率は、PG-群に比して CCR2-/-および PG+群で低下した。この組織学的検討の結果は 2 型糖尿病性腎症モデルについてと同様であり、PG 投与群で改善した。1 型および 2 型糖尿病の両モデルにおいて、CD45 および 1 型コラーゲンの 2 重陽性細胞として同定した CD45+/Col1+細胞は糖尿病腎に浸潤し、その数は PG-群に比して CCR2-/-または PG+群で低下した。腎内マクロファージ数も糸球体・間質ともに CD45+/Col1+細胞数と同様の結果であった。また、1 型コラーゲン、TGF- $\beta 1$ 、ならびに MCP-1 といった線維化に関連する分子発現も両モデルにおいて、PG-群に比して CCR2-/-または PG+群で低下した。臨床的には、1 型および 2 型糖尿病の両モデルにおいて、PG-群に比して CCR2-/-または PG+群でアルブミン尿が改善した。

2) 細胞実験

ヒト末梢血より分離・培養した CD45+/Col1+細胞を用いて高糖下での動態ならびに CCR2 を介した CD45+/Col1+細胞の直接の制御について検討した。ヒト CD45+/Col1+細胞を高糖培養した結果、pro-COL1A1 および TGF- $\beta 1$ の mRNA 発現が濃度および時間依存性に亢進した。なお、

この発現の亢進の一部はマンニトールによる刺激によっても認められた。MCP-1の発現についても同様の結果であった。

さらに、高糖下の CD45+/Co11+細胞における MCP-1-CCR2 の系について検討した。はじめに、CD45+/Co11+細胞を高糖濃度培養すると CCR2 の mRNA が発現することが確認された。次に、高糖下の CD45+/Co11+細胞に MCP-1 を添加したところ、pro-COL1A1 ならびに TGF- β 1 の mRNA 発現はグルコース単独刺激に比較し、より亢進した。MCP-1 の mRNA 発現についても同様であった。さらに CCR2 阻害薬である PG を添加した結果、pro-COL1A1 および TGF- β 1 の mRNA 発現はいずれも低下した。MCP-1 の mRNA 発現についても PG の添加により低下した。

D. 考察

本研究では、マウス糖尿病性腎症モデルにおいて、腎における MCP-1 の発現が亢進し CD45+/Co11+細胞ならびに単球・マクロファージ浸潤が増加した。同時に TGF- β 1 および 1 型コラーゲンの発現の亢進を伴い、腎線維化が進展した。CCR2 阻害により、CD45+/Co11+細胞ならびに単球・マクロファージ浸潤は減少し腎線維化が抑制された。また、MCP-1 に加え、TGF- β 1 および 1 型コラーゲンの発現が低下した。さらに、試験管内にてヒト CD45+/Co11+細胞を高糖培養した結果、pro-COL1A1、TGF- β 1 および MCP-1 の mRNA 発現が亢進した。高糖下の MCP-1 刺激により、これらの分子発現がさらに亢進した。この系における CCR2 阻害により、pro-COL1A1、TGF- β 1 および MCP-1 の mRNA 発現はいずれも低下した。以上の結果より、CD45+/Co11+細胞は少なくとも 3 つの系を介して臓器線維化の進展に関与することが示唆された。第一に、MCP-1 を産生してマクロファージを介する機序が挙げられる。第二に、TGF- β 1

を産生することにより線維芽細胞を介する機序である。そして第 3 は直接コラーゲンを産生する機序である。以上の結果から CCR2 阻害は高糖下の線維化病態における悪性サイクルを断ち切ることにより、糖尿病性腎症の進展抑制に有効性を発揮することが示唆された。

以上の動物実験および細胞実験から得られた知見から、糖尿病性腎症における骨髓由来の炎症・免疫担当細胞の制御を介した CCR2 阻害薬の有効性が示唆された。そこで、当院では現在、糖尿病性腎症患者における CCR2 阻害薬の有効性と安全性を検討する目的で介入試験 (UMIN000004779) を開始している。2 型糖尿病性腎症を対象とし、従来治療群に対して PG 投与群には 1 年間同薬剤を内服するプロトコールである。順次症例の登録が行われており、今後の解析結果が待たれる。

E. 結論

CCR2 阻害薬は骨髓由来細胞である CD45+/Co11+細胞および単球・マクロファージを制御することにより糖尿病性腎症の進展を抑制する新規治療薬として有用であることが示唆された。PG を用いた今後の前臨床試験の結果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 原章規, 和田隆志: 糖尿病性腎症の進展におけるケモカイン-ケモカイン受容体の役割, 日本腎臓学会誌 53(7), 1027-1033, 2011
- 2) 清水美保, 和田隆志: 糖尿病性腎症病期分類と CKD ステージ分類, 月刊糖尿病 3(7), 24-31, 2011
- 3) 原章規, 和田隆志: 糖尿病性腎症の進展機序-腎固有細胞および骨髓由

- 来細胞に作用するケモカイン, 医学のあゆみ(糖尿病性腎症-病態の解明と最新治療戦略) 238(9), 833-838, 2011
- 4) 和田隆志: 糖尿病性腎症, 月刊 カレントセラピー 29(8), 666-670, 2011
 - 5) 遠山直志・和田隆志: 糖尿病性腎症の病期分類, MEDICINAL 2(2), 23-30, 2012
 - 6) 和田隆志: 糖尿病性腎症の食事療法, New Diet Therapy 25(4), 45-48, 2010
 - 7) 和田隆志: 糖尿病性腎症, Pharma Medica 28(2), 25-28, 2010
 - 8) 和田隆志: 糖尿病性腎症, 医学のあゆみ 233(11), 1087-1090, 2010
 - 9) 和田隆志: 糖尿病性腎症, 日本腎臓学会誌 52 (7) , 908-913, 2010
 - 1) Furuichi K, Shintani H, Sakai Y, Ochiya T, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Effects of Adipose-Derived Mesenchymal Cells on Ischemia-Reperfusion Injury in Kidney. Clin Exp Nephrol in press 2012
 - 2) Furuichi K, Hisada Y, Shimizu M, Okumura T, Kitagawa K, Yoshimoto K, Iwata Y, Yokoyama H, Kaneko S, Wada T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane-type 1 MMP (MT1-MMP) affect the remodeling of glomerulosclerosis in diabetic OLETF rats. Nephrol Dial Transplant 26, 3124-3131, 2011
 - 3) Nakade Y, Takamura T, Sakurai M, Misu H, Nagata M, Nanbu Y, Oe H, Takamura T, Sakai Y, Kaneko S, Wada T. Association between coefficients of variation of the R-R intervals on electrocardiograms and post-challenge hyperglycemia in patients with newly diagnosed type2 Diabetes J Diabetes Invest 2, 324-327, 2011
 - 4) Wada T, Sakai N, Sakai Y, Matsushima K, Kaneko S, Furuichi K. Involvement of bone marrow-derived cells in kidney fibrosis. Clin Exp Nephrol 15, 8-13, 2011
 - 5) Wada T, Shimizu M, Toyama T, Hara A, Kaneko S, Furuichi K. Clinical impact of albuminuria in diabetic nephropathy. Clin Exp Nephrol 2011 in press
 - 6) Kimura A, Ishida Y, Wada T, Hisaoka T, Morikawa Y, Sugaya T, Mukaida N, Kondo T. The absence of interleukin-6 enhanced arsenite-induced renal injury by promoting autophagy of tubular epithelial cells with aberrant extracellular signal-regulated kinase activation. Am J Pathol 176, 40-50, 2010
 - 7) Sakai N, Furuichi K, Shinozaki Y, Yamauchi H, Toyama T, Kitajima S, Okumura T, Kokubo S, Kobayashi M, Takasawa K, Takeda S, Yoshimura M, Kaneko S, Wada T. Fibrocytes are involved in the pathogenesis of human chronic kidney disease. Human Pathol 41, 672-678, 2010
 - 8) Menke J, Iwata Y, Rabacal WA, Basu R, Yeung YG, Humphreys BD, Wada T, Schwarting A, Stanley ER, Kelley VR. CSF-1 signals directly to renal tubular epithelial cells to mediate repair in mice. J Clin Invest 119, 2330-2342, 2009
 - 9) Furuichi K, Kaneko S, Wada T. Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathogenic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease. Clin Exp

Nephrol 13, 9-14, 2009

- 10) Hara A, Sakai N, Wada T. Pathogenesis of diabetic complications through bone marrow-derived cells. Journal of Wound Technology, 2011 in press
2. 学会発表
- 1) 和田隆志：厚生労働省研究班の取り組み 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 S8-7, 2011
 - 2) 和田隆志：糖尿病性腎症の病態と管理, 第54回日本腎臓学会学術総会 RS-14, 2011
 - 3) 和田隆志：糖尿病性腎症レジストリー構築と展望, 第54回日本腎臓学会学術総会 CP3-1-4, 2011
 - 4) 和田隆志：糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発, 第54回日本腎臓学会学術総会 OPS-5-1, 2011
 - 5) 原章規、北川清樹、坂井宣彦、古市賢吾、和田隆志：糖尿病性腎症の進展におけるCD45/COL1陽性細胞の関与, 第54回日本糖尿病学会年次学術集会 一般演題 II-P-98, 2011
 - 6) 原章規、坂井宣彦、北川清樹、古市賢吾、和田隆志：骨髄由来細胞からみた糖尿病合併症の進展機序解明と治療への展開, 第2回西日本腎臓病研究会, 2011
 - 7) 原章規、北川清樹、坂井宣彦、清水美保、古市賢吾、和田隆志：糖尿病性腎症(基礎)(1) P-393. マウス2型糖尿病性腎症モデルにおけるCD45/COL1二重陽性細胞の意義, 第54回日本腎臓学会学術総会, 2011
 - 8) 清水美保、黒川幸枝、遠山直志、原章規、北川清樹、古市賢吾、和田隆志：当科における2型糖尿病性腎症の臨床病理学的検討, 第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011
 - 9) 清水美保、篠崎康之、北島信治、遠山直志、原章規、北川清樹、古市賢吾、横山仁、和田隆志：糖尿病性腎症と診断した、尿蛋白陰性の2型糖尿病例に関する臨床病理学的検討, 第54回日本腎臓学会学術総会, 2011
 - 10) 舟本智章、篠崎康之、北島信治、遠山直志、原章規、北川清樹、清水美保、古市賢吾、和田隆志：顕性蛋白尿を呈し、糖尿病性腎症と診断した2型糖尿病例の臨床病理学的検討, 第54回日本腎臓学会学術総会, 2011
 - 11) 清水美保、遠山直志、古市賢吾、伊勢拓之、吉村光弘、木田寛、和田隆志：腎病理から見た糖尿病性腎症の臨床病態, 第36回北陸臨床病理集談会・第19回同セミナー, 2011
 - 12) 清水美保、遠山直志、原章規、北川清樹、古市賢吾、吉村光弘、木田寛、横山仁、和田隆志：腎病理からみた糖尿病性腎症の臨床病態, 第23回日本糖尿病性腎症研究会, 2011
 - 13) Hara A, Sakai N, Kitagawa K, Furuichi K, Kaneko S, Wada T. Impact of CD45+/Col1+ cells through CCR2 signaling on the pathogenesis of diabetic nephropathy. ASN Renal Week 2011, 2011
 - 14) Wada T. Bone-marrow-derived cells and inflammatory processes in the regression of kidney fibrosis. 7th International Congress on Uremia Research and Toxicity (ISURT), 2011
 - 15) 和田隆志：糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発, 第53回日本腎臓学会学術総会 OPS-6-1, 2010
 - 16) 清水美保、古市賢吾、北川清樹、原章規、遠山直志、舟本智章、能勢知可子、和田隆志、横山仁：当科における糖尿病性腎症の臨床病理学的検討, 第22回日本糖尿病性腎症研究会, 2010
 - 17) 清水美保、能勢知香子、舟本智章、山内博行、原章規、北川清樹、坂井宣彦、古市賢吾、和田隆志：当科における糖尿

病性腎症の臨床病理学的検討. 第 53
回日本腎臓学会学術総会, 2010

- 18) 和田隆志: 糖尿病性腎症: 治療の進歩,
第 40 回日本腎臓学会西部学術大会 教
育セミナー11, 2010
- 19) Hara A, Sakai N, Yamauchi H,
Kitagawa K, Furuichi K, Kaneko S,
Wada T. Involvement of fibrocytes in
the progression of diabetic
nephropathy via MCP-1/CCR2
signaling. ASN Renal Week 2010, 2010
- 20) Hara A, Sakai N, Kitagawa K,
Furuichi K, Kaneko S, Wada T.
Involvement of fibrocytes in
diabetic kidney injury in
streptozotocin-treated mice.
The 9th World Congress on
Inflammation, 2009

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

- 1) 出願番号: 特願 2010-281080
発明の名称: 腎症の進行度の判定方法
並びに線維化抑制剤

2. 実用新案登録

3. その他

研究成果の刊行に関する一覧

3年間の業績に関し、謝辞があるものを以下に記載する。

【全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用】

- 1) Iwano M. EMT and TGF-beta in renal fibrosis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2:229-238 2010
- 2) Iwano M, Yamaguchi Y, Iwamoto T, Nakatani K, Matsui M, Kubo A, Akai Y, Mori T, Saito Y. Urinary FSP1 Is a Biomarker of Crescentic GN. *Journal of American Society of Nephrology* Nov 17. [Epub ahead of print], 2011
- 3) Yokoyama H. Clinicopathological insights into lupus glomerulonephritis of Japanese and Asians. *Clinical Exp Nephrol* 15, 321-330, 2011
- 4) Sugiyama H, Yokoyama H, Sato H, Saito T, Kohda Y, Nishi S, Tsuruya K, Kiyomoto H, Iida H, Sasaki T, Higuchi M, Hattori M, Oka K, Kagami S, Nagata M, Kawamura T, Honda M, Fukasawa Y, Fukatsu A, Morozumi K, Yoshikawa N, Yuzawa Y, Matsuo S, Kiyohara Y, Joh K, Taguchi T, Makino H; Committee for Standardization of Renal Pathological Diagnosis and Working Group for Renal Biopsy Database, Japanese Society of Nephrology, Tokyo, Japan. Japan Renal Biopsy Registry: the first nationwide, web-based, and prospective registry system of renal biopsies in Japan. *Clin Exp Nephrol* 15(4), 493-503, 2011
- 5) 横山 仁. 膜性腎症の疫学：腎臓病総合レジストリーの解析から. *日腎会誌* 53, 677-683, 2011

【分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析】

- 1) Koya D, Haneda M, Inomata S, Suzuki Y, Suzuki D, Makino H, Shikata K, Murakami Y, Tomino Y, Yamada K, Araka S, Kashiwagi A, Kikkawa R. Long-term effect of modification of dietary protein intake on the progression of diabetic nephropathy: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 52:2037-2045, 2009
- 2) Shikata K, Haneda M, Koya D, Suzuki Y, Tomino Y, Yamada K, Maeda S, Kawakami N, Uzu T, Nishimura M, Sato C, Ogawa D, Makino H; DNETT-Japan Study Group. Diabetic Nephropathy Remission and Regression Team Trial in Japan (DNETT-Japan): Rationale and study design. *Diabetes Res Clin Pract* 87, 228-232, 2010
- 3) Yamagata K, Makino H, Akizawa T, Iseki K, Itoh S, Kimura K, Koya D, Narita I, Mitarai T, Miyazaki M, Tsubakihara Y, Watanabe T, Wada T, Sakai O, and Advisory Committee for FROM-J. Design and methods of a strategic outcome study for chronic kidney disease - Frontier of Renal Outcome Modifications in Japan (FROM-J) . *Clin Exp Nephrol* 14, 144-151, 2010
- 4) Nagata M, Ninomiya T, Doi Y, Yonemoto K, Kubo M, Hata J, Tsuruya K, Iida M, Kiyohara Y. Trends in the prevalence of chronic kidney disease and its risk factors in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Nephrol Dial Transplant* 25, 2557-2564, 2010
- 5) Sawaguchi M, Araki S, Kobori H, Urushihara M, Haneda M, Koya D, Kashiwagi A,

Uzu T, Maegawa H. Association between urinary angiotensinogen levels and renal and cardiovascular prognoses in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation* , (in press)

- 6) Ichikawa K, Konta T, Ikeda A, Fujimoto S, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Significance of past history of kidney disease for the detection of individuals with high-risk chronic kidney disease: analysis of data from a nationwide cohort. *Clin Exp Nephrol*, 2011
- 7) Yano Y, Fujimoto S, Sato Y, Konta T, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Association between prehypertension and chronic kidney disease in Japanese general population. *Kidney Int* , 2012
- 8) Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Fujimoto S, Konta T, Asahi K, Ohashi Y, and Watanabe T. Risk factor profiles based on eGFR and dipstick proteinuria: Analysis of the participants of the Specific Health Check and Guidance System in Japan 2008. *Clin Exp Nephrol*, 2012
- 9) Kondo M, Yamagata K, Hoshi SL, Saito C, Asahi K, Moriyama T, Tsuruya K, Yoshida H, Iseki K, Watanabe T, and on behalf of the Japanese Society of Nephrology Task Force for the Validation of Urine Examination as a Universal Screening. Cost-effectiveness of chronic kidney disease mass screening test in Japan. *Clin Exp Nephrol* (in press)

【分科会：糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発】

- 1) Iwashima S, Ozaki T, Maruyama S, Saka Y, Kobori M, Omae K, Yamaguchi H, Niimi T, Toriyama K, Kamei Y, Torii S, Murohara T, Yuzawa Y, Kitagawa Y, Matsuo S. Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells Dev* 18(4), 533-43, 2009
- 2) Sakurai M, Nakamura K, Miura K, Takamura T, Yoshita K, Morikawa Y, Ishizaki M, Kido T, Naruse Y, Suwazono Y, Kaneko S, Sasaki S, Nakagawa H. Dietary glycemic index and risk of type 2 diabetes mellitus in middle-aged Japanese men. *Metabolism* ;61(1), 47-55, 2012

【分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発】

- 1) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Decreasing systolic blood pressure is associated with improving estimated glomerular filtration rate (eGFR) with lifestyle modification in Japanese healthy women. *Acta Med Okayama Vol.64*, P339-343, 2010
- 2) Kajitani N, Shikata K, Nakamura A, Nakatou T, Hiramatsu M, Makino H. Microinflammation is a common risk factor for progression of nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract Vol.88*, P171-176, 2010
- 3) Ogawa D, Asanuma M, Miyazaki I, Tachibana H, Wada J, Sogawa N, Sugaya T, Kitamura S, Maeshima Y, Shikata K, Makino H. High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. *Exp Diabetes Res*

Vol.2011, 2011

- 4) Koderu R, Shikata K, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, Kajitani N, Nishishita S, Sarai K, Hirota D, Sato C, Ogawa D, Makino H. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. *Diabetologia* Vol.54, P965-978, 2011
- 5) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Decreasing Abdominal Circumference Is Associated with Improving Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) with Lifestyle Modification in Japanese Men:A Pilot Study. 1. *Acta Med Okayama* Vol.65, P363-367, 2011
- 6) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Decreasing serum uric acid levels might be associated with improving estimated glomerular filtration rate (eGFR) in Japanese men. *Health* Vol.3, No.8, P498-503, 2011
- 7) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. The relation between estimated glomerular filtration rate (eGFR) and coffee consumption in the Japanese. *Health* 3(9), P549-552, 2011
- 8) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Comparison of muscle strength between subjects with and without proteinuria. *Health* Vol.3, No.11, P698-702, 2011
- 9) Wada T, Shimizu M, Toyama T, Hara A, Kaneko S, Furuichi K. Clinical impact of albuminuria in diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol*, 2011
- 10) Hara A, Sakai N, Wada T. Pathogenesis of diabetic complications through bone marrow-derived cells. *Journal of Wound Technology* in press
- 11) Furuichi K, Hisada Y, Shimizu M, Okumura T, Kitagawa K, Yoshimoto K, Iwata Y, Yokoyama H, Kaneko S, Wada T. Matrix metalloproteinase-2(MMP-2) and membrane-type 1 MMP (MT1-MMP) affect the remodeling of glomerulosclerosis in diabetic Nephrol Dial Transplant 26(10), 3124-3131, 2011

研究成果の刊行物・別刷

EMT and TGF-beta in renal fibrosis

Masayuki Iwano

First Department of Internal Medicine, Nara Medical University, 840 Shijo, Kashihara, Nara 634-8522, Japan

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Dissolution of cell-cell adhesion
4. Modulation of cell-ECM adhesion
5. EMT and TGF-beta1 signaling
6. EMT in the glomerulus
7. New therapeutic strategies aimed at inhibiting TGF-beta1-induced EMT
8. Conclusions
9. Acknowledgments
10. References

1. ABSTRACT

Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) is a member of TGF-beta superfamily and the principal mediator contributing to the development and progression of renal fibrosis in a variety of disease settings. A critical effect of TGF-beta1 is the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which likely explains the continuous replenishment of fibroblasts during the progression of tissue fibrosis. Since we first identified EMT as the origin of fibroblasts in renal fibrosis, the signaling underlying EMT has been intensively studied in the field of nephrology. During the past five years, detailed mechanisms by which TGF-beta1 induces EMT have been clarified, and novel therapeutic approaches targeting TGF-beta1-mediated EMT are now being proposed.

2. INTRODUCTION

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is an important physiological event that occurs frequently during embryonic development (1). However, numerous reports have shown that EMT can also occur during pathological states, such as tumor metastasis and tissue fibrosis (2-6). It is well established that tissue fibroblasts are the principal effector cells in the accumulation of extracellular matrix (ECM), but the origin of those fibroblasts was not known until recently (7). Since our report that some fraction of the tissue fibroblasts involved in renal fibrosis originates from EMT, many studies have confirmed that EMT plays a critical role in the development and progression of renal fibrosis (4).

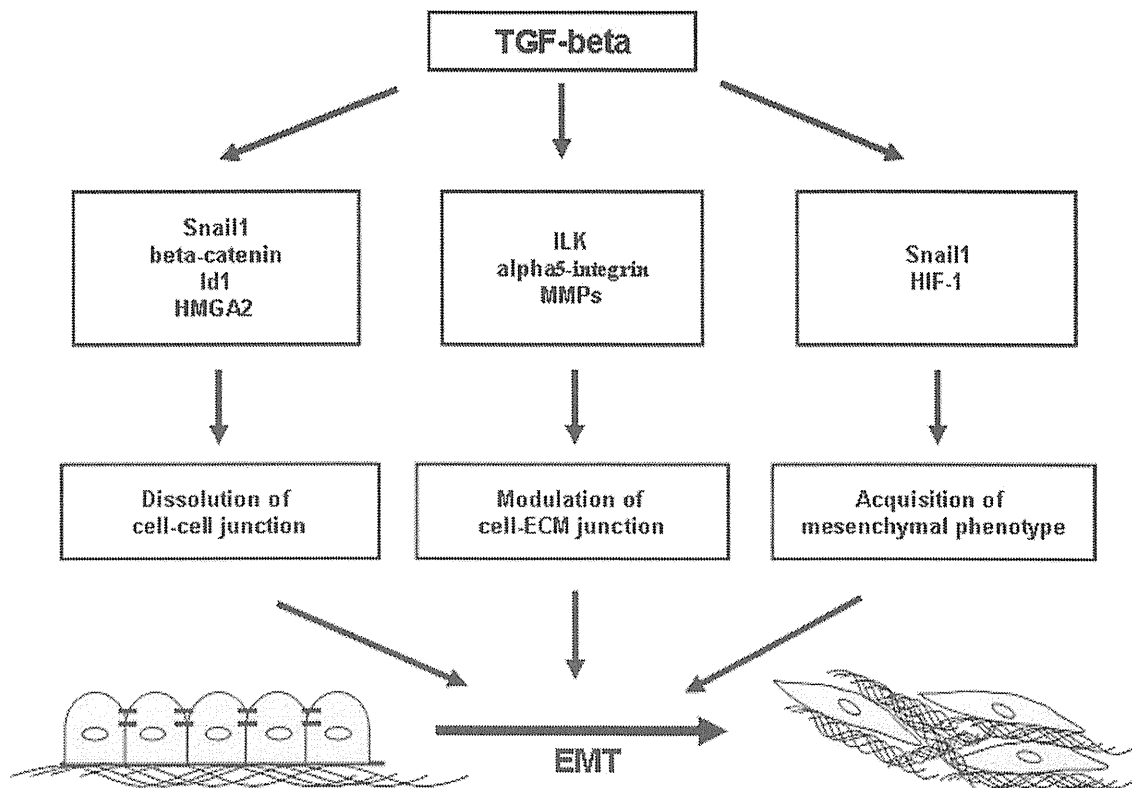


Figure 1. TGF-beta1 as a master regulator of EMT

EMT is a multi-step process involving the dissolution of tight junctions and adherens junctions, modulation of cell-ECM junctions, reorganization of the actin cytoskeleton, induction of mesenchymal gene expression, and acquisition of cellular motility. Numerous reports have shown that transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) is involved with these steps, and TGF-beta1 is now thought to be the master regulator governing the induction of EMT (8, 9) (Figure 1). Because epithelial cells are tightly bound to one another through cell-cell and cell-ECM junctions, dissolution of these junctions is necessary before epithelium can undergo EMT. Once epithelium loses its cellular polarity through the loss of these junctions, it acquires mesenchymal phenotypes, moves to interstitial areas, and participates in the accumulation of ECM. The mechanisms underlying this process are quite complex, and much remains to be learned about the molecular events mediating it. Identification of the key molecules (e.g., TGF-beta1) involved in the EMT process is essential for the development of novel therapies aimed at inhibiting the progression of fibrosis. In this review, we discuss the recent advances in our understanding of the biology of TGF-beta1-induced EMT, focusing on its role in renal fibrosis.

3. DISSOLUTION OF CELL-CELL ADHESION

E-cadherin is a well-known prototypical adhesion molecule localized in adherens junctions, which are linked to the cortical actin cytoskeletons of cells. Repression of

E-cadherin is a hallmark of EMT and is considered to be an integral step in the EMT process. A variety of transcriptional factors, including Snail1, Slug (Snail2), SIP-1, ZEB-1, E12/E47 and Twist, are known to bind directly to E-boxes in the promoter regions of E-cadherin (8, 10, 11). In particular, studies have emphasized the key role played by the zinc-finger transcription factor Snail1 which TGF-beta1 has been shown to upregulate via both Smad-dependent and -independent signaling pathways (12-14). Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells transfected with Snail1 show downregulated E-cadherin expression, increased expression of mesenchymal markers (vimentin and fibronectin), and transformation to a fibroblastoid phenotype (11). In transgenic mice, tamoxifen-induced Snail1 activation leads to development of renal fibrosis with the loss of epithelial features in renal tubules (15). Snail1 was also recently reported to be a critical regulator of fibroblast function *in vitro* and *in vivo*, and to continue to activate cellular motility and proliferation, even after terminal differentiation of mesenchymal cells (16).

Snail1 also binds directly to E-boxes in the promoter regions of two tight junction proteins, claudin and occludin, resulting in complete repression of their promoter activity. Snail1 is thus able to simultaneously repress expression of genes encoding both adherens and tight junctions (17). Claudin, occludin, two partitioning-defective proteins (PAR3 and PAR6) and zonula occludens (ZO)-1 are all membrane proteins localized at tight junctions, which are responsible for establishing and

maintaining epithelial cell polarity. Occludin binds to the TGF-beta type I receptor (TbetaRI) and promotes its recruitment to tight junctions. TGF-beta1-mediated induction of EMT is followed by the additional recruitment of TGF-beta type II receptor (TbetaRII) to the same junction complexes. In this way, occludin regulates TbetaRI localization for efficient TbetaRI-dependent dissolution of tight junctions during EMT (18). At the same time, Id1, an early TGF-beta1-inducible protein, suppresses expression of E-cadherin and ZO-1. Id1 also prevents HEB, a basic helix-loop-helix transcription factor, from binding to the E-box by sequestering it through formation of a heterodimeric HEB/Id1 complex, thereby blocking its transactivation of E-cadherin gene transcription (19).

Another molecule that has been shown to suppress E-cadherin gene transcription is T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer factor-1 (TCF/Lef1), which is associated with Wnt/beta-catenin signaling (13, 20). In renal proximal tubular cells, TGF-beta1-induced beta-catenin is required for synthesis of alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) as a marker of EMT (21). The Wnt signaling pathway is a necessary component that drives EMT in several embryonic processes (22). Wnt signaling promotes stabilization of cytoplasmic beta-catenin through phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta), which prevents beta-catenin's degradation (23). beta-Catenin is normally degraded via the ubiquitin proteasome pathway, which is mediated by a complex of proteins that includes adenomatous polyposis coli (APC), Axin and GSK-3beta (24). Dissociation of this complex as a result of GSK-3beta phosphorylation increases the stability of cytoplasmic beta-catenin and promotes its binding to TCF/Lef1. Subsequent nuclear translocation of the beta-catenin-TCF/Lef1 complex leads to a reduction in E-cadherin, thereby promoting EMT.

GSK-3beta phosphorylation has also been linked to the stable function of Snail1, which, like beta-catenin, is degraded via the ubiquitin pathway (25). Signaling pathways linked to phosphoinositide-3-kinase (PI3K) can also induce phosphorylation of GSK-3beta via downstream effectors such as integrin-linked kinase (ILK) and Akt (26). In addition, Snail1 and Slug promote formation of beta-catenin-TCF-4 transcription complexes that bind to the TGF-beta3 promoter to increase the gene's transcription. The resultant increase in TGF-beta3 signaling increases TCF/Lef1 gene expression, resulting in formation of beta-catenin-TCF/Lef1 complexes and thus initiation of EMT. Both TGF-beta1- and TGF-beta2-induced EMT appear to be TGF-beta3-dependent, establishing essential roles for multiple TGF-beta isoforms (27).

PAR3 and PAR6, two regulators of the apical-basal polarity of epithelial cells, were also reported to be key players during EMT. For instance, phosphorylation of PAR6 is required for TGF-beta1-dependent EMT in mammary gland epithelial cells. Ligand-activated TbetaRII phosphorylates PAR6, which in turn activates the E3 ubiquitin ligase SMURF1. SMURF1 then induces proteasomal degradation of RhoA, loss of the actomyosin

ring and breakdown of apical-basal polarity (28). TGF-beta1 induces transcriptional downregulation of PAR3, resulting in the cytoplasmic localization of aPKC and PAR6, downregulation of E-cadherin and loss of tight and adherens junctions. Conversely, forced expression of PAR3 leads to a marked inhibition of TGF-beta1-induced E-cadherin suppression (29). Snail1 inhibits Crumbs-3 expression, leading to the relocalization of PALS1 and PATJ, two components of the Crumbs-3 complex, as well as the relocalization of the PAR complex, which is followed by loss of apical-basal polarity. Both the PAR and Crumbs polarity complexes are displaced from tight junctions in MDCK cells undergoing Snail1-induced EMT (30). At the same time, Twist, another Snail family transcription factor, and FTS-1-binding proteins engage their respective promoters. The net result is the emergence of the EMT proteome and repression of epithelial proteins. Loss of E-cadherins and cytokeratins, rearrangement of actin stress fibers and expression of fibroblast specific protein 1 (FSP1), vimentin, interstitial collagens and, occasionally, alpha-SMA, mark the morphological transition of epithelial cells into fibroblasts (31).

4. MODULATION OF CELL-ECM ADHESION

Renal fibrosis is characterized by excess accumulation of ECM in the interstitium. Tubular epithelial cells (TECs) are surrounded by ECM, so that their biological interaction likely plays a key role in the progression of renal fibrosis. Integrins are heterodimeric proteins comprised of alpha and beta subunits and serve as receptors for ECM proteins. In primary murine TECs, TGF-beta1 upregulates expression of alpha5-integrin, while knocking down alpha5-integrin attenuates TGF-beta1-mediated induction of mesenchymal markers like alphaSMA, suggesting integrin signaling is involved in the induction of the mesenchymal phenotype (32). The adaptor molecule disabled-2 (Dab2) is a positive mediator of TGF-beta1 signaling that acts by bridging the heteromeric TGF-beta1 receptor complex to Smad proteins. TGF-beta1 was recently reported to induce the transient accumulation of Dab2 at the membrane and to increase Dab2 binding to beta1 integrin, which occurs concomitantly with the promotion of EMT. Downregulation of Dab2 inhibits activation of integrin, as indicated by the reduction of TGF-beta1-induced phosphorylation of focal adhesion kinase and cellular adherence, leading to the inhibition of EMT (33).

TGF-beta1 induces Smad-dependent expression of ILK in TECs. ILK is an intracellular serine/threonine protein kinase that interacts with the cytoplasmic domains of beta-integrins and numerous other cytoskeleton-associated proteins. ILK is involved in the regulation of such integrin-mediated processes as cell adhesion, changes in cell shape and deposition of ECM. Forced expression of ILK in human proximal TECs suppresses E-cadherin and induces fibronectin and MMP-2, while expression of a dominant-negative ILK mutant abrogates TGF-beta1-initiated EMT, suggesting ILK plays a critical role in EMT (34). ILK also interacts with PINCH-1 (particularly interesting new cysteine-histidine rich protein-1), which