

---



---

原 著

---



---

# Alport 症候群モデルマウスに対する Hepatocyte Growth Factor (HGF) 遺伝子を用いた長期間の遺伝子治療検討

エレクトロポレーション法による反復 HGF 遺伝子導入の有効性について

土 谷 修 一

新潟大学大学院医歯学総合研究科小児科学分野

(主任：内山 聖教授)

## Long Term HGF Gene Therapy of Alport Model Mice: Effectiveness of Repeated HGF Gene Transfer into Muscle by Electroporation

Shuuichi TSUCHIYA

*Division of Pediatrics,*

*Graduate School of Medical and Dental Sciences,*

*Niigata University*

*(Director: Prof. Makoto UCHIYAMA)*

### 要 旨

#### 【目的】

本研究では、Alport 症候群モデルマウスにマウス HGF をエレクトロポレーションすることで反復遺伝子導入を可能とし、その有効性をより臨床応用に近い形で検討した。また、HGF の効果と TGF- $\beta$ 1 との相互関係を明らかにするために、本モデルマウスの単離糸球体、ラットメサンギウム細胞を用いて検討を行った。

#### 【方法】

- 1) 8 週齢の野生型マウスと Alport モデルマウスの糸球体での HGF と c-Met の発現を蛍光抗体染色と半定量的 RT-PCR 法で検討した。
- 2) HGF 遺伝子の導入は、pmHGF-LacZ プラスミドを 4 週齢から 3 週毎にエレクトロポレーションにより筋肉に導入した。効果判定のため、尿蛋白と腎病理組織などを経時的に検討した。
- 3) ラットメサンギウム細胞を用い、rhTGF- $\beta$ 1 を 2ng と 4ng に分け培地に添加すると共

Reprint requests to: Shuuichi TSUCHIYA  
Division of Pediatrics  
Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Niigata University  
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,  
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科小児科学教室  
土 谷 修 一

に, pCAG-mHGF を遺伝子導入し, HGF と TGF- $\beta$ 1 相互の制御機構について検討した.

#### 【結果】

1) HGF の発現は, C4a4 ko マウスでは野生型マウスと比べ抑制されていた. 逆に c-Met の発現は, 野生型マウスよりも C4a4 ko マウスにおいて亢進していた.

2) 血中 HGF 濃度は, 尿蛋白が顕在化する前から低下し始め, 8 週齢には野生型マウスの半分以下まで低下した. また, mHGF 群の血中濃度は, 高値に保たれていた.

3) mHGF 群では, 尿蛋白が抑制され, 生命予後も有意に改善した.

4) 対照群に比べ, mHGF 群で 8 週齢の糸球体上皮細胞数は有意に保たれ, TUNEL 陽性の上皮細胞は有意に減少していた.

5) TGF- $\beta$ 1 を添加した培養細胞では HGF の発現は抑制され, 4ng 添加した細胞でより強く抑制された. また, mHGF を強制発現させた細胞では, TGF- $\beta$ 1 の発現は抑制された.

6) 8 週齢の単離糸球体を用いた RT-PCR の結果, mHGF 群では, 対照群に比べ Smad2, 3 の発現は抑制されていた. また, TGIF は, mHGF 群では, 対照群に比べ有意に増加していた.

#### 【考察】

本研究の培養実験結果から, 本マウスの血中 HGF 濃度の低下は, 腎臓での TGF- $\beta$ 1 の発現増加と血中 TGF- $\beta$ 1 濃度増加に起因し, また, HGF 遺伝子治療は, 血中 HGF 濃度の増加させることで, 血中 TGF- $\beta$ 1 濃度を低下させていることが推測された.

長期間の HGF 遺伝子治療は, C4a4 ko マウスの腎症に対して有効であった. 本症での HGF の効果は, 低 HGF 血症を改善することで, TGF- $\beta$ 1 の発現および生物活性を抑制させ, 病初期にはアポトーシスをはじめとする糸球体上皮細胞への細胞障害を抑制し, また病中期以降では同様の機序で尿細管間質の線維化抑制作用を発揮し, 有効に作用すると考えられた.

HGF はヒトへの臨床応用に向けて検討されるべき薬剤であると考えられた.

キーワード: Alport 症候群, *Col4a4* ko マウス, HGF, 遺伝子治療, エレクトロポレーション, アポトーシス, TGF- $\beta$ 1

## 緒 言

アルポート症候群は, 血尿で始まる進行性腎症と難聴を伴う遺伝性の疾患で, 1927 年に Alport により初めて報告された遺伝性腎症としては最も頻度の高い疾患である. 腎糸球体硬化への進行を阻止あるいは抑制できる治療法の開発目的に, これまでにいくつかのモデル動物を用いた本症の治療が試みられている. これらの治療成績には, サイクロスポリン A (CyA)<sup>3)</sup> や, アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEi) を投与して尿蛋白抑制効果と, 生存期間の延長を認めたとする報告<sup>4)5)</sup> などがあり, 私たちの作成した本症のモデルマウスである IV 型コラーゲン  $\alpha$  鎖 4 遺伝子をノックアウトした *Col4a4* ノックアウトマウス (C4a4 ko マウス) でもこれらの薬剤に有効性を認めている<sup>6)</sup>. しかしながら, すでにヒトにも使用されているこ

れらの薬剤は, 症例によっては無効例も存在しており, 未だに確立された薬物療法はないのが現状である. また, 薬物療法以外の治療法として, 最近の報告では, 正常骨髄幹細胞を移植することで幹細胞が腎糸球体構成細胞に分化, GBM に正常 IV 型コラーゲンの網目構造が形成され, 腎症の進行が抑制されたとする報告がされているが<sup>7)8)</sup>, 私達のモデルマウスでは, 骨髄幹細胞の移植による GBM の正常化を認めず, 効果は認められなかった (未発表データ).

さまざまな臓器に対し再生・修復, 組織保護を担う重要な生理的因子の 1 つに肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor: HGF) がある. HGF の効果は, 腎臓においては, 主に急性および慢性腎不全で残存する尿細管実質の代償性成長の促進及び ECM の分解促進を介して腎機能を是正することが報告されている<sup>9)10)</sup>. また, 最近では, 糸

糸球体病変においても、抗 Thy1.1 による糸球体腎炎のラットモデルに組み換え型ヒト HGF を投与し、PDGF との拮抗作用によって選択的にメサンギウムの活性化と増殖を抑制することで糸球体硬化抑制する効果の報告<sup>11)</sup> や、Thy-1.1 + Hubu 毒による糸球体腎炎ラットモデルに同様に組み換え型ヒト HGF を投与し、糸球体血管内皮細胞の増生を促すことで糸球体硬化像を呈する障害糸球体を修復したという報告<sup>12)</sup>、糖尿病マウスを用い、HGF が糖尿病腎症の糸球体硬化に対して線維化解除を伴う再生現象が認められたとする報告<sup>13)</sup> などがある。

これまでに私たちは、Alport 症候群の治療法の検討として、HGF による本症モデルマウスの治療法を検討している<sup>14)</sup>。この検討では、HGF の遺伝子導入法として筋肉へのエレクトロポレーション法を選択した。エレクトロポレーション法を用いた理由としては、ウイルスベクターによる遺伝子導入法に比べ、合併症が少なく、プラスミドベクターを直接導入できるので容易な遺伝子導入法であり、筋組織に遺伝子を導入し目的の遺伝子産物を血清中に分泌させることがあげられる<sup>15)</sup>。また、これまでの報告では、筋肉での導入遺伝子の発現持続期間は3週から最長9ヶ月と様々であるが<sup>16)17)</sup>、遺伝子産物によっては、従来の製剤の筋注よりも持続的に血清濃度を維持できたという報告もあり<sup>18)</sup>、慢性腎不全のモデルでは、組み換え型 HGF による抗間質線維化作用を得るために大量の HGF を頻回投与する方法がとられているが<sup>19)20)</sup>、腎疾患治療薬としての臨床応用に関しては、生体内での遺伝子発現系による HGF 持続補充がより有望であると考えた。

この HGF による本症モデルマウスの遺伝子治療法を検討した磯部の研究報告<sup>14)</sup> では、ヒト HGF の遺伝子を導入遺伝子として用いたことから、ヒト HGF に対する抗体産生が危惧され、1回のみのエレクトロポレーションとなった。しかしながら、3週間しか持続しない遺伝子発現にも関わらず、Alport 症候群モデルマウスの蛋白尿を抑制し、生命予後を改善することができた。作用機序としては、TGF- $\beta$ 1 の抑制効果による糸球体

上皮細胞障害の抑制があることが考えられたが、その機序の詳細については、明らかにできなかった。本研究では、Alport 症候群モデルマウスにマウス HGF をエレクトロポレーション法することで反復遺伝子導入を可能とし、その有効性をより臨床応用に近い形で検討するとともに、HGF の効果と TGF- $\beta$ 1 との相互関係を明らかにするために、本モデルマウスの単離糸球体、ラットメサンギウム細胞を用いて *in-vivo* および *in-vitro* の両方から検討を行った。

## 方 法

### 1. 実験動物およびマウス HGF 遺伝子の導入

Alport 症候群モデルマウスとして、マウス種が C57BL6 と 129SV のハイブリッドの C4a4 ko マウスを用いた。HGF 遺伝子の導入は、磯部の方法では、ヒトの HGF を用いたが、今回は長期間の反復導入のため、HGF に対する抗体産生が行われないよう筋肉特異的に遺伝子発現を行う SR  $\alpha$  プロモーターにマウスの HGF cDNA (mHGF) をつなぎ、さらに、遺伝子導入された細胞をマーキングするために LacZ 遺伝子を付けたプラスミド pmHGF-LacZ (図 1a) をマウス 1 匹当たり 80  $\mu$ g (80  $\mu$ g/mouse) を 4 週齢から 3 週毎にモデルマウスの腓腹筋にエレクトロポレーション法により導入した。エレクトロポレーション法の条件は電圧可変装置 CUY-21 (ネッパジーン) を使用し、電圧 50V、通電時間 50msec、電流回数 8 回 (交互 4 回ずつ) に設定して、平行ニードル電極 (間隔 5mm) を筋肉に差し込み遺伝子導入を行った。対照群には、mHGF cDNA を除いたプラスミド pLacZ を導入した。導入された mHGF 遺伝子の発現は腓腹筋から抽出した total RNA を DNase I 処理後、RT-PCR を行い評価した。

### 2. 尿蛋白およびクレアチニンの測定

尿蛋白は、8、12、16 および 20 週齢での部分尿をピロガロールレッド法を用いて測定した。血清および尿中クレアチニン、血清尿素窒素の測定には、酵素法を用いた。

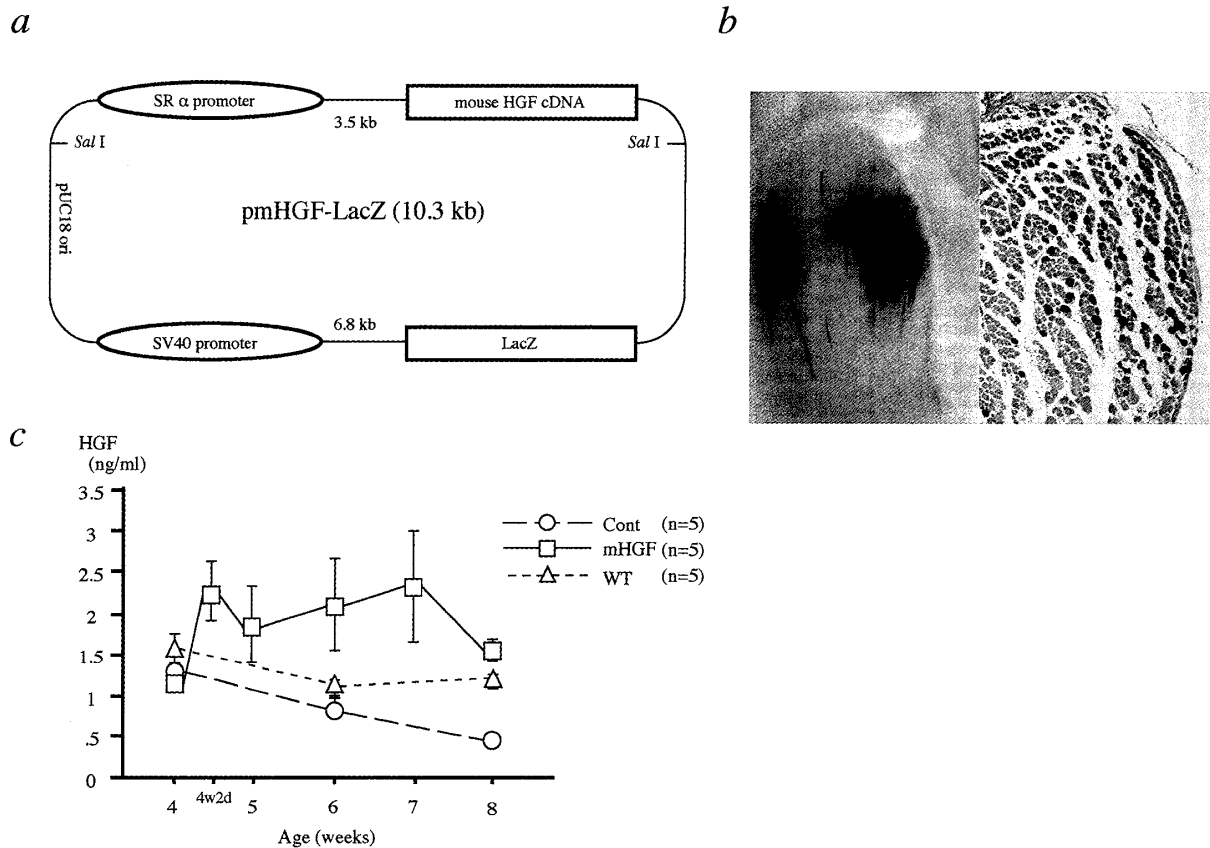


図1

**a** : プラスミド pmHGF-LacZ の構造

筋肉特異的に遺伝子発現を行う SR  $\alpha$  promoter にマウスの HGF 遺伝子をつなぎ、さらに、遺伝子導入細胞をマーキングするために LacZ 遺伝子を付けた。

**b** : pmHGF-LacZ エレクトロポレーション後の腓腹筋の X-gal 染色

遺伝子導入部位の確認のため 24 時間後に解剖し、腓腹筋を X-gal 染色した。注入部筋組織に LacZ 遺伝子の発現が認められる。

**c** : pmHGF-LacZ エレクトロポレーション後の *Col4a4* ノックアウトマウスの血中 HGF 濃度の推移

エレクトロポレーション後 48 時間で血中 HGF 濃度は高値となり、以降 7 週齢まで持続した。逆に、*Col4a4* ノックアウトマウスでは、血中 HGF 濃度は 8 週齢までに野生型マウスの約 3 分の 1 に低下していた。

Cont : *Col4a4* ノックアウトマウス, mHGF: pmHGF-LacZ を導入した *Col4a4* ノックアウトマウス, WT: 野生型マウス

### 3. 血中 HGF および TGF- $\beta$ 1 濃度の測定

各週齢マウスの眼静脈叢より採血し、血清を用いた。血中 HGF および TGF- $\beta$ 1 濃度は、ELISA 法により測定した。血中 HGF の測定には、HGF EIA kit (Institute of Immunology)、血中 TGF- $\beta$ 1 の測定には、Quantikine TGF- $\beta$ 1 ELISA kit (R&D) を用いた。

### 4. 腎の病理組織学的解析

光顕的観察は、腎臓をメチルカルノア液で固定し、PAS 染色を用いて行った。12 週齢と 16 週齢では各マウスより 50 個の糸球体を観察し、光顕上で糸球体の癒着とボーマン嚢上皮の 2 層以上の増殖を認めたものを半月体形成と判定し、半月体形成が認められる糸球体数を数え、全糸球体数に

対する障害の割合を百分率で示した。電顕標本は、腎組織を数ミリ角に切り、2.5%グルタルアルデヒド・リン酸バッファー液で固定し、Epon 812 (Taab) で包埋した。ウルトラミクロトームにて 100nm 厚の切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染め、電顕を用いて観察した。

## 5. 免疫組織化学

### a. 凍結切片の作成

腎組織を OCT コンパウンド (Sakura Finetech) に包埋、凍結した後、クライオトームを用いて 4 $\mu$ m 厚の切片を作成した。室温で乾燥させた後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

### b. 糸球体上皮細胞数の比較検討

8 週齢マウスでは、1 腎につき 1 切片 50 個、半月体等の明らかな病変を認めない糸球体について上皮細胞数を測定した。4 $\mu$ m の厚さの凍結切片を Target Retrieval Solution (Dako) にて 97 $^{\circ}$ C 30 分処理し、その後、抗ヒト WT1 ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz) により核染色した。染色には、Vectstain ABC kit (Vector Laboratories) を用いた an avidin-biotin coupling (ABC) reaction による染色を行った。糸球体上の WT1 陽性細胞を上皮細胞と考え、細胞数を計測した。

### c. 各種抗体染色および TUNEL 染色

凍結切片は、尿素処理をして 1 次抗体を室温で反応させた。HGF は、抗ヒト HGF  $\alpha$  ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Santa Cruz) を一次抗体に、c-Met には、抗マウス c-Met ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Santa Cruz) を一次抗体に、二次抗体として FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz) を使用した。

尿細管間質の線維化の指標に、抗マウス Mac-1 ラット IgG モノクローナル抗体 (Chemicon)、抗ラット Collagen type I (Col I) ウサギ IgG ポリクローナル抗体を用いて ABC による染色を行い、 $\alpha$ -SMA 染色には、EPOS System (Dako) を使用した。また、TUNEL 染色は、*in situ* Apoptosis Detection Kit (宝酒造) を用いて行った。

## 6. 単離糸球体 RNA を用いた半定量的 RT-PCR および Real Time

単離糸球体は、Takemoto らの方法を用いて採取した<sup>21)</sup>。RNA は、TRIZOR (Sigma) を用いて抽出し、DNase I 処理後、RNA 2 $\mu$ g を RT に用いた。半定量的 PCR を行った遺伝子の mRNA 量は、NIH image を用いて測定した。Real Time PCR には、SYBR Premix EX Taq を使用し、SmartCycler (TaKaRa) で定量化を行った。また、半定量的 PCR と Real Time PCR に用いた Primer を表 1, 2 に示した。

## 7. ラットメサンギウム細胞への TGF- $\beta$ 1 および HGF の添加実験

まず、初代培養ラットメサンギウム細胞 (森岡 哲夫先生より分与：新潟大学附属腎研究施設機能制御学分野) を 24 well dish に  $1 \times 10^5$ /well で撒き、20% FBS 入りの DMEM で 24 時間培養した。その後、recombinant ヒト TGF- $\beta$ 1 (rhTGF- $\beta$ 1) (R&D) を添加、2ng と 4ng/ml の 2 種類の濃度に分け、48 時間培養した。また、TGF- $\beta$ 1 に用いたものとは別に、ラットメサンギウム細胞に活性の強い CAG プロモーターに mHGF をつないだ pCAG-mHGF を 1well あたり 0.5 $\mu$ g 遺伝子導入用試薬 TransFast (Promega) を用いて遺伝子導入し、48 時間培養した。それぞれ培養後、トリプシン処理で細胞を採取し、TRIZOR を用いて RNA を抽出し、DNase I 処理後、RNA 2 $\mu$ g を RT に用いた。各遺伝子の mRNA 量は Real Time PCR を用いて定量化した。

## 8. 統計処理

生存期間、半月体形成率に関しては Student の t-検定を用いた。その他の統計処理は Mann-Whitney の U 検定を用いた。

## 結 果

### 1. エレクトロポレーション法による mHGF 遺伝子発現

エレクトロポレーション後 24 時間してから

表1 半定量的 RT-PCR に使用した Primer を示す。

| Gene             | Sequence              |
|------------------|-----------------------|
| mHGF F           | CTGTTGCTGCAGCATGTCCT  |
| mHGF R           | CCTGATACACCTGTTGGCAC  |
| C-Met F          | TGAAGGGTCTCCTCTGGTGG  |
| C-Met R          | CCATCCACTTTACTGGTAGC  |
| TGF- $\beta$ 1 F | CTGCTGACCCCCACTGATAC  |
| TGF- $\beta$ 1 R | CAAATATAGGGGCAGGGTCC  |
| Bcl-X1 F         | GTACCGGAGAGCGTTCAGTG  |
| Bcl-X1 R         | AGCGGTTGAAGCGCTCCTGG  |
| Bax F            | ATCCAGGATCGAGCAGGGAG  |
| Bax R            | GCCTTGAGCACCAGTTTGCT  |
| Caspase3 F       | GGAGCTGGACTGTGGCATTGA |
| Caspase3 R       | CAGTCTTTTCGTCAGCATGGA |
| Caspase8 F       | GCAGGAGACCATCGAGGATG  |
| Caspase8 R       | CGCTCACTTCTTCTGAGAGC  |
| GAPDH F          | GTGTCTTCACCACCATGGAG  |
| GAPDH R          | GGATGACCTTGCCACAGC    |

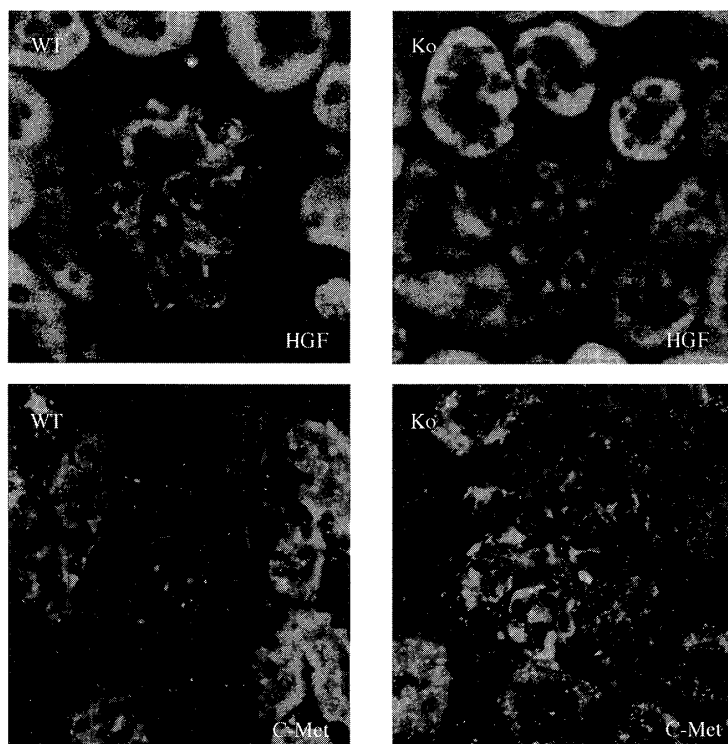
Note. F, forward; R, revers.

表2 Real Time PCR で使用した Primer を示す。

| Gene    | Sequence                  |
|---------|---------------------------|
| Smad2 F | CAGTGCGATGCTCAAGCATG      |
| Smad2 R | TGATGAGACCTCAAGTGCTG      |
| Smad3 F | CACCACGCAGAACGTGAACA      |
| Smad3 R | CATGGTGGCTGTGCAGGTCG      |
| Smad4 F | GCTATAGGTAGGCTGTCTAC      |
| Smad4 R | GCATCCTGGCCACACTGTAG      |
| HGF F   | ATGGATCACACAGAATCAG       |
| HGF R   | ATGGCCTCGGCTTGCCATC       |
| TGIF F  | TGAACACAGATAACAACGCCTATCC |
| TGIF R  | GCCATCCTTTCTCAGCATGTC     |
| GAPDH F | TGCACCACCAACTGCTTAG       |
| GAPDH R | GGATGCAGGGATGATGTC        |

表2の Primer は、すべて、マウスとラットの両方で増幅できるように設計されている。

a



b

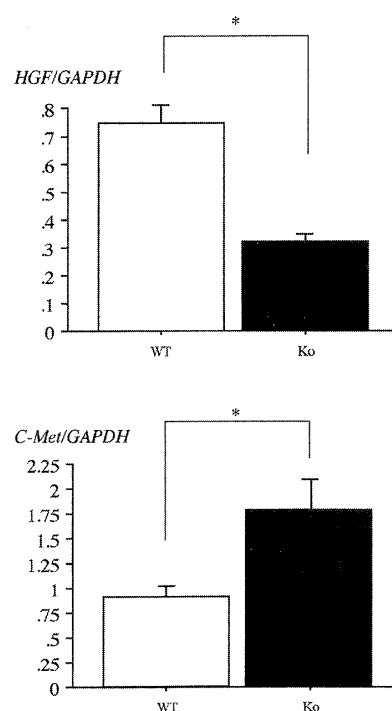


図2 *Col4a4* ノックアウトマウスの糸球体における HGF, C-Met の発現

a : 蛍光抗体 b : 単離糸球体 RNA を用いた半定量的 RT-PCR

LacZ 染色を行い、遺伝子導入部位および効率を検討したが、全例の腓腹筋に導入されていることが確認された (図 1b)。mHGF 遺伝子の発現期間は、hHGF の場合と同様に 3 から 4 週の間で消失が認められた (未発表データ)。したがって、mHGF 遺伝子の発現も、エレクトロポレーション法では約 3 週間持続すると考えられ、4 週齢からの 3 週毎の反復法による遺伝子導入を行うこととした。

## 2. 血中 HGF 濃度の推移

4 週齢 C4a4 ko マウスの腓腹筋にエレクトロポレーションを行い、その後の血中濃度の推移を検討した。C4a4 ko マウスの自然経過では、尿蛋白の増加をはじめ 8 週齢の C4a4 ko マウスの HGF 血中濃度は野生型マウスの約 3 分の 1 に低下しており、本実験でのエレクトロポレーション

による C4a4 ko マウスの HGF 血中濃度は筋肉での発現が持続する期間 (3 週間) で、高値に保たれていた (図 1c)。

## 3. C4a4 ko マウスの腎糸球体における HGF と c-Met 受容体の発現

今回の検討に際して C4a4 ko マウスの HGF と HGF 受容体である c-Met の糸球体での発現を蛍光抗体法と単離糸球体 RNA を用いて半定量的 RT-PCR で検討した。8 週齢マウスにおける HGF の発現は、蛍光抗体染色の結果、メサンギウム領域に局限していたが、C4a4 ko マウスでは野生型マウスと比べ弱く、RNA の発現も抑制されていた。c-Met の発現は、逆に野生型マウスよりも C4a4 ko マウスの障害糸球体において、RNA および蛋白レベルの両方で亢進していることがわかった (図 2a, b)。

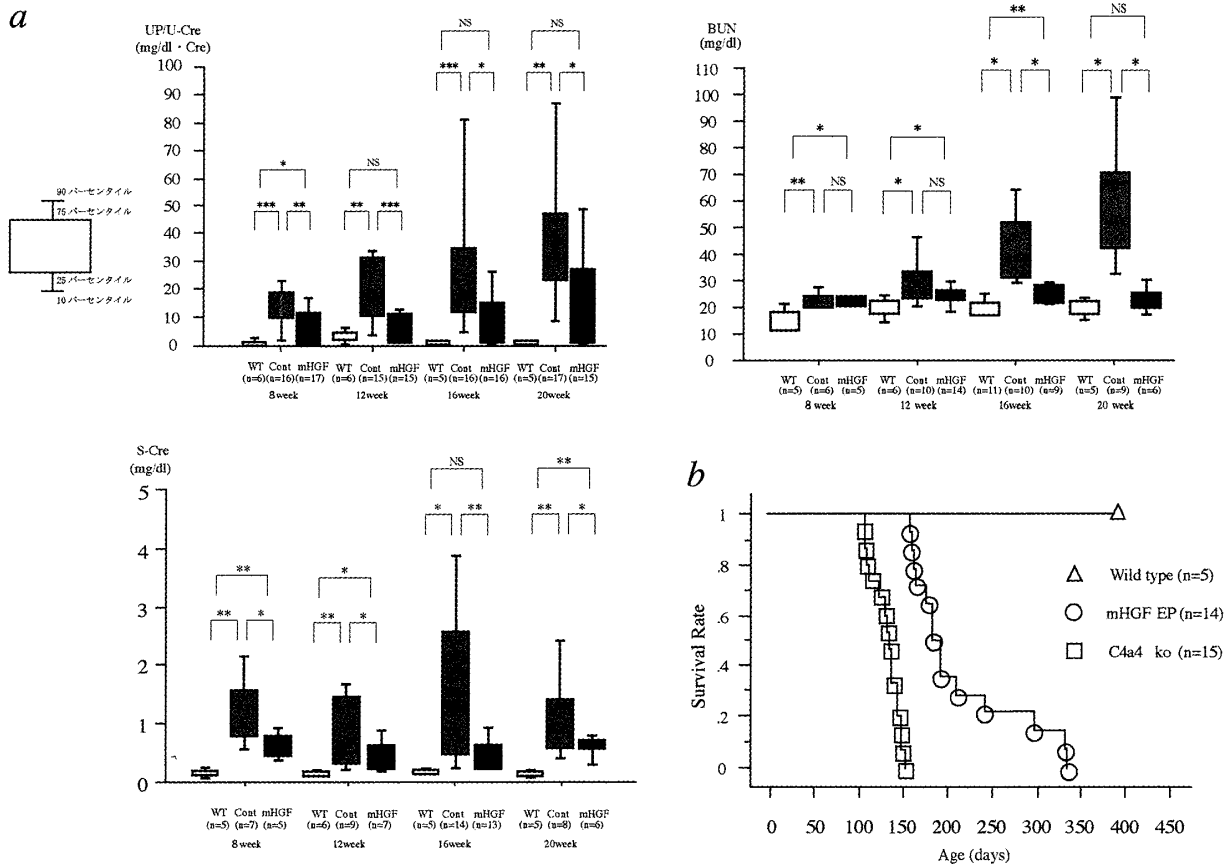


図3

## a : mHGF 遺伝子導入による効果

尿蛋白/クレアチニン比は、8週齢では、野生型マウス (n = 6)  $0.96 \pm 0.56$ , 対照群 (n = 16)  $13.79 \pm 6.97$  (平均値±標準偏差), mHGF 遺伝子導入群 (以下 mHGF 群) (n = 17)  $6.62 \pm 6.48$ , 12週齢では、野生型マウス (n = 6)  $3.02 \pm 2.03$ , 対照群 (n = 15)  $21.75 \pm 14.07$ , mHGF 群 (n = 15)  $6.54 \pm 4.93$ , 16週齢では、野生型マウス (n = 5)  $0.50 \pm 0.28$ , 対照群 (n = 16)  $36.77 \pm 47.79$ , mHGF 群 (n = 16)  $9.89 \pm 10.47$ , 20週齢では、野生型マウス (n = 5)  $2.95 \pm 2.51$ , 対照群 (n = 17)  $39.13 \pm 25.69$ , mHGF 群 (n = 15)  $17.29 \pm 18.37$  であり, mHGF 群ではすべての週齢で対照群に比べ有意に蛋白尿は抑制された。同様に, 血清クレアチニンも 20週齢までのすべての週齢で, また BUN は, 16週齢と 20週齢の mHGF 群で有意に抑制された。

UP/U - Cre : 尿蛋白/クレアチニン比, BUN : 血清尿素窒素, S - Cre : 血清クレアチニン

## b : 累積生存率による mHGF 遺伝子導入の効果判定

mHGF 遺伝子導入群の生存率は, すべての日齢で対照群よりも上回っており, 生存期間  $211.93 \pm 16.92$  日でも対照群 ( $129.53 \pm 4.09$  日) と比べ有意な延長 ( $p < 0.0001$ ) が認められた。

## 4. 蛋白尿, 血清クレアチニン, BUN

尿蛋白/クレアチニン比は, 8週齢では, 野生型マウス (n = 6)  $0.96 \pm 0.56$ , 対照群 (n = 16)  $13.79 \pm 6.97$  (平均値±標準偏差), mHGF 遺伝子導入群 (以下 mHGF 群) (n = 17)  $6.62 \pm 6.48$ ,

12週齢では, 野生型マウス (n = 6)  $3.02 \pm 2.03$ , 対照群 (n = 15)  $21.75 \pm 14.07$ , mHGF 群 (n = 15)  $6.54 \pm 4.93$ , 16週齢では, 野生型マウス (n = 5)  $0.50 \pm 0.28$ , 対照群 (n = 16)  $36.77 \pm 47.79$ , mHGF 群 (n = 16)  $9.89 \pm 10.47$ , 20週齢



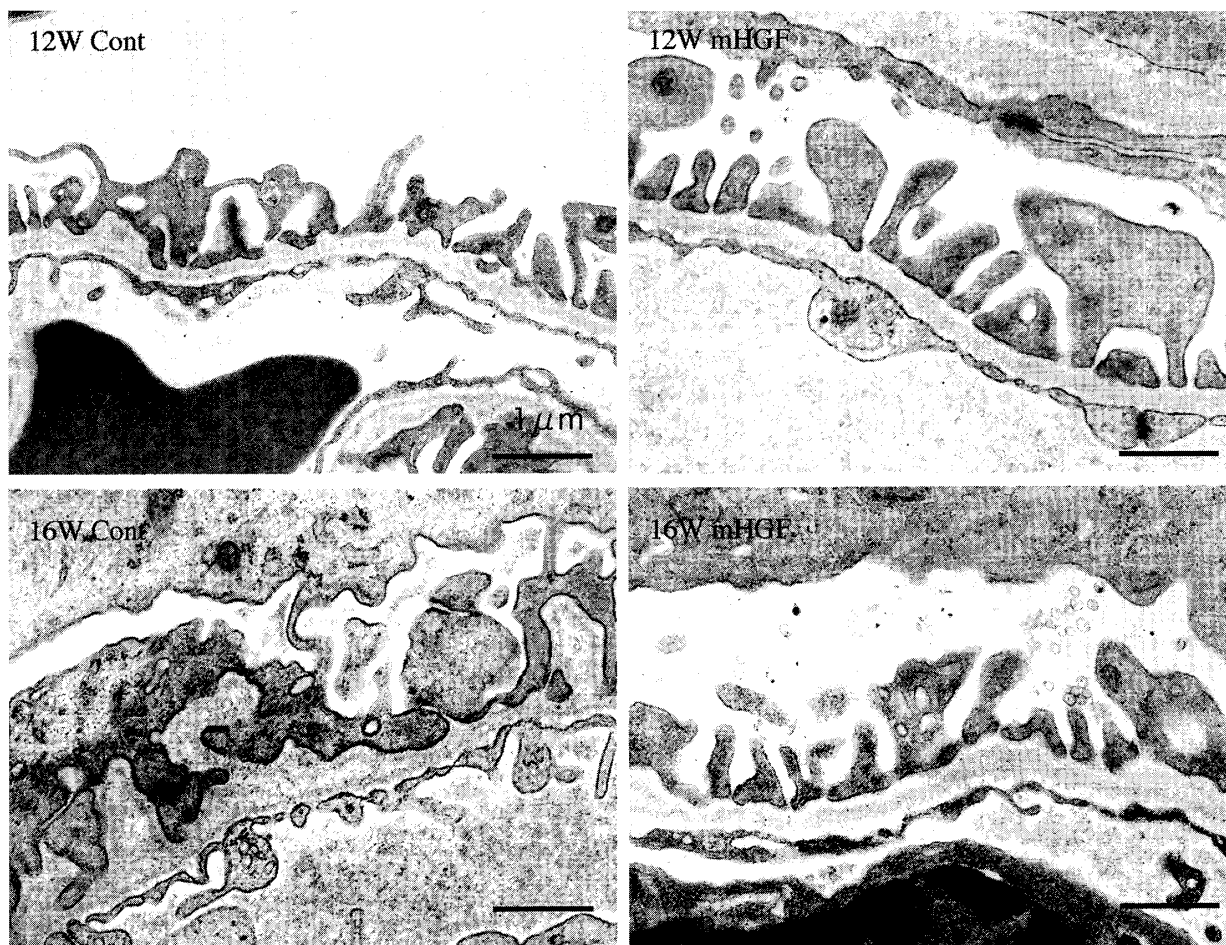


図4 mHGF 遺伝子導入群マウスの糸球体基底膜領域の電顕像

12 週齢から 16 週齢にかけて、対照群では、GBM の不整は著明となり、肥厚した部分と菲薄化および断裂した部分の双方が認められ、糸球体上皮細胞足突起も癒合し、完全に平坦化するが、mHGF 群では、GBM の変化および足突起の癒合もより緩徐に進行していた。

では、野生型マウス ( $n = 5$ )  $2.95 \pm 2.51$ 、対照群 ( $n = 17$ )  $39.13 \pm 25.69$ 、mHGF 群 ( $n = 15$ )  $17.29 \pm 18.37$  であり、mHGF 群ではすべての週齢で対照群に比べ有意に蛋白尿は抑制された。同様に、血清クレアチニンも 20 週齢までのすべての週齢で、また BUN は、16 週齢と 20 週齢の mHGF 群で有意に抑制された (図 3a)。

### 5. 生存期間

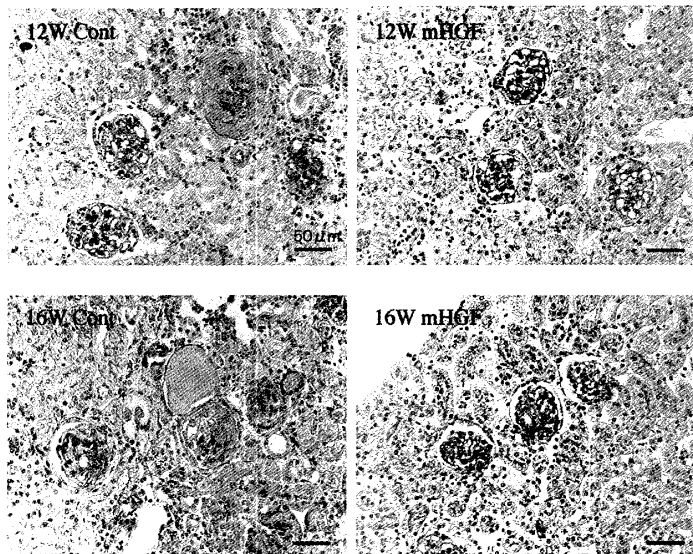
累積生存率では、mHGF 群は対照群をすべての日齢で上回っていた (図 3b)。生存期間は、対照群 ( $n = 15$ )  $129.53 \pm 4.09$  日、mHGF 群 ( $n =$

14)  $211.93 \pm 16.92$  日であり、mHGF 群は有意 ( $p < 0.0001$ ) に生命予後の改善が認められた。

### 6. 病理組織学的検討

電顕では、12 週齢から 16 週齢にかけて、対照群では、GBM の不整は著明となり、肥厚した部分と菲薄化および断裂した部分の双方が認められ、糸球体上皮細胞足突起も癒合し、完全に平坦化するが、mHGF 群では、GBM の変化および足突起の癒合もより緩徐に進行していた (図 4)。光顕では、12 週齢の対照群では、一部の糸球体に半月体が認められ、さらに、16 週では線線性変化な

a



b

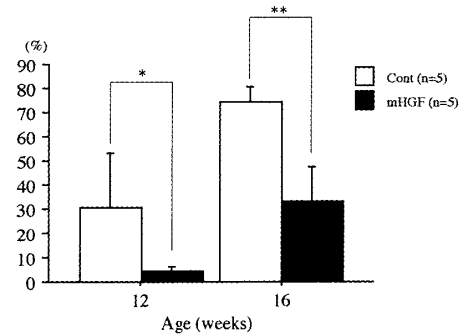


図5 mHGF遺伝子導入マウスにみられる病理組織学的変化

a: 光顕像

光顕では、12週齢の対照群では、一部の糸球体に半月体が認められ、さらに、16週齢では線維性変化ないし癒痕化をきたしている糸球体も一部に認められた。また、尿細管および間質にも細胞浸潤と線維化が認められた。mHGF群では、半月体形成は対照群に比較して12週、16週齢でともに有意に抑制され、線維性変化をきたした糸球体も少なかった。

b: 半月体形成率

半月体形成率は、12週齢で対照群 (n = 5) 30.8 ± 22.1 %, mHGF群 (n = 5) 4.6 ± 1.8 %, 16週齢で対照群 (n = 5) 74.4 ± 6.2 %, mHGF群 (n = 5) 33.0 ± 14.4 % であり、mHGF群で有意 (12週齢: p = 0.0297, 16週齢: p = 0.0004) に半月体形成の抑制が認められた。

いし癒痕化をきたしている糸球体も一部に認められた。また、尿細管および間質にも細胞浸潤と線維化が認められた (図5a)。mHGF群では、半月体形成は対照群に比較して12週、16週齢でともに有意に抑制され、線維性変化をきたした糸球体も少なかった (図5a, b)。

## 7. 糸球体上皮細胞数の比較、および糸球体でのアポトーシスの頻度と関連分子の変化

8週齢の糸球体上皮細胞数は、対照群に比較してmHGF群では有意に多く保たれていた (図6)。また、糸球体上皮細胞の減少にともない、本マウスでは、野生型マウスに比べ上皮細胞でもTUNEL陽性細胞が増加することが明らかになっ

ており (未発表データ)、今回の検討では、対照群に比較して、mHGF群でTUNEL陽性の上皮細胞は有意に減少していた (図7a)。

TUNELの結果から、いくつかのアポトーシスの関連分子の発現を8週齢マウスの単離糸球体を用いた半定量的RT-PCRで検討した。アポトーシスを抑制する分子と知られるBcl-xLは、野生型マウスに比べ、糸球体での発現は、対照群で減少していたが、mHGF群では、野生型マウスに比べても有意に増加していた。逆に、アポトーシスを促進する分子Baxとその下流でアポトーシスを実行する分子であるcaspase3は、野生型マウスに比べ、有意に対照群で増加していたが、mHGF群では、野生型マウスと同じレベルに保た

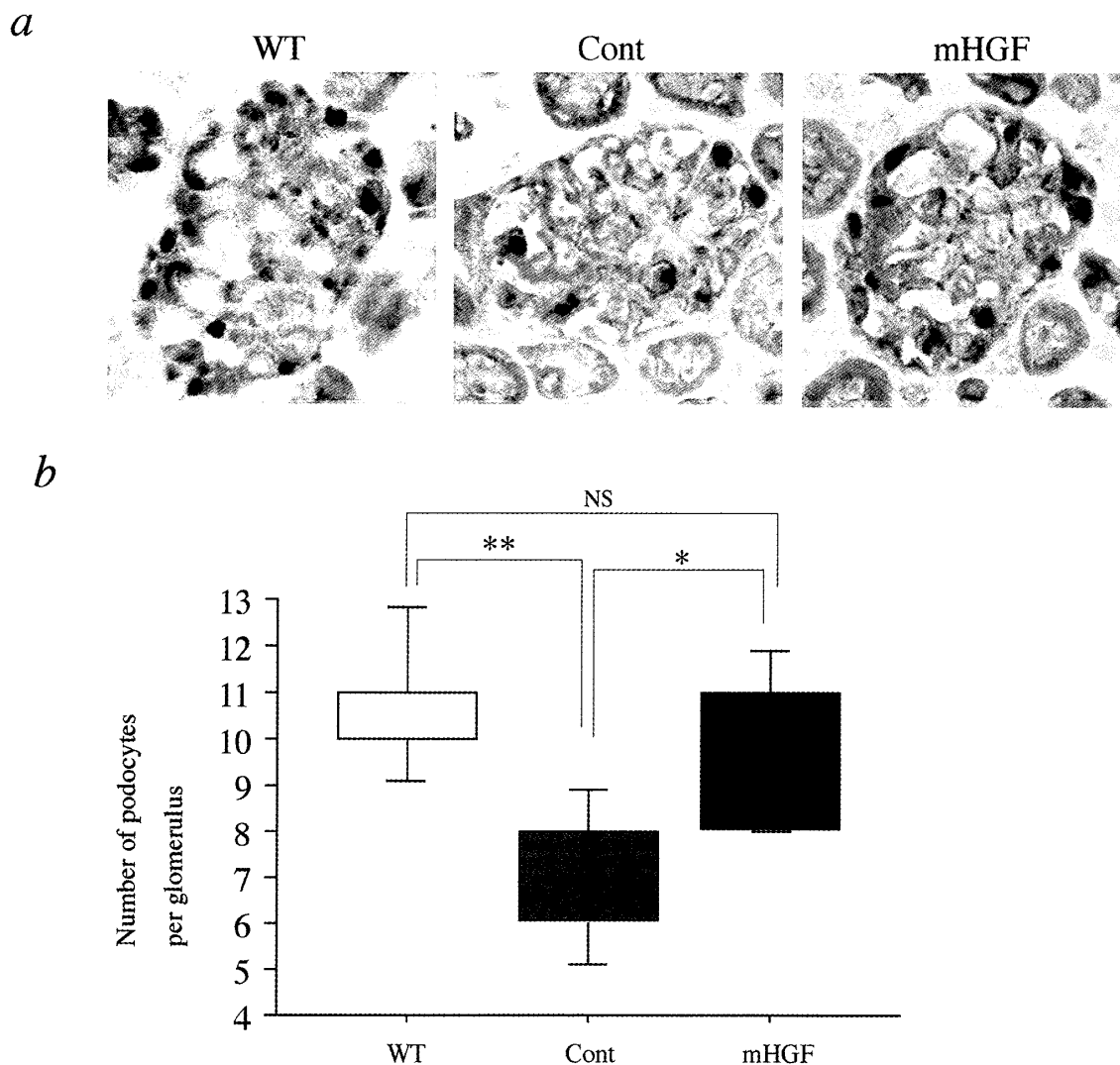


図6 8週齢の mHGF 遺伝子導入マウスの上皮細胞数

a：半月体形成率5%以下の8週齢の各群マウス (n = 5) より1腎につき1切片10個, 半月体等の明らかな病変を認めない糸球体の WT1 染色陽性細胞を上皮細胞として測定した.

b：1糸球体あたり野生型マウス  $10.83 \pm 1.33$ , 対照群  $7.17 \pm 1.47$ , mHGF 遺伝子導入群  $9.83 \pm 1.60$  だった.

\* :  $P < 0.05$ , \*\* 上付: :  $P < 0.005$

れていた (図 7b).

## 8. 血中および糸球体における TGF- $\beta$ 1 の推移

対照群の TGF- $\beta$ 1 の血中濃度は, 血中 HGF の減少が認められる6週齢で上昇する. これに対して mHGF 群では, 野生型マウスに比べ上昇するものの対照群に比べて低値で推移していた. また,

単離糸球体を用いた RT-PCR による TGF- $\beta$ 1 の発現の変化でも, mHGF 群の TGF- $\beta$ 1 発現は, 6週~16週で有意に抑制されていた (図 8a, b).

## 9. メサンギウム培養細胞を用いた HGF および TGF- $\beta$ 1 の相互の調節についての検討

rhTGF- $\beta$ 1 を添加したメサンギウム培養細

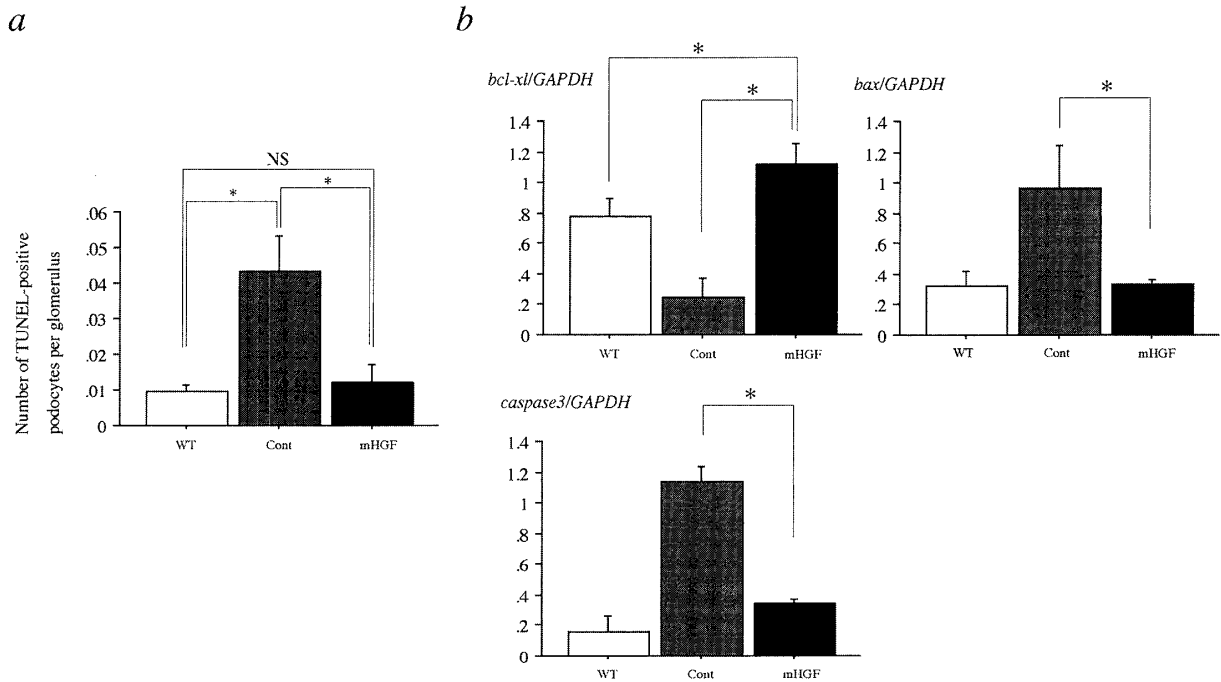


図7 糸球体でのアポトーシスの頻度と関連分子の変化

a : 8週齢のmHGF遺伝子導入マウスのアポトーシス細胞を有する糸球体数の検討

8週齢の各群マウス (n = 5) より1腎につき1切片約100個の糸球体でアポトーシス細胞を有する糸球体数を数えた。

b : アポトーシスの関連分子の変化

アポトーシスを抑制する分子と知られるBcl-xLは、野生型マウスに比べ、糸球体での発現は、対照群で減少していたが、mHGF群では、野生型マウスに比べても有意に増加していた。逆に、アポトーシスを促進する分子Baxとその下流でアポトーシスを実行する分子であるCaspase 3は、野生型マウスに比べ、有意に対照群で増加していたが、mHGF群では、野生型マウスと同じレベルに保たれていた。

胞ではHGFの発現は4ng添加した群で強く抑制され、用量依存性に抑制傾向を認めた。逆に、また、pCAG-mHGFを遺伝子導入し、HGFの発現が増加した細胞では、TGF- $\beta$ 1の発現が抑制された(図9a, b)。

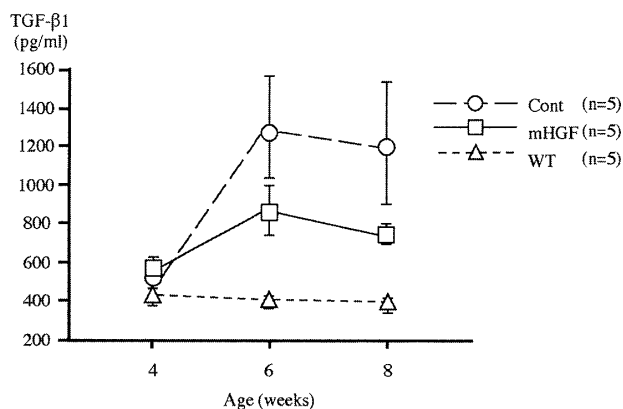
以上よりHGFとTGF- $\beta$ 1は相互に負の調節を受けていると考えられた。

#### 10. Alportマウスの腎糸球体および正常メサンギウム培養細胞におけるHGFのTGF- $\beta$ 1のシグナルに調節機構の検討

8週齢マウスの単離糸球体を用いたRT-PCR

の結果では、対照群は、TGF- $\beta$ 特異的転写制御因子Smad2, 3が有意に増加していたが、mHGF群では、対照群にくらべ発現は抑制されていた。また、TG-interacting factor (TGIF)は、野生型マウスに比べ対照群で減少していたが、mHGF群では、有意に増加していた。同様に、メサンギウム培養細胞では、TGF- $\beta$ 1の用量依存的にSmad2, 3の増加が認められ、HGF遺伝子導入細胞では、発現が有意に抑制されていた。逆にTGIFは、TGF- $\beta$ 1の用量依存的に抑制され、HGF遺伝子導入細胞では有意に増加していた(図10)。

a



b

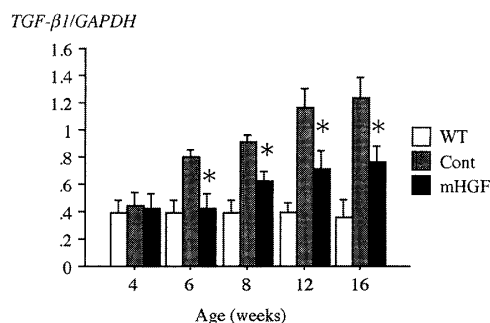


図 8

a：血中 TGF-β1 の推移

対照群の TGF-β1 の血中濃度は、血中 HGF の減少が認められる 6 週齢で上昇する。これに対して mHGF 群では、野生型マウスに比べ上昇するものの対照群に比べて低値で推移していた。

b：糸球体での TGF-β1 の推移

単離糸球体を用いた RT-PCR による TGF-β1 の発現の変化でも、mHGF 群の TGF-β1 発現は、6 週～16 週で有意に抑制されていた。(すべての群で n = 3) \* : P < 0.05

## 11. 腎間質の線維化における HGF の効果検討

遠隔期の効果として、16 週齢マウスの尿細管間質病変において、線維化マーカーである Col I, α-SMA とマクロファージのマーカーである Mac-1 を比較した。mHGF 群では有意に間質の線維化と細胞浸潤が抑制されていた (図 11)。

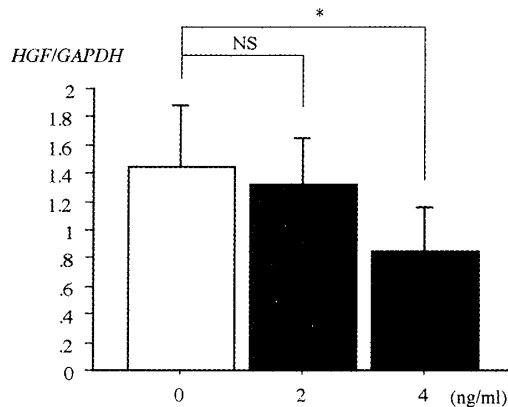
### 考 察

本研究結果は、C4a4 ko マウスの腎症に対して、長期間の HGF 遺伝子治療が有効であることを示した。しかしながら、本研究で使用したマウスと磯部の研究報告<sup>14)</sup>で使用したマウスは、マウス種の遺伝的背景が違いから腎症の進行速度と平均生存期間が異なり、また、導入した HGF 遺伝子も、ヒトからマウスに変更してあることから、1 回のエレクトロポレーションによる短期の HGF 発現と本研究の反復エレクトロポレーションによる長期の HGF 発現による効果の違いを単純に述べることは難しい。それぞれのマウス種における

C4a4 ko マウスの自然経過を考慮した場合、磯部の研究では、C4a4 ko マウスの尿蛋白抑制効果が 129SV 種純系での病中期にあたる 12 週齢の短期にとどまっていたことに対して、本研究では、ハイブリッドの C4a4 ko マウスが末期腎不全に陥る 20 週齢まで尿蛋白および、血中クレアチニン、BUN の抑制効果があった。このことは、HGF が、本症の病初期から末期までのすべての病態に対して有効であることを示唆している。

これまでの検討から、本症においては糸球体上皮細胞の変性および基底膜からの剥離・減少が、蛋白尿を増加させ、糸球体硬化へと進行させる最大の引き金であり、この上皮細胞障害に対して、糸球体での細胞外マトリックス (ECM) の代謝制御因子 TGF-β1 の発現増加と GBM 領域での ECM 増加は、上皮細胞の接着環境を悪化させ、剥離を促進する増悪因子になると考えている<sup>6)22)</sup>。この TGF-β1 の発現増加に対して磯部の研究では、hHGF 遺伝子の発現期間内にも TGF-β1 の発現抑制が認められていた。TGF-β1 は線維芽

a



b

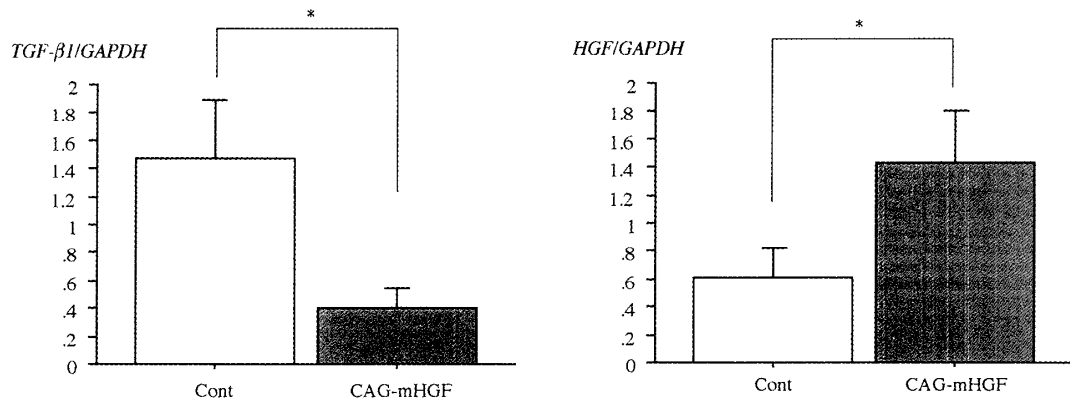


図9

a : TGF-β1を添加したメサンギウム培養細胞でのHGFの発現

b : mHGFを遺伝子導入したメサンギウム培養細胞でのTGF-β1の発現

細胞や肝伊東細胞などのHGFを産生する多く間質ストローマ細胞に対してHGF mRNAの発現を抑制する<sup>23)24)</sup>。一方、HGF自身も線維芽細胞などのさまざまな細胞に対してTGF-β1の産生を抑制することが明らかとなっており<sup>25)26)</sup>、本研究でも、メサンギウム細胞の培養実験においてHGFとTGF-β1が互いにその発現を抑制し、分子機能を調節していることを証明している。以上から本研究により、初めて明らかになった本マウスの血中HGF濃度の低下は、腎臓でのTGF-β1の発現増加と血中TGF-β1濃度増加に起因し、また、HGF遺伝子治療では、血中HGF濃度の増

加させることで、血中TGF-β1濃度を低下させていることが推測される。

正常糸球体においてHGFの受容体であるc-Metの発現は、メサンギウム細胞にみられる程度であるが、本症初期の糸球体では、c-Metがメサンギウムのみならず上皮細胞にも強く発現していた。c-Metの発現亢進は、抗Thy1.1による糸球体腎炎のラットモデルにおいて、メサンギウム細胞に認められることが報告されている<sup>27)</sup>。このメサンギウム細胞のc-Metの発現の亢進は、PDGFの刺激により増殖した筋線維芽細胞(myofibroblasts)様に形質転換

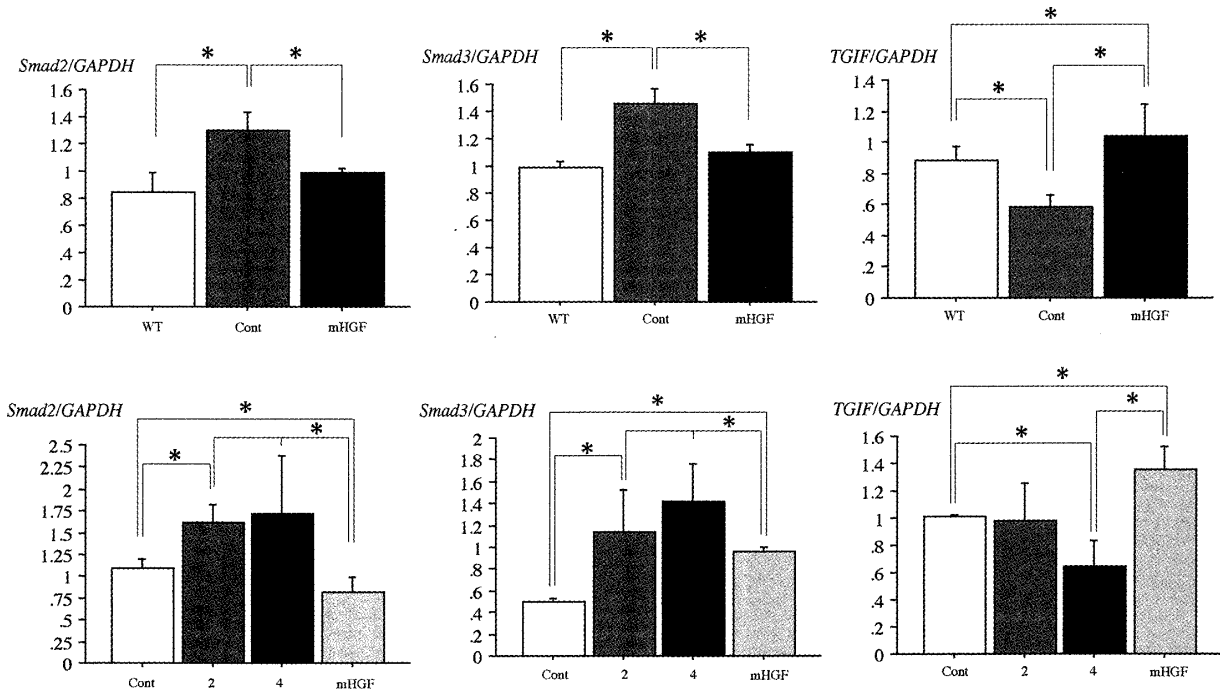


図 10 Alport マウスの腎糸球体および正常メサンギウム培養細胞における HGF の TGF- $\beta$ 1 のシグナルに調節機構の検討機構の検討

上段；WT: 野生型マウスの単離糸球体 RNA, Cont: *Col4a4* ノックアウトマウス, mHGF: mHGF 遺伝子導入マウス

下段；Cont: 正常初代培養ラットメサンギウム細胞, 2: 2ng/ml TGF- $\beta$ 1 添加, 4: 4ng/ml TGF- $\beta$ 1 添加, mHGF: mHGF 遺伝子導入

\* : P < 0.05

した活性化メサンギウム細胞に認められる変化であり、この活性化メサンギウム細胞の増殖は HGF により抑制される。HGF は、上皮系細胞の細胞増殖、形態形成を促進し、アポトーシスを抑制し、間葉系細胞（主に筋線維芽細胞）では逆の生物活性を示す<sup>28)</sup>とされ、本症の糸球体での c-Met 発現増加は、HGF への感受性を高めることで、TGF- $\beta$ 1 や PDGF などの増殖因子などによる細胞の変性、形質転換を抑制し、細胞の恒常性を保つための変化とも考えられた。

HGF の糸球体上皮細胞に対する効果に関して、磯部の研究では、8 週齢のモデルマウス糸球体におけるアポトーシスを HGF は抑制できなかったことより、抗アポトーシスによるものではないと結論づけたが、本研究では、上皮細胞のアポト

シスの頻度は有意に低下し、上皮細胞数も有意に保たれていた。この理由として、磯部の研究で用いた 129SV 種純系 *C4a4 ko* マウスの腎症の進行が早いことと、HGF の発現が短期間であったため十分な抗アポトーシス作用を得られなかったことが考えられる。また、TGF- $\beta$ 1 にはアポトーシス促進作用があることが明らかになっているが、腎臓との関係で興味深いことは、TGF- $\beta$ 1 を強制発現するトランスジェニックマウスは、focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) を生じ、このトランスジェニックマウスでは、本症マウスと同様に早期に上皮細胞のアポトーシスが強く認められることである<sup>29)</sup>。本症の TGF- $\beta$ 1 の血中濃度と糸球体での発現増加は、本症の上皮細胞のアポトーシスにも関与していると考えられる。



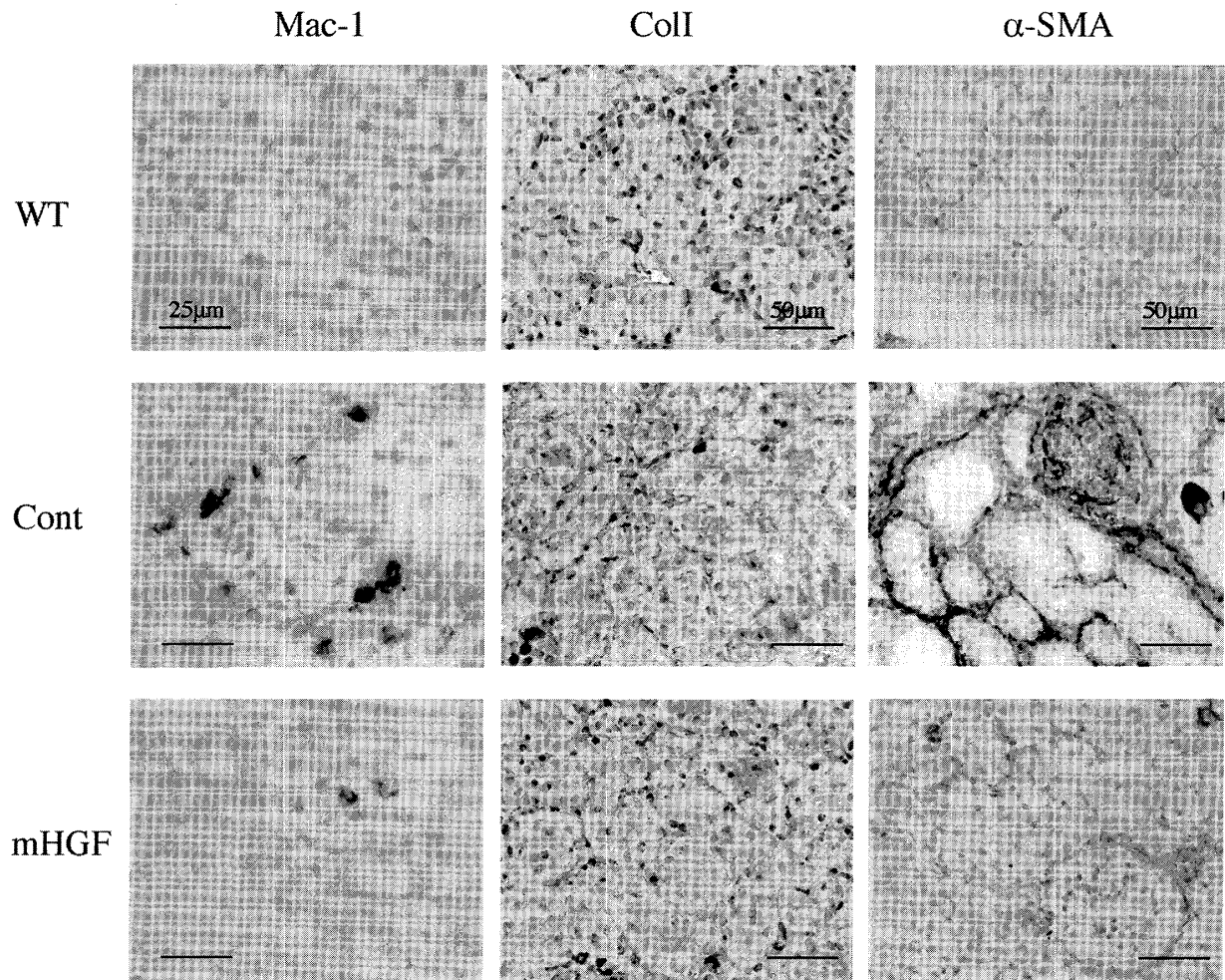


図11 腎尿細管間質での線維化マーカーの免疫組織染色

16週齢マウスの尿細管間質病変において、線維化マーカーである type I collagen (Col I),  $\alpha$ -SMA とマクロファージのマーカーである Mac-1 を比較した。mHGF 群では有意に間質の繊維化と細胞浸潤が抑制されていた。

アポトーシスは、多様な刺激で誘導されるが、刺激には無関係に特異的なプロテアーゼ Caspase の活性化を通し行われる。Caspase の活性化に至る過程は、Bcl-2 ファミリーなどを含む複数の系によりコントロールされ、アポトーシスシグナル伝達経路は厳密な遺伝子制御下にある。増殖因子が、アポトーシスを中心とした細胞死を抑制する作用のメカニズムが徐々に明らかになり、HGF にも他の増殖因子と同様に細胞死抑制作用を持つことが報告されているが、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 や Bcl-xL の up-regulation を介

する経路<sup>30)–32)</sup>、Bax の細胞質からミトコンドリア膜への移動を抑制する機序<sup>33)</sup>、PI3-kinase の活性化あるいはその下流に存在する Akt (protein kinase B) の活性化を介して caspase 3 活性を抑制する経路などが重要な働きを有していることがこれまで明らかにされている。本症の糸球体でも HGF の作用により、アポトーシスを抑制する分子と知られる Bcl-xL 発現の増加と、アポトーシスを促進する分子 Bax とその下流でアポトーシスを実行する分子である caspase 3 の発現抑制が認められ、抗アポトーシスに働いていることを示



していた。

本症での HGF の TGF- $\beta$  1 に対するシグナル調節機構として、転写制御因子 Smad2, 3 の発現を抑制することや、核内で Smad 複合体と転写共役因子の結合を阻害する TGIF を増加させることで、TGF- $\beta$  1 シグナル標的遺伝子の発現を抑制することが示された。同様の効果は、糖尿病性腎症のモデルマウスやメサングリウム細胞による実験でも報告されている<sup>34)35)</sup>。本症の糸球体におけるこれらの HGF と TGF- $\beta$  1 の相互調節機構のバランスは、低 HGF 血症と糸球体での HGF の発現低下のため、TGF- $\beta$  1 の発現増加と生物活性が促進する方向に傾き、糸球体硬化へと進行すると考えられる。以上から本症での HGF の効果は、特に低 HGF 血症を改善することで、TGF- $\beta$  1 の発現および生物活性を抑制し、病初期には糸球体上皮細胞への細胞障害を抑制することにより、また病中期以降では尿細管間質の線維化を抑制することで有効に作用していると考えた。エレクトロポレーションによる持続的 HGF 補充療法は本症の治療の選択肢の一つになると考えられる。

## 結 論

本症での HGF の効果は、低 HGF 血症を改善することで、TGF- $\beta$  1 の発現および生物活性を抑制させ、病初期には糸球体における基底膜の変性を軽減して、アポトーシスをはじめとする糸球体上皮細胞への細胞障害を抑制し、また病中期以降では同様の機序で尿細管間質の線維化抑制作用を発揮し、有効に作用すると考えられた。

HGF はヒトへの臨床応用に向けて検討されるべき薬剤であると考えられた。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり直接ご指導いただきました伊東達雄助手、里方一郎教授（新潟大学大学院医歯学総合研究科分化再生制御学分野）、研究指導および論文の御校閲をいただきました内山 聖教授（新潟大学大学院医歯学総合研究科小児科学分野）、ご指導およびご協力

いただいた丸山弘樹講師（新潟大学大学院医歯学総合研究科第二内科）、森岡哲夫助教授（新潟大学附属腎研究施設機能制御学分野）、矢尾板永信助教授、山本 格教授（新潟大学附属腎研究施設構造病理分野）、水野信哉助手、中村敏一教授（大阪大学大学院医学系研究科分子組織再生分野）に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL and Tryggvason K: Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 248: 1224 - 1227, 1990.
- 2) Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson V, Verellen DC, Chan B, Schroder CH, Smeets HJ and Reeders ST: Identification of mutations in the alpha 3 (IV) and alpha 4 (IV) collagen gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* 8: 77 - 81, 1994.
- 3) Chen D, Jefferson B, Harvey SJ, Zheng K, Gartley CJ, Jacobs RM and Thorner PS: Cyclosporine A slows the progressive renal disease of Alport syndrome (X-linked hereditary nephritis): results from a canine model. *J Am Soc Nephrol* 14: 690 - 698, 2003.
- 4) Grodecki KM, Gains MJ, Bauml R, Osmond DH, Cotter B, Valli VEO and Jacobs RM: Treatment of X-linked Hereditary Nephritis in Samoyed Dogs with Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitor. *J Comp Path* 117: 209 - 225, 1997.
- 5) Gross O, Bejrowski B, Koepke M, Kuck J, Reiner M, Addicks K, Smyth N, Schulze LE and Weber M: Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome. *Kidney int* 63: 438 - 446, 2003.
- 6) 伊東達雄：アルポート症候群モデルマウスに対する薬物療法の検討. *新潟医学会雑誌* 116: 324 - 336, 2002.
- 7) Sugimoto H, Mundel TM, Sund M, Xie L, Cosgrove D and Kalluri R: Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane

- collagen defects and reverse genetic kidney disease. PNAS 103: 7321 - 7326, 2006.
- 8) Prodromidi EI, Poulsom R, Jeffery R, Roufosse CA, Pollard PJ, Pusey PJ and Cook HT: Bone-marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. Stem Cells 28: 2448 - 2455, 2006.
  - 9) Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H and Nakamura T: Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure of accelerates renal regeneration in mice. Proc Natl Acad Sci USA 91: 4357 - 4361, 1994.
  - 10) Taniguchi Y, Yorioka N, Yamashita K and Xue-Feng Y: Localization of hepatocyte growth factor and tubulointerstitial lesions in IgA nephropathy. Am J Nephrol 17: 413 - 416, 1997.
  - 11) Bessho K, Mizuno S, Matsumoto K and Nakamura T: Counteractive effects of HGF on PDGF-induced mesangial cell proliferation in a rat model of glomerulonephritis. Am J Physiol Renal Physiol 284: 1171 - 1180, 2003.
  - 12) Mori T, Shimizu A, Masuda Y, Fukuda Y and Yamanaka N: Hepatocyte growth factor-stimulating endothelial cell growth and accelerating glomerular capillary repair in experimental progressive glomerulonephritis. Nephron Exp Nephrol 94: e44 - e54, 2003.
  - 13) Mizuno S and Nakamura T: Suppression of chronic glomerular injuries and TGF- $\beta$  1 production by HGF in attenuation of murine diabetic nephropathy. Am J Physiol 286: F134 - F143, 2004.
  - 14) 磯部賢論: *In vivo* エレクトロポレーション法を用いた Hepatocyte Growth Factor による Alport 症候群モデルマウスの遺伝子治療の検討. 新潟医学会雑誌 119: 611 - 625, 2005.
  - 15) Woff JA and Malone RW: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 247: 1465 - 1468, 1990.
  - 16) Aihara H and Miyazaki J: Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. Nat Biotechnol 16: 867 - 870, 1998.
  - 17) Mathiesen I: Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. Gene Ther 6: 508 - 514, 1999.
  - 18) Maruyama H, Sugawa M, Moriguchi Y, Imazeki I, Ishikawa Y, Ataka K, Hasegawa S, Ito Y, Higuchi N, Kazama JJ, Gejyo F and Miyazaki J: Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using in vivo electroporation. Hum Gene Ther 11: 429 - 437, 2000.
  - 19) Mizuno S, Kurosawa T, Matumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M and Nakamura T: Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. J Clin Invest 101: 1827 - 1834, 1998.
  - 20) Mizuno S, Matsumoto K and Nakamura T: Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. Kidney Int 59: 1304 - 1314, 2001.
  - 21) Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y and Betsholtz C: A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. Am J Pathol 161: 799 - 800, 2002.
  - 22) 中山正成: アルポート症候群モデルマウスの作成と腎糸球体上皮細胞障害に関する研究. 新潟医学会雑誌 115: 452 - 463, 2001.
  - 23) Matsumoto K, Tajima H, Okazaki H and Nakamura T: Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor- $\beta$  1 and glucocorticoids. J Biol Chem 267: 24917 - 24920, 1992.
  - 24) Ramadori G, Neubauer K, Odenthal M, Nakamura T, Knittle T, Schwogler S and Meyer Zum Buschenfelde KH: The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor- $\beta$ . Biochem Biophys Res Commun 183: 739 - 742, 1992.
  - 25) Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H, Moriguchi A, Sakonjo H, Shokei-Kim, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J and Ogihara T: Potential contribution of a novel anti-fibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters. Circulation 102: 246 -

- 252, 2000.
- 26) Naim R, Chang RC, Alfano SS, Riedel F, Bayerl C, Sadick H, Bran G and Hormann K: Targeting TGF- $\beta$  1 increases hepatocyte growth factor (HGF/SF) levels in external auditory canal cholesteatoma (EACC) epithelial cell culture. *Regulatory Peptides* 130: 75 - 80, 2005.
- 27) Bessho K, Mizuno S, Matumoto K and Nakamura T: Counteractive effects of HGF on PDGF-induced mesangial cell proliferation in a rat model of glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: 1171 - 1180, 2003.
- 28) Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno - Horikawa Y, Okamoto M and Nakamura T: Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest* 101: 1827 - 1834, 2001.
- 29) Schiffer M, Bitzer M, Roberts Ian SD, Kapp JB, Dijke P, Mundel P and Bottinger EP: Apoptosis in podocytes induced by TGF- $\beta$  and Smad7. *J Clin Invest* 108: 807 - 816, 2001.
- 30) Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S, Matsushita H, Nakagami H, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y and Ogihara T: Contribution of Bcl - 2, but not Bcl - xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia - conditioned human endothelial cells. *Hypertension* 37: 1341 - 1348, 2001.
- 31) Liu Y: Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms. *Am J Physiol* 277: F624 - F633, 1999.
- 32) Fornoni A, Li H, Foschi A, Striker GE and Striker LJ: Hepatocyte growth factor, but not insulin - like growth factor I , protects podocytes against cyclosporin A - induced apoptosis. *Am J Pathol* 158: 275 - 280, 2001.
- 33) Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Yamasaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y and Ogihara T: Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane. *Diabetes* 51: 2604 - 2611, 2002.
- 34) Liu Y: Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F7 - 16, 2004.
- 35) Dai C and Liu Y: Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF -  $\beta$  1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Am Soc Nephrol* 15: 1402 - 1412, 2004.

(平成 19 年 1 月 15 日受付)