慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	抗アレルギー薬トラニラストの糸球体腎炎の進行抑制効果に関する研究
Sub Title	
Author	力石, 昭宏(Tikaraishi, Akihiro) 猿田, 享男(Saruta, Ikuo)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.T215- T232
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0215

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・81(4)：T215～T232，2004

学位論文

抗アレルギー薬トラニラストの糸球体腎炎の進行抑制効果に関する研究

慶應義塾大学医学部内科学教室
（指導：猿田享男教授）
力石昭宏（ちからいしあきひろ）

（平成16年2月18日受付）

Key Words：tranilast, monocyte chemoattractant protein-1, anti-Thy 1.1 nephritis, nuclear factor-κB, mesangial cell

今日我が国の透析患者は20万人に達し，新規透析導入患者も年間約3万人に及び，その増加傾向が留まる兆しは認めていない．透析導入の原疾患としては慢性糸球体腎炎と糖尿病性腎症がその原因の約3分の1ずつを占めている[1]．糸球体腎炎の根本的な原因は現時点で未解明ではあるが，一度糸球体での炎症サイクルが始まれば，それが糸球体硬化に向かうプロセスはほぼ共通の経路をたどると考えられている．糸球体腎炎において，腎糸球体及び間質領域へのマクロファージの浸潤は病変の活動性を示唆する重要な所見であり，炎症の進展にマクロファージが関与する一連のプロセスは以下のように説明される[2]．当初，何らかの誘因（例えばウィルス感染や免疫学的な機序など）を契機として糸球体に浸潤したマクロファージは種々のプロテアーゼや活性酸素により係蹄壁を障害して蛋白尿を生じさせるとともに，多種多様なサイトカインや増殖因子を放出して糸球体構成細胞，特にメサンギウム細胞を活性化する．活性化により形質転換したメサンギウム細胞は過剰な増殖と細胞外基質を産生させると同時に，サイトカインや走化活性化因子を分泌してさらにマクロファージを呼び寄せる[3]．このような糸球体内の炎症サイクルは間質領域にも波及し，サイトカインや尿蛋白により刺激を受けた尿細管細胞が，サイトカインや走化活性化因子を分泌して尿細管間質領域にもマクロファージの浸潤や筋線維芽細胞の増生を認めるようになる[4]．このような炎症の増幅サイクルが遷延することにより，最終的に糸球体硬化・腎間質の線維化へ至ると考えられている．以上から糸球体腎炎の進展機序において，マクロファージの浸潤とそれに引き続くメサンギウム細胞の活性化という一連の過程が共通のプロセスとして重要な役割を果たしていることが示唆される．さらに近年では糸球体腎炎のみならず，糖尿病腎症の進展過程にもマクロファージが深く関与していることも明らかになりつつある[5]．

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は白血球走化活性化因子であるC-Cケモカインサブファミリーの一員で主に単球/マクロファージの炎症部位への誘導・活性化の中心的役割を担っている[6]．ヒト腎疾患では炎症糸球体・間質領域においてMCP-1の発現増加が認められ，これはマクロファージの浸潤の程度とよく相関する[7, 8]．また糸球体腎炎患者の尿中MCP-1排泄量は炎症活動性をよく反映し，さらに治療反応性の指標としての有用性も指摘されている[9, 10]．細胞実験では，interleukin-1βをはじめとするサイトカインやlipopolysaccarideによりメサンギウム細胞・尿細管上皮細胞においてMCP-1の産生・分泌が誘導されるが[8]，これは，腎実質を構成する細胞が炎症に直接関与するとの考えを支持するものである．さらに，腎炎の実験モデルにおける検討では，抗MCP-1中和抗体の投与によりマクロファージ浸潤と糸球体硬化が抑制されることが報告されている[11～13]．以上から腎炎局所で産生されるMCP-1がマクロファージの浸潤・活性化を介して炎症の進展に重要な役割を果たしていることが示唆される．

本論文はChikaraishi A, Hirahashi J, Takase O, Marumo T, Hishikawa K, Hayashi M, Saruta T：Tranilast inhibits interleukin-1β-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat mesangial cells. Eur J of Pharmacol 427：151-158, 2001の一部を含む．

このようにMCP-1が新たな治療法の標的として注目されつつあるにも関わらず，MCP-1の発現抑制効果を有する実用的な薬剤は極めて限定されているのが現状である[7]．

トラニラスト，(N-(3,4-demethoxycinnamoyl)-anthranilic acid)は，従来，アトピー性皮膚炎，気管支喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー性疾患の治療に広く臨床的に用いられてきた薬剤である．トラニラストは，線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生を抑制することから，過剰な皮膚の瘢痕やケロイド形成を予防する目的でも使用されている[14]．さらに，近年では，経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の著明な再狭窄抑制効果が報告され(TREAT)[15]注目されている．この効果を説明する機序としては，platelet derived growth factor (PDGF) やtransforming growth factor-β (TGF-β) による血管平滑筋細胞の基質産生・増殖・遊走作用などを抑制する効果[16, 17]，血管病変におけるマクロファージ由来のサイトカインや活性酸素の放出を抑制する作用[18, 19]などが想定されている．しかしながら，現時点でトラニラストの腎疾患への応用を検討した報告例は極めて限られている．In vitroでは当教室のHishikawaらがメサンギウム細胞においてPDGFによる細胞増殖を当薬剤が抑制することを示したのが最初の報告例であり[20]，メサンギウム細胞・尿細管細胞など腎実質細胞におけるMCP-1の産生・分泌に対する影響を検討した報告はなされていない．動物実験モデルにおいても当薬剤の糸球体腎炎に対する投与効果は検討されていないのが現状である．

抗Thy 1.1抗体メサンギウム増殖性腎炎（以下Thy 1.1腎炎）はラットメサンギウム細胞に発現するThy 1.1抗原に対する抗体を投与することにより惹起されるメサンギウム増殖性腎炎のモデルである[21]．ラットに経静脈的に抗Thy 1.1抗体を投与すると，同抗体が補体依存性にメサンギウム細胞を融解し（mesangiolysis），その後，反応性にメサンギウム細胞の増殖・基質産生が過剰に生じて，メサンギウム増殖性腎炎に近似した組織像を呈するようになる．この初期段階のmesangiolysisは，抗体投与の直後から2，3日目にかけて認められ，この時期にはメサンギウム細胞数は著明に減少し，糸球体内にはマクロファージや好中球の浸潤を伴うようになる．この時期を過ぎるとメサンギウム細胞が再出現し，5日目から10日目頃には活性化して形質転換したメサンギウム細胞による反応性の過剰な増殖像や細胞外基質の蓄積を認めるようになる．このメサンギウム細胞の活性化の過程にマクロファージなどから放出されるサイトカインや増殖因子，特にPDGFやTGF-βが重要であることが明らかとなっている[3]．このThy 1.1腎炎において，抗MCP-1中和抗体の投与により糸球体内浸潤マクロファージの減少のみならず最終的な糸球体硬化が抑制され[11, 12]，かつ糸球体でのMCP-1産生の主要な起源がメサンギウム細胞であることも報告されている[22]．従って同モデルではメサンギウム細胞由来のMCP-1が腎臓における炎症進展の鍵であり，MCP-1の抑制作用に基づく糸球体腎炎の改善効果を確認する上で最適な実験モデルと考えられる．

以上を踏まえて今回我々はメサンギウム細胞・尿細管細胞におけるMCP-1の誘導・分泌に対するトラニラストの影響・その作用機序につき検討する[23]とともに，ラットThy 1.1腎炎に対してトラニラストを投与して，腎障害改善効果の有無，炎症局所へのマクロファージ浸潤に対する効果，さらにMCP-1発現への影響につき検討した．

材料と方法

1．腎実質細胞のMCP-1誘導に対するトラニラストの作用の検討・機序の解明

1）細胞培養

ラット糸球体メサンギウム細胞はSprague-Dawleyラットの腎臓より既報の方法に従って採取した[24]．実験には第5-12代のメサンギウム細胞を使用し，37℃，5％のCO_2の状況下で10%新生仔牛血清とInsulin-Transferrin-Selenium Supplementsを含むRPMI 1640培地で培養した．細胞が70%から80%の密度となった後，培養液を維持培地（0.5%新生仔牛血清を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)）に交換し，48時間培養した．

ラット尿細管上皮細胞NRK52E細胞[25]（American Type Culture Collection, Rockville, MD）は成長培地として5% 新生仔牛血清を含むDMEMを維持培地として無血清のDMEMを使用して同様に培養した．

以下のいずれの実験においてもトラニラストはinterleukin-1β添加1時間前より添加した．

2）MCP-1発現に対するトラニラストの影響

MCP-1蛋白分泌量はELISA法により測定した．48穴プレートに培養したメサンギウム細胞（あるいはNRK 52E細胞）に0.2nMの濃度のinterleukin-1β (以下IL-1βと略す；Genzyme, MNPS,MN）を加え，12時間培養を続けた．その後培養上清を採取し，MCP-1測定用ELISA kit (Biosource International, Camarillo, SA) を使用しMCP-1蛋白濃度を測定した．

MCP-1 mRNAの発現量はノザンブロット法により検討した．10 cmディッシュに培養したメサンギウム細胞（あるいはNRK 52E細胞）に0.2nMのIL-1βを6時間（NRK 52E細胞は4時間）作用させた後，RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて細胞からtotal RNAを抽出した．得られたtotal RNA (10 μg) を変性ホルムアデヒドゲルで電気泳動後，hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK) に転写した．マウスMCP-1 (Dr. Rollins (Boston,MA) より供与) およびヒトglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Clontech, Palo Aito, CA) に対する特異的cDNAに対してPrime a Gene labeling system (Clontech) を用いてランダムプライマー法により^{32}P標識を行った．転写後のメンブレンをプローブとハイブリダイズし洗浄した後，BAS 2000 (Fuji Film Institution, Tokyo, Japan) システムを用いて放射活性を測定した．MCP-1 mRNA発現量はMCP-1とGAPDHの放射活性比を求め定量した．

3）NF-κB活性化に対するトラニラストの影響

核転写因子nuclear factor-κB (以下NF-κB) 依存性の転写活性はルシフェラーゼ活性測定系により検討した．24穴プレートに培養したメサンギウム細胞に0.5 μgのpNF-κB-Luc (Dr. Schmid (Ulm, German) より供与) をSuperfect kit (Qiagen) を用いてトランスフェクトした．トランスフェクション効率を標準化する目的で0.16 μgのpRL-TKベクター（Promega, Madison, WI）も同時にトランスフェクトした．トランスフェクション24時間後，細胞をIL-1βで6時間刺激し，細胞溶解液のルシフェラーゼ活性をdual luciferase assay system (Promega) を用いて測定した．NF-κB依存性転写活性はκBルシフェラーゼ活性とpRL-TKルシフェラーゼ活性の比を算出して補正した．

NF-κBのDNA結合能はelectromobility shift assay (以下EMSAと略す)により検討した．6 cmディッシュに培養したメサンギウム細胞をIL-1βで1，3，6時間刺激した後，細胞から既報の方法[24]に従い核蛋白成分を抽出した．Gel shift assay core system kit (Promega) を用いて5'ラベリング法によりNF-κB結合領域を含むオリゴヌクレオチドを^{32}P標識しプローブを作成した．核蛋白（6 μg）と標識プローブ（3000カウント）を室温で20分間結合反応させた後，6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した．ゲルを吸引乾燥後，X線フィルムに露光した．競合アッセイとして標識プローブ添加前に予め100倍濃度の非標識オリゴヌクレオチドを核蛋白と10分間反応させたものを使用した．また，スーパーシフト解析のために予め1 μgの特異的抗p65抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) もしくは抗p50抗体（Santa Cruz Biotechnology）を核蛋白に添加し4℃で12時間反応させたものを，標識プローブとの結合反応に用いた．

4）MAP kinaseの活性化に対するトラニラストの影響

Mitogen-activated protein (MAP) kinaseの主要3経路extracellular signal-regulated kinase (ERK)，p38, Jun N-terminal kinase (JNK) 経路の活性化はそれぞれ抗リン酸化ERK，p38，JNK抗体を用いたウェスタンブロット法により検討した．6穴プレートに培養したメサンギウム細胞（各穴当り5×10^5の細胞数）をIL-1βで刺激後0，15，30分の時点で既報の方法に従い全細胞蛋白溶解液を調整した[24]．20 μgの蛋白溶解液を12.5% SDSポリアクリルアミドゲルで泳動後，Hybond ECL (Amersham) に転写した．転写後のメンブレンはブロッキング後，1000倍希釈の抗リン酸化MAP kinase一次抗体（抗リン酸化ERK抗体（Santa Cruz Biotechnology），抗リン酸化p38抗体（New England Biolabs, Beverly, MA），抗リン酸化JNK抗体（Promega））に室温で一晩反応させた．洗浄後，100倍希釈のhorseradishペロキシダーゼ結合二次抗体と室温で1時間結合反応を行い，化学冷光法（ECL：Amersham）で目的のバンドを発色させX線フィルムに感光させた．リン酸化MAP kinaseの検出後のメンブレンは抗体を除去した後，1000倍希釈の抗MAP kinase抗体（抗ERK抗体（Santa Cruz），抗p-38抗体（New England Biolab），抗JNK抗体（New England Biolab））を一次抗体として再度ハイブリダイズを行った．

2．糸球体腎炎モデル（ラットThy-1.1腎炎）に対するトラニラストの投与効果の検討

1）モデル動物の作成・トラニラストの投与法

メサンギウム増殖性腎炎の動物モデルであるThy-1.1腎炎は6週齢の雌Wistarラット（Charles River社）にモノクローナル抗体1-22-3（新潟大学腎研河内裕先生より供与[26]）250 μg / 100 g体重を尾静脈から投与することにより作成した．トラニラストは腎炎惹起2日前よりトラニラスト原末（キッセイ製薬より供与）400 mg/kg体重を粉末状の餌（CA-1, 日本クレア）に混じて連日投与した．コントロール群に対しては腎炎惹起時に生理食塩水0.4 mlを尾静脈より投与した．コントロール群，腎炎未治療群，腎炎トラニラスト治療群の各群6

匹ずつの動物は代謝ケージで飼育し，連日蓄尿を行い，尿中排泄アルブミンを定量した．腎炎惹起後7日目にtail-cuff 血圧測定器（夏目 KW210）にて血圧を測定後，麻酔下にて腎臓ならびに血液を採取し，腎炎の治療効果の評価のため以下に示す項目について解析を行った．

動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドを遵守して施行した．

2）PAS 染色標本の評価

生理食塩水で潅流後に摘出した腎臓は10%ホルマリンで固定後にパラフィン包埋し，periodic acid-Schiff (PAS) 染色した．各検体の糸球体障害の程度は既報の方法に基づき，メサンギウム細胞と細胞外基質の領域拡大の程度により以下の基準に従って半定量的にスコア化した[27]；0＝糸球体内細胞数，基質沈着とも正常，1＝細胞数増多・基質過剰沈着を認める領域が糸球体面積の25%以下，2＝細胞数増多・基質過剰沈着を認める領域が糸球体面積の25%以上50%以下，3＝細胞数増多・基質過剰沈着を認める領域が糸球体面積の50%以上75%以下，4＝細胞数増多・基質過剰沈着を認める領域が糸球体面積の75%以上．各ラットより得られた腎臓の50以上の糸球体のスコアの平均値を算出し，この値より各群の平均スコアを算出した．

3）腎臓の免疫組織染色

マクロファージの浸潤ならびに活性化メサンギウム細胞と間質筋線維芽細胞を評価する目的で，ED-1 抗原および α-smooth muscle actin (以下 α-SMA) の免疫組織染色を行った．腎臓組織を ED-1 染色用に periodate-lysine-paraformaldehyde 液で，α-SMA 染色用に 4% パラホルムアルデヒド液にそれぞれ浸し 4℃で一晩固定し，濃度勾配をつけたシュークロース液で洗浄後，液体窒素にて OCT (optimal cutting temperature) 包埋した．6 μm の薄切切片は洗浄，内因性ペロキシダーゼの失活化，ブロッキングを行った後，一次抗体として 100 倍希釈のマウスモノクローナル抗ラット ED-1 抗体 (Pharmingen, San Diego, CA) もしくは 50 倍希釈のマウスモノクローナル抗 α-SMA 抗体 (DAKO, Glostrup, Denmark)) にて室温で1時間反応させた．3回洗浄をくり返した後，1000 倍希釈のビオチン化抗マウス二次抗体を室温で 30 分間結合させ，さらにアビジン-ビオチン-ペロキシダーゼ試薬 (DAKO) に 30 分間反応させた．洗浄後，diaminobendine chromogen 含有ペロキシダーゼ発色色素にて発色反応を行った．

糸球体および腎間質の ED-1 発現は，各検体につき 30 以上の糸球体もしくは 20 視野以上の高倍率（200 倍）の腎皮質の間質領域に観察される ED-1 陽性細胞数を数え，1 糸球体当り，もしくは間質領域の 1 視野当りの陽性細胞数の平均値を算出することにより評価した．

活性化メサンギウム細胞の指標である糸球体の α-SMA 発現は既報の方法に従って以下のように 0 から 4 の 5 段階のスコアに半定量的に分類した[27]；0＝染色されず，1＝糸球体当り 25%以下の陽性率，2＝糸球体当り 25%以上 50%以下の陽性率，3＝糸球体当り 50%以上 75%以下の陽性率，4＝糸球体当り 75%以上の陽性率．腎間質筋線維芽細胞の指標である間質領域の α-SMA 発現は以下に示す基準に基づいて 0 から 3 の 4 段階のスコアに分類した；0＝染色されず，1＝間質領域 5%以下の陽性率，2＝間質領域 5%以上 10%以下の陽性率，3＝間質領域 10%以上の陽性率．各検体につき 30 以上の糸球体および 20 視野以上の高倍率（200 倍）の間質領域のスコアの平均値を算出した．

4）尿 MCP-1 の定量

蓄尿検体の MCP-1 濃度は ELISA kit (Biosource) を使用して測定を行い，一日当たりの排泄量は尿中濃度に一日尿量を乗ずることにより算出した．

3．統計

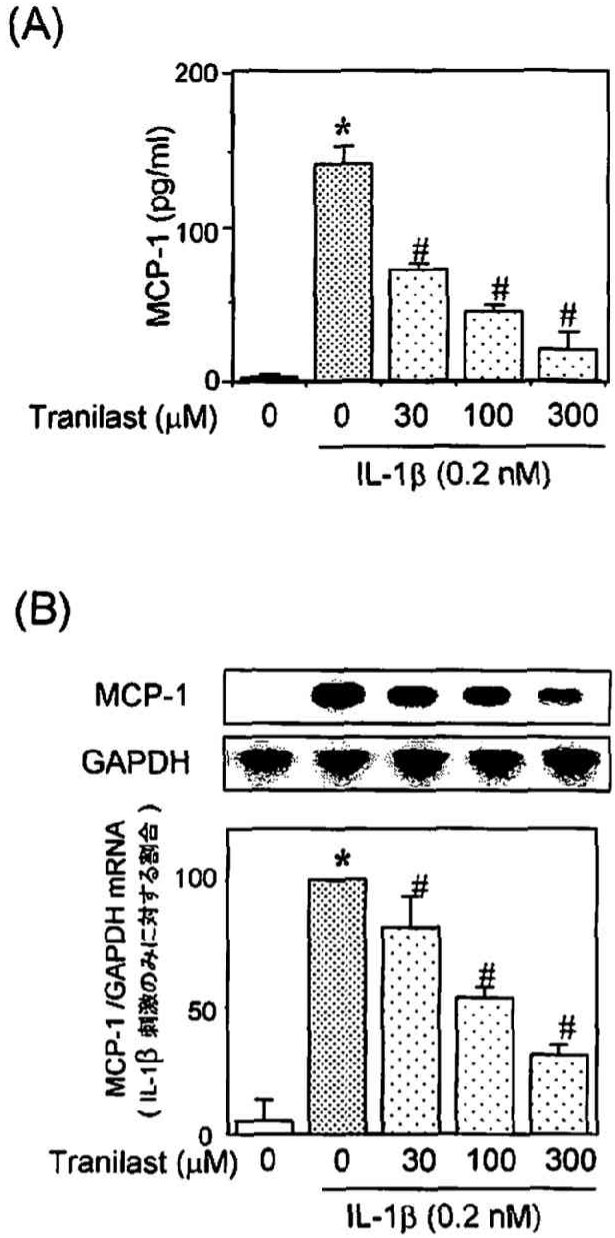
数値は平均値標準誤差で表した．2 群の比較には paired-t テストを，3 群以上の比較には one-way analysis of variance (ANOVA) を用い，有意差を認めた場合には Fisher の post hoc テストによる多重比較を行った．$P<0.05$ を有意差ありと判断した．

結　果

1．腎実質細胞の MCP-1 誘導に対するトラニラストの作用の検討・機序の解明

1）メサンギウム細胞における interleukin-1β による MCP-1 発現誘導に対するトラニラストの影響

培養メサンギウム細胞の培養上清中の MCP-1 蛋白量を ELISA 法で測定した．IL-1β は MCP-1 の発現誘導を介して腎障害の進展過程に重要な役割を担うことが明らかとなっている[8]．非刺激条件下のメサンギウム細胞は極少量の MCP-1 分泌を認めたのみであったが，IL-1β刺激により著明な MCP-1 の分泌増加を認めた．MCP-1 分泌量は IL-1β 0.2nM でピークに達したため，以後全ての実験においてこの濃度の IL-1β を使用した．種々の濃度（30 μM から 300 μM）のトラニラストを添加し IL-1β 刺激 12 時間後の培養上清中の MCP-1 分泌の変化を比較したところ，トラニラストは濃度依存的に MCP-1 分泌量を抑制した（第1図A）．なお，細胞のバ



第1図　メサンギウム細胞における interleukin-1β (IL-1β) 刺激による monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 分泌量（A），mRNA 発現量（B）に対するトラニラストの抑制効果．（A）メサンギウム細胞を IL-1β (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度（30 μM から 300 μM）のトラニラスト添加条件下で刺激し，12 時間後の培養上清中の MCP-1 分泌量を ELISA 法にて計測し比較した．数値は平均値±標準誤差を表す（n=4）．*P<0.05 コントロール群と比較；#P<0.05 IL-1β刺激単独群と比較．(B) メサンギウム細胞を IL-1β (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度（30 μM から 300 μM）のトラニラスト添加条件下で刺激し，6 時間後の MCP-1mRNA 発現量をノザンブロット法にて比較した．数値は平均値±標準誤差を表す（n=4）．*P<0.05 コントロール群と比較；#P<0.05 IL-1β 刺激単独群と比較．（Chikaraishi A et al：Eur J Pharmacology 427：151-158, 2001）の第1図を許可を得て転載）

イアビリティーをみるためにトリパンブルー染色にて生細胞数と死細胞数の割合を求めたところ，本実験で用いたトラニラスト濃度では細胞のバイアビリティーには影響を認めなかった．

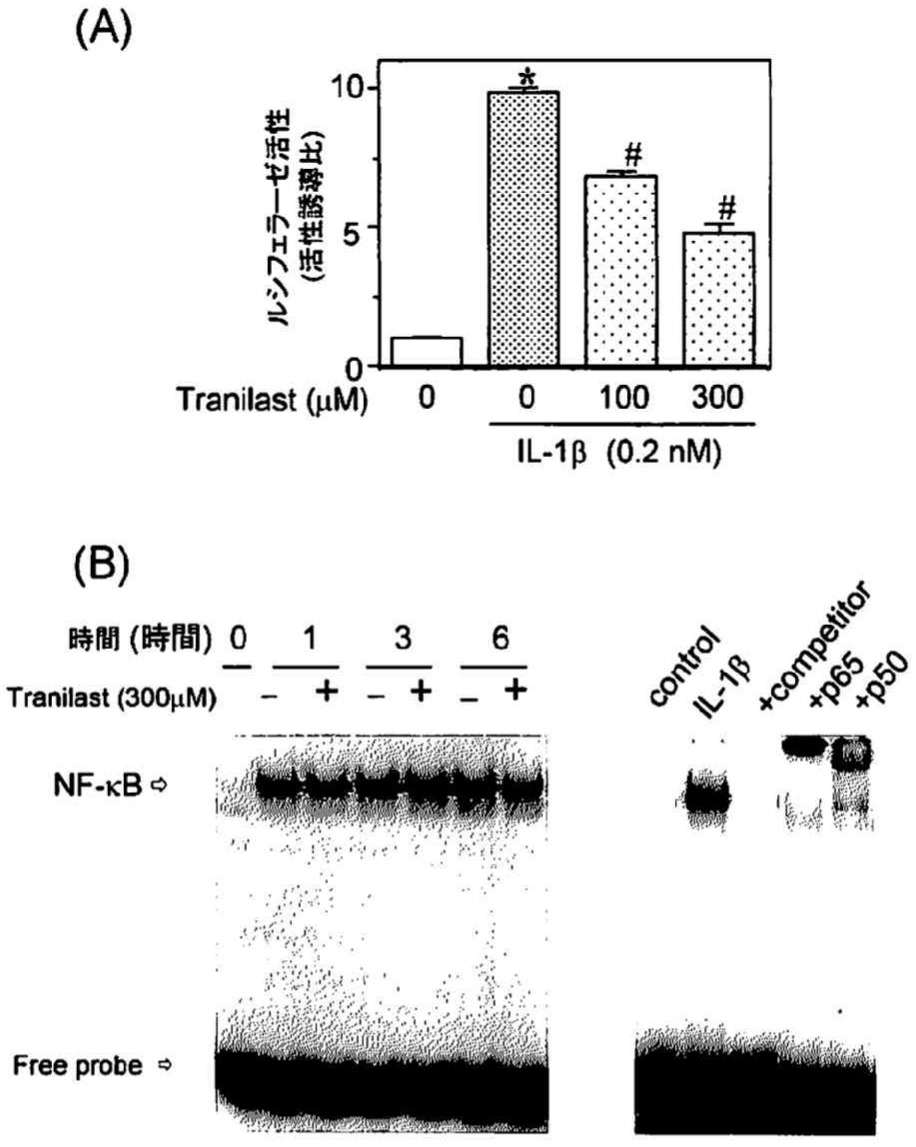
ノザンブロット法を用いたメサンギウム細胞の IL-1β 刺激による MCP-1 mRNA 発現誘導の検討では，IL-1β 刺激 6 時間後に MCP-1 mRNA の発現量が最大となることが明らかとなった．IL-1β 刺激 6 時間後の MCP-1 mRNA の発現はトラニラストの添加により濃度依存性に抑制された（第1図B）．アクチノマイシン D の存在下で新たな mRNA の転写を抑制し，トラニラスト添加の有無による IL-1β 刺激後の MCP-1 mRNA の分解速度を比較検討した実験では，トラニラストは MCP-1 mRNA の分解速度に影響せず，トラニラストの MCP-1 mRNA 発現抑制は主に転写レベルへの作用によるものであることが示唆された．

2）IL-1β刺激による NF-κB 活性化に対するトラニラストの影響

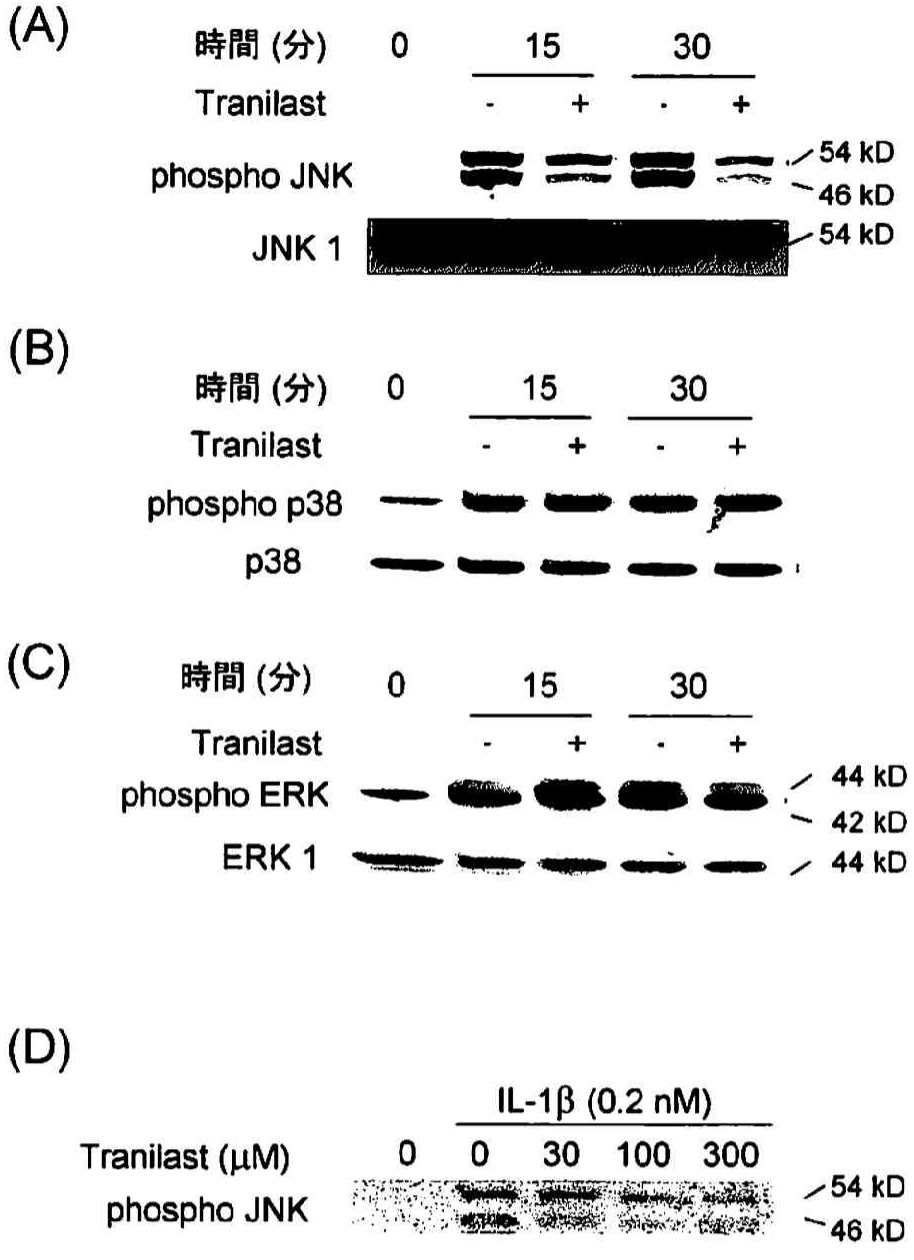
メサンギウム細胞において IL-1β 刺激による MCP-1 の発現誘導に核転写因子 NF-κB の活性化が重要であることが報告されている[28, 29]．まず，IL-1β 刺激による NF-κB 依存性の転写活性化をルシフェラーゼアッセイ法で検討した．第2図 A に示すようにトラニラストは IL-1β 刺激後 6 時間の NF-κB 依存性のルシフェラーゼ活性を有意に抑制した．トラニラストが IL-1β 刺激による NF-κB 活性化を抑制することが明らかとなったため，次にトラニラストが NF-κB の DNA 結合能に影響するか否かを EMSA 法で検討した．第2図 B に示すように IL-1β は NF-κB の DNA 結合能を著明に増強し，この効果は刺激 6 時間まで持続した．トラニラストは NF-κB の DNA 結合能に対する抑制効果を示さなかった．EMSA における NF-κB のバンドの特異性は過剰量の非標識オリゴヌクレオチドを用いた競合アッセイによる目的バンドの消失により確認した．また特異的抗 p-65 抗体および抗 p-50 抗体を核蛋白と前処置することにより目的バンドのスーパーシフトを認め，目的バンドが p65 と p50 サブユニットのヘテロダイマーにより形成されていることが示唆された．

3）IL-1β 刺激による MAP kinase の活性化に対するトラニラストの影響

MAP kinase の 3 つの主要な経路（ERK, p38, JNK）はいずれも NF-κB 依存性の転写活性に関与していることが明らかとなっている[30~32]．今回，MAP kinase の活性化に及ぼすトラニラストの影響をウェスタンブロット法でリン酸化 MAP kinase を検出することにより検討

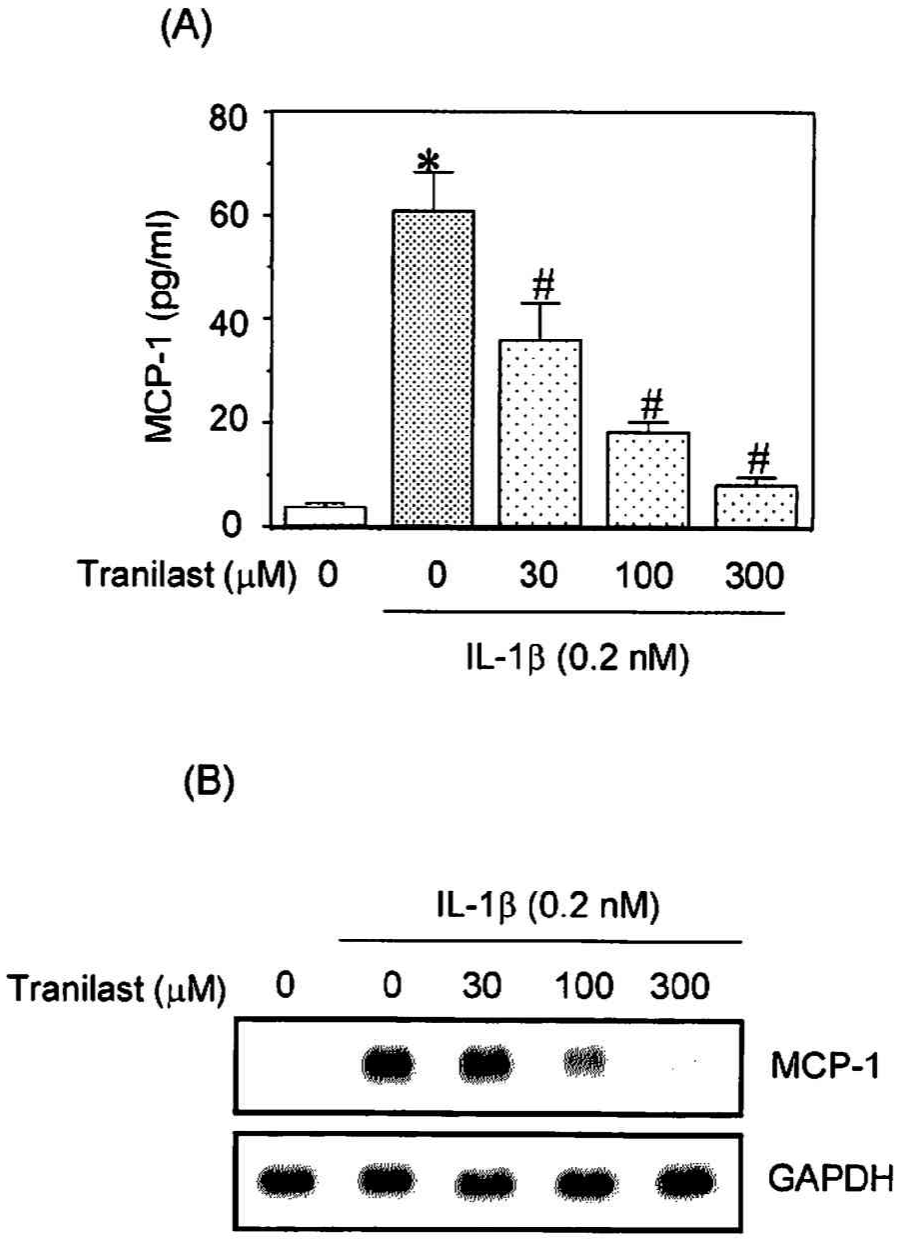


第2図　メサンギウム細胞における interleukin-1β (IL-1β) 刺激による核蛋白 nuclear factor-κB (NF-κB) 依存性の転写活性化（A），DNA 結合能の誘導（B）に対するトラニラストの影響の検討．（A）メサンギウム細胞に pNF-κB-Luc と pRL-TK ベクターをトランスフェクト後，IL-1β (0.2nM) あるいはトラニラスト（100，300 μM）添加条件下で6時間刺激し，細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を測定した．NF-κB 依存性転写活性はκB ルシフェラーゼ活性と pRL-TK ルシフェラーゼ活性の比を算出して補正した．数値は平均値±標準誤差を表す（n＝5）．＊P＜0.05 コントロール群と比較；＃P＜0.05 interleukin-1β刺激単独群と比較．（B）メサンギウム細胞を IL-1β 単独あるいはトラニラスト（300 μM）添加条件下で 1，3，6 時間刺激した後，核蛋白成分を抽出し，NF-κB の DNA 結合能を electromobility shift assay により解析した．同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプルを用いて4回行ったが結果は同様であった．右図は競合解析（100倍濃度の非標識オリゴヌクレオチドを使用）およびスーパーシフト解析（抗 p65 抗体，抗 p50 抗体を使用）の結果を示す．（Chikaraishi A et al：Eur J Pharmacology 427：151-158, 2001）の第3図を許可を得て転載）



第3図　メサンギウム細胞における interleukin-1β (IL-1β) 刺激による3つの主要な mitogen-activated protein kinase (MAP kinase (Jun N-terminal kinase (JNK：A), p38 kinase (B), extracellular signal-regulated kinase (ERK：C))) の活性化に対するトラニラストの影響と，トラニラストの濃度を変化させた時の JNK の活性化に対する影響（D）の検討．

（A，B，C）メサンギウム細胞を IL-1β (0.2nM) 単独あるいはトラニラスト（300 μM）添加条件下で刺激し，0，15，30 分の時点で蛋白溶解液を調整し，抗リン酸化 MAP kinase 一次抗体（抗リン酸化 ERK 抗体，抗リン酸化 p38 抗体，抗リン酸化 JNK 抗体）を使用してウェスタンブロット法により解析した．リン酸化 MAP kinase の検出後のメンブレンは抗体を除去した後，抗 MAP kinase 抗体（抗 ERK 抗体，抗 p-38 抗体，抗 JNK 抗体）を一次抗体として再度ウェスタンブロット法を行い，蛋白量を確認した．同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプルを用いて3回行ったが結果は同様であった．（D）メサンギウム細胞を IL-1β (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度（30 μM から 300 μM）のトラニラスト添加条件下で刺激し，30 分後の JNK の活性化を抗 JNK 抗体を使用したウェスタンブロット法により解析した．同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプルを用いて3回行ったが結果は同様であった．（Chikaraishi A et al：Eur J Pharmacology 427：151-158, 2001）の第4図を許可を得て転載）



第4図　尿細管上皮細胞における interleukin-1β (IL-1β) 刺激による monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 分泌量（A），mRNA 発現量（B）に対するトラニラストの抑制効果．（A）尿細管上皮細胞（NRK52E）を IL-1β (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度（30 μM から 300 μM）のトラニラスト添加条件下で刺激し，12 時間後の培養上清中の MCP-1 分泌量を ELISA 法にて計測し比較した．数値は平均値±標準誤差を表す（n＝4）．＊P< 0.05 コントロール群と比較；＃P＜0.05 IL-1β 刺激単独群と比較．（B）メサンギウム細胞を IL-1β (0.2nM) 単独あるいは種々の濃度（30 μM から 300 μM）のトラニラスト添加条件下で刺激し，6 時間後の MCP-1mRNA 発現量をノザンブロット法にて比較した．同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプルを用いて 4 回行ったが結果は同様であった．

した．第3図Aに示すようにトラニラストはIL-1β刺激によるJNKのリン酸化を抑制した．これに対し，トラニラストはIL-1β刺激によるp38，ERKのリン酸化には影響せず（第3図B，C），トラニラストによる活性化の抑制はJNK選択的であることが明らかとなった．各種MAP kinase蛋白量のレベルは総MAP kinaseに対する抗体（抗ERK抗体，抗p38抗体，抗JNK抗体）により検出されるバンドにより確認した．トラニラストによるJNK活性化の抑制効果は濃度依存性であった（第3図D）．

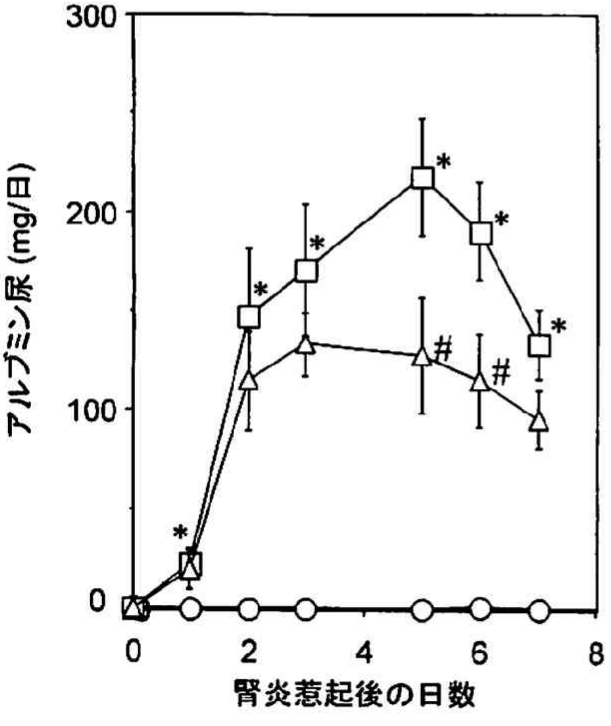
4）尿細管上皮細胞におけるInterleukin-1βによるMCP-1発現誘導に対するトラニラストの影響

培養尿細管上皮細胞NRK52E細胞においてもIL-1β刺激（0.2nM）により著明なMCP-1の発現誘導を認め，これに対してトラニラストは濃度依存的にMCP-1蛋白（第4図A），mRNA（第4図B）の発現を抑制した．

2．糸球体腎炎モデル（ラットThy 1.1腎炎）に対するトラニラストの投与効果の検討

1）アルブミン尿に対するトラニラストの効果

第5図に示すようにMoAb 1-22-3投与直後より著明な尿アルブミンの増加を認め，Thy 1.1腎炎無処置群においては腎炎誘発5日目まで増加傾向が持続して5日目にピークとなり，以後漸減傾向となった．これに対してThy1.1腎炎トラニラスト投与群では腎炎3日目をピークに以後漸減傾向に転じ，5日目，6日目ではThy 1.1腎炎無処置群に比して有意に尿アルブミンは減少していた．コントロール群の尿アルブミン排泄量は極少量であった．



第5図　Thy 1.1腎炎惹起後のアルブミン尿の経時的変化（○：コントロール群，□；Thy 1.1腎炎無処置群，△：Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群）．数値は平均値±標準誤差を表す．＊P<0.05 コントロール群と比較；#P<0.05 Thy 1.1腎炎無処置群と比較．

2）血液化学検査・血圧値の比較

腎炎誘発7日目における収縮期血圧値，体重，血液化学検査値を比較した．第1表に示すように収縮期血圧，体重は各群で変化を認めなかった．Thy 1.1腎炎無処置群の血清アルブミン値と血清総蛋白値は尿中への漏出を反映してコントロール群と比較して著明に減少したが，Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群ではこれらの減少の程度が有意に緩和されていた．腎機能に関しては，Thy 1.1腎炎無処置群ではコントロール群と比較して血清クレアチニン値が有意に上昇したが，Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群ではその上昇の程度が抑制される傾向を認め，コントロール群との間のクレアチニン値の変化は有意なものではなかった．

3）糸球体障害に対するトラニラストの効果

PAS染色標本により腎炎誘発7日目の腎臓の組織学的変化を評価した．過去の報告例にもあるように[21, 26] Thy 1.1腎炎無処置群の糸球体（第6図B）はコントロール群（第6図A）と比較して著明な細胞増多と基質沈着の増加を認め，一部にメサンギウム融解像が残存していた．一方，Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群（第6図C）ではこのような糸球体の病的変化が改善しており，糸球体障害スコアの改善は腎炎無処置群と比較して有意であった（第6図D）．なお腎炎誘発24時間後のメサンギウム細胞融解（mesangiolysis）の程度はトラニラスト投与の有無により影響を受けなかった．

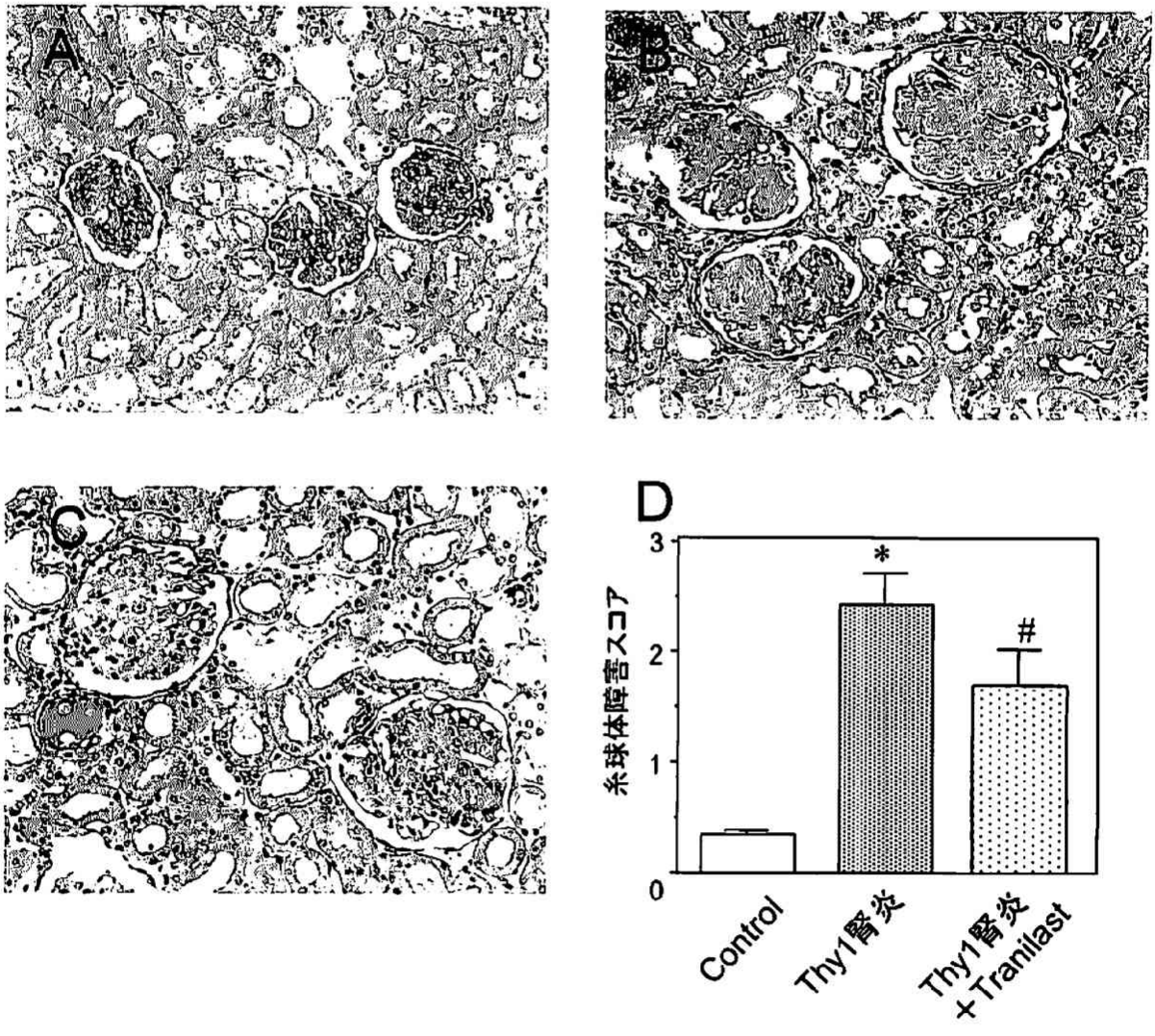
4）糸球体・間質領域へのマクロファージ浸潤に対するトラニラストの効果

Thy 1.1腎炎無処置群の糸球体内ED-1陽性マクロファージ数はコントロール群と比較して著明に増加した（第7図AとC）．これに対し，Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群の糸球体浸潤マクロファージ数は無処置群と比較して有意に減少していた（第7図Eと第8図A）．尿細管間質領域においてもThy 1.1腎炎無処置群（第7図D）ではコントロール群（第7図B）と比較して軽度開大した間質間隙に有意なマクロファージの浸潤を認め，トラニラスト投与により浸潤マクロファージ数は有意に減少していた（第7図Fと第8図B）．

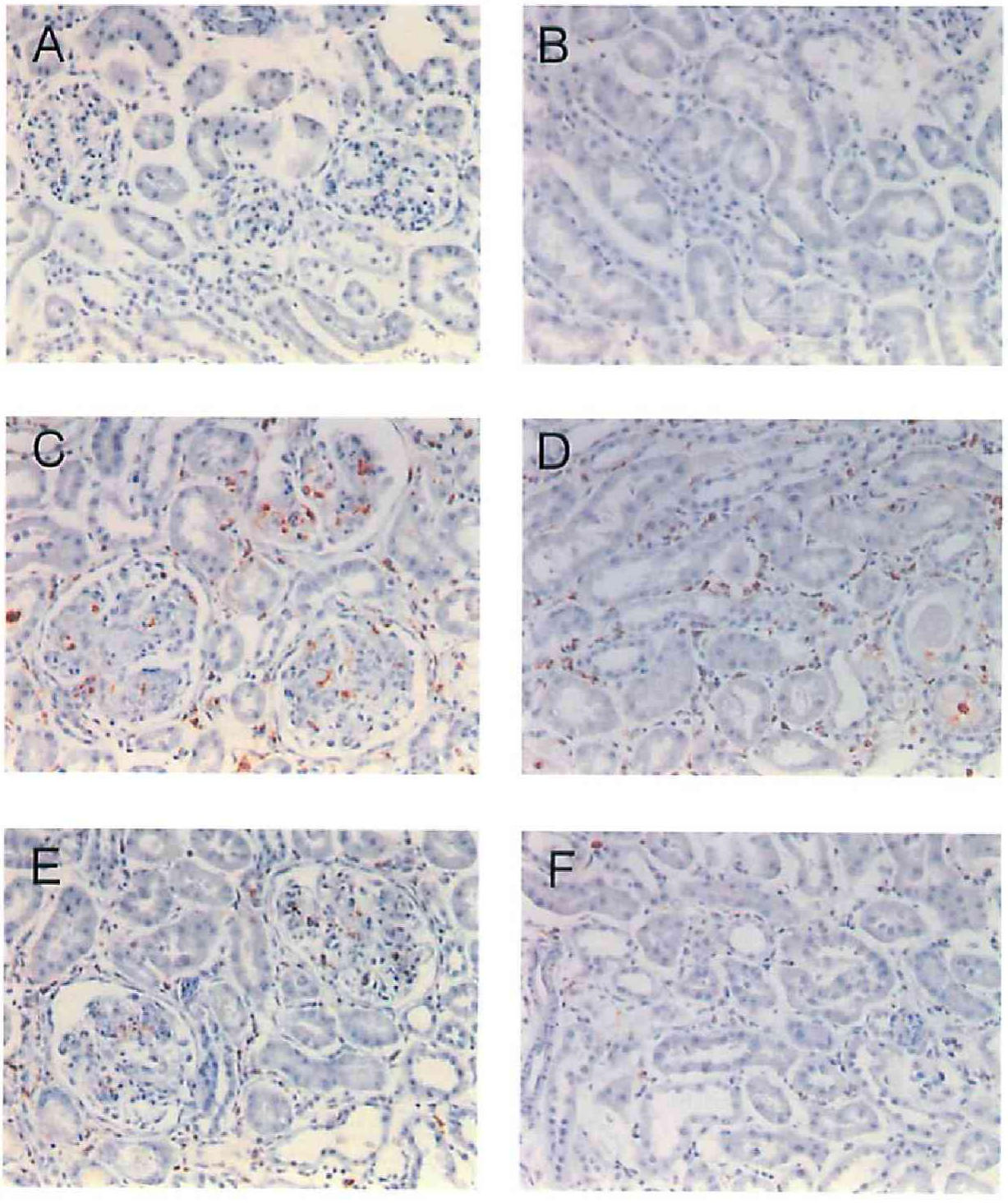
第1表　トラニラスト投与の体重・血圧・血液生化学値への影響

	コントロール群	腎炎未治療群	腎炎＋トラニラスト投与群
体重（g）	164.2±2.0	162.5±5.2	159.5±4.2
収縮期血圧（mmHg）	119±8	128±12	130±5
血清総蛋白（g/dl）	5.60±0.09	5.20±0.06*	5.48±0.09#
血清アルブミン（g/dl）	4.44±0.08	3.50±0.11*	3.86±0.17*#
血清クレアチニン（mg/dl）	0.22±0.02	0.34±0.04*	0.28±0.03

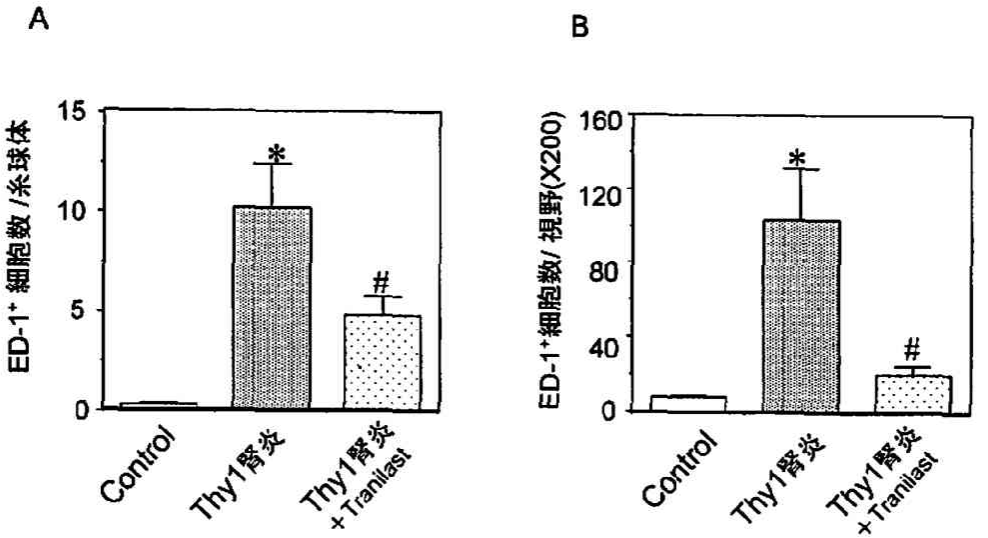
腎炎ラットにトラニラストを連日経口投与し，腎炎7日目に大動脈より採血した．数値は平均値±標準誤差を表す．*P<0.05 コントロール群と比較；#P<0.05 腎炎未治療群と比較．



第6図　A-C：糸球体領域（倍率×200）の periodic acid-Schiff 染色標本写真（A：コントロール群，B：Thy 1.1 腎炎無処置群，C：Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群），D：糸球体障害スコアの検討（Control：コントロール群，Thy1 腎炎；Thy 1.1 腎炎無処置群，Thy1 腎炎＋Tranilast：Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群）．数値は平均値±標準誤差を表す，＊P< 0.05 コントロール群と比較；#P< 0.05 Thy 1.1 腎炎無処置群と比較．



第7図　糸球体（A，C，E：倍率×200），腎皮質間質領域（B，D，F：倍率×100）のED-1に対する免疫組織染色標本写真（A，B：コントロール群，C，D：Thy 1.1 腎炎無処置群，E，F：Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群）．



第8図　糸球体（A），皮質間質領域（B）のED-1陽性細胞数の検討（Control：コントロール群，Thy1腎炎；Thy 1.1腎炎無処置群，Thy1腎炎＋Tranilast：Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群）．数値は平均値±標準誤差を表す．＊P<0.05 コントロール群と比較；＃P< 0.05 Thy 1.1腎炎無処置群と比較．

5）活性化メサンギウム細胞・間質筋線維芽細胞に対するトラニラストの効果

活性化メサンギウム細胞の指標である糸球体α-SMA[9]は，Thy 1.1腎炎無処置群では糸球体構成細胞の大部分に発現を認め，メサンギウム細胞の著明な活性化が示唆された（第9図C）．一方，Thy 1.1腎炎トラニラスト投与群では無処置群と比較して糸球体α-SMA発現が有意に抑制されていた（第9図Eと第10図A）．

腎間質領域のα-SMA発現は間質障害の進展に重要な役割を果たす間質筋線維芽細胞を反映している[4]．Thy 1.1腎炎無処置群ではコントロール群と比較して軽度ではあるが有意な間質α-SMA発現増加を認め（第9図D），Thy 1.1腎炎トラニラスト治療群ではこの増加が有意に抑制されていた（第9図Fと第10図B）．

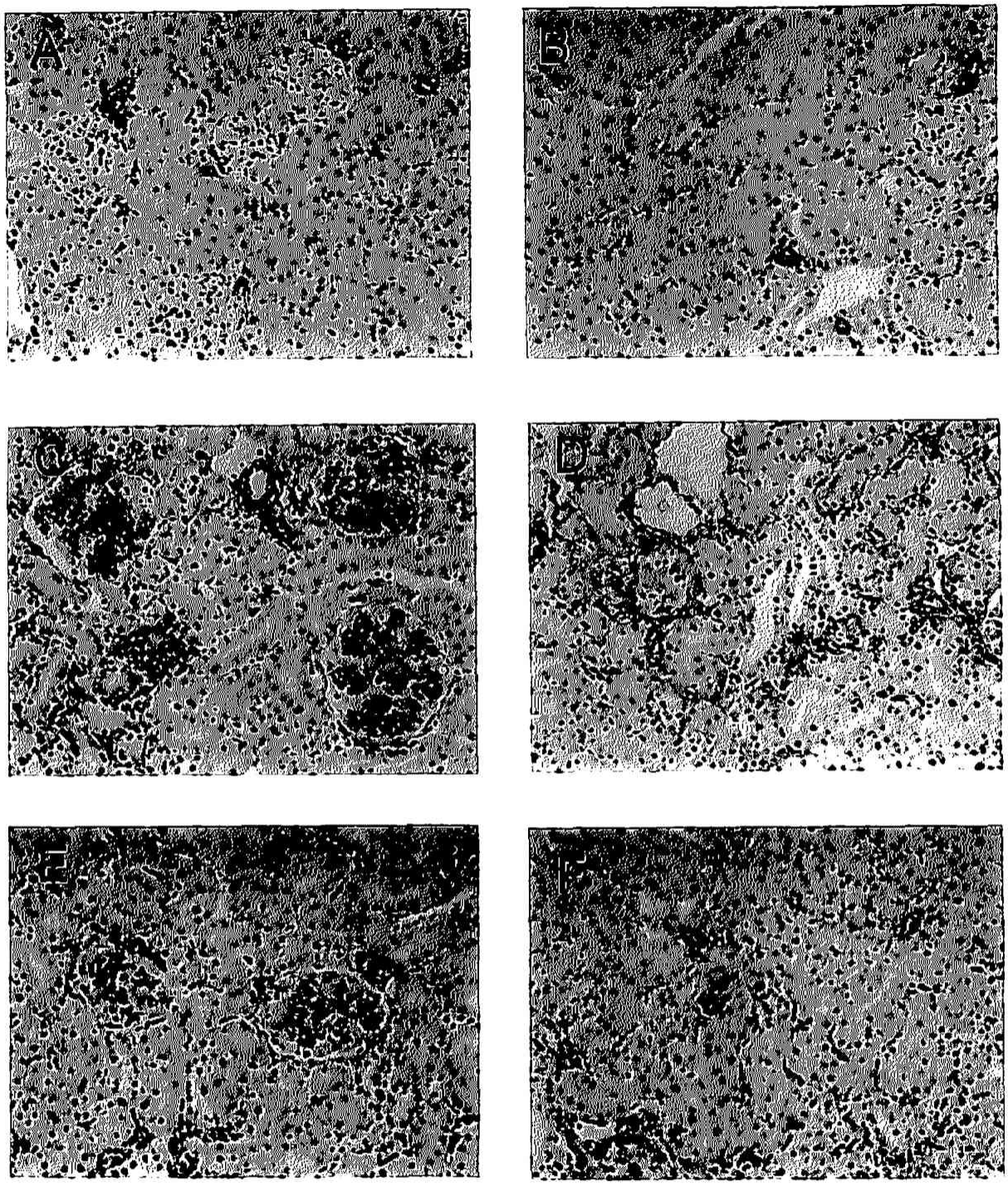
コントロール群では正常な発現部位である小葉間動脈レベルの脈管以外，糸球体，間質領域のいずれにもα-SMAの発現は認めなかった（第9図AとB）．

6）尿中MCP-1排泄量に対するトラニラストの効果

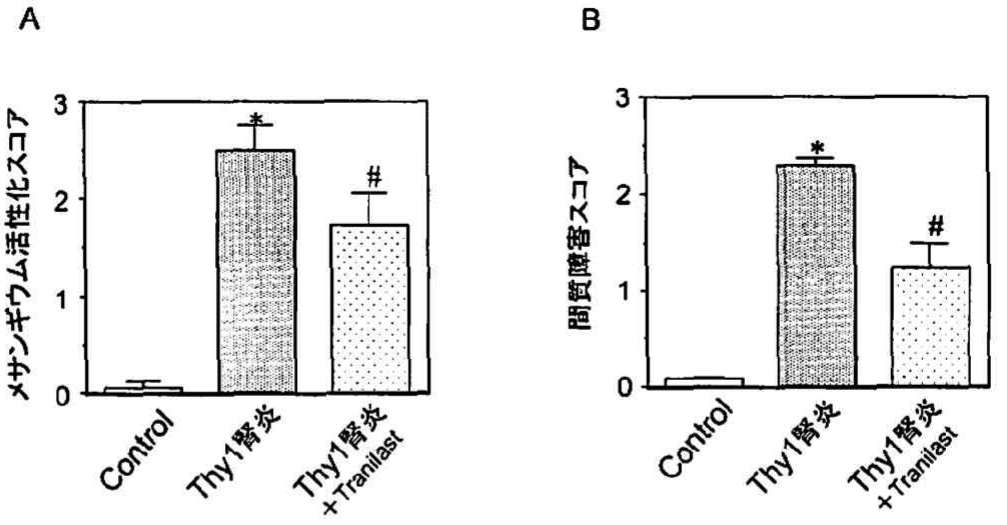
Thy 1.1腎炎においてMCP-1はマクロファージの浸潤・活性化に中心的役割を担っていることが報告されており[11, 12, 22]，Thy 1.1腎炎の尿中MCP-1排泄量に対するトラニラストの投与効果を検討した．第11図に示すようにThy 1.1腎炎無治療群ではコントロール群と比較して尿MCP-1排泄量の有意な増加を認め，経時的に漸増傾向であった．トラニラスト治療により尿MCP-1排泄量の増加は抑制される傾向を認め，腎炎誘発1日目と7日目ではトラニラスト治療による減少が有意であった．

考　察

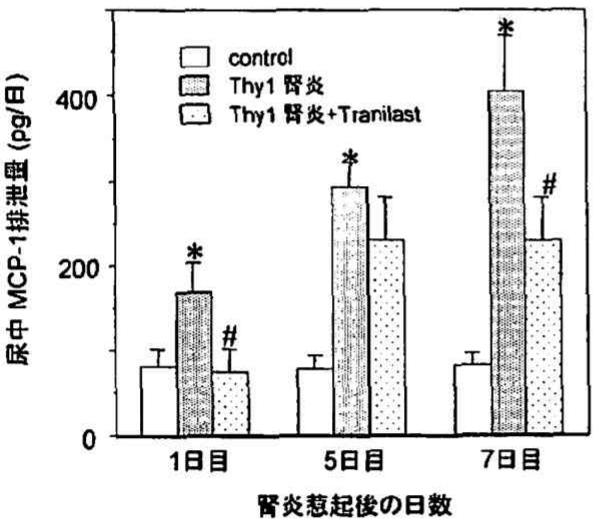
本研究では抗アレルギー薬であるトラニラストが，まず，腎糸球体メサンギウム細胞と尿細管上皮細胞において，マクロファージの走化活性化因子であるMCP-1の発現誘導を抑制することを示した．続いて，MCP-1発現への関与を指摘されている細胞内シグナル伝達経路である核転写因子NF-κBの活性化と，MAPkinase経路の主要な3つの経路のうち，JNK経路の活性化を同薬剤が選択的に抑制することを明らかにした．さらに，糸球体腎炎の動物モデルであるラットThy 1.1腎炎に対してトラニラストの投与を試み，同薬剤による治療が炎症局所のマクロファージ浸潤を抑制することにより腎障害改善効果を有することを示した．トラニラストは現在まで臨床的に広く用いられてきた薬剤であり，近年ではPTCA後の著明な再狭窄予防効果が注目されるに従い[15]，炎症性細胞や血管平滑筋細胞などに対するトラニラストの多種多様な抗炎症・抗増殖効果の報告が相次いでなされている[16~19]．同薬剤の臨床での標準的な投与量におけ



第9図　糸球体（A，C，E：倍率×200），腎皮質間質領域（B，D，F：倍率×100）のα-smooth muscle actin に対する免疫組織染色標本写真（A，B：コントロール群，C，D：Thy 1.1 腎炎無処置群，E，F：Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群）．



第10図　メサンギウム細胞の活性化スコア（A），間質筋線維細胞の増加スコア（B）の検討（Control：コントロール群，Thy1 腎炎：Thy 1.1 腎炎無処置群，Thy1 腎炎＋Tranilast：Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群）．数値は平均値±標準誤差を表す．＊P＜0.05 コントロール群と比較；＃P＜0.05 Thy 1.1 腎炎無処置群と比較．



第11図　Thy 1.1 腎炎惹起後の尿中 monocyte chemoattractant protein-1（MCP-1）排泄量の経時的変化の比較（Control：コントロール群，Thy1 腎炎；Thy 1.1 腎炎無処置群，Thy1 腎炎＋Tranilast：Thy 1.1 腎炎トラニラスト投与群）．数値は平均値±標準誤差を表す（n＝6）．＊P＜0.05 コントロール群と比較；＃P＜0.05 Thy 1.1 腎炎無処置群と比較．

るヒトの血清中の濃度は 100 μM 程度，血清での蛋白結合率が 80%程度であるので，血清中の遊離濃度（20 μM 程度）は我々の実験系において MCP-1 の発現誘導を抑制した濃度（30 μM）と比較しても遜色なく，臨床での使用において MCP-1 の抑制作用を期待し得る数字である．そして，今回我々がラットに対して経口投与に用いた量についても，過去の報告において臨床的投与量によるヒトの血中濃度とラットの血中濃度がほぼ同程度に達成されている方法を採用した[33]．

細胞実験では，まず，メサンギウム細胞で ELISA 法を用いて IL-1 刺激による MCP-1 蛋白の分泌増加をトラニラストが濃度依存性に抑制することを示し，さらにノザンブロット法によりトラニラストが同刺激による MCP-1 mRNA 発現の誘導を抑制することを明らかにした．トラニラストによる MCP-1 蛋白・mRNA の発現誘導の抑制作用は尿細管上皮細胞でも同様に認められた．

核転写因子 NF-κB は炎症に関与する種々の炎症性サイトカインや接着因子の転写の促進に関与しており[34]，メサンギウム細胞では IL-1β 刺激による MCP-1 遺伝子の発現に重要であることが報告されている[35, 36]．NF-κB は非刺激下の細胞では抑制蛋白 IκB と複合体を形成し細胞質内に局在しているが，IL-1β 刺激が加わると IκB は速やかに分解され，遊離した NF-κB が核内に移行し

て標的遺伝子のプロモーター領域に存在するκB配列に結合し，その転写を活性化する[6]．今回我々はルシフェラーゼ法を用いて，メサンギウム細胞においてIL-1β刺激による核転写因子NF-κBの活性化をトラニラストが抑制することを示したが，EMSAにより得られた結果ではトラニラストはIL-1β刺激によるNF-κBのDNA結合能の増加を抑制しなかった．なおウェスタンブロット法によりIκBの分解を検討した結果も，トラニラストはIL-1β刺激によるIκBα及びIκBβの分解の程度に影響せず，EMSAの結果と合致するものであった．近年，NF-κB依存性の転写活性化のメカニズムとしてNF-κBのDNA結合過程以降に複数のプロセスが介在し，転写の活性化にはNF-κBがκB配列に結合した後に，NF-κBのp65サブユニットのリン酸化[35]，コアクチベーター蛋白との結合[36]，p65とRNAポリメラーゼIIとの相互作用[37]などの過程を必要とすることが明らかとなっている．従って本実験におけるルシフェラーゼ法とEMSAの結果から，トラニラストがNF-κBの活性化を抑制した機序として，同薬剤がNF-κBのDNA結合以降のこれらのプロセスに影響を及ぼした可能性も想定される．内皮細胞においては，トラニラストがNF-κB依存性の転写活性をそのDNA結合能に影響せずに抑制し，その機序としてトラニラストがNF-κBとコアクチベーターCBP (cAMP response element binding protein)との相互作用を抑制することを示唆する報告がなされている[38]．

近年，NF-κBの活性化にMAPkinaseの主要な3つの経路ERK[30]，p38[31]，JNK[32]のいずれもが関与することが明らかにされ注目されている．JNK経路に関しては抑制優勢変異型のJNKの導入により単球におけるNF-κB依存性の転写活性の抑制効果が示されている[31]．今回の実験ではIL-1βにより活性化されるMAPkinaseの3つの経路のうち，トラニラストはERK，p38の活性に影響せずにJNKの活性化を選択的に抑制した．メサンギウム細胞においてJNK経路とNF-κBを結び付ける所見としては，NF-κB依存性に転写されるcyclooxygenase 2 (COX 2)とinducible nitiric oxide synthase (iNOS)のIL-1βによる転写の誘導にJNK経路が必要であるとの報告が近年なされている[39, 40]．MCP-1の誘導におけるJNK経路の関与についてはさらに詳細な検討を要するが，これらの所見はトラニラストによるNF-κB活性化抑制へのJNK経路の関与を示唆するものであると考えられる．

今回，ラットThy 1.1腎炎に対してトラニラスト投与効果を検討した実験では，トラニラストによりアルブミン尿が減少し，腎組織所見の解析では，糸球体における細胞増多・基質過剰蓄積の緩和，マクロファージ浸潤の減少，メサンギウム活性化の抑制効果などの所見が得られた．トラニラストの治療効果は糸球体障害の改善にとどまらず，尿細管間質領域へのマクロファージの浸潤や筋線維芽細胞の増加所見に特徴づけられる二次的な間質障害をも緩和するものであった．

MCP-1は様々な腎臓疾患においてマクロファージの誘導，活性化の中心的役割を担っており，Thy 1.1腎炎においても糸球体に発現するMCP-1がマクロファージの浸潤[2]そして糸球体硬化の進展[1]に関与していることが示されている．今回，トラニラストはThy 1.1腎炎の糸球体へのマクロファージの浸潤を抑制した．Thy 1.1腎炎の初期の段階では主たるMCP-1産生の場はメサンギウム細胞であることが示唆されており[22]，メサンギウム細胞においてトラニラストがMCP-1の誘導を抑制した結果と考えあわせると，トラニラストによる腎炎ラットの糸球体浸潤マクロファージの減少は，少なくとも部分的には，メサンギウム細胞からのMCP-1産生抑制に基づくものであると考えられる．

αSMAは活性化メサンギウム細胞の発現マーカーであり，活性化したメサンギウム細胞は収縮型から分泌型へ形質転換し，増殖し細胞外基質を過剰産生するようになる．Thy 1.1腎炎において糸球体αSMA発現は糸球体障害を反映して顕著な増加を認める[3]．今回，トラニラストは糸球体αSMA発現を有意に抑制し，これはPAS染色における糸球体の細胞増多・基質過剰蓄積の有意な抑制効果を伴っていた．メサンギウム細胞の活性化には浸潤マクロファージに由来する種々のサイトカインや増殖因子，特にPDGF[41]とTGF-β[42, 43]が重要とされており，トラニラストによるメサンギウム細胞活性化の抑制効果にはマクロファージの浸潤抑制作用が関与していると考えられる．加えて，トラニラストがメサンギウム細胞においてPDGFの効果を抑制するとのHishikawaらの報告[17]や，同薬剤の抗TGF-β作用を示す多数の報告例[16, 33]から，炎症腎におけるPDGFやTGF-βによるメサンギウム細胞への活性化刺激のシグナルをトラニラストが直接抑制した可能性も示唆される．

トラニラストはThy 1.1腎炎に伴う尿細管間質へのマクロファージの浸潤，並びに間質筋線維芽細胞の増生を抑制した．ヒト糸球体腎炎では間質領域のMCP-1発現量は間質へのマクロファージ浸潤の程度と極めてよく相関し[44]，実験腎炎においては尿細管上皮由来のMCP-1の発現を特異的に抑制することにより，尿細管間質障害が緩和されることが明らかにされている[45]．本実験で

はトラニラストが尿細管上皮細胞のMCP-1発現誘導を抑制しており，これを腎炎ラットにおける腎間質領域のマクロファージの浸潤を抑制した機序の一つとして想定することが可能である．近年，片側尿管結紮によるラット腎間質障害モデルへのトラニラストの投与による尿細管障害と間質線維化の抑制効果が報告されたが[46]，これは純粋な腎間質病変に対するトラニラストの治療効果を示している．本実験でもトラニラストは腎間質障害の指標であるα-SMA陽性筋線維芽細胞数を減少させたが，これらの結果は糸球体病変に続発する間質障害においても同薬剤が直接腎間質に作用して病変の進展を抑制している可能性を示唆するものである．

ヒト腎障害において尿排泄MCP-1の由来としては，メサンギウム細胞や尿細管上皮細胞，そして浸潤マクロファージなどが想定されている[5, 44]．今回，トラニラストは細胞実験でメサンギウム細胞・尿細管上皮細胞においてMCP-1の発現誘導を抑制し，実際に炎症腎の糸球体・間質のマクロファージの浸潤を減少させた．さらにトラニラストは腎炎ラットの尿MCP-1排泄量を減少させた．以上の所見は，腎炎におけるマクロファージの浸潤抑制効果にこれらの細胞に由来するMCP-1へのトラニラストによる発現・分泌抑制効果が関与することを裏付けるものであると考えられる．

今日まで，ヒト腎炎の治療薬としてはステロイドや免疫抑制薬が用いられてきたが，免疫系や代謝系など種々の全身的副作用が臨床の場で問題となりその使用の機会を制限してきた．これに対してトラニラストによる副作用の主だったものは，PTCA再狭窄予防効果を検討したTREAT試験の報告でも肝機能障害程度であり，その出現頻度は5%以下に留まっている[15]．今回の実験ではトラニラスト投与による肝障害や低栄養などの合併は認められなかった．トラニラストは臨床的に安全性が確立されている薬剤であり，こうした観点からも抗ケモカイン作用・NF-κB抑制作用により腎炎進展を抑制する安全な経口薬として注目に値すると考える．

総　括

1．メサンギウム細胞及び尿細管上皮細胞を用いた検討においてトラニラストはIL-1β刺激により誘導されるMCP-1 mRNA発現量を濃度依存的に抑制した．この抑制機序として，トラニラストによるIL-1β刺激下での核蛋白NF-κBの活性化の抑制作用や選択的なJNK経路の抑制作用が関与している可能性が示唆された．

2．ラット糸球体腎炎モデルでの検討では，トラニラスト経口投与による治療は尿アルブミンを減少させ，糸球体・間質へのマクロファージ浸潤を抑制し，糸球体・間質いずれにおいても病変の進展を緩和した．さらに，尿中MCP-1排泄量もトラニラストにより減少した．

以上の結果より，臨床的に広く安全に使用されている抗アレルギー薬であるトラニラストがMCP-1発現抑制作用により，糸球体腎炎の進展抑制効果を有することが明らかにされた．

本稿を終えるにあたり，懇切な御指導と御校閲を賜りました，慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深く感謝いたします．また，本研究を直接御指導いただきました，林松彦助教授に心より感謝いたします．ならびに御協力，御助言をいただきました研究室各員に深く感謝いたします．

本論文の要旨の一部は第43回（名古屋，2000年）と第44回（大阪，2001年）日本腎臓学会，33rd (Toronto, 2000) and 34th (San Francisco, 2001) Annual Meeting of American Society of Nephrologyにおいて発表した．

本研究の一部は平成13年度文部省科学研究費補助金（奨励研究（A），課題番号13770606）によった．

文　献

1) Nakai S, Shinzato T, Sanaka T, Kikuchi K, Kitaoka T, Shinoda T, Yamazaki C, Sakai R, Omori H, Morita O, Iseki K, Kubo K, Tabei K, Masakane I, Fushimi K, Wada A, Miwa N, Akiba T：The current state of chronic dialysis treatment in Japan. J Jpn Soc Dial Ther 35：1155-1184, 2002
2) Atkins RC：Macrophages in renal injury. Am J Kidney Dis 31：xiv-xivii, 1998
3) Johnson RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM, Pritzl P, Gordon K, Gown AM：Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. J Clin Invest 87：847-858, 1991
4) Eddy AA：Molecular insights into renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol 7：2495-2508, 1996
5) Banba N, Nakamura T, Matsumura M, Kuroda H, Hattori Y, Kasai K：Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. Kidney Int 58：684-690, 2000
6) Luster, AD：Chemokines：chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Eng J Med 338：436-445, 1998
7) Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J：Glomerular expression of monocyte attractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. Lab

Invest 71 : 536-542, 1994
8) Segerer S, Nelson PJ, Schloendorf D : Chemokines, chemokine receptors, and renal disease : from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. J Am Soc Nephrol 11 : 152-176, 2000
9) Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, Mantovani A : Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. Lab Invest 73 : 804-809, 1995.
10) Rovin BH, Doe N, Tan LC : Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. Am J Kidney Dis 27 : 640-646, 1996
11) Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RAK : Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming factor-β. Kidney Int 56 : 135-144, 1999
12) Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss F, Helmchen UM, Stahl RAK : Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. Kidney Int 51 : 770-776, 1997
13) Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi KI, Harada K, Naruto M, Su SB, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K : Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). FASEB J 10 : 1418-1425, 1996
14) Isaji M, Nakajoh M, Naito J : Selective inhibition of collagen accumulation by *N*-(3, 4-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (*N*-5') in granulation tissue. Biochem Pharmacol 36 : 469-474, 1987
15) Tamai H, Katoh O, Suzuki S, Fujii K, Aizawa T, Takase S, Kurogane H, Nishikawa H, Sone T, Sakai K, Suzuki T, for the Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial Study Group : Impact of tranilast on restenosis after coronary angioplasty : Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial (TREAT). Am Heart J 138 : 968-975, 1999
16) Fukuyama J, Miyazawa K, Hamano S, Ujiie A : Inhibitory effects of tranilast on proliferation, migration, and collagen synthesis of human vascular smooth muscle cells. Can J Physiol Pharmacol 74 : 80-84, 1996
17) Hishikawa K, Nakaki T, Hirahashi J, Marumo T, Saruta T : Tranilast restores cytokine-induced nitric oxide production against platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. J Cardiovas Pharmacol 28 : 200-207, 1996
18) Suzawa H, Kikuchi S, Ichikawa K, Koda A : Inhibitory action of tranilast, an anti-allergic drug, on the release of cytokines and PGE2 from human monocytes-macrophages. Jpn. J Pharmacol 60 : 85-90, 1992
19) Capper EA, Roshak AK, Bolognese BJ, Podolin PL, Smith T, Dewitt DL, Anderson KM, Marshall LA : Modulation of human monocyte activities by tranilast, SB252218, a compound demonstrating efficacy in restenosis. J Pharmacol Exp Ther 295 : 1061-1069, 2000
20) Hishikawa K, Nakaki T, Hirahashi J, Marumo T, Saruta T : Tranilast inhibits the effects of platelet-derived growth factor on cell proliferation and induction of nitric oxide. Eur J Phamacol 291 : 435-438, 1995
21) Bagchus WM, Hoedemaeker PHJ, Rozing J, Bakker WW : Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy 1.1 antibodies. A sequential histological and ultrastructural study in the rat. Lab Invest 55 : 680-687, 1986
22) Stahl RAK, Thaiss F, Disser M, Helmchen U, Hora K, Schloendorf D : Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. Kidney Int 44 : 1036-1047, 1993
23) Chikaraishi A, Hirahashi J, Takase O, Marumo T, Hishikawa K, Hayashi M, Saruta T : Tranilast inhibits interleukin-1β-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat mesangial cells. Eur J Pharmacol 427 : 151-158, 2001
24) Hirahashi J, Takayanagi A, Hishikawa K, Takase O, Chikaraishi A, Hayashi M, Shimizu N, Saruta T : Overexpression of truncated IκBα potentiates TNF-α -induced apoptosis in mesangial cells. Kidney Int 57 : 959-968, 2000
25) Fan J-M, Ng Y-Y, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY : Transforming growth factor-β regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro*. Kidney Int 56 : 1455-1467, 1999
26) Kawachi H, Orikasa M, Matsui K, Iwanaga T, Toyabe S, Oite T, Shimizu F : Epitope-specific induction of mesangial lesions with proteinuria by a MoAb against mesangial cell surface antigen. Clin exp Immunol 88 : 399-404, 1992
27) Grande J.P, Walker HJ, Holub BJ, Warner GM, Keller DM, Haugen JD, Donadio,Jr. JV, Dousa TP : Suppressive effects of fish oil on mesangial cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. Kidney Int 57 : 1027-1040, 2000
28) Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert A : Activation of nuclear factor-B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. Kidney Int 48 : 1263-1271, 1995
29) Stylianou E, Nie M, Ueda A, Zhao L : c-Rel and p65 *trans*-activate the monocyte chemoattractant protein-1 gene in interleukin-1 stimulated mesangial cells. Kidney Int 56 : 873-882, 1999
30) McGilvray ID, Lu Z, Bitar R, Dackiw APB, Davreux CJ, Rotstein OD : VLA-4 integrin cross-linking on human monocytic THP-1 cells induces tissue factor expression by mechanism involving mitogen-

activated protein kinase. J Biol Chem 272 : 10287-10294, 1997
31) Wesselborg S, Bauer MKA, Vogt M, Schmitz ML, Schulze-Osthoff K : Activation of transcriptional factor NF-κB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. J Biol Chem 272 : 12422-12429, 1997
32) Tuyt LML, Dokter WHA, Birkenkamp K, Koopmans SB, Lummen C, Kruijer W, Vellenga E : Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-κB-dependent IL-6 expression in human monocytes. J Immunol 162 : 4893-4902, 1999
33) Pinto YM, Pinto-Sietsma S-J, Philipp T, Engler S, Kossmehl P, Hocher B, Marquardt H, Sethmann S, Lauster R, Merker H-J, Paul M : Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor β_1 attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR (mRen2) 27 rat. Hypertension 36 : 747-754, 2000
34) Barmes PJ, Karin M : Nuclear factor-B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N Eng J Med 336 : 1066-1071, 1997
35) Egan LJ, Mays DC, Huntoon CJ, Bell M.P, Pike MG, Sandborn WJ, Lipsky JJ, McKean DJ : Inhibition of Interleukin-1-stimulated NF-B RelA/p65 phosphorylation by mesalamine is accompanied by decreased transcriptional activity. J Biol Chem.274 : 26448-26453, 1999
36) Gerritsen ME, Williams AJ, Neish AS, Moore S, Shi Y, Collins T : CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. Proc Natl Acad Sci USA 94 : 2927-2932, 1997
37) Qiu D, Zhao G, Aoki Y, Shi L, Uyei A, Nazarian S, Ng JCH, Kao PN : Immunosuppressant PG490 (Triptolide) inhibits T-cell interleukin-2 expression at the level of purine-box/nuclear factor of activated T-cells and NF-κB transcriptional activation. J Biol Chem 274 : 13443-13450, 1999
38) Spiecker M, Lorenz I, Meyer J, Darius H : Tranilast inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappa B activation in vascular endothelial cells. Mol Pharmacol 62 : 856-863, 2002
39) Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR : Interleukin-1β-induced cyclooxygenase expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p-38 MAPK signal pathways in rat mesangial cells. J Biol Chem 273 : 28670-28676, 1998
40) Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR : Both p38α MAPK and JNK/SAPK pathways are important for induction of nitric-oxide synthase by interleukin-1β in rat glomerular mesangial cells. J Biol Chem 274 : 36200-36206, 1999
41) Nakamura H, Isaka Y, Tsujie M, Akagi Y, Sudo T, Ohno N, Imai E, Hori I : Electroporation-mediated PDGF receptor-IgG chimera gene transfer ameliorates experimental glomerulonephritis. Kidney Int 59 : 2134-2145, 2001
42) Blom IE, van Dijk AJ, Wieten L, Duran K, Ito Y, Kleij L, deNichilo M, Rabelink TJ, Weening JJ, Aten J, Goldschmeding R : *In vitro* evidence for differential involvement of CTGF, TGF, and PDGF-BB in mesangial response to injury. Nephrol Dial Transplant 16 : 1139-1148, 2001
43) Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E : Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β1. Nature 346 : 371-374, 1990
44) Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Marra F, Schena FP : Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides : a pathogenetic role in interstitial monocyte recruitment. J Am Soc Nephrol 7 : 906-913, 1996
45) Okada H, Moriwaki K, Kalluri R, Imai H, Ban S, Takahama M, Suzuki H : Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 expression in tubular epithelium attenuates tubulointerstitial alteration in rat Goodpasture syndrome. Kidney Int 57 : 927-936, 2000
46) Miyajima A, Asano T, Asano T, Yoshimura I, Seta K, Hayakawa M : Tranilast ameliorates renal tubular damage in unilateral ureteral obstruction. J Urol 165 : 1714-1718, 2001