総 説

組織線維化の進展機序

木村久仁子, 岩野正之

Molecular mechanisms of tissue fibrosis

Kuniko KIMURA and Masayuki IWANO

First Department of Internal Medicine, Nara Medical University

(Received April 1, 2009)

summary

Tissue fibrosis is a common cause of organ failure. Consequently, elucidation of the mechanisms underlying both the initiation and progression of fibrosis is an essential step toward establishing new therapeutic strategies for the treatment of organ failure. Fibroblasts are the principal effectors mediating fibrosis and their heterogeneous origins, including epithelial-mesenchymal transition (EMT), bone marrow-derived cell or fibrocyte, and endothelial-mesenchymal transition (EndMT), have been demonstrated. Chronic hypoxia has been proposed as an important microenvironmental factor in the development of tissue fibrosis. Recently, we reported that hypoxia induces EMT in renal tubular epithelial cells through activation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). Using the Cre-loxP mediated gene targeting of HIF-1 α or VHL which acts as a ubiquitin ligase to promote degradation of HIF-1 α , we showed that HIF-1 α plays a key role in the progression of renal fibrosis. As a large number of molecules that contribute to the induction of fibrosis have been identified, and their signal transduction pathway has been characterized, these fibrosis-related molecules have been proposed as therapeutic targets. EMT antagonists, TGF- β signal modulator, and HIF-1 α inhibitor could be useful for the treatment of fibrosis.

Key words—fibrosis; fibroblast; epithelial-mesenchymal transition; hypoxia; toll-like receptor

抄 録

組織線維化は臓器不全に共通の病態である。したがって、線維化の機序を解明することは、臓器不全の進展予防や治療法の開発に重要である。線維芽細胞は線維化において中心的役割を果たす細胞であるが、その起源として epithelial-mesenchymal transition (EMT), 末梢血前駆細胞・骨髄細胞由来, endothelial-mesenchymal transition (EndMT) などが報告されている。細胞を取り巻く微小環境において、低酸素は線維化を誘導する重要な因子である。われわれは、低酸素刺激が hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) を介して尿細管上皮細胞に EMT を誘導することを報告した。さらに、尿細管上皮細胞で特異的に HIF-1 α を欠損あるいは安定発現させた遺伝子改変マウスを用いて、HIF-1 α が腎間質線維化を促進させることを証明した。現在、シグナル伝達系を含む多くの線維化関連分子が同定され、これらをターゲットとした治療法の開発が進められている。EMT 抑制因子, TGF- β シグナル修飾薬, および HIF-1 α 活性阻害薬は線維化の新たな治療薬として期待される。

はじめに

線維化は、障害組織の治癒過程にみられる生体適応反応である。しかし、過剰な細胞外基質の蓄積は正常組織を破壊し臓器不全をもたらす。また、線維化は諸臓器の終末期に共通してみられる病理像であることから、疾患の分野を問わず、機序の解明や治療法の開発に向けての研究が進められている。線維芽細胞は線維化病変に集積し、細胞外基質を産生す

る中心的細胞と考えられる¹⁾。線維芽細胞の由来は長年不明であったが、近年の遺伝子標識法の進歩によってその起源が明らかにされつつある。線維芽細胞の主な起源として 1) 局所の線維芽細胞の活性化と増殖, 2) 上皮細胞からの移行 (Epithelial-mesenchymal transition : EMT), 3) 骨髄細胞・末梢血前駆細胞に由来するものが報告されている。最近では、心腎組織において内皮細胞からの移行 (Endothelial-mesenchymal transition : EndMT) やペリサイトとの関与も報告され、多様性を増している。

線維化に関する研究は、組織学的特徴である細胞

外基質の過剰蓄積に関する研究から、線維芽細胞を中心とした研究へと展開し、線維芽細胞を誘導するさまざまな因子の同定やシグナル伝達系が解明されつつある。一方、細胞をとりまく微小環境に着目した際に、慢性炎症や感染、虚血・低酸素は線維化を惹起する重要な因子である。

本稿では、線維芽細胞の起源について最近の報告を中心に紹介し、さらに虚血・低酸素や免疫応答を介した線維化の機序について概説する。また、近年試みられている様々な抗線維化療法を紹介する。

1. 線維芽細胞の起源

従来から線維芽細胞は局所の線維芽細胞が活性化したものと考えられてきたが、現在はその多様な起源が明らかとなっている。

1. Epithelial-mesenchymal transition

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) とは、上皮細胞がその特異的形質を失い、かわりに間葉系細胞の形質を発現する現象である。元来、EMT は胎生期の器官形成過程にみられる現象として知られてきた。しかし、創傷治癒の過程に EMT が関与していることが報告されて以来、成熟上皮細胞においても病的環境下では EMT が認められることが示唆された。その後の研究で、transforming growth factor- β (TGF- β)、epidermal growth factor (EGF)、fibroblast growth factor-2 (FGF-2) などの刺激によって、培養上皮細胞が間葉系細胞の形質を発現することが明らかとなった^{2,3)}。Iwano らは、生体内における EMT 由来線維芽細胞の出現を検討するために、Cre-loxP システムを用いて近位尿管管上皮細胞を LacZ 遺伝子でパーマナント標識した遺伝子改変マウスを作製した。同マウスに一側尿管結紮 (UUO) で腎間質線維化を誘導しところ、間質線維化領域には LacZ を発現する線維芽細胞すなわち EMT 由来線維芽細胞が認められた。さらに、間質線維化領域に認められる線維芽細胞のうち 36% が EMT に由来する線維芽細胞であったことから、線維化における EMT の重要性が証明された⁴⁾。

2. 末梢血前駆細胞・骨髄細胞由来

Grimm らは、慢性拒絶反応を示した移植腎にレシピエント由来の筋線維芽細胞が認められることを報告し、筋線維芽細胞が末梢血前駆細胞あるいは骨髄細胞に由来する可能性を示した⁵⁾。末梢血細胞の

なかには、I 型コラーゲン産生能を有する CD45 および CD34 陽性細胞が約 0.5% 認められ、fibrocyte と称されている。Fibrocyte は、CCR7, CXCR4, および CCR2 などのケモカインレセプターを発現している^{6,7)}。Wada らは、CCR7 リガンドである secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21) に対する抗体 (抗 CCL21 抗体) や CCR7-null マウスを用いた研究から、fibrocyte の腎間質への浸潤機構に CCL21/CCR7 システムが関与していることを明らかにした。また、CCL21/CCR7 は、TGF- β や MCP-1/CCL2 産生を介したマクロファージ浸潤も誘導し、線維化の進展に関与すると考えられる⁸⁾。

一方、骨髄細胞の関与を示唆する報告も数多く認められる。FSP1 プロモーター下に EGFP を発現するトランスジェニックマウスをドナーとして骨髄移植したマウスに、UUO による腎間質線維化を惹起すると、線維化領域に骨髄細胞由来の FSP1 陽性線維芽細胞が認められる⁴⁾。また、GFP マウスをドナーとして骨髄移植したマウスにブレオマイシンによる肺線維症を誘発すると、線維化領域には多数のコラーゲン産生能を有する GFP 陽性細胞が認められることが報告されている⁹⁾。骨髄細胞由来の線維芽細胞の割合については 10-40% と報告により異なっている。

3. Endothelial-mesenchymal transition (EndMT)

EndMT は胎生期の心臓の発達段階にみられる現象であり、弁や中隔の形成に関わる間葉系細胞が内皮細胞に由来することで知られている。心筋線維化病変の多くは血管周囲や心内膜下に認められることは、線維芽細胞が内皮細胞に由来することを示唆する。Zeisberg らは、内皮細胞で特異的に LacZ が発現する遺伝子改変マウスに、大動脈結紮による心筋線維化モデルを作製した。心筋線維化領域に、LacZ を発現する線維芽細胞が認められたことから、線維芽細胞が内皮細胞に由来することが示された¹⁰⁾。同様に、UUO による腎間質線維化モデルやストレプトゾトシンによる糖尿病性腎症モデルにおいても、CD31 陽性内皮細胞が線維芽細胞のマーカーである fibroblast specific protein 1 (FSP1) や α -smooth muscle actin (α -SMA) を発現することが報告されている¹¹⁾。

4. pericyte/perivascular fibroblast の関与

ペリサイトは内皮細胞を裏打ちして血管構造を安

定に支持する細胞である。Lin らは、コラーゲン type1 $\alpha 1$ のプロモーター下に EGFP の発現が誘導される遺伝子改変マウスを作製した。正常腎では、間質領域における EGFP 陽性細胞はペリサイトであった。また、UUO 後の経時的観察から、線維化進展とともにペリサイト周囲に EGFP 陽性かつ α -SMA 陽性の細胞が集積することから、筋線維芽細胞の起源としてペリサイトが有力であるとの仮説を立てている¹²⁾。しかし、古典的な病理手法のみによる検討であるため、今後、パーマネント遺伝子標識による証明が必要と思われる。

II. EMT の機序

線維化進展における EMT の重要性が示されて以来、線維化と EMT の関連についての膨大な研究が行われ、EMT を制御する様々な因子やシグナル伝達系が解明されてきた¹³⁻¹⁵⁾。EMT は、1) 細胞間および細胞-細胞外基質間接着の消失、2) アクチン細胞骨格の再構成、3) 間葉系遺伝子の発現と運動能の獲得といった多段階のステップを経て生じる現象である。代表的な adherens junction (AJ) 蛋白である E-カドヘリンの消失は、EMT の標準的なマーカーと考えられている。E-カドヘリンの発現を抑制する転写因子として、Snail1, Slug (Snail2), SIP-1, ZEB-1, E12/E47, および Twist などが報告されている。これらの転写因子は、E-カドヘリンのプロモーター領域にある E-boxes に直接結合することで E-カドヘリンの発現を抑制する¹⁶⁻¹⁸⁾。中でも、EMT 誘導因子としての Snail1 に関する報告は非常に多い。Snail1 は tight junction (TJ) 蛋白である claudin や occludin のプロモーター領域にある E-box にも直接結合し、その発現を抑制している¹⁹⁾。Snail1 の発現調節については、integrin-linked kinase (ILK) や glycogen synthase kinase 3β (GSK- 3β) の関与が知られている。ILK は、poly-ADP-ribose polymerase1 (PARP-1) の Snail1 プロモーターへの結合を促進することで Snail1 の発現を誘導する。一方、ILK や PARP-1 を阻害すると、Snail1 の発現が抑制されて E-カドヘリンの発現が維持されることが証明されている²⁰⁾。Phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/ILK/Akt による GSK- 3β のリン酸化は、ユビキチン・プロテオソーム系を介した Snail1 の分解を抑制する²¹⁾。さらに、Wnt シグナルを介した GSK- 3β のリン酸化によって、細胞質内 β -catenin が安定化し T-cell specific transcrip-

tion factor/lymphoid enhancer factor-1 (TCF/Lef1) と複合体を形成後、核内に移行して E-カドヘリンの発現を抑制することが報告されている²²⁾。

細胞間接着の消失に加えて、細胞極性の消失は EMT 誘導に重要である。Partitioning-defective protein (Par) 6 は、細胞極性を制御する TJ 蛋白であるが、TGF- β による EMT の機序に関与している。Par6 は TGF- β receptor I (T β RI) と結合して TJ に存在する。TGF- β 刺激により Par6 のセリン残基がリン酸化されると E3 ユビキチンリガーゼである Smad ubiquitin regulatory factors (Smurf) 1 が活性化される。活性化された Smurf1 は RhoA を分解することで、アクチン束が障害され、細胞極性が消失する²³⁾。

細胞間接着や極性を失った上皮細胞が、運動能を獲得して組織内に遊走するためには基底膜構造の分解が必要である。Metalloproteinase-2 (MMP-2) や MMP-9 は、基底膜の主要成分であるコラーゲン IV を基質とすることから、EMT における MMP の関与が示唆される。MMP-2 は TGF- β の発現亢進を介して EMT を誘導し、MMP-9 の発現低下は基底膜構造を安定化させて EMT を抑制する^{24,25)}。アクチン細胞骨格の再編成には、Rho, Rac, cdc42 などの Rho ファミリーの関与が考えられる。MMP-3 は乳腺上皮細胞にアクチン細胞骨格の再編成を誘導して EMT を惹起するが、Radisky らはその機序に Rac サブファミリーに属する Rac1 のスプライシング産物である Rac1b が関与していることを報告した²⁶⁾。細胞の運動能に関わる因子としては lysyl oxidase (LOX), c-MET, CXCR4 が知られている。これらは癌細胞の浸潤転移に関連した因子であり、細胞の運動能を高めることが示されている。後述するように、尿細管上皮細胞は低酸素刺激により EMT が誘導され運動能が亢進するが、LOX 阻害薬を投与することによってその運動能が抑制される。

III. 低酸素と線維化

低酸素と線維化には密接な関連があると考えられてきた。従来は、細胞外基質の過剰蓄積による毛細血管の脱落や酸素拡散の低下の結果、組織が低酸素状態になるとの見方が主流であった。最近になり、腎不全、心不全、肺線維症、強皮症、肝硬変など組織線維化をきたす多くの疾患で、線維化が起こっていない比較的早期の段階から血管のリモデリングや血流異常、酸素の需要と供給の不均衡による低酸素

が存在することが明らかとなり、低酸素の線維化促進因子としての側面が注目されるようになった^{27,28)}。

低酸素による線維化の機序として、直接的なコラーゲンの産生能の亢進に加えて、TGF- β , tissue inhibitor of MMP 1 (TIMP-1), MMP-2などを介した細胞外基質の産生亢進・分解抑制が報告されてきた²⁹⁾。最近、われわれは、低酸素による線維化の新たな機序として、低酸素による EMT を証明した。さらに、低酸素応答で中心的役割を果たす hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) が、低酸素による EMT を介して線維化進展に関与していることを *in vitro* と *in vivo* において明らかにした^{30,31)}。また、低酸素は炎症細胞浸潤を促し、局所の免疫細胞を賦活化させることで炎症の増悪・遷延化を誘導して線維化を進展させる。これら機序にも HIF が関与することが証明されている³²⁾。

1. 低酸素と EMT

EMT は、前述のように線維芽細胞の起源として重要であり、線維化進展に深く関与している。われわれは、低酸素による線維化進展の機序に EMT が関与しているとの仮説を立て、その証明を試みた。まず、近位尿細管上皮細胞を低酸素下で培養したところ、線維芽細胞様の形態変化が認められ、上皮細胞のタイトジャンクション蛋白である ZO-1 の発現が消失し、 α -SMA の発現が認められた。また、スクラッチアッセイでは、低酸素培養下の尿細管上皮細胞は、定常酸素培養下の尿細管上皮細胞に比し、運動能が高いことが明らかとなった。これらの結果は、低酸素刺激による尿細管上皮細胞の EMT を示唆するものであった。そこで、より直接的に EMT を検出するために、近位尿細管上皮細胞が LacZ 遺

伝子でパーマネント標識された遺伝子改変マウスを作製し、このマウスから単離した近位尿細管上皮細胞を低酸素下で培養した。LacZ で標識された近位尿細管上皮細胞が低酸素刺激により線維芽細胞の特異的マーカーである FSP1 を発現することから、低酸素による EMT が証明された³⁰⁾ (図 1)。

2. Hypoxia-inducible factor (HIF) の関与

生体は、低酸素刺激に対してエネルギー代謝、造血・血管新生、細胞増殖などに関わる多くの遺伝子の発現を調節して恒常性を保っている。Hypoxia-inducible factor (HIF) は、その中心的役割を果たす転写因子であり、間接的作用を含めると数千種類を超える遺伝子の発現を調節していることが分かっている。酸素感受性 α サブユニットである HIF-1 α は、定常酸素下では von-Hippel Lindau (VHL) 蛋白によってユビキチン化されプロテアソームにより速やかに分解されている。細胞が低酸素にさらされると、VHL 蛋白との結合が阻害され、恒常的に発現している β サブユニットである HIF-1 β (ARNT) と 2 量体を形成して核内に移行し、hypoxia-responsive element (HRE) に結合して標的遺伝子の発現を誘導する³³⁾。われわれは、低酸素による EMT の機序に HIF-1 α が関与していることを証明するために、Cre-loxP システムを用いて尿細管上皮細胞で HIF-1 α を特異的に欠損させた遺伝子改変マウス (HIF1 $\alpha^{-/-}$ マウス) を作製した。このマウスから得られた近位尿細管上皮細胞 (HIF1 $\alpha^{-/-}$ PTECs) を低酸素下で培養したところ、HIF1 $\alpha^{-/-}$ PTECs では低酸素による EMT が抑制されたことから、低酸素による EMT に HIF-1 α が関与していることが明らかになった³⁰⁾。HIF-1 α による EMT

図 1 低酸素刺激による EMT の誘導

LacZ 遺伝子でパーマネント標識された尿細管上皮細胞を低酸素下で培養すると、 β -gal で染色される尿細管上皮細胞 (左) が線維芽細胞のマーカーである FSP1 (中央) を発現し、二重染色で β -gal と FSP1 を発現する細胞 (右、矢印) が認められる。

図2 HIF-1 α 安定発現による線維化の誘導

VHL^{+/+} マウス (左) と VHL^{-/-} マウス (右) で 96 週間自然経過を観察したところ, コントロールマウスでは線維化がほとんど認められないのに比し, VHL^{-/-} マウスでは腎間質線維化が誘導される

誘導の機序についてはさらなる検討が必要であるが, HIF-1 α は CTGF, LOX, CXCR4, c-Met などの EMT 関連遺伝子の発現を誘導することから³³⁻³⁶⁾, これらの遺伝子が HIF-1 α による EMT の機序に関与している可能性が考えられる。

次に, *in vivo* における HIF-1 α の線維化に及ぼす作用を明らかにするために, HIF1 α ^{-/-} マウスに UUO による腎間質線維化モデルを作製した。HIF1 α ^{-/-} マウスでは, コントロールマウスに比して間質線維化が有意に抑制された³⁰⁾。一方, 近位尿管上皮細胞で VHL 遺伝子を欠損させ, HIF-1 α を安定発現させた遺伝子改変マウス (VHL^{-/-} マウス) では, コントロールマウスに比して線維化が有意に高度であった³¹⁾ (図 2)。以上の結果から, HIF-1 α は *in vivo* において線維化進展に重要な役割を果たすことが証明された。

HIF は虚血・低酸素に対して erythropoietin (EPO) や vascular endothelial growth factor (VEGF) など造血や血管新生に関与する遺伝子の発現を誘導することによって低酸素状態を解除し, 線維化を抑制させることも考えられる。プレコンディショニングによって HIF を活性化させると, 虚血再還流モデルによる腎障害が軽減することや, コバルトによる HIF の安定化が腎間質線維化を抑制するとの報告がある^{37,38)}。最近, EPO の発現は HIF のもうひとつの α サブユニットである HIF-2 α により誘導されることが明らかにされた³⁹⁻⁴¹⁾。HIF が線維化の進展と抑制の両方向に作用するというのは矛盾した現象に思われるが, 慢性虚血による尿管上皮細胞での HIF-1 の安定化は線維化を進展する方向に作用し, 急性虚血における内皮細胞におけ

る HIF-2 の安定化は虚血解除により線維化を抑制する方向に作用すると考えるべきである。

IV. 免疫学的機序による線維化

慢性炎症は線維化を進展させる要素として重要である。慢性炎症の発症機序には toll-like receptor (TLR) を介した免疫応答が関与すると考えられる。TLR はマクロファージ, 樹状細胞, 好中球, B 細胞, ナチュラルキラー細胞などの細胞表面に存在する受容体蛋白で, 種々の病原体を認識し自然免疫を作動させる。TLR は LPS や鞭毛のフラジェリンなどの pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) や細胞や組織の障害によって産生される内因性分子 (damage-associated molecular patterns : DAMPs) をリガンドとして認識する^{42,43)}。代表的な DAMPs として, heat-shock proteins や high-mobility group box 1 (HMGB1) などの細胞内蛋白, ヒアルロン酸や biglycan などの細胞外基質由来のフラグメント, 壊死細胞から放出される尿酸などのプリン代謝産物が報告されている⁴²⁻⁴⁵⁾。DAMPs/TLR を介したシグナルは, IFN regulatory factor や NF- κ B を活性化し, IFN- α , IL-1, IL-6 などの炎症性サイトカインおよびマクロファージや好中球浸潤を誘導するケモカインの発現を誘導することで炎症を惹起させる。さらに, DAMPs/TLR シグナルは, MHC による抗原提示能を高め, T 細胞を介した免疫応答を誘導する⁴²⁾。近年, 腎や肝の虚血再還流モデルにおいて, HMGB1 やヒアルロン酸などの DAMPs の発現が亢進していることが示され, これらが TLR-2 や TLR-4 を介して, 虚血再還流による組織障害を誘導することが報告されて

いる⁴⁵⁻⁴⁷). また, TLR-4 が MyD88/NF- κ B シグナル系を介して TGF- β の偽受容体である BMP and activin membrane-bound inhibitor (Bambi) の発現を抑制し, TGF- β シグナルを増強させることによって肝線維化を促進させることが示されている⁴⁸). TLR が慢性炎症反応に関与することは明らかであるが, 直接的な線維化との関連を示した報告は少ない. 今後の検討により, 線維化の進展における TLR の位置づけを明確にすることが, 線維化の新しい治療法を開発する上で重要と思われる.

V. 抗線維化療法の試み

線維化の進展機序が解明されるにつれて, シグナル伝達系を含む多くの線維化関連分子が同定され, これらを標的とした治療法の開発が進められている. EMT の抑制は, 線維化の抑制だけでなく, 組織の構造と機能維持にも重要である. EMT を抑制する因子として hepatocyte growth factor (HGF) および bone morphogenic protein-7 (BMP-7) が知られている. HGF は, Smad 抑制因子である SnoN の発現を誘導することにより Smad2/3 の作用を減弱させて EMT を抑制する^{49,50}). また, BMP-7 は Smad1/5 を介して mesenchymal-epithelial transition (MET) を誘導することで, TGF- β による EMT 誘導作用と拮抗することが報告されている⁵¹). 両者とも, 動物実験モデルにおいて線維化抑制作用が確認されている. 最近では, BMP-2 や C-peptide が TGF- β シグナルを修飾することにより EMT を抑制することが報告されている^{52,53}). さらに, T β RI インヒビターや ILK インヒビターなどの阻害剤による EMT の抑制効果が証明されている^{20,54}).

われわれは, HIF-1 α が低酸素による EMT を誘導し線維化を促進させることから, HIF-1 α の活性抑制が線維化の新たな治療法となりうるかを検討した. 正常マウスに UUO による間質線維化モデルを誘導し, HIF-1 α インヒビターを投与したところ, HIF-1 α インヒビター投与群ではコントロール群に比して, 線維芽細胞が有意に減少し間質線維化が抑制された³¹). HIF は, 癌の浸潤転移の機序に密接に関わっていることから, 癌領域ではすでに多くの HIF 活性阻害薬が開発され臨床応用されつつある⁵⁵). これらの薬剤は, 将来的に線維化の新たな治療薬となりうる可能性がある. また, 今後は, 線維化の治療効果を判定しうる簡便かつ有効なマーカーの開発も必須である.

おわりに

先進国における全死因のうち, 組織線維化に起因する臓器不全が 40% 以上を占めている. したがって, 線維化の進展機序に関する研究および線維化に対する新しい治療法の開発は, 近い将来, 医学研究の最重要課題となるであろう. 線維化は炎症の治療過程に生じる合理的な生体反応とも考えられることから, 単純に線維化を抑制することのみが個体にとって有益とは限らない. より詳細な線維化の発症・進展メカニズムを解明し, 個々の標的分子に対する地道な研究を蓄積することが重要であろう.

文 献

- 1) Iwano M, Fischer A, Okada H, et al. : Conditional abatement of tissue fibrosis using nucleoside analogs to selectively corrupt DNA replication in transgenic fibroblasts. *Mol Ther* **3** : 149–159, 2001.
- 2) Okada H, Danoff TM, Kalluri R, et al. : Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* **273** : F563–F574, 1997.
- 3) Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, et al. : Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* **61** : 1714–1728, 2002.
- 4) Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. : Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* **110** : 341–350, 2002.
- 5) Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. : Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med* **345** : 93–97, 2001.
- 6) Moore BB, Kolodnick JE, Thannickal VJ, et al. : CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* **166** : 675–684, 2005.
- 7) Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, et al. : Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* **114** : 438–446, 2004.
- 8) Sakai N, Wada T, Yokoyama H, et al. : Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** : 14098–14103, 2006.
- 9) Hashimoto N, Jin H, Liu T, et al. : Bone mar-

- row-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **113** : 243–252, 2004.
- 10) Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. : Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* **13** : 952–961, 2007.
 - 11) Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. : Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* **19** : 2282–2287, 2008.
 - 12) Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, et al. : Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol* **173** : 1617–1627, 2008.
 - 13) Iwano M, Neilson EG. : Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13** : 279–284, 2004.
 - 14) Kalluri R, Neilson EG. : Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* **112** : 1776–1784, 2003.
 - 15) Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, et al. : The epithelial-mesenchymal transition : new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* **172** : 973–981, 2006.
 - 16) Battle E, Sancho E, Franci C, et al. : The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2** : 84–89, 2000.
 - 17) Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. : The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2** : 76–83, 2000.
 - 18) Zavadil J, Bottinger EP. : TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24** : 5764–5774, 2005.
 - 19) Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, et al. : Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition : direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* **116** : 1959–1967, 2003.
 - 20) McPhee TR, McDonald PC, Oloumi A, et al. : Integrin-linked kinase regulates E-cadherin expression through PARP-1. *Dev Dyn* **237** : 2737–2747, 2008.
 - 21) Schlessinger K, Hall A. : GSK-3 β sets Snail's pace. *Nat Cell Biol* **6** : 913–915, 2004.
 - 22) Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, et al. : Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and beta-catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J* **17** : 1371–1384, 1998.
 - 23) Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, et al. : Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* **307** : 1603–1609, 2005.
 - 24) Cheng S, Lovett DH. : Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol* **162** : 1937–1949, 2003.
 - 25) Yang J, Shultz RW, Mars WM, et al. : Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* **110** : 1525–1538, 2002.
 - 26) Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, et al. : Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* **436** : 123–127, 2005.
 - 27) Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, et al. : Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol* **15** : 1277–1288, 2004.
 - 28) Varga J, Abraham D. : Systemic sclerosis : a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* **117** : 557–567, 2007.
 - 29) Orphanides C, Fine LG, Norman JT. : Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production via a TGF- β 1-independent mechanism. *Kidney Int* **52** : 637–647, 1997.
 - 30) Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, et al. : Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **117** : 3810–3820, 2007.
 - 31) Kimura K, Iwano M, Higgins DF, et al. : Stable expression of HIF-1 α in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **295** : F1023–1029, 2008.
 - 32) Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, et al. : HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* **112** : 645–657, 2003.
 - 33) Schofield CJ, Ratcliffe PJ. : Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5** : 343–354, 2004.
 - 34) Ding M, Cui S, Li C, et al. : Loss of the tumor suppressor Vhlh leads to upregulation of Cxcr4 and rapidly progressive glomerulonephritis in mice. *Nat Med* **12** : 1081–1087, 2006.
 - 35) Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, et al. :

- Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* **440** : 1222–1226, 2006.
- 36) Higgins DF, Biju MP, Akai Y, et al. : Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol* **287** : F1223–1232, 2004.
 - 37) Bernhardt WM, Campean V, Kany S, et al. : Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **17** : 1970–1978, 2006.
 - 38) Tanaka T, Matsumoto M, Inagi R, et al. : Induction of protective genes by cobalt ameliorates tubulointerstitial injury in the progressive Thyl nephritis. *Kidney Int* **68** : 2714–2725, 2005.
 - 39) Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, et al. : Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** : 2301–2306, 2007.
 - 40) Haase VH. : Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **291** : F271–281, 2006.
 - 41) Rankin EB, Biju MP, Liu Q, et al. : Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* **117** : 1068–1077, 2007.
 - 42) Anders HJ, Banas B, Schlondorff D. : Signaling danger : toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **15** : 854–867, 2004.
 - 43) Marshak-Rothstein A. : Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **6** : 823–835, 2006.
 - 44) Schaefer L, Babelova A, Kiss E, et al. : The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* **115** : 2223–2233, 2005.
 - 45) Tsung A, Sahai R, Tanaka H, et al. : The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* **201** : 1135–1143, 2005.
 - 46) Leemans JC, Stokman G, Claessen N, et al. : Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest* **115** : 2894–2903, 2005.
 - 47) Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al. : TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* **117** : 2847–2859, 2007.
 - 48) Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. : TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* **13** : 1324–1332, 2007.
 - 49) Tan R, Zhang X, Yang J, et al. : Molecular basis for the cell type specific induction of SnoN expression by hepatocyte growth factor. *J Am Soc Nephrol* **18** : 2340–2349, 2007.
 - 50) Yang J, Dai C, Liu Y. : A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* **16** : 68–78, 2005.
 - 51) Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, et al. : BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* **9** : 964–968, 2003.
 - 52) Hills CE, Al-Rasheed N, Al-Rasheed N, et al. : C-peptide reverses TGF-beta1-induced changes in renal proximal tubular cells : implications for treatment of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* **296** : F614–621, 2009.
 - 53) Yang YL, Liu YS, Chuang LY, et al. : Bone morphogenetic protein-2 antagonizes renal interstitial fibrosis by promoting catabolism of type I transforming growth factor-beta receptors. *Endocrinology* **150** : 727–740, 2009.
 - 54) Petersen M, Thorikay M, Deckers M, et al. : Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-beta type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney Int* **73** : 705–715, 2008.
 - 55) Semenza GL. : Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3** : 721–732, 2003.