

コモンマーモセットにおける腎線維化モデルの確立と  
ヒト TGF- $\beta$ 1 に対する遺伝子制御化合物  
ピロール・イミダゾールポリアミドの基礎的検討  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系腎臓内科学専攻

大月 正理

修了年 2018 年

指導教員 阿部 雅紀

## 【研究の背景】

慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease：CKD）の概念は2002年に米国で提唱された<sup>1</sup>。CKDの原疾患となりうる糖尿病性腎症や高血圧性腎硬化症、慢性糸球体腎炎のいずれにおいても、共通となる病態は腎内虚血と腎線維化、腎性貧血である<sup>2-4</sup>。CKDにおける腎線維化のメカニズムとして腎尿細管の上皮間葉化現象（Epithelial Mesenchymal Transition：EMT）が主体であることが確立されており、transforming growth factor - beta1（TGF- $\beta$ 1）がEMTの責任分子の一つとして知られている<sup>5</sup>。

ピロール・イミダゾール（Pyrrole-Imidazole：PI）ポリアミドは、1996年にカリフォルニア工科大学のPeter B. Darvan教授が抗生物質から発見したDNAの塩基配列に特異的に結合する中分子化合物である<sup>6</sup>。2本鎖DNAの表面にある浅い溝のminor grooveにDNAの各塩基との間で水素結合を介して可逆的に結合し、Pyrrole（Py）/Imidazole（Im）ペアがCytosine（C）-Guanine（G）を、Py/PyペアがAdenin（A）-Thymine（T）またはT-Aを、Im/PyペアがG-Cの塩基配列を認識し、任意のDNAに特異的に強力に結合するため、ターゲットとなる遺伝子のプロモーターに結合するように設計すると、転写因子の結合を阻害して遺伝子の転写を制御することができる。PIポリアミドは既存の核酸医薬と異なり、核酸分解酵素で分解されず細胞や生体内で安定であること、ベクターやデリバリー試薬なしに細胞の核に取り込まれること、様々な遺伝子をターゲットとして自由に分子設計ができることなどの特徴がある。

TGF- $\beta$ 1は細胞の分化や増殖、運動の制御などの機能をもち、細胞外基質の増生、線維芽細胞の遊走などの創傷治癒に関与していることが知られており、その作用は多彩である<sup>7</sup>。一方で、肝硬変症、肺線維症、CKD、肥厚性癭痕などの線維性疾患においてTGF- $\beta$ 1はその病態の責任分子であることが知られており<sup>5,8,9</sup>、これらの疾患ではTGF- $\beta$ 1の発現制御は新たな治療のターゲットとして期待されているが、現状ではTGF- $\beta$ 1に対する効果的な治療法は確立されていない。線維化の主体とされるEMTはE-cadherinの脱落と $\alpha$ -SMAの上昇で定義される<sup>10</sup>。TGF- $\beta$ 1により誘導されるEMTでは、TGF- $\beta$ 1の発現の亢進とその下流のSmadカスケードの亢進によ

り、Snail の発現が誘導され、Snail は E-cadherin の転写を抑制するため、E-cadherin の上皮細胞からの脱落が生じる。また、TGF- $\beta$  1 により誘導された  $\alpha$ -SMA も発現が亢進し EMT が進行していく。日本大学ではこれまで TGF- $\beta$  1 プロモーターに対する PI ポリアミドがラットの腎症<sup>11,12</sup>、血管再狭窄<sup>13</sup>、腹膜硬化症<sup>14</sup>、角膜損傷<sup>15</sup>、皮膚癒痕<sup>16</sup>を著明に抑制する事を報告した。またヒト TGF- $\beta$  1 に対する PI ポリアミド、ヒト TGF- $\beta$  1 ポリアミドがヒト血管平滑筋細胞の TGF- $\beta$  1 発現を抑制する事も確認した<sup>17</sup>。しかし、現状ではヒトに PI ポリアミドのようなペプチド化合物を投与することは不可能で、よりヒトに近い疾患動物モデルを使用してその効果の検証をする必要がある。そこで、ヒトの遺伝子と約 86%の相同性を持つ霊長類コモンマーモセットを用いた検証を、公益財団法人・実験動物中央研究所（Central Institute for Experimental Animals : CIEA）との共同研究として行うこととなった。まず、ヒト TGF- $\beta$  1 PI ポリアミドの局所投与による効果の確認として皮膚肥厚性癒痕に対する前臨床試験が施行され、ヒト TGF- $\beta$  1 PI ポリアミドはヒトにゲノム構造が近い霊長類のコモンマーモセットでも局所投与で有効であることが確認された<sup>18</sup>。そこで、本研究ではコモンマーモセットの腎線維化モデルを作製し、ヒト TGF- $\beta$  1 PI ポリアミドの全身投与による進行性腎障害に対する効果を検討した。

コモンマーモセット（学名：*Callithrix jacchus*）は南米に生息する新世界ザルの一種で、小型で扱いやすく、繁殖も安定している。また、新世界ザルで唯一全ゲノム解析が完了しており、マウスよりもゲノム構造がヒトに近いことが判明している。本研究では、コモンマーモセットの動物実験を行っている CIEA と日本大学の間で共同研究を行う契約を結び、シクロスポリン腎症または片側尿管結紮術（Unilateral ureteral obstruction : UUO）水腎症によるコモンマーモセットの腎線維化モデルの確立を目指し、作製したコモンマーモセットの腎線維化モデルを用いて、ヒト TGF- $\beta$  1 PI ポリアミドの腎線維化に対する効果を共同で検討することとなった。

シクロスポリンは免疫抑制作用を示す薬剤だが、重大な副作用に腎障害がある。シクロスポリン投与により TGF- $\beta$  1 の産生が亢進されることは報告されており<sup>19,20</sup>、

抗 TGF- $\beta$ 1 抗体投与によりシクロスポリン腎症の抑制が起こるとする報告もある<sup>20,21</sup>。シクロスポリン投与下で腎線維化モデルを惹起するには低塩 (0.05%)、低 Mg (0.05%) 食とする必要があるとの報告がある<sup>22</sup>。そこで、低塩・低 Mg 食下でシクロスポリン投与により腎線維化モデルの作製を行うこととした。一方マウスに UUO を施行すると、片側の尿管閉塞により TGF- $\beta$ 1 の分泌が刺激され、尿細管上皮細胞の EMT が生じて線維化が起こることが報告されている<sup>23</sup>。そこで、コモンマーモセットに UUO を施行し、新たな腎線維化モデルとして用いた。

### 【研究の目的】

本研究は、ヒトに近いゲノム構造をもつ霊長類コモンマーモセットの腎線維化モデルを作製すること、そしてコモンマーモセットの腎線維化モデルを用いた、創薬開発における前臨床試験としてのヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドの有効性の検討が目的である。

### 【研究の材料と方法】

本研究を施行するにあたり、CIEA と日本大学との間で共同研究を行う契約を結び、動物実験については実験施設である CIEA の動物実験委員会にて承認を受け (CIEA 承認番号 : 14016A、15025A、16034A) マーモセットを用いた実験に習熟した実験実施者によって実施された。コモンマーモセットは可能な限り同程度の年齢の個体を使用し、実験開始前に①体重減少を伴う慢性下痢症の無いこと、②血液検査で血中尿素窒素値 34.0 mg/dl 以下、血清クレアチニン値 0.4 mg/dl 以下、血清アルブミン値 3.5 g/dl 以上、尿中タンパク/クレアチン比 0.5 以下、血清ヘマトクリット値 40% 以上、③腹部エコーで検出できる腎臓の形態異常がない、④体重 300 g 以上を選定基準とした。尚、体重の 20% 以上の減少や血液・尿検査により異常を認めた場合は実験を中止することとし、20% 以下の体重減少であっても、飼料の摂取量や体調などに応じてシクロスポリンの投与量の減量や休薬を速やかに検討することとした。

シクロスポリン腎症モデルでは、まず腎症作製のためのシクロスポリンの投与量を検討した。実験開始 1 週間前より低塩、低 Mg 食を与え、シクロスポリンを低用量で

4週間連日皮下投与し、投与中の経過や実験終了後の腎組織学的変化を確認しながら1頭ずつ用量を調整して行うこととした。経過中に、1週間に1回、体重測定と、血液検査（血算、生化学）、尿検査（尿蛋白定性、尿蛋白定量、尿糖定性）を行い、コモンマーモセットの飼料摂取量などは毎日観察した。UUO水腎症モデルは、右の尿管2ヶ所を結紮して、結紮部位の間で尿管を切断しモデルを作製した。結紮術施行からまず3週間後に両側腎の組織切片標本を作製し、線維化の発生を確認することとした。経過中の飼料摂取量などは毎日観察し、コモンマーモセットの状態に変化がなければ、血液検査や尿検査などは検査開始前に施行するのみとした。

腎線維化モデル作製の経過から、UUO水腎症モデルがPIポリアミドの評価に適していると判断し、UUO水腎症モデルにおいてヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドの効果を検討することとした。線維化の程度におけるヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドの効果も検討するため、3週間モデル（PIポリアミド投与個体1頭、コントロール個体1頭）と5週間モデル（PIポリアミド投与個体3頭、コントロール個体2頭）を作製し、それぞれでヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドの効果を検討することとした。ヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドはIgarashiら<sup>18</sup>が使用したのと同じものを使用した。ヒトTGF- $\beta$ 1PIポリアミドは、注射用水で1mg/kgの濃度に調節し尾静脈よりコモンマーモセットに静脈内投与した。コントロールとして注射用水投与個体を用い、1mg/kgを尾静脈より静脈内投与した。

その後、摘出した腎臓を用いて、Hematoxylin Eosin染色、Masson Trichrome染色から得られた糸球体障害スコア（Glomerular injury score：GIS）や間質障害スコア（Tubulointestinal injury score：TIS）、TGF- $\beta$ 1、E-cadherin、 $\alpha$ -smooth muscle actin（ $\alpha$ -SMA）の免疫染色による組織学的検証を行った。また、リアルタイム Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction（RT-PCR）でTGF- $\beta$ 1のmRNA（*transforming growth factor beta1, TGFB1* mRNA）の発現やEMTや線維化に関するSnailのmRNA（*snail family transcriptional repressor 1, SNAI1* mRNA）の発現、 $\alpha$ -SMAのmRNA（*actin, alpha 2, smooth muscle, aorta, ACTA2* mRNA）の

発現も評価した。

リアルタイム RT-PCR の結果は平均±標準偏差で検討した。GIS、TIS の値は、個々の値を実測値で示し、UUO 5 週間モデルでは各群で得られた値を UUO 側値/非結紮 (Contralateral unobstructed kidney : CUK) 側値として求め、平均±標準偏差で検討した。各群の平均の差の検定は対応の無い *t* 検定を用いて、P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

## 【研究の結果】

シクロスポリン腎症モデルは低用量とした場合では、腎臓に組織学的な変化は認められず、用量を増量した場合には横紋筋融解症や高血糖などシクロスポリン投与によると思われる副作用が出現し実験を中断せざるを得ず、腎症モデル作製に適した用量を見出すことはできなかった。シクロスポリン投与による副作用の出現には個体差があったが、腎臓の組織学的変化は副作用の出現の有無には関与していないことがわかり、その原因としてコモンマーモセット特有の腎障害の自然発症 (Wasting marmoset syndrome) が考えられ、個体間での比較となるシクロスポリン腎症モデルによるヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドの薬効の評価は困難と判断した。UUO 水腎症モデルは、結紮術施行から 3 週間経過すると腎臓の線維化が生じた。自然発症の Wasting marmoset syndrome を考慮すると、同一個体で非結紮側と結紮側を比較できるため薬効の多角的な評価が可能で、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドの効果を評価する腎線維化モデルとして適切だと判断した。

そこで、UUO 水腎症モデルを用いてヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドの基礎的検討を行った。UUO3 週間モデルでは、注射用水投与個体、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体共に UUO 側の方が CUK 側よりも線維化を認め、GIS、TIS も高い傾向にあった。UUO 5 週間モデルでは、UUO 側で比較すると、注射用水投与個体の方がヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体に比べ広範囲の線維化を認めた。また、CUK 側で比較すると、線維化の程度や GIS、TIS には個体による差があることが分かった。UUO 5 週間モデルの GIS、TIS の結果をまとめると、GIS、TIS 共にヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポ

リアミドを投与した個体の方が低値で、TIS は統計学的に有意 (P 値<0.05) に低値であった。

免疫組織学的染色の結果、UUO 3 週間モデル、UUO 5 週間モデル共に TGF- $\beta$ 1 は遠位尿細管を中心に、 $\alpha$ -SMA は腎間質領域を中心に染色されたが、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体の UUO 側では同部位は染色されなかった。また、E-cadherin は UUO 3 週間モデル、UUO 5 週間モデル共に遠位尿細管を中心に染色されたが、UUO 3 週間モデルの注射用水投与個体の UUO 側では同部位が染色されたのに対し、UUO 5 週間モデルの UUO 側では同部位は染色されなかった。

*TGFB1*、*ACTA2*、*SNAI1* の mRNA の発現の結果、UUO 3 週間モデルの UUO 側では、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体の *TGFB1* mRNA が注射用水投与個体と同程度で、*ACTA2* mRNA はヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体の方が発現は低い傾向にあった。UUO 5 週間モデルでは、*TGFB1* mRNA、*ACTA2* mRNA の発現は、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体群の方で低い傾向にあった。*SNAI1* mRNA の発現は UUO 3 週間モデル、UUO 5 週間モデル共に、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体側で低い傾向にあり、特に UUO 3 週間モデルでは低い傾向にあった。

## 【考察】

シクロスポリン腎症モデルでは、低用量では腎臓の組織学的変化は認めず、高用量ではシクロスポリン投与によると思われる腎機能障害と高血糖が強く見られ、モデル作製のために要する用量の決定が困難であった。また、コモンマーモセットには特有の Wasting marmoset syndrome の報告<sup>24-26</sup>があり、その発症時期や性別の違いなどは不明で個体選定時に除外することは非常に困難であることが分かった。シクロスポリンの全身投与によりモデルを作製することから別個体同士での比較とならざるを得ず、Wasting marmoset syndrome の存在を考慮するとヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドの薬物効果を正確に評価することは困難であることが分かり、本研究の腎線維化モデルとして適さないと判断した。UUO 水腎症モデルではモデル作製に使用する薬剤や手技による副作用の出現はなく、コモンマーモセットの体調が良好のまま腎線維化

モデルが作製できた。コモンマーモセットの UUO 側では、UUO 実施より 3 週間では強い線維化は起きず、5 週間で広範囲な線維化が見られた。モデル作製に使用した個体のうち、ベースに Wasting marmoset syndrome が存在していたことが示唆された個体もあったが、UUO 水腎症モデルはコントロールとなる別個体と比較ができることに加え、CUK 側が同一個体のコントロールとしての役割を果たすことになるため、Wasting marmoset syndrome のような潜在的な腎障害の影響を可能な限り排除でき、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドの薬効を評価するには適していると判断した。

UUO 5 週間モデルにおいて、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体群で TIS の有意な低下を確認し、GIS もヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体群の UUO 側で低い傾向にあった。TGF $\beta$ 1 mRNA と EMT マーカーの一つである ACTA2 mRNA の発現もヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体群の UUO 側で低い傾向にあった。TGF- $\beta$ 1 から誘導される EMT では、SNAI1 の発現亢進は E-cadherin の脱落につながるため、SNAI1 の発現抑制は EMT を阻止していることを意味するが、SNAI1 mRNA の発現もヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体群の UUO 側で低い傾向にあった。また UUO 3 週間モデルにおいては、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体の ACTA2 mRNA、SNAI1 mRNA 発現は、UUO 5 週間モデルよりさらに低い傾向にあった。TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA の免疫組織学的染色でも UUO 3 週間モデル、UUO 5 週間モデル共にヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体の UUO 側は、注射用水投与個体の UUO 側と同部位は染色されず、TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA の発現が抑制されている可能性が示唆された。E-cadherin の免疫組織学的染色では UUO 3 週間モデルと UUO 5 週間モデル共に、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体の UUO 側でも CUK 側と同部位が染色されていたことから、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド投与個体では E-cadherin が保たれている可能性が示唆された。以上より、ヒトの TGF- $\beta$ 1 遺伝子プロモーターに設計したヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドは、ヒトにゲノム構造に高い相同性のある霊長類コモンマーモセットの UUO 水腎症に伴う腎尿細管の EMT や腎間質の線維化を抑制する可能性があることが分かった。また、実験経過中にヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドの投与



によると考えられる有害事象は起こらず、最大 4 週間では安全に投与可能であることも分かった。動物愛護的観点から科学的に必要な最少の動物数を使用したため、本研究では 2 種類の腎線維化モデルを作製し検討する必要があるため、ヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドの効果を検討するために使用できた個体数が限られてしまった。加えて、Wasting marmoset syndrome のような潜在的な腎障害の存在による個体差もあった。統計学的な有意差が認められなかった原因としては、このように実験に使用した個体数が少ないことや個体差も影響の一つとして考えられる。

本研究で作製した UUO 水腎症モデルでは、UUO 施行により水腎症が生じて線維化する<sup>23</sup>が、実医療での進行性腎障害の原因として水腎症はまれである。現段階では、腎機能障害の進展をモニター出来る利点に加えて、腎性貧血や二次性副甲状腺機能亢進症が出現するような CKD の疾患モデルとしては 5/6 腎摘モデルが報告されており<sup>27</sup>、今回 UUO 水腎症モデルにおいてヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドが腎線維化を抑制する可能性があったことから、今後は実験に使用する個体数を可能な限り増やし、5/6 腎摘モデルでの有効性も確認する必要があると思われる。

今後の検討課題として、PI ポリアミドは殆どが尿排泄で一部が胆汁排泄であるということが挙げられる<sup>12,28-30</sup>。CKD 患者に対して投与する際は、排泄遅延が生じる可能性もある。PI ポリアミドは長期に核に結合するため、安全性についての検討も考慮する必要がある。また、本研究においてヒト TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミドは線維化の進行抑制の可能性は認められたが、線維化を強力に抑制するまでには至らなかった。PI ポリアミドの投与の理想的なタイミングについて、Washio ら<sup>16</sup>はラットの皮膚瘢痕による検討の結果から、*TGF $\beta$ 1* mRNA が急激に増加し、発現がピークに至る以前が最適としている。本研究ではコモンマーモセットの腎組織における *TGF $\beta$ 1* mRNA の発現のピークは分からなかった。また血液検査に加え、形態学的検査として超音波検査を施行しても、既に Wasting marmoset syndrome を発症しているケースがあった。皮膚組織においては、熱傷、切創などの瘢痕化する原因の発症時期が明確であるため、受傷から早期に PI ポリアミドを投与することが可能である。しかし、腎組織

においては腎線維化の原因となる CKD の発症時期が明確でなく、また *TGFβ1* mRNA の発現のピークを含め、CKD のどの段階が PI ポリアミド投与開始の理想的なタイミングであるかは現段階では明確にできていない。特に CKD ステージ G3b～5 が末期腎不全 (End-stage renal disease : ESRD) の危険因子であると報告されている<sup>31,32</sup> ことから、それ以前の CKD ステージ G3a までが腎線維化の可逆性のある時期で、PI ポリアミドの投与が適している時期である可能性もある。実際に本研究では、UUO 3 週間モデルにおいて、*SNAIL1* mRNA、*ACTA2* mRNA はヒト TGF-β1 PI ポリアミド投与個体で著明に低下しており、線維化が完成する前にヒト TGF-β1 PI ポリアミドが投与可能であれば、より強力な線維化の抑制作用が確認できる可能性がある。今後は、PI ポリアミドの投与のタイミングについても検討する必要があると思われる。また、ヒト TGF-β1 PI ポリアミド以外の他の TGF-β1 に対する PI ポリアミド<sup>18</sup> での創薬開発の検討や、TGF-β1 以外の線維化に関与する分子を標的とした新たな PI ポリアミドの設計、開発も考慮する必要がある。

## 【結論】

コモンマーモセットの腎線維化モデルとして、シクロスポリン腎症モデルと片側尿管結紮術水腎症モデルを作製した。コモンマーモセットに特有である Wasting marmoset syndrome の影響を考慮すると片側尿管結紮術水腎症モデルの方が、PI ポリアミドの薬効評価に適していると考えられた。

ヒトに対し分子設計・合成したヒト TGF-β1 PI ポリアミドは、コモンマーモセットの片側尿管結紮術水腎症モデルにおいて安全に投与可能であることが確認でき、腎線維化の進行を抑制する可能性があると考えられた。

## 【引用文献】

1. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* **39**, S1-266 (2002).
2. Wright, J. R. *et al.* Clinicopathological correlation in biopsy-proven

- atherosclerotic nephropathy: implications for renal functional outcome in atherosclerotic renovascular disease. *Nephrol. Dial. Transplant* **16**, 765–70 (2001).
3. Souma, T. *et al.* Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 1599–1616 (2013).
  4. Mimura, I. & Nangaku, M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **6**, 667–78 (2010).
  5. Zeisberg, M. *et al.* BMP-7 counteracts TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat. Med.* **9**, 964–8 (2003).
  6. Trauger, J. W., Baird, E. E. & Dervan, P. B. Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations. *Nature* **382**, 559–61 (1996).
  7. Dennler, S., Goumans, M.-J. & ten Dijke, P. Transforming growth factor  $\beta$  signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 731–40 (2002).
  8. Epstein, F. H., Border, W. A. & Noble, N. A. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1286–1292 (1994).
  9. Loeffler, I. & Wolf, G. Transforming growth factor- $\beta$  and the progression of renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, i37–i45 (2014).
  10. Zhou, X. *et al.* Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to-mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **305**, F957–67 (2013).
  11. Matsuda, H. *et al.* Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting the TGF- $\beta$ 1 promoter for treatment of progressive renal diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 422–32 (2006).
  12. Matsuda, H. *et al.* Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole–imidazole polyamide targeting of the transforming growth factor- $\beta$ 1 promoter. *Kidney Int.* **79**, 46–56 (2011).

13. Yao, E.-H. *et al.* A pyrrole–imidazole polyamide targeting transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits restenosis and preserves endothelialization in the injured artery. *Cardiovasc. Res.* **81**, 797–804 (2009).
14. Serie, K. *et al.* Pyrrole-imidazole polyamide targeting transforming growth factor  $\beta$ 1 ameliorates encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit. Dial. Int.* **32**, 462–72 (2012).
15. Chen, M. *et al.* Pretranscriptional regulation of Tgf- $\beta$ 1 by PI polyamide prevents scarring and accelerates wound healing of the cornea after exposure to alkali. *Mol. Ther.* **18**, 519–527 (2010).
16. Washio, H. *et al.* Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole–imidazole polyamide, targeting the TGF- $\beta$ 1 promoter. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1987–1995 (2011).
17. Lai, Y.-M. *et al.* Synthetic pyrrole-imidazole polyamide inhibits expression of the human transforming growth factor-beta1 gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**, 571–5 (2005).
18. Igarashi, J. *et al.* Preclinical study of novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting human TGF- $\beta$ 1 promoter for hypertrophic scars in a common marmoset primate model. *PLoS One* **10**, e0125295 (2015).
19. Slattery, C., Campbell, E., McMorrow, T. & Ryan, M. P. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition. *Am. J. Pathol.* **167**, 395–407 (2005).
20. Ling, H. *et al.* Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 377–88 (2003).
21. Islam, M. *et al.* Effect of anti-transforming growth factor- $\beta$ gr; antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int.* **59**, 498–506 (2001).
22. Burdmann, E. A. *et al.* Prevention of experimental cyclosporin-induced

interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am. J. Physiol.* **269**, F491-9 (1995).

23. Chevalier, R. L., Forbes, M. S. & Thornhill, B. A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* **75**, 1145–52 (2009).