

氏名（本籍）	たか くら こう じ 高 倉 浩 二（茨城県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	乙第344号
学位授与の日付	平成27年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	線維化抑制による慢性腎臓病治療薬の創出に関する研究

論文審査委員	（主査）教授 田沼 靖一
	教授 磯濱洋一郎 教授 花輪 剛久
	教授 廣田 孝司 准教授 秋本 和憲

## 論文内容の要旨

本研究は、新規慢性腎臓病（CKD）治療薬の創出の作用機序として線維化抑制に着目し、「抗線維化機序による CKD 治療薬」という創薬コンセプトの検証を目的とした。

CKD の定義は、日本腎臓学会によれば①腎障害を示唆する所見（検尿異常、画像異常、血液異常、病理所見など）の存在、②糸球体濾過率（GFR） $60 \text{ mL/分/1.73 m}^2$ 未満、①②のいずれかまたは両方が3 カ月以上持続することとされている。CKD は進行すると末期腎不全となり、血液透析や腎臓移植による治療が必要となる。血液透析は1週間に3回、1回につき4時間以上の治療が必要であり QOL を著しく低下させる。また腎移植ドナーは絶対的に数が不足している。さらに CKD は冠動脈疾患や脳血管疾患などの心血管イベントの発症リスクを高めることが分かっている。現行の CKD 標準治療薬は、レニン・アンジオテンシン（RAS）系であるアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬およびアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬であるが、CKD の病態は複雑でありこれだけでは進行を抑制することはできていない。近年は、生活習慣の変化により先進国のみならず開発途上国でも CKD 患者数が増加している。このように新規 CKD 治療薬の開発は急務である。

CKD は糸球体腎炎、ネフローゼ、巣状糸球体硬化症など原発性のものと、高血圧、糖尿病、脂質異常などに起因する二次性のものがある。いずれの病因においても腎線維化が認めら

れ、線維化は腎機能低下と相関していることが報告されている。このように腎線維化はCKD進展の共通経路であり、線維化を抑制することでCKD進行を抑制することができると考えられる。

この様な背景のもと、本研究では抗線維化薬である Pirfenidone を用いて線維化抑制によるCKD治療のコンセプト検証を行なった。Pirfenidoneは1995年にマウスBleomycinモデルにおいて肺の線維化を抑制する化合物として報告され、2008年に特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) の治療薬として承認されている。Pirfenidoneが作用するターゲット分子は不明であるが、ピレスパ錠®の添付文書によればその薬効機序は炎症性サイトカイン、線維化形成に関与する増殖因子、細胞外マトリックスの産生調節および線維芽細胞増殖抑制など複合的な作用に基づく抗線維化とされている。Pirfenidoneの腎臓病に対するエビデンスは、ラット腎障害モデルにおける線維化の抑制や少数の患者での臨床研究報告があるが、CKDのタンパク尿や腎機能低下に対する有効性は明確ではない。そこで本研究では臨床での抗線維化作用が証明されている Pirfenidone を用いて、腎疾患モデルでのタンパク尿や腎機能低下に対する有効性検証を行なった。それを基にCKDに対する抗線維化薬の臨床応用について考察した。

本研究では以下の3つの検討を行なった。1. 近位尿細管上皮細胞の transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 刺激に対する Pirfenidone の作用、2. 5/6 腎臓摘出モデルでの Pirfenidone の作用、3. 糸球体腎炎モデルでの Pirfenidone の作用、である。

最初に *in vitro* での作用を確認するために、ラット近位尿細管上皮細胞である NRK-52E 細胞を用いて、TGF- $\beta$ 1 刺激による type 1 collagen、fibronectin、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、connective tissue growth factor (CTGF)、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、vimentin の産生に対する作用を検討した。近位尿細管上皮細胞は腎障害に伴い肥厚、変性、脱落を生じるが、これに TGF- $\beta$  の関与が示唆されている。TGF- $\beta$  は細胞外マトリックス産生や線維化促進因子の産生、さらには上皮間葉移行

(epithelial-mesenchymal transition; EMT) を介して腎線維化を促進するとされる。実験の結果、TGF- $\beta$  による type 1 collagen、fibronectin、PAI-1、CTGF の発現上昇に対して Pirfenidone は濃度依存的な抑制作用を示した。ただしその作用には  $\mu$ M オーダーの濃度を要した。CKD においては複数の因子が協働していると推測されることから、TGF- $\beta$  と同じく腎線維化への関与が示唆されている PDGF との共刺激に対する作用も検討した。その結果 Pirfenidone は TGF- $\beta$  単独刺激時と同様に抑制作用を示した。一方で Pirfenidone は  $\alpha$ -SMA や vimentin のような EMT に関連する因子の発現は抑制しなかった。以上のことから、Pirfenidone は TGF- $\beta$ 1 による尿細管上皮細胞からの細胞外マトリックスや線維化促進因子の産生を阻害するが、EMT は阻害しないことが示唆された。

次にラット 5/6 腎臓摘出モデルでの Pirfenidone の有効性を評価した。げっ歯類の腎臓はヒトと基本構造や機能が同じであるためヒトを外挿するために汎用されている。5/6 腎摘モデルは、ネフロン数を強制的に少なくすることで単位糸球体当たりの濾過量を増やし慢性的に負荷を掛けるモデルである。過剰濾過によるストレスは糸球体障害を引き起こし、尿細管障害や間質線維化を続発させるため、CKD 病態進行を模している。本検討では Pirfenidone の他に ACE 阻害薬である Enalapril を比較評価した。その結果、Pirfenidone は Enalapril と比較してタンパク尿の抑制作用は弱い、腎機能低下をほぼ同等に抑制した。Enalapril は糸球体への圧負荷を軽減する機序のため本モデルでは効きやすい薬剤であることから、糸球体障害、尿細管障害、間質線維化のいずれの病理所見も改善した。これに対し Pirfenidone は糸球体障害、尿細管障害を軽減する作用は弱い、間質線維化を強く抑制した。このように Pirfenidone は Enalapril と異なる作用より腎臓を保護した。一方で、本モデルの尿細管上皮およびボウマン嚢上皮には  $\alpha$ -SMA の発現が上昇していたが、Pirfenidone はこの発現を抑制しなかったことから EMT を抑制しないことが示唆された。以上、Pirfenidone は 5/6 腎摘モデルにおいて腎線維化を抑制し腎機能低下を抑制した。抗線維化薬は RAS 系阻害薬とは奏功機序が異なることから新規 CKD 治療薬として有望であると考えられた。

最後に、Pirfenidone のタンパク尿に対する作用を明確にするため糸球体腎炎モデルの評価を行なった。タンパク尿は腎障害を診断する重要なマーカーであり、治療方針を決める基準としても用いられている。タンパク尿測定は簡便で再現性も高いため、タンパク尿に対する抑制作用があれば臨床応用上のメリットは大きい。5/6 腎摘モデルでの結果では Pirfenidone はタンパク尿を軽減するものの統計的有意差はなかった。抗 glomerular basement membrane (GBM) 糸球体腎炎モデルは、糸球体基底膜に抗 GBM 抗体が沈着し補体を活性化することが引き金となり、糸球体係蹄壁が傷害され、持続的にタンパク尿が増加することからタンパク尿評価に適したモデルである。さらに糸球体内外に細胞外マトリックスが蓄積し糸球体硬化および間質線維化も認められる。Pirfenidone の評価は発症と同時の予防投与あるいは発症後 2 週間からの治療投与により実施した。その結果、予防投与では Pirfenidone は炎症細胞の浸潤や糸球体硬化を抑制し、タンパク尿増加および腎機能低下を有意に抑制した。興味深いことに Pirfenidone は Podocyte 特異的に発現する Nephlin や Podocin の発現低下を抑制した。Podocyte は糸球体基底膜を裏打ちする細胞であり、Nephlin や Podocin は Podocyte のスリット膜形成に関与している。解析の結果、

Nephrin 発現量とタンパク尿には高い逆相関関係が認められたことから、ポドサイト保護がタンパク尿抑制につながったと考えられた。一方、予防投与とは対照的に治療投与においては Pirfenidone はタンパク尿を抑制しなかった。しかしながら線維化を抑制し腎機能低下を抑制した。このことから抗線維化はタンパク尿とは無関係に腎機能低下を抑制することが示された。以上のことから、Pirfenidone のタンパク尿抑制は予防的限定な作用であった。腎疾患治療薬は予防的に処置することはないと想定されることから抗線維化薬はタンパク尿を薬効指標にできないことが判明した。したがって抗線維化薬の有効性を評価するためには、タンパク尿に代わるサロゲートマーカーが必要と考えられた。一方で、抗線維化による腎機能低下抑制作用は強く、優れた CKD 治療薬となる可能性が示唆された。

以上、本研究から以下のことが判明した。1. 抗線維化は腎機能低下を抑制する効果に優れ、CKD 治療薬創出において魅力的な機序である。2. 抗線維化薬開発にはタンパク尿に代わるバイオマーカーが必要である。3. 高い治療的效果を示す方策として EMT 抑制がある。このように、将来、線維化抑制による新規 CKD 治療薬創出に活かせる知見を得ることができた。

## 論文審査の結果の要旨

慢性腎臓病 (chronic kidney disease, CKD) は、様々な原因により腎臓の機能が低下していく疾患であり、近年の生活習慣の変化もあり先進国を中心に増加し続けている。CKD が進行し腎機能が破たんすると、生命維持には透析や腎移植治療が必要となる。現行の CKD 治療は、renin/angiotensin (RAS) 系阻害薬による進行抑制であり、この薬剤の作用機序は糸球体高血圧の是正である。しかし、CKD の病態は複雑であるため、RAS 系阻害薬のみでは CKD 治療は不十分であり、新規薬剤の創出が求められている。

CKD ではその原因に関わらず腎線維化が認められ、線維化の程度と腎機能低下レベルは相関するとされている。そして、腎線維化は組織障害の結果だけではなく病態進行の原因であり、腎線維化の抑制は CKD 進行を遅らせることができると考えられている。しかし、線維化阻害による CKD 進行抑制のエビデンスは十分でないのが現状である。

そこで本研究では、新規 CKD 治療薬創出という目標のため、「抗線維化機序による CKD 治療」のコンセプト検証を実施した。検証にはヒト特発性肺線維症の治療薬で抗線維化作用が証明されている pirfenidone を用いた。評価には腎臓の構造や機能がヒトに類似するラットを使用した。

第二章では、CKD モデルである 5/6 腎臓摘出モデルに対する pirfenidone の有効性を検証した。本モデルは 5/6 の腎臓を除去することで残存腎に過剰負荷をかけるモデルであり、RAS 系阻害薬が有効性を示す。pirfenidone には降圧作用がないため、全身血圧の上昇する本モデルにおいて降圧によら



ない腎保護効果の検証が可能である。その結果、pirfenidone は糸球体および尿細管の障害を軽減するとともに間質線維化を抑制し、腎機能低下を抑制した。しかし、タンパク尿の抑制作用は明確でなかった。線維化と腎機能には高い相関関係が認められたことから、線維化抑制が腎機能低下抑制につながったと考えられた。以上より抗線維化薬は糸球体高血圧を呈する病態において、降圧によらず腎機能低下を抑制し、CKD 治療薬の奏功機序として有望であることが判明した。

第三章では、ヒト進行性糸球体腎炎に類似した病態を呈する抗 GBM 腎炎モデル (glomerular basement membrane) に対する pirfenidone の有効性を検証した。本モデルは炎症を主体とした腎障害モデルであり、多様な病態を呈する CKD への効果を外挿する意味において有効性を示すことは重要である。検討の結果、pirfenidone は予防的投与において糸球体障害を軽減しタンパク尿および腎機能低下を抑制した。治療的投与においても間質線維化を軽減し腎機能低下を抑制したが、タンパク尿には無効であった。本モデルにおいても線維化と腎機能には高い相関関係が認められたことから、抗線維化による腎機能低下抑制が示唆された。以上のことから、血圧上昇を伴わない炎症性モデルにおいても抗線維化機序による腎機能低下抑制が証明された。一方でタンパク尿に対する治療的效果は無いことから、抗線維化薬はタンパク尿を有効性の指標とすることができないことが判明した。

上記 2 つの腎障害モデルで pirfenidone はタンパク尿よりも腎機能低下に有効性を示したことから、pirfenidone の腎保護効果は糸球体よりも尿細管側にあると推測された。そこで第四章では、培養近位尿細管細胞に対する線維化関連因子の発現に対する pirfenidone の作用を検証した。その結果 pirfenidone は TGF- $\beta$  刺激による collagen type I, fibronectin, CTGF, PAI-1 の発現を濃度依存的に抑制した。一方で  $\alpha$ -SMA および vimentin の発現は抑制しなかった。このことは 5/6 腎摘モデルでの結果と一致するものであった。腎線維化は尿細管周囲に認められることから、本検討結果は pirfenidone の生体内での作用の一部分を示しているものと考えられた。

以上、本研究で得られた結果をまとめると、①抗線維化は腎機能低下を抑制する効果に優れ、CKD 治療薬として魅力的な機序であることが判明した。②抗線維化によるタンパク尿抑制は限定的であるため、早期に薬効を検出するためには他の評価指標が必要であることが明らかとなった。これらの結果は新規治療薬の創出が望まれている CKD に対して、線維化抑制機序による創薬の妥当性を示す知見であり、博士 (薬学) の学位に十分値する研究である。