

特集：糖尿病性腎症

糖尿病性腎症に対する創薬の展望

宮田 敏男

はじめに

医科学分野における基礎研究成果の臨床応用は、「トランスレーショナルリサーチ」あるいは「From bench to bedside」として近年重要視されている。バイオテクノロジーが目覚ましい勢いで進歩し、医科学への応用が進んだ今日でさえ、すべての医療分野が恩恵を受けているわけではない。製薬企業の重点研究分野は種々条件(基礎研究基盤の充溢度、市場、リスクなど)により限定される。すなわち、製薬企業が取り組んでいる「創薬」の領域は限られている。同じようなスタチン系高脂血症治療薬や降圧薬が数多くの製薬企業から次々と販売されているにもかかわらず、オーファンや製薬企業が取り組まないが社会的に重要な疾患群(例えば腎臓病)、または unmet medical need(全く薬のない分野かあってもなお不十分)である領域の創薬は思うように進んでいない。これら領域で自らトランスレーショナルリサーチを進めていくことは、患者に少しでも良い医療を還元したいと希望する臨床医の責務の一つとも考えられる。筆者らは、「薬に繋がる有用な新規化合物の取得」に重点を置き研究を展開している。これは、自らが見出した遺伝子・蛋白から予測される「治療コンセプト」を提唱するだけでなく、それを検討するためのツール(新規化合物など)を自ら取得し、さらにこれらを用いて動物モデルで自らのコンセプトを証明(Proof of concept)することも重要と考えているからである。本総説でいくつかのモデルを紹介したい。

腎臓病治療薬のオプション

腎臓病治療薬は少なく、治療のオプションは限られてい

Novel therapeutic approaches to diabetic nephropathy

東海大学医学部腎・代謝内科学
東海大学総合医学研究所

る。さらに、現在腎臓病の治療薬として用いられている薬剤はすべて、元来、腎臓病治療薬として開発された薬ではない。例えば、一部の降圧薬、ステロイド・免疫抑制剤などは、臨床的経験から評価されてきたものである。腎臓病薬は薬効の適応拡大の過程で展開された薬がほとんどであり、保険上の適用も認可されていなくても臨床的に使われている薬剤も多くある。確かに、一部の降圧薬(アンジオテンシン受容体拮抗薬やアンジオテンシン変換酵素阻害薬など)の腎保護が大規模臨床試験で証明されたが、これら降圧薬単剤での透析導入先送り効果は高々数年であり、まだまだ十分とは言い難い(RENAAL スタディ後の医療経済的解析結果から)。今後、腎臓病の進展を抑制する新規治療薬を見出し、少しでも透析導入を先送りできるような治療のオプションを拡げることが急務と考えられる。

ゲノム創薬の時代を迎えて

2000年6月にヒトゲノム解析終了が宣言され、医薬品開発は「ゲノム創薬」(遺伝子の塩基配列情報や機能蛋白質の解析の成果を利用することで効率的に医薬品を開発する手法)の時代を迎えた。これまでの新薬開発は、ハイスループット・ランダムスクリーニングなど“偶然”に見出された薬剤の種(ヒット化合物)の化学構造を、少しずつ変化させた誘導体化合物を実践的有機化学で多数合成し、試験管内や動物実験で効果を確認するという地道な手法を繰り返すことで探索されてきた(トラディショナルな創薬アプローチ)。一方、ゲノム創薬では、遺伝子から翻訳された蛋白の構造や作用メカニズムに基づき、有効性があり、副作用の少ない新薬候補物質をロジカルに、効率よく探索できる可能性がある。X線解析結果を基に、1-2オングストローム(0.1~0.2 nm)の精度で蛋白の構造(原子の位置)を決定し、蛋白(内の溝やポケット)と結合する候補化合物をバーチャル化合物ライブラリーからコンピュータを用い

て予測する創薬アプローチ (structure based drug design : SBDD) などが一つの例である。最新のテクノロジーに裏付けられた遺伝子解析に引き続くポストゲノム研究から治療薬開発が遅れた医療分野に有用なヒト遺伝子・蛋白情報が得られ、創薬が一気に加速されることが期待された。

しかし、残念ながらゲノム創薬に対する大きな期待とは裏腹に、まだ思うような成果があげられていないのが現状であろう。やはり「創薬」には、泥臭い地道な努力と多大な時間が必要なかもしれない。ただし、トラディショナルなストラテジーではアプローチが難しい創薬分野もいまだに多く(腎臓病もその一例)、ゲノム創薬に真摯に取り組んでいる研究者も少なからずいる。

本稿ではわれわれの腎臓病ゲノム創薬に対する試みの一端を紹介したい。

Megsin ポストゲノム研究と megsin 阻害薬

われわれの教室では、腎臓に存在する細胞に特異的に発現する新規な機能遺伝子群を同定し、このなかからゲノム創薬につながる有用な標的分子を明らかにし、創薬につながるリード化合物を探索するための基盤研究を行ってきた。さらに、これら機能遺伝子の改変に基づき、ヒト腎炎ときわめて類似の病態を呈する自然発症腎炎モデルの作製に取り組み、治療薬評価系として有用な腎臓病モデルの確立に取り組んできた。

これまでに、メサンギウム細胞抗原として Thy-1 が唯一報告されたが、Thy-1 はラットにのみ発現しており、ヒトおよびマウスには発現が認められない¹⁾。さらに、メサンギウム特異的ではない(ラットでは胸腺にも発現)。一部のアメリカのベンチャー企業、大手製薬メーカーがメサンギウム細胞機能遺伝子の同定を目指して研究を開始したと報告されたが、具体的な報告はなく、依然不明のままであった。われわれは、ヒトメサンギウム細胞のトランスクリプトームを行った結果、世界に先駆けヒトメサンギウム細胞の全発現遺伝子定量的・質的プロファイルを完了させ²⁾、megin をはじめとしていくつかの新規メサンギウム細胞高発現機能遺伝子群を単離同定した^{3,4)}。

Megin は serine protease inhibitor (serpin) に属する新規蛋白で、種を超えてメサンギウム細胞にかなり特異的に発現している^{3,5)}。megin の標的 serine protease は特定されていないが、少なくとも plasmin 活性を抑制する⁶⁾。In situ hybridization や免疫組織化学解析の結果、megin 遺伝子・蛋白の発現はヒト IgA 腎症や糖尿病性腎症^{7,8)}、さら

にラット Thy-1 腎炎モデル⁹⁾ で亢進していた。ヒトメグシンを全身に過剰発現したマウスを作製した (megin transgenic mice : megin Tg)⁶⁾ ところ、megin Tg は発育は正常と変わらず、主要臓器にも特筆すべき病理学的異常は認められなかった。しかし、腎臓においては加齢とともに異常を認め、40 週齢頃から約 6 割の megin Tg がメサンギウム増殖性糸球体腎炎に類似の病像(糸球体細胞の増加、メサンギウム領域拡大、免疫複合体沈着など)を呈した。この megin Tg では、megin を全身で発現したにもかかわらず、病変部は糸球体を中心とした異常のみであった。最近、megin、RAGE (receptor for advanced glycation end products)、iNOS の triple Tg mice を作製したが、若週齢から高度な蛋白尿を呈し、16 週齢で約 70 % に糖尿病性結節性病変に類似の病理が確認できた(糸球体肥大、基底膜肥厚、上皮障害、間質線維化、炎症性細胞浸潤なども確認)¹⁰⁾。

われわれの megin ポストゲノム研究は、この新規蛋白が本当に腎臓病治療薬の創薬ターゲットになりうるか否かを明らかにすることが最終目的である。megin の創薬上での有用性を見極めるためには、megin 阻害作用を有する化合物を実際に腎臓病動物モデルに投与して、腎障害軽減に有用か否かを評価することが必要と考え、megin 阻害化合物の探索に着手した。megin 阻害化合物をトラディショナルな創薬ストラテジーの一つであるハイスルーブット・ランダムスクリーニングで探索することは、設備や費用などから大学レベルでは試行できない。そこで、ロジカルなアプローチでの阻害化合物の探索を考慮した。最近、megin の中和抗体(活性阻害する抗体)が得られたが、megin 中和抗体の認識部位および阻害作用を検討する過程で、megin の活性阻害機構を明らかにすることができた。serpin の活性発現には分子内構造変化 (serine protease により特異的に切断された serpin 内の反応性ループ構造が、serpin body 内のベータシート間への溝に挿入される) が必須であり、反応性ループ構造の部分ペプチドで活性が阻害できる。この部分ペプチドのベータシート挿入を 3 次元的に解析することにより、部分ペプチドの低分子化合物 mimetics を探索できる可能性が考えられた。ただし、このためには megin の正確な X 線解析情報が必要であった。大腸菌や CHO 細胞で発現した精製 megin recombinant 蛋白を用いて、megin の結晶化に向け種々の条件下で取り組んだが、微小結晶は生じるものの、解析に十分な結晶は得られなかった。

幸いなことに、serpin 蛋白同士は構造上の類似性が高

く、megsin と PAI-1 蛋白は 40%以上のホモロジーがある⁹⁾。そこで、すでに取得されている他の serpin の X 線解析情報を基に、コンピュータ上で megin 蛋白の構造を予測し、そのデータを基に SBDD で megin 阻害作用のある化合物の探索を、*in silico* で試みた¹¹⁾。バーチャル・ケミカルライブラリーから約 50 個の候補化合物が得られ、plasmin 阻害を指標にした *in vitro* の生物学的評価法により、megsin 阻害作用のあるヒット化合物が実際に取得できた。ただ、活性が弱く薬剤としては不十分であったので、さらに薬効の強い化合物の探索に取り組んでいる。有効な megin 阻害化合物が取得できれば、腎臓病動物モデルに投与して評価したい。

Plasminogen activator inhibitor 1(PAI-1) 阻害薬

糸球体細胞外マトリックス (ECM) の産生と分解のバランスは巧妙に制御されており、この機能バランスが破綻して産生が代謝を上回ると、マトリックス蓄積、さらには糸球体硬化にもつながる。ECM の産生亢進メカニズムが明らかになれば、そのプロセスを阻害することにより糸球体硬化を抑制することが期待できるため、治療薬開発に向けて ECM の代謝・産生の機序に関する基礎研究が行われている。plasminogen activator inhibitor (PAI-1) も興味あるターゲットであり、これは plasmin を活性化する tissue plasminogen activator (tPA) および urokinase-like plasminogen activator (uPA) の主要な阻害酵素で serpin に属する。PAI-1 は血栓の形成や融解に重要であるのみならず、ECM の分解にも重要な役割を果たしていることがわかってきた。

腎炎における PAI-1 の病態生理学的意義に関しても知見が蓄積している。例えば、PAI-1 欠損マウスでの片側尿管結紮モデルでは、腎臓の線維化の軽減が報告されている¹²⁾。また、抗糸球体基底膜腎炎においても、PAI-1 の欠損は半月体形成の減少とコラーゲン蓄積の軽減を伴うことが示された¹³⁾。一連の研究から、PAI-1 を阻害し、plasmin 活性を増加させることは、ECM 分解を促進し、組織の線維化を抑制する可能性を示唆している。実際、正常な腎臓では PAI-1 は検出できず、糸球体硬化モデル動物や多くのヒト糸球体腎炎で PAI-1 の発現が亢進している。興味深いことに、腎炎進展に重要とされている TGF- β や angiotensin II は、PAI-1 の発現を亢進する。Noble NA, Border WA らは、PAI-1 拮抗剤として不活性な変異

PAI-1 蛋白を Thy-1 腎炎に投与し、ECM 分解が亢進する事実を報告し¹⁴⁾、PAI-1 阻害の腎臓病治療への可能性を提唱している。ただし、変異 PAI-1 蛋白は治療には使用できないため、PAI-1 を阻害する低分子化合物が期待されている。

上述したように、megsin と同じ serpin に属する PAI-1 の反応性ループ構造の阻害部分ペプチド構造情報を基に、SBDD で PAI-1 阻害作用のある化合物を探索した。その結果、約 100 個の候補化合物が得られ、tPA 活性を指標にした合成基質法、電気泳動法による PAI-1 と tPA 複合体形成阻害の検討、天然基質法によるフィブリン形成に対する検討など *in vitro* の生物学的評価法により、これまでに 2 個の PAI-1 阻害作用のあるヒット化合物を取得できた。

これまで複数の国内外の製薬企業が PAI-1 阻害薬の開発を目指したが、われわれ以外で PAI-1 阻害薬を取得できているのは、ランダムスクリーニングで成功した Wyeth 社のみである。われわれの化合物は、Wyeth 社の構造とは全く異なっており、生物学的活性評価での活性は同等以上であることが *in vitro* の試験で明らかとなっている。現在、これらヒット化合物の安定性試験、予備的な毒性試験 (細胞毒性、急性毒性、亜急性毒性)、薬物動態試験としての吸収試験も終了し、一部の動物モデル (血栓モデル、肺線維化モデル) では薬効が確認できている。残念ながら、現在の化合物の腎臓組織への移行性は不十分であり、腎臓病モデルでの評価はできない。今後、これらヒット化合物の最適化を進め、腎臓病モデルでの有用性についても検討したい。

Hypoxia inducible factor (HIF) 活性化薬

近年、間質・尿細管障害が腎障害進展に重要であることを示唆する知見が蓄積されてきた。東京大学医学部南学らは、傍尿細管毛細血管の喪失や間質の線維化などに伴う腎栄養血管面積の減少と低酸素 (慢性虚血) が、さまざまな腎障害の進展に重要である事実を指摘した^{15,16)}。実際、虚血状態を可視化できる BOLD MRI を用いた検討で、DN 早期のモデルラット腎臓での慢性虚血の存在が明らかにされ、2 型糖尿病ラットモデル SHR/NDmcr-cp を用いてわれわれが施行した実験でも確認できた¹⁷⁾。慢性虚血状態は、さらに酸素の metabolic disorder をもたらし、酸化ストレスの形成にも関与する^{18,19)}。

細胞が低酸素に応答する際に重要な転写調節因子が

hypoxia inducible factor(HIF)である。HIFの下流で調節されている遺伝子群としては、造血因子エリスロポエチン、細胞にエネルギーを供給する glut-1、血管新生因子 VEGF などがあり、組織を虚血から保護している。われわれは、虚血に対する治療薬のターゲットとして、エリスロポエチン、VEGF などの上流に位置する HIF を考えて、ゲノム創薬に取り組んでいる。実際、細胞内の HIF の蓄積を促すコバルト(HIF を分解する prolylhydroxylase の活性に必須な鉄と置換し、prolylhydroxylase を阻害)を2型糖尿病ラットモデルに投与することにより、高血圧や代謝異常の改善に依存せず、さらにアンジオテンシン受容体拮抗薬以上に強い腎保護が得られる。確立した HIF 活性を定量的に評価するための培養細胞²⁰⁾を用いて、化合物ライブラリーを探索する過程で、*in vitro* で HIF 活性を強く亢進させる化合物を2つ同定することができた。これら化合物の急性毒性試験、吸収性試験、細胞障害性試験も終了し、安全性は確認した。特筆すべきは、これら化合物の皮下投与によって、ラット皮下での血管増生を *in vivo* で誘導できたことである。以上、*in vitro* および *in vivo* で創薬コンセプトを支持する知見が集積しつつある。

虚血性心疾患、脳血管障害、糖尿病など生活習慣病の急増に伴い、近年、HIF をターゲットとした治療薬開発は非常に注目されている分野となった。prolylhydroxylase と競合するようなペプチドの製剤化、prolylhydroxylase の活性を阻害し HIF-1 α を安定化する物質の利用、HIF-1 遺伝子改変により安定性を高める試みなどが、世界各国の研究で精力的に行われている。

文 献

- Miyata T, Isobe K, Dawson R, Ritter MA, Inagi R, Oda O, Taguchi R, Ikezawa H, Inoue I, Seo H, Hasegawa M, Kobayashi S, Maeda K, Yamada K, Nakashima I. Determination of the molecular nature and cellular localization of Thy-1 in human renal tissue. *Immunology* 1990 ; 69 : 391-395.
- Yasuda Y, Miyata T, Nangaku M, Iida Y, Maeda K, Okubo K, Kurokawa K. Funcional quantitative analysis of the genome in cultured human mesangial cells. Funcional quantitative analysis of the genome in cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 1998 ; 53 : 154-158.
- Miyata T, Nangaku M, Suzuki D, et al. A mesangium-predominant gene, megsin, is a new serpin up-regulated in IgA nephropathy. *J Clin Invest* 1998 ; 102 : 828-836.
- Wada T, Miyata T, Inagi R, et al. Cloning and characterization of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4 from mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12 : 2601-2608.
- Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Ueyama H, Takeyama K, Kato S, Kurokawa K. Transcriptional regulation of a mesangium-predominant gene, megsin. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 2715-2722.
- Miyata T, Inagi R, Nangaku M, Imasawa T, Sato M, Izuhara Y, Suzuki D, Yoshino A, Onogi H, Kimura M, Sugiyama S, Kurokawa K. Overexpression of the serpin megsin induces progressive mesangial cell proliferation and expansion. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 585-593.
- Suzuki D, Miyata T, Nangaku M, Takano H, Saotome N, Toyoda M, Mori Y, Zhang S, Inagi R, Endoh M, Kurokawa K, Sakai H. Expression of megsin mRNA, a novel mesangium-predominant gene, in the renal tissues of various glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 1999 ; 10 : 2606-2613.
- Inagi R, Miyata T, Suzuki D, Toyoda M, Wada T, Ueda Y, Izuhara Y, Sakai H, Nangaku M, Kurokawa K. Specific tissue distribution of megsin, a novel serpin, in the glomerulus and its up-regulation in IgA nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 286 : 1098-1106.
- Nangaku M, Miyata T, Suzuki D, Umezono T, Hashimoto T, Wada T, Yagi M, Nagano N, Inagi R, Kurokawa K. Cloning of rodent megsin revealed its up-regulation on mesangioproliferative nephritis. *Kidney Int* 2001 ; 60 : 641-652.
- Inagi R, Yamamoto Y, Nangaku M, Izuhara Y, Okamoto H, Yamamoto H, Miyata T. The novel diabetic nephropathy mouse model reminiscent of Kimmelstiel-Wilson nodules in triple transgenic mice overexpressing RAGE, iNOS and megin. *Diabetes* 2006 ; 55 : 356-366.
- Goto J, Kataoka R, Hirayama N. Ph4Dock-pharmacophore-based protein-ligand docking. *J Med Chem* 2004 ; 47 : 6804-6811.
- Oda T, Jung Yo, Kim HS, Cai X, Lopez-Guisa JM, Ikeda Y, Eddy AA. PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int* 2001 ; 60 : 587-596.
- Kitching AR, Kong YZ, Huang XR, Davenport O, Edgton KL, Carmeliet P, Holdsworth ST, Tipping PG. Plasminogen activator inhibitor-1 is a significant determinant of renal injury in experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 1487-1495.
- Huang Y, Haraguchi M, Lawrence DA, Border WA, Yu L, Noble NA. A mutant, noninhibitory plasminogen activator inhibitor type 1 decreases matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* 2003 ; 112 : 379-388.
- Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury : a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 17-25.
- Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T,

- Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M. Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol* 2004 ; 15 : 1277-1288.
17. Izuhara Y, Nangaku M, Inagi R, Tominaga N, Aizawa T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. Renoprotective properties of angiotensin receptor blockers beyond blood pressure lowering. *J Am Soc Nephrol* 2005 ; 16 : 3631-3641.
 18. Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, van Ypersele de Strihou C, Monnier VM, Witztum JL, Kurokawa K. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1997 ; 100 : 2995-3004.
 19. Miyata T, van Ypersele de Strihou C. Renoprotection of angiotensin receptor blockers : Beyond blood pressure (editorial review). *Nephrol Dial Transplant* 2006 ; 21 : 846-849.
 20. Tanaka T, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku N. Hypoxia in renal disease with proteinuria and/or glomerular hypertension. *Am J Pathol* 2004 ; 165 : 1979-1992.