

特集：腎疾患の新規治療薬

# PHD 阻害薬

## 腎性貧血治療薬としての開発状況ならびに 低酸素に対する腎保護薬としての期待

PHD inhibitors

倉田 遊 南学正臣 田中哲洋

Yu KURATA, Masaomi NANGAKU, and Tetsuhiro TANAKA

### はじめに

腎性貧血は慢性腎臓病(chronic kidney disease : CKD)の主要な合併症の一つである。赤血球造血刺激因子製剤(erythropoiesis-stimulating agents : ESA)の登場により、腎性貧血のコントロールが格段に改善した一方で、ESA は血栓症・心血管イベントリスク、ESA 低反応性の存在、抗体産生による赤芽球癆などの課題を抱えている。

低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor : HIF)は、組織低酸素に対する生理的応答を司る主要な転写因子であり、造血にかかわるエリスロポエチン(EPO)は HIF の標的遺伝子の一つである。HIF はプロリン水酸化酵素(prolyl hydroxylase domain enzyme : PHD)により、酸素濃度依存性に制御されている。PHD 阻害薬は PHD を阻害し HIF を安定化することで貧血を改善する新たな腎性貧血治療薬として国内外で臨床研究が進行中である<sup>1,2)</sup>。PHD 阻害薬は小分子化合物の経口内服製剤であり、注射薬である ESA と比較して低侵襲である。さらに、生理的な EPO 濃度での貧血改善効果、鉄代謝の適正化などが報告されており、従来の ESA に代わる新規治療薬として期待されている。

慢性低酸素状態は CKD 進行の final common pathway であり、HIF を活性化し組織の低酸素応答を高める PHD 阻害薬は腎保護薬としての可能性が期待されている。実際にさまざまな腎疾患モデルにおいて、HIF 活性化が腎保護的に働くことが報告されている。

本稿では、腎性貧血治療薬としての開発状況および腎保

護薬としての PHD 阻害薬の可能性について概説する。

### HIF とその制御

HIF は組織低酸素応答の主要制御因子であり、さまざまな標的遺伝子発現誘導により、造血、血管新生、嫌気性解糖などを亢進させ、低酸素環境に対応する。HIF は酸素感受性のある  $\alpha$  鎖と恒常的に発現している  $\beta$  鎖から構成されるヘテロ 2 量体であり、HIF- $\alpha$  には HIF-1 $\alpha$ 、2 $\alpha$ 、3 $\alpha$  のアイソフォームが存在する。腎臓において、主に HIF-1 $\alpha$  は尿細管上皮、HIF-2 $\alpha$  は血管内皮および間質に発現しており、EPO は HIF-2 $\alpha$  により発現が制御されている。

HIF は PHD により酸素濃度に応じた調節を受けている(図)。PHD は  $\text{Fe}^{2+}$  などを補因子とする 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼであり、酸素分子を基質として水酸化を行う。PHD には PHD1、PHD2、PHD3 のアイソフォームがあり、主に PHD2 が HIF- $\alpha$  のプロリン水酸化を行う。正常酸素下では、HIF- $\alpha$  は PHD によりプロリン残基が水酸化される。水酸化された HIF- $\alpha$  を von Hippel-Lindau protein (pVHL) が認識し、HIF- $\alpha$  はユビキチン化されプロテアソームにより分解される。一方、低酸素下では PHD によるプロリン水酸化が行われず、HIF- $\alpha$  は分解を免れ核に移行する。HIF- $\alpha$  は核で HIF- $\beta$  とヘテロ二量体を形成し、低酸素配列(hypoxia-responsive element : HRE)を持つ標的遺伝子群の転写を促す。

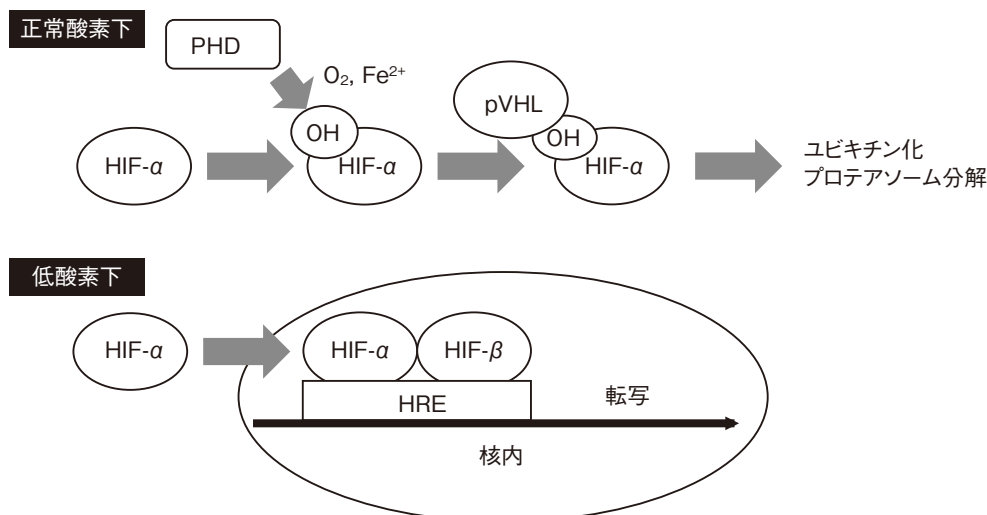


図 酸素濃度依存性の HIF 発現調節

HIF: hypoxia-inducible factor, PHD: prolyl hydroxylase domain, HRE: hypoxia-responsive element, pVHL: von Hippel-Lindau protein

### 腎性貧血の機序

腎臓において EPO は、主に皮髄境界付近の間質に存在する線維芽細胞様細胞で産生される。低酸素状態では皮質全体および髄質外層でも EPO が産生されるようになり、EPO 産生量が増加する<sup>3)</sup>。CKD が進行すると、エリスロポエチン産生細胞は myofibroblast に形質転換し EPO 産生能が失われ、この EPO 産生能の低下が腎性貧血の主要な原因となる<sup>3)</sup>。

しかし、腎障害が進行した末期腎不全患者において EPO 産生能は完全に失われているわけではない。透析患者においても低酸素環境下では血中 EPO 濃度が上昇し、酸素濃度の低い高地では必要な ESA 量が減少することが報告されている<sup>4)</sup>。また、腎臓のない透析患者においても、腎臓の残存している透析患者には劣るものの PHD 阻害薬投与後の血中 EPO 濃度上昇が確認されており、これは肝臓により EPO が産生されたと考えられている<sup>5)</sup>。さらに、EPO 産生細胞特異的 PHD ノックアウトにより、myofibroblast に形質転換した EPO 産生細胞が EPO 産生能を取り戻すことが報告されている<sup>6)</sup>。以上より、PHD 阻害薬による HIF 活性化は残腎での EPO 産生能の回復、肝臓での EPO 産生を促すことで腎性貧血を改善することが期待できる。

### 鉄代謝と HIF 活性化

生体内の鉄の約 2/3 はヘモグロビン(Hb)のヘム鉄として存在し、その他は主に網内系マクロファージ、肝細胞内に貯蔵される。食事由来の 3 価鉄は十二指腸で duodenal cytochrome B (DCYTB) により 2 価鉄に還元され、divalent metal transporter 1 (DMT1) を介して腸上皮細胞に吸収される。鉄欠乏時にはこれらの細胞内の貯蔵鉄が鉄輸送膜蛋白であるフェロポルチン (FPN) を介して血中に供給される。FPN は、主に肝臓で産生されるヘプシジンにより制御されており、ヘプシジンが細胞膜上の FPN に結合することで FPN は細胞内に取り込まれ、リソソーム分解を受ける。その結果、細胞膜上の FPN が減少し、血中への鉄輸送が抑制される。CKD 患者ではヘプシジン排泄低下や慢性炎症などにより、血中ヘプシジン値が上昇しており、血中への鉄供給減少により機能的鉄欠乏に陥っていることが知られている。

HIF 活性化は EPO 産生だけでなく鉄代謝にもかかわっており、FPN, DCYTB, DMT1 はいずれも HIF-2 $\alpha$  により発現が誘導される<sup>3)</sup>。また、HIF 活性化はヘプシジンを低下させることで血中への鉄供給を増加させる。この機序として当初は HIF が直接ヘプシジンを制御していると考えられていたが、その後の研究で EPO による造血刺激により赤芽球から産生されるエリスロフェロンを介して、間接的にヘプシジン産生を抑制していると考えられている<sup>7)</sup>。

さらに、最近、腸上皮細胞において、FPN による細胞内

表 1 Roxadustat の第 III 相試験

NCT	症例数	CKD 区分	期間	対照群	目的 (Hb 維持/改善)	国	試験結果
02780726	56	PD	24 週	なし	維持/改善	日本	平均 Hb 増加量は ESA 未治療群では 1.69 g/dL, ESA からの切り替え群では 0.14 g/dL。Hb 値維持率は ESA 未治療群では 92.3%, 切り替え群では 86.5%
02952092	303	HD	24 週	DA	維持	日本	平均 Hb 値変化量における Roxadustat 群と DA 群の群間差は -0.02 g/dL と非劣性を示した。Hb 値維持率は, Roxadustat 群で 95.2%, DA 群で 91.3%。Roxadustat 群では網膜出血などの眼科的異常のリスク増加を認めず。
02652806	304	HD+PD	26 週	rhEPO	改善	中国	Roxadustat 群の平均 Hb 増加量は rhEPO 群と比較して非劣性を示し (0.8 vs. 0.5 g/dL), 有意なヘプシジン低下 (-30.2 vs. -2.3 ng/mL), コレステロール低下を認めた。
02652819	151	NDD	26 週	プラセボ	改善	中国	Roxadustat 群はプラセボと比較して有意な Hb 上昇 (1.9 vs. -0.4 g/dL), ヘプシジン低下 (-56.14 vs. -15.10 ng/mL), コレステロール低下を認めた。

CKD: chronic kidney disease, PD: peritoneal dialysis, HD: hemodialysis, NDD: non-dialysis dependent, DA: darbepoetin alpha, rhEPO: recombinant human erythropoietin, Hb: hemoglobin, ESA: erythropoiesis stimulating agent

鉄濃度低下を介した HIF-2 $\alpha$  安定化が報告された<sup>8)</sup>。FPN は細胞からの鉄排出を促し、腸上皮細胞内の鉄濃度を減少させる。鉄は PHD の必須補因子であり、細胞内鉄濃度減少により PHD の活性が低下し、その結果 HIF-2 $\alpha$  が安定化し、鉄代謝関連遺伝子 (FPN, DCYTB, DMT1) の発現を促す。

### PHD 阻害薬の臨床試験

現在 5 種類 (Vadadustat, Daprodustat, Roxadustat, Molidustat, Enarodustat) の PHD 阻害薬の第 III 相試験が国内外で進行中または一部はすでに終了している。いずれも内服薬であり、Roxadustat は週 2 回または 3 回の内服で、その他は基本的に 1 日 1 回の内服である。このうち、Roxadustat の試験が最も進んでおり、2018 年 10 月のアメリカ腎臓学会で、日本および中国で行われた第 III 相試験結果が発表されている (表 1)<sup>24,25)</sup>。いずれも良好な Hb 値上昇効果を示し、対照群と比較して非劣性を示した。安全性に関しても対照群と比較して重篤な副作用の増加を認めなかった。これらの結果を受けて Roxadustat は中国で 2018 年 12 月に承認され、本邦では 2018 年 10 月に透析患者の腎性貧血治療薬として承認申請されており、近く臨床現場に登場する見込みである。

これまで報告されている PHD 阻害薬の第 II 相試験結果は表 2 の通りである。用量依存性の貧血改善効果が示しており、血中 EPO 濃度のピーク値は 100U/L 前後またはそれ以下で貧血改善効果を示している (rhEPO 使用下では 500U/

L 前後)<sup>9,11,14~18)</sup>。ESA 未使用の保存期 CKD および ESA 使用中の血液透析患者を対象とした Daprodustat の第 II 相試験において、保存期 CKD 患者では 0.5, 2, 5 mg/日の Daprodustat 投与により用量依存性の Hb 増加を認めた一方で、血液透析患者では ESA から Daprodustat 0.5, 2 mg/日への切り替えでは Hb を維持できず、Hb 維持に 5 mg/日投与を必要とした<sup>14)</sup>。また、ESA 使用中の血液透析患者を対象とした Vadadustat の第 II 相試験では、Vadadustat 450 mg 週 3 回投与群のうち 19% が貧血の悪化のため試験中止となっており、それらは試験前の rhEPO 高用量使用者であった<sup>21)</sup>。これらの結果からは残腎機能や ESA 使用量が PHD 阻害薬に対する反応性に影響する可能性が示唆される。一方で、Roxadustat の第 II 相試験では背景の CRP 値と無関係な貧血改善効果を認めており<sup>10,12)</sup>、慢性炎症により ESA 低反応性を呈する症例では、PHD 阻害薬の切り替えによる貧血改善効果が期待できる。

鉄代謝への影響に関しては、ほぼすべての第 II 相試験で PHD 阻害薬使用による血中ヘプシジン値低下を認めており、Hb 増加量が大いほどヘプシジン値が低下していた。また、低下を認めなかった試験<sup>14,22)</sup>はいずれも ESA からの切り替えで Hb 維持を目的としており、PHD 阻害薬投与前後で Hb 値に変化を認めていなかった。以上の結果は PHD 阻害薬によるヘプシジン低下効果は、主に EPO の造血刺激によるエリスロポエチン産生を介していることを支持している。

さらに、Roxadustat, Daprodustat の第 II 相試験では、貧

表 2 PHD 阻害薬の臨床試験：PHD 阻害薬の第 II 相試験

		症例数	CKD 区分	期間	対照群	目的 (Hb 維持/改善)	主要結果
Roxadustat	Besarab, 2015 <sup>9)</sup>	116	NDD	4 週	プラセボ	改善	用量依存性の Hb 増加 (0.7~2.0 mg/kg TIW)
	Besarab, 2016 <sup>10)</sup>	60	HD+PD	12 週	プラセボ	改善	鉄動態、炎症所見にかかわらず貧血改善
	Provenzano, 2016 <sup>11)</sup>	144	HD	6, 19 週	rhEPO	維持	生理的な EPO 濃度下で Hb 維持
	Provenzano, 2016 <sup>12)</sup>	143	NDD	16 週	プラセボ	改善	炎症所見にかかわらず用量依存性の貧血改善
	Chen, 2017 <sup>13)</sup>	91	NDD	8 週	プラセボ	改善	用量依存性の Hb 増加 (1.1~2.25 mg/kg TIW)
	Chen, 2017 <sup>13)</sup>	87	HD	6 週	rhEPO	維持	用量依存性の Hb 増加 (1.1~2.3 mg/kg TIW)
Daprodustat	Holdstock, 2016 <sup>14)</sup>	72	NDD	4 週	プラセボ	改善	用量依存性の Hb 増加 (0.5~5mg/日)
	Holdstock, 2016 <sup>14)</sup>	82	HD	4 週	rhEPO	維持	5mg/日で rhEPO と同等に Hb 維持 (0.5, 2mg/日では Hb 維持できず)
	Brigandi, 2016 <sup>15)</sup>	70	NDD	4 週	プラセボ	改善	用量依存性の Hb 増加 (10~100mg/日)
	Brigandi, 2016 <sup>15)</sup>	37	HD	4 週	プラセボ	改善	用量依存性の Hb 増加 (10, 25mg/日)
	Akizawa, 2017 <sup>16)</sup>	97	HD	4 週	プラセボ	維持	用量依存性の Hb 増加 (4~10mg/日)
	Meadowcroft, 2019 <sup>17)</sup>	216	HD	24 週	rhEPO	維持	用量依存性の Hb 増加 (4~12mg/日)
	Holdstock, 2019 <sup>18)</sup>	252	NDD	24 週	rhEPO	維持/改善	生理的 EPO 濃度で Hb 維持
Vadadustat	Pergola, 2016 <sup>19)</sup>	210	NDD	20 週	プラセボ	改善	Hb 改善 (450~600mg/日)
	Martin, 2017 <sup>20)</sup>	93	NDD	6 週	プラセボ	改善	用量依存性の Hb 増加 (240~630mg/日)
	Haase, 2019 <sup>21)</sup>	94	HD	16 週	なし*	維持	いずれの用量 (300mg/日, 450mg/日, 450 mg TIW) でも Hb を維持
Molidustat	Macdougall, 2019 <sup>22)</sup>	121	NDD	16 週	プラセボ	改善	用量依存性に Hb 増加 (25~100mg/日)
	Macdougall, 2019 <sup>22)</sup>	124	NDD	16 週	DA	維持	開始用量 25, 50, 75 mg/日いずれも Hb 維持
	Macdougall, 2019 <sup>22)</sup>	199	HD	16 週	rhEPO	維持	開始用量 25, 50mg/日では Hb 維持できず。75mg/日以上で維持
Enarodustat	Akizawa, 2019 <sup>23)</sup>	94	NDD	30 週	プラセボ	改善	用量依存性の Hb 増加 (2~6mg/日)
	Akizawa, 2019 <sup>23)</sup>	103	NDD	30 週	プラセボ	維持	用量依存性の Hb 増加 (2~6mg/日)

NDD: non-dialysis dependent, HD: hemodialysis, PD: peritoneal dialysis, NDD: no dialysis dependent, rhEPO: recombinant human erythropoietin, DA: darbepoetin alpha, TIW: three times weekly

\*Vadadustat の投与方法でグループ分け

血改善に加えてコレステロール値の低下が報告されており、HIF 安定化が脂質代謝にも影響している可能性が示唆される<sup>11~13,16)</sup>。

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) は HIF のターゲットの一つであり、PHD 阻害薬の使用により VEGF が活性化し、腫瘍増殖や転移、糖尿病性網膜症が増悪することが懸念される。血中 VEGF 値を評価した第 II 相試験では PHD 阻害薬使用による有意な変化を認めなかった<sup>14~21,23)</sup>。血中 VEGF 値は Daprodustat 50 mg 以上の投与で上昇することが報告されているが<sup>26)</sup>、臨床試験で

の Daprodustat の投与量は多くても 10 mg/日程度であり、貧血改善効果を有する投与量では血中 VEGF 値には影響を与えないことが示唆される。Roxadustat の第 III 相試験 (NCT02952092) では眼底評価が行われているが、眼底出血を含む眼科的リスクの増加を認めなかった。

また、ADPKD モデルマウスにおいて PHD 阻害薬使用が嚢胞増大をもたらすことが最近報告されている<sup>27)</sup>。前述の VEGF のように貧血治療の用量では嚢胞増大をきたさない可能性もあるが、ADPKD 症例では慎重なフォローアップが必要と考えられる。

### 腎臓における低酸素

腎臓は心拍出量の20～25%を受ける血流が豊富な臓器であるが、動静脈シャントの存在のため血流量に対して酸素の取り込み効率が低下し、生理的に低酸素状態となっている。腎臓は虚血による傷害を受けやすい臓器であり、虚血は急性腎障害の主要な原因である。虚血再灌流傷害 (ischemia reperfusion injury : IRI) モデルにおいて腎臓低酸素の存在および HIF 活性化が示されている<sup>28)</sup>。さらに、造影剤腎症、横紋筋融解症、シスプラチン腎症などの他の急性腎障害モデルにおいても HIF 活性化が報告されている<sup>28)</sup>。

CKD が進行すると、酸素供給の減少(糸球体硬化、傍尿細管毛細血管脱落、間質線維化、貧血など)と酸素需要の増大(尿細管における代謝亢進など)の両面により更なる低酸素状態に陥る<sup>29)</sup>。慢性的な低酸素状態は間質線維化を進行させる一方で間質線維化は酸素拡散効率を低下させ、この悪循環により進行性に腎機能が低下し末期腎不全に至る<sup>30)</sup>。CKD ではさまざまな要因により慢性低酸素状態となっているが、その低酸素の程度に対して HIF 活性化が不十分である可能性が指摘されており、その原因として酸化ストレス<sup>31～33)</sup>、HIF の異常糖化修飾<sup>34)</sup>、尿毒症物質<sup>35)</sup>などが考えられている。

### HIF 活性化による腎保護効果

HIF 活性化により虚血傷害に対する組織応答性が改善されること、CKD ではその低酸素状態の程度に対して HIF 活性化が不十分であることから、AKI および CKD の両者において HIF 活性化が腎保護的に働くことが期待される。実際に HIF 活性化は AKI モデルにおいて腎保護効果を示している。IRI モデルに対する一酸化炭素(CO)<sup>50)</sup>、キセノン<sup>51)</sup> およびコバルト<sup>52)</sup>、L-mimosine<sup>53)</sup>、dimethylxalylglycine (DMOG)<sup>54)</sup>などの PHD 阻害薬<sup>50,55,56)</sup>による HIF 活性化は腎保護効果を示している。これらはいずれも虚血前に HIF 活性化を誘導しており、虚血後の HIF 活性化について検討した報告ではいずれも腎保護効果は認めなかった<sup>55,56)</sup>。この IRI モデルにおける PHD 阻害薬の腎保護作用は内皮細胞特異的 HIF-2 $\alpha$  ノックアウトにより消失することから、内皮細胞の HIF-2 $\alpha$  が腎保護的に働くことが推測されている<sup>48)</sup>。シスプラチン腎症モデルにおいても、CO<sup>57)</sup>、コバルト<sup>58)</sup>、PHD 阻害薬<sup>59)</sup>の前投与は腎保護効果を示した。また、Fisher-Lewis ラット腎移植モデルにおいて、移植6時間前に PHD 阻害薬をドナーに投与したところ移植後急性腎障害

を軽減させ、長期移植生着率を改善させた<sup>60)</sup>。

CKD に対する HIF 活性化に関しては、代表的な CKD モデルであるラット 5/6 腎摘モデルにおいて、コバルト<sup>61)</sup>、DMOG<sup>62)</sup>、L-mimosine<sup>63)</sup>投与による腎保護効果が示されている。このうち L-mimosine に関してはその投与期間についても検討されている。5/6 腎摘後、早期(2～12週)、中期(4～12週)、後期(8～12週)に分けて L-mimosine を投与したところ、中期群では腎保護効果を認めたが、後期群では変化を認めず、早期群では逆に腎機能を悪化させた<sup>63)</sup>。この結果は、HIF 活性化はその時期および期間によって異なる影響を及ぼすことを示唆している。また、コバルト投与は、片腎摘抗 Thy1 腎炎モデル<sup>64)</sup>、ストレプトゾシン誘発性 1 型糖尿病モデル<sup>65)</sup>においても腎保護効果を示している。

さらに遺伝子改変動物を用いた検討も数多く報告されている(表3)。全身性に VHL をノックアウトし HIF を活性化させたマウスでは IRI<sup>36)</sup> および UUO モデル<sup>37)</sup>において腎障害が軽減した。さらに部位特異的に遺伝子改変を行ったマウスでもさまざまな検討がなされている。尿細管上皮特異的 VHL ノックアウト (KO) マウスにおいて、抗糸球体腎炎モデル<sup>43)</sup>、横紋筋融解症誘発性 AKI モデル<sup>44)</sup>を作製したところ、共に腎障害が軽減した。また、尿細管上皮特異的に HIF-2 $\alpha$  を過剰発現したトランスジェニックマウスでは、アデニン誘発腎不全モデルにおいて腎障害が軽減した<sup>45)</sup>。Thick ascending limb (TAL) 特異的 VHL KO マウスおよび内皮細胞特異的 PHD2 KO マウスでは、IRI 後の腎障害の軽減を認めた<sup>46,48)</sup>。骨髄系細胞特異的 VHL KO マウスで UUO モデルを作製すると、マクロファージ浸潤が減少し、骨髄系細胞特異的 HIF-1 $\alpha$ /2 $\alpha$  double KO マウスでは逆にマクロファージ浸潤が増加した。T 細胞特異的 HIF-2 $\alpha$  KO マウスでは、IRI 後の腎障害が増悪し、さらに HIF-2 $\alpha$  KO マウスから採取した natural killer T (NKT) 細胞を養子移入したところ、IRI での腎障害が増悪したことから HIF-2 $\alpha$  は NKT 細胞の細胞傷害性を制御していることが示唆された<sup>47)</sup>。以上はいずれも遺伝子改変による HIF 活性化が腎保護的に働くことを示しているが、一方で、特に長期観察下において HIF が線維化促進因子として作用する可能性も報告されている。近位尿細管特異的 HIF-1 $\alpha$  KO マウスに UUO モデルを作製したところ、間質線維化が抑制され、HIF-1 $\alpha$  が線維化に働くことが示唆された<sup>39)</sup>。また、近位尿細管特異的 VHL KO マウスに 5/6 腎摘モデルを作製したところ、15カ月の長期観察の結果、線維化の進行を認めた<sup>40)</sup>。さらに遠位ネフロン・集合管特異的 HIF-2 $\alpha$  過剰発現マウス<sup>42)</sup>、内皮細胞特異的 PHD2 KO マウス<sup>49)</sup>において、長期観察中に

表3 遺伝子改変マウスを用いた検討

部位(使用プロモーター)	遺伝子改変	主要結果	文献
全細胞( $\beta$ actin)	VHL KO	IRI モデルにおいて腎障害軽減(BUN↓, Cre↓, 尿細管障害↓)	36
全細胞(Ubc)	VHL KO	UUO モデルにおいて線維化↓, マクロファージ浸潤↓	37
	HIF-1 $\alpha$ /2 $\alpha$ DKO	UUO モデルにおいてマクロファージ浸潤↑	
近位尿細管(PEPCK*)	VHL KO	EPO 高値, 多血症, 腎嚢胞形成	38
	HIF-1 $\alpha$ KO	UUO モデルにおいて線維化↓, マクロファージ浸潤↓	39
近位尿細管( $\gamma$ -GT)	VHL KO	5/6 腎摘モデルにおいて 60 週齢で線維化↑	40
近位尿細管(Ndr1)	PHD2 KO	高脂肪食肥満モデルにおいて, 尿中アルブミン↓, 尿中 NGAL↓, 糸球体肥大改善	41
遠位ネフロン, 集合管(Ksp)	HIF-2 $\alpha$ OE	15 カ月齢で嚢胞形成, 線維化↑	42
尿細管上皮(PAX8)	VHL KO	抗糸球体腎炎モデルにおいて腎障害軽減(BUN↓, 尿蛋白↓, 糸球体・尿細管障害↓)	43
		横紋筋融解症誘発性 AKI モデルにおいて腎障害軽減(Cre↓, BUN↓, 尿細管壊死↓)	44
	HIF-2 $\alpha$ OE	アデニン誘発腎不全モデルにおいて腎障害軽減(Cre↓, BUN↓), 線維化↓	45
TAL (Thp)	VHL KO	IRI モデルにおいて, 腎障害軽減(Cre↓, BUN↓, 尿細管障害↓)	46
骨髄性細胞 (LysM)	VHL KO	UUO モデルにおいてマクロファージ浸潤↓	37
	HIF-1 $\alpha$ /2 $\alpha$ DKO	UUO モデルにおいてマクロファージ浸潤↑	
T 細胞(Lck)	HIF-2 $\alpha$ KO	IRI モデルにおいて Cre↑, 好中球浸潤↑	47
内皮細胞(Cdh5)	HIF-1 $\alpha$ KO	IRI モデルにおいて腎障害に変化認めず	48
	HIF-2 $\alpha$ KO	UUO モデルにおいて線維化↑, IRI モデルにおいて腎機能低下遷延・線維化↑・マクロファージ浸潤↑	
	PHD2 KO	IRI モデルにおいて腎障害軽減(尿細管障害↓)	
	PHD2 KO	15 カ月齢で嚢胞形成, 腎機能低下, 線維化↑	

\*PEPCK は肝細胞にも発現

Ubc: ubiquitin c, PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase,  $\gamma$ -GT: gamma-glutamyl transpeptidase, Ndr1: N-myc downstream-regulated gene 1 protein, Ksp: kidney specific cadherin, PAX8: paired box gene 8, TAL: thick ascending limb, Thp: Tamm-Horsfall protein, LysM: lysozyme M, Lck: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, Cdh5: cadherin 5, KO: knockout, DKO: double knockout, OE: overexpression

嚢胞形成, 線維化増悪を認めた。

以上の結果を踏まえると, 虚血前の短期間の HIF 活性化など, 適切なタイミングでの薬理的な HIF 活性化は腎保護効果が期待できる。一方で, 部位特異的遺伝子改変動物を用いた検討では, その部位などの背景因子に応じて HIF 活性化が腎保護的にも線維化促進的にも働くことが示されている。ただし, 遺伝子改変による HIF 活性化の効果は強力かつ永続的であり, 薬理的な HIF 活性化により適切なレベルに HIF を活性化することで, 線維化を促進することなく腎保護作用を発揮させることができる可能性がある。

## おわりに

PHD 阻害薬は, 生理的な EPO 濃度での貧血改善効果を示し, 鉄代謝改善作用も併せ持つ新規腎性貧血治療薬として期待を集めている。これまでに行われた臨床試験では重篤な有害事象の報告はないが, HIF 活性化に伴う多面的な作用は, 血管新生, 腫瘍増殖, 嚢胞増大などの悪影響を及ぼす可能性があり, 長期使用に伴う影響を慎重に評価すべきである。腎臓は低酸素による傷害を受けやすく, 慢性低酸素状態は CKD 進行の final common pathway であり, HIF 活性化は低酸素応答を改善させることで臓器保護効果を発揮することが期待されている。しかし, これまでの報告で

は HIF 活性化は腎保護効果を示す一方で状況によっては線維化促進などの負の側面があり、その影響は部位、程度、期間などの背景に左右される。HIF 活性化が腎保護的に働く適切な条件を見出し、臨床応用につなげるために更なる知見の集積が求められる。

利益相反自己申告：

南学正臣；田辺三菱製薬(報酬額，講演料，奨学寄附金)，協和発酵キリン(報酬額，講演料，原稿料，奨学寄附金)，中外製薬(報酬額，講演料，奨学寄附金)，アステラス製薬(報酬額，講演料，奨学寄附金)，JT(報酬額，研究費・助成金)，グラクソ・スミスクライン(報酬額)，バイエル薬品(奨学寄附金)  
田中哲洋；協和発酵キリン(講演料)，JT(研究費・助成金)

## 文 献

- Sugahara M, Tanaka T, Nangaku M. Prolyl hydroxylase domain inhibitors as a novel therapeutic approach against anemia in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2017 ; 92 : 306–312.
- Hasegawa S, Tanaka T, Nangaku M. Hypoxia-inducible factor stabilizers for treating anemia of chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2018 ; 27 : 331–318.
- Koury MJ, Haase VH. Anaemia in kidney disease : Harnessing hypoxia responses for therapy. *Nat Rev Nephrol* 2015 ; 11 : 394–410.
- Maxwell PH, Eckardt KU. HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anaemia and beyond. *Nat Rev Nephrol* 2016 ; 12 : 157–168.
- Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, Chou J, Schmieder RE, Gunzler V, Eckardt KU. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010 ; 21 : 2151–2156.
- Souma T, Nezu M, Nakano D, Yamazaki S, Hirano I, Sekine H, Dan T, Takeda K, Fong G-H, Nishiyama A, Ito S, Miyata T, Yamamoto M, Suzuki N. Erythropoietin synthesis in renal myofibroblasts is restored by activation of hypoxia signaling. *J Am Soc Nephrol* 2016 ; 27 : 428–438.
- Kautz L, Jung G, Valore E V, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014 ; 46 : 678–684.
- Schwartz AJ, Das NK, Ramakrishnan SK, Jain C, Jurkovic MT, Wu J, Nemeth E, Lakhali-Littleton S, Colacino JA, Shah YM. Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 $\alpha$  axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload. *J Clin Invest* 2019 ; 129 : 336–348.
- Besarab A, Provenzano R, Hertel J, Zabaneh R, Klaus SJ, Lee T, Leong R, Hemmerich S, Yu K-HP, Neff TB. Randomized placebo-controlled dose-ranging and pharmacodynamics study of roxadustat (FG-4592) to treat anemia in nondialysis-dependent chronic kidney disease (NDD-CKD) patients. *Nephrol Dial Transplant* 2015 ; 30 : 1665–1673.
- Besarab A, Chernyavskaya E, Motylev I, Shutov E, Kumbar LM, Gurevich K, Chan DTM, Leong R, Poole L, Zhong M, Saikali KG, Franco M, Hemmerich S, Yu K-HP, Neff TB. Roxadustat (FG-4592) : Correction of anemia in incident dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2016 ; 27 : 1225–1233.
- Provenzano R, Besarab A, Wright S, Dua S, Zeig S, Nguyen P, Poole L, Saikali KG, Saha G, Hemmerich S, Szczech L, Yu KHP, Neff TB. Roxadustat (FG-4592) versus epoetin alfa for anemia in patients receiving maintenance hemodialysis : A phase 2, randomized, 6- to 19-week, open-label, active-comparator, dose-ranging, safety and exploratory efficacy study. *Am J Kidney Dis* 2016 ; 67 : 912–924.
- Provenzano R, Besarab A, Sun CH, Diamond SA, Durham JH, Cangiano JL, Aiello JR, Novak JE, Lee T, Leong R, Roberts BK, Saikali KG, Hemmerich S, Szczech LA, Yu KHP, Neff TB. Oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) for the treatment of anemia in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016 ; 11 : 982–991.
- Chen N, Qian J, Chen J, Yu X, Mei C, Hao C, Jiang G, Lin H, Zhang X, Zuo L, He Q, Fu P, Li X, Ni D, Hemmerich S, Liu C, Szczech L, Besarab A, Neff TB, Peony Yu KH, Valone FH. Phase 2 studies of oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor FG-4592 for treatment of anemia in China. *Nephrol Dial Transplant* 2017 ; 32 : 1373–1386.
- Holdstock L, Meadowcroft AM, Maier R, Johnson BM, Jones D, Rastogi A, Zeig S, Lepore JJ, Cobitz AR. Four-week studies of oral hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor GSK1278863 for treatment of anemia. *J Am Soc Nephrol* 2016 ; 27 : 1234–1244.
- Brigandi RA, Johnson B, Oei C, Westerman M, Olbina G, de Zoysa J, Roger SD, Sahay M, Cross N, McMahon L, Guptha V, Smolyarchuk EA, Singh N, Russ SF, Kumar S, PHI112844 Investigators. A novel hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor (GSK1278863) for anemia in CKD : a 28-day, phase 2a randomized trial. *Am J Kidney Dis* 2016 ; 67 : 861–871.
- Akizawa T, Tsubakihara Y, Nangaku M, Endo Y, Nakajima H, Kohno T, Imai Y, Kawase N, Hara K, Lepore J, Cobitz A. Effects of daprodustat, a novel hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor on anemia management in Japanese hemodialysis subjects. *Am J Nephrol* 2017 ; 45 : 127–135.
- Meadowcroft AM, Cizman B, Holdstock L, Biswas N, Johnson BM, Jones D, Nossuli AK, Lepore JJ, Aarup M, Cobitz AR. Daprodustat for anemia : a 24-week, open-label, randomized controlled trial in participants on hemodialysis. *Clin Kidney J* 2019 ; 12 : 139–148.
- Holdstock L, Cizman B, Meadowcroft AM, Biswas N, Johnson BM, Jones D, Kim SG, Zeig S, Lepore JJ, Cobitz AR. Daprodustat for anemia : a 24-week, open-label, randomized controlled trial in participants with chronic kidney disease. *Clin Kidney J* 2019 ; 12 : 129–138.

19. Pergola PE, Spinowitz BS, Hartman CS, Maroni BJ, Haase VH. Vadadustat, a novel oral HIF stabilizer, provides effective anemia treatment in nondialysis-dependent chronic kidney disease. *Kidney Int* 2016 ; 90 : 1115–1122.
20. Martin ER, Smith MT, Maroni BJ, Zuraw QC, DeGoma EM. Clinical trial of vadadustat in patients with anemia secondary to stage 3 or 4 chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2017 ; 45 : 380–388.
21. Haase VH, Chertow GM, Block GA, Pergola PE, DeGoma EM, Khawaja Z, Sharma A, Maroni BJ, McCullough PA. Effects of vadadustat on hemoglobin concentrations in patients receiving hemodialysis previously treated with erythropoiesis-stimulating agents. *Nephrol Dial Transplant* 2019 ; 34 : 90–99.
22. Macdougall IC, Akizawa T, Berns JS, Bernhardt T, Krueger T. Effects of molidustat in the treatment of anemia in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2019 ; 14 : 28–39.
23. Akizawa T, Nangaku M, Yamaguchi T, Arai M, Koretomo R, Matsui A, Hirakata H. A placebo-controlled, randomized trial of enarodustat in patients with chronic kidney disease followed by long-term trial. *Am J Nephrol* 2019 ; 49 : 165–174.
24. ASN Kidney Week 2018 : Data presented from two Japanese phase 3 studies on roxadustat in the treatment of anemia associated with chronic kidney disease in patients on dialysis | Astellas Pharma US, Inc. <https://www.astellas.com/us/news/14326> (accessed March 4, 2019).
25. FibroGen Presents Results from Two Phase 3 Studies of Roxadustat for the Treatment of Anemia Associated with Chronic Kidney Disease Conducted in China at American Society of Nephrology Kidney Week 2018 Annual Meeting Nasdaq:FGEN. <https://globenewswire.com/news-release/2018/10/25/1627610/0/en/FibroGen-Presents-Results-from-Two-Phase-3-Studies-of-Roxadustat-for-the-Treatment-of-Anemia-Associated-with-Chronic-Kidney-Disease-Conducted-in-China-at-American-Society-of-Nephro.html> (accessed March 4, 2019).
26. Hara K, Takahashi N, Wakamatsu A, Calabiano S. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of single, oral doses of GSK1278863, a novel HIF-prolyl hydroxylase inhibitor, in healthy Japanese and Caucasian subjects. *Drug Metab Pharmacokinet* 2015 ; 30 : 410–418.
27. Kraus A, Peters DJM, Klanke B, Weidemann A, Willam C, Schley G, Kunzelmann K, Eckardt KU, Buchholz B. HIF-1 $\alpha$  promotes cyst progression in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2018 ; 94 : 887–899.
28. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt KU. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2013 ; 40 : 148–157.
29. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney : Tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol* 2010 ; 6 : 667–678.
30. Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury : a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 17–25.
31. Rosenberger C, Khamaisi M, Abassi Z, Shilo V, Weksler-Zangen S, Goldfarb M, Shina A, Zibertrest F, Eckardt KU, Rosen S, Heyman SN. Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int* 2008 ; 73 : 34–42.
32. Katavetin P. High glucose blunts vascular endothelial growth factor response to hypoxia via the oxidative stress-regulated hypoxia-inducible factor/hypoxia-responsible element pathway. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 1405–1413.
33. Zhu XY, Chade AR, Rodriguez-Porcel M, Bentley MD, Ritman EL, Lerman A, Lerman LO. Cortical microvascular remodeling in the stenotic kidney : role of increased oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 1854–1859.
34. Ceradini DJ, Yao D, Grogan RH, Callaghan MJ, Edelstein D, Brownlee M, Gurtner GC. Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 10930–10938.
35. Tanaka T, Yamaguchi J, Higashijima Y, Nangaku M. Indoxyl sulfate signals for rapid mRNA stabilization of Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2) and suppresses the expression of hypoxia-inducible genes in experimental CKD and uremia. *FASEB J* 2013 ; 27 : 4059–4075.
36. Iguchi M, Kakinuma Y, Kurabayashi A, Sato T, Shuin T, Hong SB, Schmidt LS, Furihata M. Acute inactivation of the VHL gene contributes to protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2008 ; 110 : e82–90.
37. Kobayashi H, Gilbert V, Liu Q, Kapitsinou PP, Unger TL, Rha J, Rivella S, Schlöndorff D, Haase VH. Myeloid cell-derived hypoxia-inducible factor attenuates inflammation in unilateral ureteral obstruction-induced kidney injury. *J Immunol* 2012 ; 188 : 5106–5115.
38. Rankin EB, Tomaszewski JE, Haase VH. Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 2576–2583.
39. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, Saito Y, Johnson RS, Kretzler M, Cohen CD, Eckardt K, Iwano M, Haase VH. Hypoxia promotes fibrogenesis *in vivo* via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 3810–3820.
40. Kimura K, Iwano M, Higgins DF, Yamaguchi Y, Nakatani K, Harada K, Kubo A, Akai Y, Rankin EB, Neilson EG, Haase VH, Saito Y. Stable expression of HIF-1 $\alpha$  in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 ; 295 : F1023–1029.
41. Futatsugi K, Tokuyama H, Shibata S, Naitoh M, Kanda T, Minakuchi H, Yamaguchi S, Hayashi K, Minamishima YA, Yanagita M, Wakino S, Itoh H. Obesity-induced kidney injury is attenuated by amelioration of aberrant PHD2 activation in proximal tubules. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 36533.
42. Schietke RE, Hackenbeck T, Tran M, Gunther R, Klanke B, Warnecke CL, Knaup KX, Shukla D, Rosenberger C, Koesters R, Bachmann S, Betz P, Schley G, Schodel J, Willam C, Winkler T,



- Amann K, Eckardt KU, Maxwell P, Wiesener MS. Renal tubular HIF-2 $\alpha$  expression requires VHL inactivation and causes fibrosis and cysts. *PLoS One* 2012 ; 7 : e31034.
43. Theilig F, Enke AK, Scolari B, Polzin D, Bachmann S, Koesters R. Tubular deficiency of von Hippel-Lindau attenuates renal disease progression in anti-GBM glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2011 ; 179 : 2177–2188.
  44. Fahling M, Mathia S, Paliege A, Koesters R, Mrowka R, Peters H, Persson PB, Neumayer H-H, Bachmann S, Rosenberger C. Tubular von Hippel-Lindau knockout protects against rhabdomyolysis-induced AKI. *J Am Soc Nephrol* 2013 ; 24 : 1806–1819.
  45. Kong KH, Oh HJ, Lim BJ, Kim M, Han KH, Choi YH, Kwon K, Nam BY, Park KS, Park JT, Han SH, Yoo TH, Lee S, Kim SJ, Kang DH, Choi KB, Eremina V, Quaggin SE, Ryu DR, Kang SW. Selective tubular activation of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  has dual effects on renal fibrosis. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 11351.
  46. Schley G, Klanke B, Schodel J, Forstreuter F, Shukla D, Kurtz A, Amann K, Wiesener MS, Rosen S, Eckardt KU, Maxwell PH, Willam C. Hypoxia-inducible transcription factors stabilization in the thick ascending limb protects against ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 2004–2015.
  47. Zhang J, Han C, Dai H, Hou J, Dong Y, Cui X, Xu L, Zhang M, Xia Q. Hypoxia-inducible factor-2 limits natural killer cell cytotoxicity in renal ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2016 ; 27 : 92–106.
  48. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, Kobayashi H, Davidoff O, Bian A, Yao B, Zhang MZ, Harris RC, Duffy KJ, Erickson-Miller CL, Sutton TA, Haase VH. Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *J Clin Invest* 2014 ; 124 : 2396–2409.
  49. Wang S, Zeng H, Chen ST, Zhou L, Xie XJ, He X, Tao YK, Tuo QH, Deng C, Liao DF, Chen JX. Ablation of endothelial prolyl hydroxylase domain protein-2 promotes renal vascular remodeling and fibrosis in mice. *J Cell Mol Med* 2017 ; 21 : 1967–1978.
  50. Bernhardt WM. Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 1970–1978.
  51. Ma D, Lim T, Xu J, Tang H, Wan Y, Zhao H, Hossain M, Maxwell PH, Maze M. Xenon preconditioning protects against renal ischemic-reperfusion injury via HIF-1 $\alpha$  activation. *J Am Soc Nephrol* 2009 ; 20 : 713–720.
  52. Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, Fujita T, Nangaku M. Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 1825–1832.
  53. Fang Y, Zhang H, Zhong Y, Ding X. Prolyl hydroxylase 2 (PHD2) inhibition protects human renal epithelial cells and mice kidney from hypoxia injury. *Oncotarget* 2016 ; 7 : 54317–54328.
  54. Hill P, Shukla D, Tran MGB, Aragonés J, Cook HT, Carmeliet P, Maxwell PH. Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2008 ; 19 : 39–46.
  55. Wang Z, Schley G, Türkoglu G, Burzlaff N, Amann KU, Willam C, Eckardt K-U, Bernhardt WM. The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2012 ; 27 : 929–936.
  56. Kapitsinou PP, Jaffe J, Michael M, Swan CE, Duffy KJ, Erickson-Miller CL, Haase VH. Preischemic targeting of HIF prolyl hydroxylation inhibits fibrosis associated with acute kidney injury. *AJP Ren Physiol* 2012 ; 302 : F1172–1179.
  57. Weidemann A, Bernhardt WM, Klanke B, Daniel C, Buchholz B, Câmpean V, Amann K, Warnecke C, Wiesener MS, Eckardt KU, Willam C. HIF activation protects from acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2008 ; 19 : 486–494.
  58. Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M. Hypoxia-inducible factor modulates tubular cell survival in cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 ; 289 : F1123–1133.
  59. Yang Y, Yu X, Zhang Y, Ding G, Zhu C, Huang S, Jia Z, Zhang A. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) protects against cisplatin-induced acute kidney injury. *Clin Sci (Lond)* 2018 ; 132 : 825–838.
  60. Bernhardt WM, Gottmann U, Doyon F, Buchholz B, Câmpean V, Schödel J, Reisenbuechler A, Klaus S, Arend M, Flippin L, Willam C, Wiesener MS, Yard B, Warnecke C, Eckardt KU. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model. *Proc Natl Acad Sci* 2009 ; 106 : 21276–21281.
  61. Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Ingelfinger JR, Adler S, Fujita T, Nangaku M. Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Lab Invest* 2005 ; 85 : 1292–1307.
  62. Song YR, You SJ, Lee YM, Chin HJ, Chae DW, Oh YK, Joo KW, Han JS, Na KY. Activation of hypoxia-inducible factor attenuates renal injury in rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant* 2010 ; 25 : 77–85.
  63. Yu X, Fang Y, Liu H, Zhu J, Zou J, Xu X, Jiang S, Ding X. The balance of beneficial and deleterious effects of hypoxia-inducible factor activation by prolyl hydroxylase inhibitor in rat remnant kidney depends on the timing of administration. *Nephrol Dial Transplant* 2012 ; 27 : 3110–3119.
  64. Tanaka T, Matsumoto M, Inagi R, Miyata T, Kojima I, Ohse T, Fujita T, Nangaku M. Induction of protective genes by cobalt ameliorates tubulointerstitial injury in the progressive Thy1 nephritis. *Kidney Int* 2005 ; 68 : 2714–2725.
  65. Nordquist L, Friederich-Persson M, Fasching A, Liss P, Shoji K, Nangaku M, Hansell P, Palm F. Activation of hypoxia-inducible factors prevents diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2015 ; 26 : 328–338.