

# HIF の活性化が CKD にもたらす多面的影響

田中 哲洋

尿細管間質の慢性低酸素は慢性腎臓病（CKD）の病態進展における最終共通経路を担う。エリスロポエチン（EPO）遺伝子の転写調節機構に関連する研究から低酸素誘導因子（HIF）が発見され、その発現調節を司るプロリン水酸化酵素（PHD）が同定されたことにより、EPOの低酸素誘導を薬理学的に活性化することが可能になった。現在、HIFの活性化をもたらすPHD阻害薬が新規腎性貧血治療薬として開発され、国内外で大規模臨床試験が進行中である。一方、PHD阻害薬が有する潜在的付加価値として、低酸素を背景に有する腎疾患そのものに対する治療応用の可能性が挙げられる。同コンセプトは急性腎障害モデルを用いて精力的に研究されてきたが、CKDの病態における影響を検討した報告は限定的である。いくつかの疾患モデルでは炎症や酸化ストレスを抑制して病態軽減をもたらす一方、間質線維化の増悪や多発性囊胞腎における囊胞の増大など、HIFが病態の進展・増悪に寄与するリスクも報告されており、PHD阻害薬によるHIF活性化が腎臓にもたらす影響は原疾患や病期に強く依存するものと考えられる。他方で、近年のヒト臨床試験のデータから、PHD阻害薬に糖・脂質代謝の改善作用があることが伺われ、糖尿病や肥満を伴う腎障害に対する有効性が検討されている。PHD阻害薬がCKDの腎臓に与える影響は多面的であり、疾患文脈ごとに慎重に知見を蓄積する必要がある。

キーワード：慢性腎臓病、腎性貧血、プロリン水酸化酵素（PHD）阻害薬

## 1. 序文：慢性腎臓病（CKD）における尿細管間質の慢性低酸素

現在、本邦には約1300万人のCKD患者が存在する。これらの患者に対して疾患をより早期に発見し、有効な治療法を提供することは医学上喫緊の課題である。原疾患ごとの特異的な病態に対する治療アプローチが進歩すると同時に、多くの原疾患に共通する病態進展因子に対する洞察も深まり、治療標的として注目を集めてきた。

尿細管間質の慢性低酸素状態は、そのような病態修飾因子の一つである<sup>1)</sup>。腎臓は効率的に尿を濃縮する必然性から尿細管が皮質表層から深部髄質に向けて垂直に走行しており、その周囲において動静脈が密接に並行して走行するため、動静脈間酸素シャントが形成され、深部に向かうに伴い酸素分圧が低下する（皮質酸素分圧：約40 mmHg、髓質酸素分圧：約15 mmHg）。CKDの状態では尿細管周囲毛細血管網の脱落やその上流の糸球体毛細血管の機能不全、尿細管細胞の酸素需要の増大やミトコンドリア脱共役による酸素消費量の増加、腎性貧血など様々な要因によって皮質表層の酸素化がより一層低下する。低酸素に陥った尿細管上皮細胞は増殖・分化異常（例：epithelial-mesenchymal transdifferentiation : EMT）や細胞死を引き起こし、線維芽

細胞におけるcollagen Iやtissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1 mRNAの産生を亢進する。また、尿細管周囲毛細血管の内皮細胞障害は毛細血管網の脱落をもたらして低酸素障害をより一層進行させる。尿細管上皮より産生されたplatelet-derived growth factor (PDGF)- $\beta$ は血管周皮細胞を活性化し、それ自身を $\alpha$ smooth muscle actin (SMA)陽性活性化線維芽細胞へと分化させる一方、毛細血管から遊離させて血管脆弱性をもたらす。さらに低酸素尿細管は直接的に、あるいは局所への白血球浸潤を介してtransforming growth factor (TGF)- $\beta$ を産生し、線維化を加速させる。このように低酸素は尿細管・間質領域の様々な構成細胞に働きかけることで障害を惹起し、障害を増悪させる<sup>2)</sup>。チベット高地民族は民族背景を同じくする広州や北京の住民と比較してCKDの発症頻度が高いという観察研究があるが、これらの知見は低酸素による腎障害を示唆する点で興味深い<sup>3)</sup>。従来、腎臓における低酸素状態の評価は針電極や化学試薬を必要としたため、侵襲性の観点から主に動物実験モデルで実証してきたが、近年、非侵襲的な方法で低酸素状態を評価することが可能になり、ヒトCKDに対する洞察が深まった。一例として機能的MRIであるblood oxygen level-dependent (BOLD)-MRIが挙げられ、低酸素の指標として用いられるT2\*値が推定糸球体濾過率 (eGFR)



低下率と相関すること<sup>4)</sup> や、皮質表層の酸素化の低下が腎予後不良と関連すること<sup>5)</sup> など、新しい知見が次々と報告されている。

## 2. CKD における HIF の発現・機能

生体を構成するすべての細胞には、低酸素状態に適応するための分子機構が備わっている。その中心的な役割を果たすのが、低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor : HIF) である。HIF は basic helix-loop-helix (bHLH) /Per-ARNT-Sim homology (PAS) ファミリーに属する転写因子であり、酸素依存性に分解を受ける  $\alpha$  鎖と恒常的に発現する  $\beta$  鎖から構成される。HIF の主要な isoform として HIF-1 と HIF-2 があり、前者は全身の global な低酸素応答を司るのに対し、後者の発現はより限局的であり、erythropoietin (EPO) などの特定の遺伝子群の転写に関与する<sup>6)</sup>。腎臓における HIF の発現はラット組織を用いた高感度免疫染色法によって詳細に調べられている。全身低酸素暴露や急性貧血、腎動脈結紮による腎虚血や一酸化炭素吸入による機能的貧血によって、尿細管上皮細胞に HIF-1 $\alpha$  が、間質線維芽細胞や血管内皮細胞に HIF-2 $\alpha$  の発現が確認されている<sup>7)</sup>。CKD においても、片側尿管結紮 (UUO) や 5/6 腎摘など様々なモデルで尿細管上皮の HIF-1 $\alpha$  発現が亢進する<sup>8)</sup>。しかしながら、CKD で認められる HIF の発現・機能レベルは不適切に抑制を受けている可能性も示唆されている。例として、streptozotocin (STZ) によって誘発された I 型糖尿病モデルでは尿細管及び間質の HIF-1 $\alpha$  および HIF-2 $\alpha$  の発現レベルは、抗酸化物質の投与によって一層強くなることから、酸化ストレスが HIF の減弱因子として作用している可能性が示唆されている<sup>9)</sup>。また、透析患者より脂肪細胞由来幹細胞 (adipose-derived stem cells : ASCs) を採取してその遺伝子発現を非 CKD 患者の ASCs と網羅的に比較したところ、前者では p300/CBP-associated factor (PCAF) の発現が低下しており、それに伴って HIF 標的遺伝子である血管内皮増殖因子 (VEGF) の低酸素誘導が減弱していることが報告された<sup>10)</sup>。これらの観察は、CKD における HIF 応答の dysregulation を示唆し、HIF を介するシグナルの強化が CKD の病態を修飾する可能性が考えられた。

## 3. PHD 阻害薬による治療介入

プロリン水酸化酵素 (PHD) は 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼに属する水酸化酵素であり、HIF- $\alpha$  のプロリン残基を水酸化する。プロリン水酸化は HIF- $\alpha$  と E3 ユビキチンリガーゼ複合体の親和性を高め、プロテアソーム分解を促進する。低酸素条件下では PHD 酵素活性が減弱するために HIF- $\alpha$  が分解を逃れ、安定化する。同様に、薬理学的に PHD を阻害することで HIF が活性化することから、HIF 安定化薬として PHD 阻害薬が開発された。

## 4. 腎性貧血治療

腎性貧血は CKD が進行すると高頻度で認められる合併症である。EPO の相対的欠乏を主因とする本病態に対し

て、従来より組み換えヒト EPO 製剤 (rhEPO) が使用され、患者の QOL 向上に多大な貢献をしてきた。しかしながらコストや頻回注射に伴う侵襲性、高血圧、血栓性合併症など、臨床的に未解決な課題も数多く残されている。一方で、EPO は代表的な HIF 標的遺伝子であることから、PHD 阻害薬によって腎臓間質に存在する EPO 産生細胞 (REP 細胞) の HIF-2 が活性化されると、EPO 産生が亢進して赤血球造血が促される。PHD の 3 つの paralogues (PHD1, PHD2, PHD3) のうち、PHD2 の阻害が REP 細胞の EPO 産生誘導に重要である<sup>11)</sup>。

PHD 阻害薬は HIF を安定化して EPO 遺伝子転写を亢進させる他に、腸管からの鉄吸収や体内での鉄利用を最適化することで赤血球造血の効率を高められる可能性がある。セルロプラスミン (ceruloplasmin) やトランスフェリン (transferrin)、トランスフェリン受容体などの鉄の体内運搬、利用に関与する因子群は HIF-1 の標的遺伝子であり、腸管からの鉄吸収に関与する 2 倍金属トランスポーター (divalent metal transporter 1 (DMT1)) や duodenal cytochrome B (Dcytb) の発現は HIF-2 によって調節されている。さらに骨髄で造血機能が亢進するとエリスロフェロン (erythroferrone) の産生が誘導され、ヘプシジン (hepcidin) が抑制される。ヘプシジンはフェロポルチン (ferroportin) の機能抑制を介して腸管からの鉄吸収やマクロファージからの鉄リサイクル、肝臓からの鉄放出を抑制するため、HIF の活性化はこれら的作用に拮抗して鉄利用を促進すると考えられる<sup>12)</sup>。体内的鉄動員を最適化することによる治療上の利益は、腎性貧血治療開始直後で鉄需要が高い時期や、慢性炎症を伴う貧血の治療などで認められる可能性がある。海外からの第 II 相試験の報告では、ある一定の Hb を上昇させるために必要であった EPO の量は患者の CRP 値と相關した一方で、PHD 阻害薬のそれは CRP 値と相関していなかった<sup>13)</sup>。つまり、PHD 阻害薬による赤血球造血作用は対象患者の炎症状態に依存しない可能性がある。

PHD 阻害薬が有するもう一つの特徴として、体内的 EPO 血中濃度が生理的な範囲内に維持される点が挙げられる。HIF の活性化による EPO 産生誘導は、ESA 製剤の注射で認められるような血中濃度の overshoot を引き起こさない。過去の大規模臨床試験の post hoc 解析によると、赤血球造血刺激因子製剤 (erythropoiesis-stimulating agent : ESA) の使用量は達成したヘモグロビン値よりも心血管イベントリスクの増加と強く関連していたため<sup>14)</sup>、EPO 血中濃度の overshoot 抑制はそのようなリスクを軽減できる可能性がある。

PHD 阻害薬は上記の特徴を有する小分子化合物であり、現在、保存期 CKD 患者<sup>15)</sup> や透析患者<sup>16)</sup> を対象に腎性貧血の臨床試験が進行中である。これまでに報告された試験結果からは、概ね有効性と安全性が支持されている。しかしながら担がん患者における腫瘍増殖や網膜症の増悪、高カリウム血症など、今後明らかにすべき臨床的課題も多い。将来さらなる知見の蓄積が望まれる。

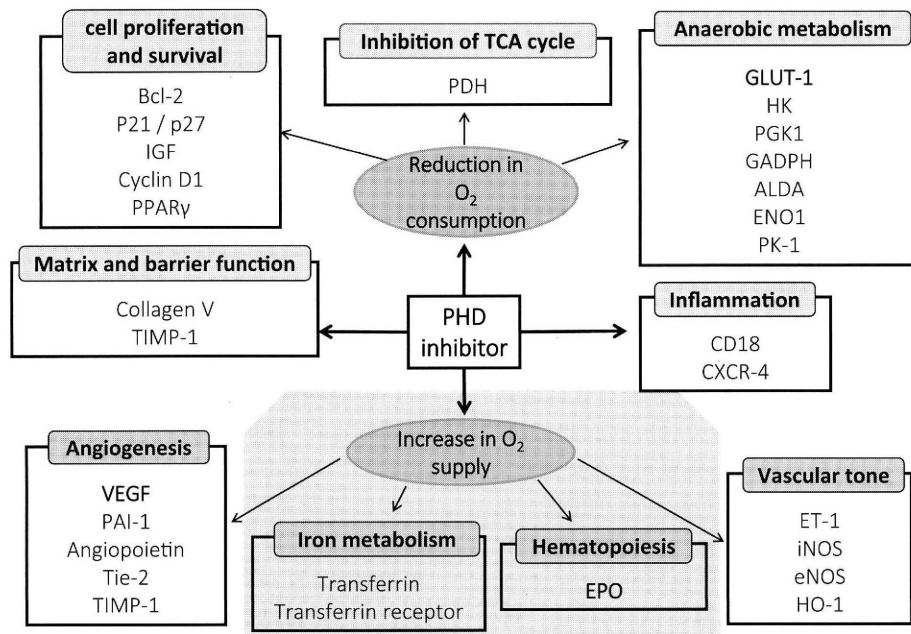


図1 PHD阻害薬によってHIFの活性化がもたらす多面的影響

PHD阻害薬によって全身でHIFが活性化されると、赤血球造血や鉄代謝に関する遺伝子群が誘導される（中央下部、灰色囲み部分）他、血管新生や嫌気性代謝、細胞外マトリックス代謝や炎症など、様々な役割を担う遺伝子群が協調的に誘導される。

## 5. PHD阻害薬が腎障害に与える影響

HIFの標的遺伝子は上述のEPOの他、血管新生や嫌気性代謝、炎症、細胞外基質代謝などに関与する100～200種類が報告されている（図1）。したがって、PHD阻害薬によるHIFの活性化は広範な作用を有し、腎性貧血治療の枠を超えて低酸素臓器障害の病態にも影響を及ぼす可能性が考えられる。

## 6. 急性腎障害（AKI）に対する防御機構

上記の概念はまず、虚血再灌流障害<sup>17)</sup>やシスプラチニ腎症<sup>18)</sup>などの様々なAKIモデルで検証してきた。コバルト投与（鉄のキレートによりPHD活性を阻害し、HIFを安定化する）や一酸化炭素吸入による機能的貧血、PHD阻害薬投与などをAKI誘導前に施すと、いずれのモデルにおいても急性尿細管障害が軽減されるが、その分子機構は不明であった。近年の研究により、尿細管におけるグリコーゲンの蓄積が酸化ストレスからの防御に重要である可能性が提唱されている。培養尿細管細胞においてPHD-2ノックダウン、PHD阻害薬投与を行うHIF-1依存性に低酸素刺激（oxygen and glucose deprivation:OGD）下での酸化ストレスが軽減し、死細胞の割合が減少した。PHD阻害薬投与群では解糖系酵素の発現が有意に上昇し、それに伴ってglycogen synthase (GYS) 1などのグリコーゲン合成に関与する遺伝子群の発現も亢進し、尿細管細胞のグリコーゲン貯蔵量が増加していた。グリコーゲン合成の律速段階酵素と考えられるGYS1をノックダウンしたところ、上記の細胞保護効果は消失した。グリコーゲンの増加に伴ってGSHやNADPHが増加して細胞内酸化ストレスが抑制され、グ

ルタチオン還元酵素の阻害薬によって上記の保護効果は消失したことから、尿細管細胞においてグリコーゲンの増加が酸化ストレスの軽減をもたらし、細胞保護につながっているものと考えられた<sup>19)</sup>。

## 7. CKDにもたらす多面的作用

一方、HIFの活性化がCKDの病態に与える影響には未知な部分が多く、対象疾患や病期、HIFが活性化される腎臓の構成細胞などの様々な要因によって規定されるようである。一例として、Fisher-Lewisラット腎移植モデルにおける検討では、ドナー腎臓をPHD阻害薬で前処置したところ移植後急性期の尿細管壊死やクレアチニン(Cre)の上昇が抑制され、ドナー腎臓の長期生存も有意に改善した<sup>20)</sup>。一方でマウス多発性腎嚢胞モデルにおいてHIFを活性化したところ、腎嚢胞及び腎容積が増大し、腎機能低下速度が速まる懸念も報告されている<sup>21)</sup>。また、ラット5/6腎摘モデルに対してPHD阻害薬であるL-mimosineを長期（第2～12週）、中期（第4～12週）、後期（第8～12週）に分けて投与したところ、腎機能や尿細管間質のコラーゲンIII沈着、マクロファージ浸潤は中期投与群では改善したものの、長期投与群ではむしろ悪化し、後期投与群では変化がないという結果になった<sup>22)</sup>。さらに遺伝子改変マウスでUUOモデルを作製し、HIFの活性化部位ごとに及ぼす影響の違いを検討したところ、全身性にHIFを活性化したマウス(Ubc Vhl-/-)では炎症細胞浸潤と線維化が抑制され、骨髄由来細胞特異的にHIFを活性化したマウス(LysM Vhl-/-)では炎症細胞浸潤が有意に抑制されていた<sup>23)</sup>。他方、近位尿細管特異的にHIF-1αをノックアウトしたマウス(PEPCK HIF1a-/-)では、UUOモデルにおいて近位尿細管のEMT

が抑制されて炎症細胞浸潤と線維化がそれぞれ軽減していくことから、尿細管上皮の HIF-1 は向線維化に作用する可能性も示唆されている<sup>24)</sup>。

## 8. 代謝性腎疾患における PHD 阻害薬の役割

糖尿病の合併症としての腎障害は古典的には糖尿病(性)腎症と呼ばれ、糖尿病発症後 5~10 年以上の期間を経て微量アルブミン尿、顕性タンパク尿へと移行してその後腎不全に至ると考えられてきた。一方で近年、レニン・アンジオテンシン系 (RAS) 阻害薬の全世界的な普及などを背景として糖尿病を合併する CKD の臨床像に変化が認められ、約 20~50% の患者においては eGFR が 60 未満に至った段階でアルブミン尿を呈していないことが明らかとなり、糖尿病の代謝障害を背景とする腎機能障害を「糖尿病性腎臓病 (diabetic kidney disease : DKD)」と再定義されるに至った。従来よりアルブミン尿は残腎機能の低下速度と密接に関連する因子として認識されているが、アルブミン尿とは独立した病態加速因子の存在にも注目が集まっている。

慢性低酸素は DKD においてもそのような候補因子の一つである。ヒト糖尿病腎における酸素化の状態を BOLD-MRI によって評価すると、病期が進展するに伴って皮質表層の低酸素が顕著になり、低酸素の程度と eGFR の間には相関関係が認められている<sup>25)</sup>。低酸素の成因は多因子的であり、尿細管細胞のミトコンドリア呼吸鎖に依存する酸素消費が健常腎の尿細管と比較して約 40%亢進することや<sup>26)</sup>、病理組織学的に尿細管周囲毛細血管網面積と血清 Cre 値が逆相関することなどが報告されている<sup>27)</sup>。糖尿病の腎臓においては前述のように HIF の発現・機能が不適切に減弱している可能性が示唆されていることや<sup>9)</sup>、いくつかのヒト臨床試験において PHD 阻害薬によるコレステロール低下作用が報告され<sup>28)</sup>、その責任因子として insulin-induced gene 2 (Insig-2) が特定されたことから<sup>29)</sup>、PHD 阻害薬投与下における DKD の病態への影響に興味が持たれた。

BTBR/obob マウスは 6 週齢より高血糖、8 週齢よりアルブミン尿と腎組織変化が顕在化する 2 型糖尿病モデルマウスである。本マウスにおいて 4~22 週齢に PHD 阻害薬を投与したところ、アルブミン尿が有意に減少した。本影響は糸球体上皮・内皮細胞障害の改善を伴い、糸球体より mRNA を単離して遺伝子発現を網羅的に解析したところ、濃縮されたシグナル伝達経路の多くが細胞外基質のリモデリングや細胞-細胞外マトリックス相互作用に関連するものであったことから、糸球体の構造的改善をもたらした可能性が示唆された。さらに実薬投与群では尿中 MCP-1 が減少し、糸球体へのマクロファージ浸潤も抑制されていた。本モデルにおいて糖・脂質代謝への影響を調べたところ、摂餌量には影響しない一方で体重増加は抑制され、インスリン抵抗性が改善していた。また総コレステロールが低下し、白色脂肪細胞の肥大・炎症細胞浸潤が抑制され、アディポネクチンが上昇していた。アディポネクチン受容体アゴニストである AdipoRon は培養メサンギウム細胞にお

いて AMPK を活性化させ、MCP-1 産生抑制に寄与していた。以上により、PHD 阻害薬による HIF の活性化は BTBR/obob マウスに対して、多面的な機序を介してアルブミン尿を減少させるものと考えられた<sup>30)</sup>。また、PHD 阻害薬によるアルブミン尿の抑制や糸球体炎症細胞浸潤の抑制、糸球体硬化像の軽減は高脂肪食負荷による肥満関連腎症モデルでも認められている<sup>31)</sup>。

## 9. まとめ

HIF 活性化薬としての PHD 阻害薬は、腎臓病領域においてとりわけ強く切望されてきた薬剤である。EPO の産生誘導や鉄動員の効率化・最適化を介する腎性貧血治療に関しては現在大規模臨床試験が進行中であり、保存期 CKD 患者や透析患者を対象にその有効性、安全性が報告されている。また、HIF の活性化は腎臓局所における低酸素応答を強化することにもつながり、尿細管間質の慢性低酸素を病態の最終共通経路に有する CKD の病態修飾にも関与する可能性がある。上記のような期待が大きい一方、担がん患者における腫瘍増殖や網膜症の増悪、高カリウム血症など様々な生体への影響も懸念されることから、今後慎重な第Ⅳ相試験において知見を蓄積することが望まれる。

**著者の利益相反**：田中哲洋（協和キリン株式会社、日本ばこ産業株式会社）。

## 文献

- 1) Nangaku M. J Am Soc Nephrol. 2006;17:17-25.
- 2) Tanaka T. Clin Exp Nephrol. 2016;20:835-844.
- 3) Chen W, et al. Nephrol Dial Transplant. 2011;26:1592-1599.
- 4) Sugiyama K, et al. Nephrol Dial Transplant. 2018 [Epub ahead of print]
- 5) Pruijm M, et al. Kidney Int. 2018;93:932-940.
- 6) Warnecke C, et al. FASEB J. 2004;18:1462-1464.
- 7) Rosenberger C, et al. J Am Soc Nephrol. 2002;13:1721-1732.
- 8) Tanaka T, et al. Nat Rev Nephrol. 2013;9:211-222.
- 9) Rosenberger C, et al. Kidney Int. 2008;73:34-42.
- 10) Yamanaka S, et al. PLoS One. 2014;9:e102311.
- 11) Souma T, et al. J Am Soc Nephrol. 2016;27:428-438.
- 12) Sugahara M, et al. Kidney Int. 2017;92:306-312.
- 13) Provenzano R, et al. Am J Kidney Dis. 2016;67:912-924.
- 14) McCullough PA, et al. Am J Nephrol. 2013;37:549-558.
- 15) Chen N, et al. N Engl J Med. 2019 [Epub ahead of print]
- 16) Chen N, et al. N Engl J Med. 2019 [Epub ahead of print]
- 17) Matsumoto M, et al. J Am Soc Nephrol. 2003;14:1825-1832.
- 18) Weidemann A, et al. J Am Soc Nephrol. 2008;19:486-494.
- 19) Ito M, et al. Jpn J Nephrol. 2019;61:296.
- 20) Bernhardt WM, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:21276-21281.
- 21) Kraus A, et al. Kidney Int. 2018;94:887-899.
- 22) Yu X, et al. Nephrol Dial Transplant. 2012;27:3110-3119.
- 23) Kobayashi H, et al. J Immunol. 2012;188:5106-5115.
- 24) Higgins DF, et al. J Clin Invest. 2007;117:3810-3820.
- 25) Yin WJ, et al. Eur J Radiol. 2012;81:1426-1431.
- 26) Baines A, et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2002;283:F286-F293.
- 27) Bohle A, et al. Nephrol Dial Transplant. 1998;13:556-563.
- 28) Provenzano R, et al. Clin J Am Soc Nephrol. 2016;11:982-991.
- 29) Hwang S, et al. J Biol Chem. 2017;292:9382-9393.
- 30) Sugahara M, et al. Jpn J Nephrol. 2019;61:295.
- 31) Saito H, et al. Lab Invest. 2019;99:1217-1232.

## Multiple consequences of HIF activation in CKD

Tetsuhiro Tanaka

*Division of Nephrology and Endocrinology, The University of Tokyo School of Medicine*

**Abstract.** Tubulointerstitial hypoxia negatively influences the balance between injury and repair, and serves as a final common pathway in chronic kidney disease (CKD). Studies on erythropoietin (EPO) transcription led to the identification of hypoxia inducible factors (HIFs) and their key regulators, prolyl hydroxylases (PHDs). Based on these, several small molecule PHD inhibitors are developed for the treatment of anemia in CKD, which are currently in phase II/III clinical trials. In addition to treating anemia, application of PHD inhibitors may have several potential implications; there is a promising view that activation of the HIF signaling might protect the ischemic kidney from injury. This is extensively tested in multiple acute kidney injury models, whereas knowledge is limited in the context of CKD. Some studies demonstrate the protective effects of ameliorating inflammation and reducing oxidative stress, whereas negative consequences of sustained HIF activation, such as renal fibrosis and aggravation of polycystic kidney disease, are also reported. Recent human clinical studies reported amelioration in glucose and lipid metabolism, which may be beneficial for the treatment of metabolic kidney disorders. Renal consequences of PHD inhibitors are likely determined by multiple systemic effects of sustained HIF activation and may thus differ depending on the clinical context and the pathological stages.