

HIF スタビライザー：PHD 阻害薬*

伊藤麻里江** 田中哲洋** 南学正臣**

はじめに

腎性貧血は慢性腎臓病で高頻度に見られる合併症で、その原因は腎臓での erythropoietin (EPO) 産生低下である。1980年代までは輸血によって治療されており、抗赤血球抗体や抗 HLA 抗体の産生、感染症、鉄過剰などのさまざまな問題や供給不足のため、ある程度の Hb 低値は許容されていた。1980年代末から遺伝子組換えヒト EPO (rHuEPO) 製剤が腎性貧血に対するより効率的で安全な治療として確立し、早期から介入がなされるようになって慢性腎臓病患者の生活は大きく改善した。その後、rhEPO 製剤から半減期が長くなるよう改良された、アミノ酸置換により糖化修飾部位を付加したダルベポエチン α (ネスプ®) や、ポリエチレングリコール分子を結合した持続性エリスロポエチン受容体活性化薬 (ミルセラ®) が開発された [まとめて erythropoiesis-stimulating agents (ESA) 製剤と呼ぶ]。また、1990 年以降 EPO 遺伝子の発現調節因子である低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor : HIF) が同定され¹⁾、その後その主要な発現調節因子であるプロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase domain-

containing protein : PHD) が同定され、続いて低分子の PHD 阻害薬が開発された。従来の ESA 製剤には注射薬しかないことや、そのほかの問題 (血圧上昇、痙攣、シャントを含めた血栓塞栓症の増加) を受けて、経口投与可能なこの代替薬が関心を集めている。

I 適 応

前述のとおり、PHD 阻害薬は腎性貧血の治療薬として期待されており、国内外にて保存期腎不全、透析患者を対象に第Ⅱ相、第Ⅲ相試験が進行中である。ほかに、下記 (Ⅱ. 機序参照) に示すような多面的な HIF の効果を受けて、二次性貧血に対する適応、鎌状赤血球症における胎児ヘモグロビンの増加、虚血/虚血後灌流状態に対する保護 (例：心血管手術前の脳梗塞・急性腎障害予防、脳死腎移植前のドナーへ投与することによる虚血後灌流状態・delayed graft function 予防)、創傷治癒への効果が期待されて、今後の知見の蓄積が待たれる^{2,3)}。

* Hypoxia-inducible factor stabilizer : prolyl hydroxylase domain-containing protein (or enzyme) inhibitor

key words : 腎性貧血, hypoxia-inducible factor (HIF), prolyl hydroxylase domain-containing protein (or enzyme) (PHD) 阻害薬, erythropoiesis-stimulating agents (ESA) 製剤

** 東京大学医学系研究科腎臓・内分泌内科 Ito Marie, TANAKA Tetsuhiro, NANGAKU Masaomi
〔〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1〕

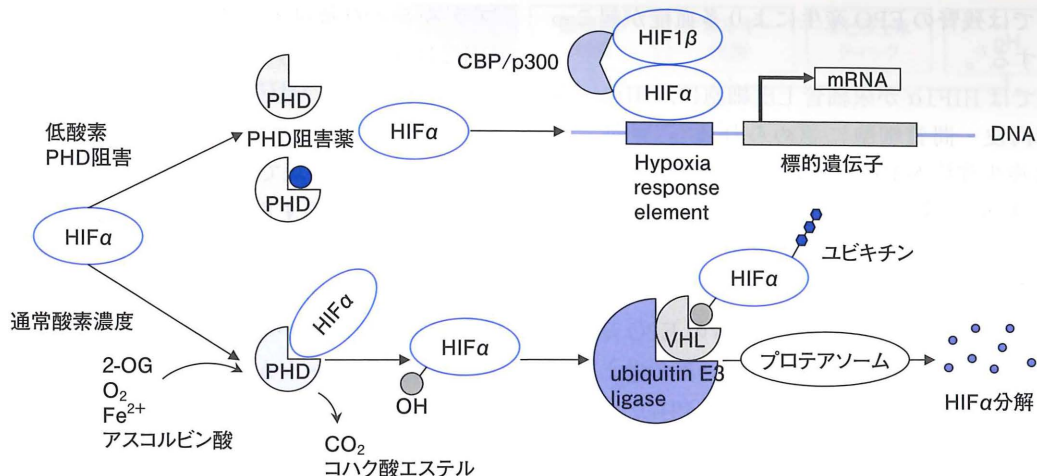


図1 HIF 経路と PHD による HIF 標的遺伝子の転写調節

低酸素下や PHD 阻害などにより PHD が不活性化していると（上段），HIF は各種の標的遺伝子転写を調整する。通常酸素濃度下などで PHD が活性化していると（下段），HIF2 α は水酸化され，続いて von Hippel Lindau（VHL）ubiquitin E3 ligase と結合し，ユビキチン化が起こる。ユビキチン化された HIF2 α はプロテアソームにより分解される。HIF 分解における律速段階は PHD による水酸化であり，この段階が分子の酸素センサーとして働く。

OG : oxoglutarate

（文献1）より引用，改変）

II 機序

1. Hypoxia-inducible factor (HIF)

HIF は低酸素条件下で安定化する転写因子で，特定の標的遺伝子のエンハンサー（hypoxia response element）に結合してその転写を促進する³⁾。標的遺伝子は EPO を含め低酸素に対する適応反応に関連するものや，直接的な関連性が明確でないものを含めて数百に及ぶ。

HIF は 1 α ，2 α または 3 α と，1 β の 2 つのサブユニットから構成される。HIF1 β が恒常的に発現する一方で，酸素分子の存在下で HIF α は PHD による 2 つのプロリン残基の水酸化を受け，ユビキチンリガーゼ複合体を構成する von Hippel Lindau（VHL）蛋白と結合し，プロテアソーム分解を受ける（図1）。生理的な酸素濃度の範囲にわたって PHD による水酸化率は変化するため，PHD が生体内の実質的な低酸素センサーとして機能する。PHD には 1～3 のサブタイプがあり，膜貫通型 PHD 蛋白も HIF α を水酸化できる可能

性がある。

ほかにも，PHD と同じスーパーファミリーに属する 2-oxoglutarate（OG）-dependent dioxygenase factor inhibiting HIF-1（FIH-1）は HIF α の C 末端付近のアスパラギン残基の水酸化を行い，HIF が活性化補助因子の CBP/p300 と結合するのを阻害することにより HIF の働きを制御している⁴⁾。

2. 腎での効果

EPO は下記（3. 肝での効果参照）の場合を除いて，約 90% が腎皮質と髄質外層の皮質尿細管周囲線維芽細胞で産生される。腎での EPO 産生が障害されても，肝をはじめとする他臓器（星状膠細胞，骨細胞）での代償は少なくとも不十分であるが，その理由は明らかでない。

また，末期腎不全の患者においても，EPO 産生は完全には消失していない。急性の低酸素や貧血に対する反応はみられたり⁵⁾，酸素分圧の低い高地で ESA 製剤の必要量が少なかったり⁶⁾，移植後

患者では残腎の EPO 産生により多血症が起こったりする⁷⁾。

腎では HIF1 α が尿細管上皮細胞に、HIF2 α が血管内皮・間質細胞に認められる⁷⁾。腎臓での EPO 産生部位が HIF2 α の発現部位に一致することや、EPO を産生する間質線維芽細胞では低酸素に反応して HIF2 α が活性化され、HIF1 α の活性化が検出できないこと⁸⁾、HIF2 α ノックダウンマウスが貧血を呈すること⁹⁾から、腎の EPO 産生では HIF2 α が主要な役割を担っていると考えられる。また、HIF α との結合能を欠く PHD2 のヘテロ変異によって多血症を呈する一方¹⁰⁾、PHD1、PHD3、FIH それぞれの単独欠損マウスではヘマトクリットの増加がないことから^{4,11)}、PHD2 が HIF2 α 分解に最も寄与していると考えられる。

3. 肝での効果

EPO は、胎児期・出生後早期は肝の星細胞・肝細胞で産生される。成人でも、肝炎回復期の肝再生に伴い EPO が産生されていると考えられている¹²⁾。

肝でも腎と同様、HIF2 α により低酸素への反応が司られているようだが、PHD2 単独の不活性化では EPO 産生は効率的に増加しない。一方、PHD 1-3 の2つ以上の阻害により EPO 産生が増加し、すべての PHD 阻害によって EPO 産生は最大化する¹³⁾。このことより、腎臓および肝臓における EPO 産生の最大化には異なった PHD 阻害プロファイルが必要であると考えられる。末期腎不全患者では残腎の大きさ、障害の程度にばらつきがあるので、現時点では肝の PHD もよい阻害のターゲットのようである。実際、両腎がない患者でも PHD 阻害薬が貧血改善に効果を示す¹⁴⁾。

4. EPO 産生以外の on-target 効果 (図 2)

1) 利益となりうる効果

(1) 鉄利用の改善

HIF には EPO を介さずに、鉄の利用や吸収に関与して造血亢進する経路がある。HIF1 はトランスフェリンやトランスフェリン受容体、セルロ

プラスミンの発現を誘導して鉄利用を亢進し、HIF2 は duodenal cytochrome b や divalent metal transporter などの遺伝子群の発現を制御して鉄吸収を促進する。

また、HIF は肝臓での hepcidin 産生を抑えることで鉄利用を促進する。Hepcidin は体内での過剰な鉄取り込みを抑制する生体調節機構であり、鉄排出ポンプ ferroportin の細胞内取り込み・分解を介して腸上皮細胞からの鉄吸収や肝細胞からの放出、マクロファージからのリサイクルを抑制している。慢性腎機能障害の程度に相関して hepcidin は高値となる傾向があり、Hb 値とは逆相関する。ESA 製剤も hepcidin を減少させる可能性が指摘されているが、赤芽球における erythroferrone の産生増加によると考えられている²⁾。PHD 阻害薬では EPO を介する・介さない両方の機序により hepcidin を低下させることが報告されており、さらに効率的な貧血改善につながる可能性がある。実際に PHD 阻害薬を用いて腎性貧血治療を行った際、従来の ESA 製剤と比較して鉄投与量を減少できるかが重要な問題である。

(2) 心血管イベントの減少

PHD 阻害薬は、HIF による血圧低下、耐糖能の改善、脂質代謝異常の改善、そして虚血に対する保護効果を通じて心血管イベントを減らす可能性がある。しかし、これらが本当に死亡率や合併症の減少といった hard endpoint に寄与するかについては、現在行われている大規模臨床試験の結果が待たれる。

(3) 腎保護

虚血性急性腎障害で、HIF は腎保護的に働くことが動物実験では明らかになっている。慢性腎臓病では尿細管間質の低酸素状態が末期腎不全に至る final common pathway であり、低酸素状態に比して HIF が十分活性化されていないことから、HIF が治療ターゲットとして期待されている。しかし現時点で不明な点は多く、さらなる研究が必要である¹⁵⁾。

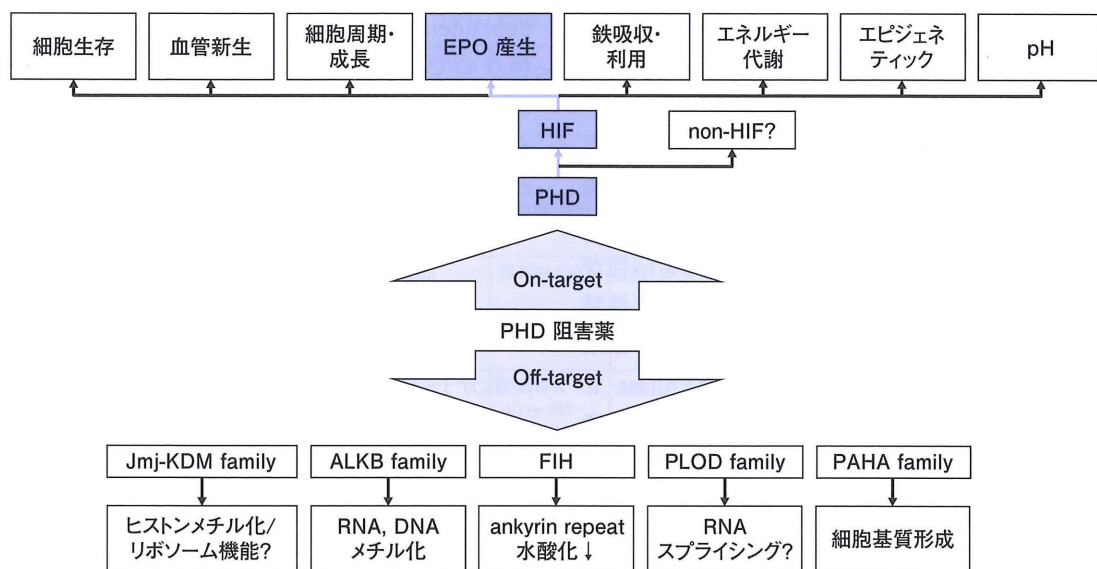


図2 PHD 阻害薬の on-target 効果と off-target 効果

腎性貧血ではPHD阻害によりHIFを活性化し、EPO産生を増加させることが治療の主要なターゲットとなる。HIFを活性化させると、別のon-target効果ももたらす（上段参照）。また、PHD阻害も、PHDと構造が似ているほかの2-OG dependent dioxygenaseを阻害することでHIFを介さないoff-target効果をもたらす可能性があり、現時点では不明な点も多い（下段参照）。

ALKB: α -ketoglutarate-dependent dioxygenase, FIH: factor inhibiting HIF, Jmj-KDM: Jumonji domain-containing histone-lysine(K) demethylase, PAHA: prolyl-4-hydroxylase, PLOD: procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase
(文献1)より引用、改変)

2) 今後検討されるべき課題

(1) 腎明細胞癌、褐色細胞腫 (von Hippel Lindau 病に関連して)

von Hippel Lindau 病はVHL蛋白をコードするVHLの一方のcopyに遺伝子変異があり、もう一方のcopyの後天的な体細胞変異により腎明細胞癌や褐色細胞腫、網膜・小脳・脊髄の血管芽腫が起こる病気で、VHL変異によるHIF分解障害が病因の1つと考えられている。特に孤発性腎明細胞癌においては、von Hippel Lindau 病と関連なく過半数でbiallelicなVHL不活性化が指摘され¹⁶⁾、HIFが発現を促進する蛋白のオートクリン作用が腫瘍の増殖・生存に関与しているため³⁾、PHD阻害薬によるHIF活性化とこれらの関連が危惧されている。ただし、マウスとvon Hippel Lindau病患者で、VHL不活性化と付随するHIF活性化のみでは腎上皮細胞の明らかな細胞増殖は

認めないため、腎明細胞癌発症にはほかの要因が必要と考えられる。

褐色細胞腫とHIFの関連はさらに不明瞭で、HIF制御能を完全に失うようなVHL変異で褐色細胞腫のリスクは逆に減少する¹⁷⁾。しかし、HIF2A、PHD2、PHD1の変異は褐色細胞腫発症と関連が示されており、HIF-PHD-VHL経路との関連があることは間違いなさそうである。仮説としては、発達段階における部分的なHIF経路の不活性化のみ（ただし、VHL蛋白機能の完全喪失ではない）が褐色細胞腫形成を促進すると考えられる²⁾。

(2) ほかの悪性腫瘍

悪性腫瘍は低酸素により化学・放射線療法への耐性が増すことが広く知られており、原発巣のHIF1 α 、HIF2 α の発現量が多いと各種悪性腫瘍で予後不良となる。以上より、HIF活性化がオート

クリンシグナル、代謝の再プログラミング、血管新生、免疫抑制、浸潤・転移の促進を介して悪性腫瘍を増悪させる可能性が危惧されている³⁾。

しかし、少数ながら HIF 異常活性化による先天的赤血球増加症〔VHL 両対立遺伝子変異 (R200W) による Chuvash polycythemia, HIF2 活性が上昇する HIF2A 変異, PHD2 酵素活性が低下する PHD2 変異〕の患者では明らかな悪性腫瘍の増加はなかった。また、PHD 阻害薬 GSK 1278863 (GlaxoSmithKline 社) を用いた phase II の臨床試験において、保存期 CKD 患者や維持透析患者において血清 VEGF 値は治療によって影響を受けなかったことも安心材料の 1 つとなりうる¹⁸⁾。

(3) 肺高血圧

HIF2A 変異患者に重症肺高血圧が合併することがある。また、Chuvash polycythemia 患者の肺動脈圧は健常人より高値で、低酸素に対する肺動脈収縮反応がより強い¹⁹⁾。マウスの Chuvash polycythemia モデルは HIF を介した肺高血圧を発症する²⁰⁾。以上より、持続的な HIF 活性化が肺高血圧を起こす懸念がある。

(4) 血栓塞栓症

Chuvash polycythemia 患者の平均寿命は健常人より短く (65 歳までの生存割合が前者が 29% に対し後者は 64%)²¹⁾、原因は完全には解明されていないが血栓塞栓症の著明な増加が関連している。統計学的有意差はなかったが、治療的瀉血を受けた Chuvash polycythemia 患者は未治療患者と比較して 5.6 倍血栓塞栓症発症率が少なかった²¹⁾。これについてはさらなる前向き研究が必要である。

(5) そのほか

動物や *in vitro* 実験では、アンジオテンシン誘発性血管リモデリングやコレステロール血栓の増悪の可能性が示唆されている。腎間質線維化を促進して CKD を増悪させるかについては相反する実験結果があり、現時点で明らかでない¹⁾。

5. Off-target 効果 (図 2)

PHD は幅広い生理学的機能をもつ 2-OG-

dependent dioxygenase スーパーファミリーの一種なので、PHD 阻害薬が別の 2-OG-dependent dioxygenase の阻害効果をもつ可能性があり、現在少なくとも一部の 2-OG-dependent dioxygenase を一定程度は阻害することがほぼ確実に示されている²⁾。

III 特 長

低分子であることから経口投与が可能となり、単純な (おそらく安価な) 製造が可能であり、安定性がある。また、経口投与なので抗原性が低い²⁾、従来の ESA 製剤に認められる稀ではあるが、重篤な合併症である赤芽球癆のリスクは格段に低いと考えられる。

IV 臨床応用への道のり

HIF の標的は EPO 産生のほか多岐にわたり、有益な場合と有害な場合がともに考えられる。経口投与が可能となる点は魅力的だが、総合的に hard endpoint (死亡率、心血管イベントの減少) を改善するかが現在の焦点である。2016 年 3 月時点で、6 種類の PHD 阻害薬が phase I-III の国内外で臨床試験中である (表)。最大 2 年間 PHD 阻害薬を投与して効果や有害事象を評価し、2019 年頃までに phase III の結果が判明する²⁾。これらとさらなる臨床試験により、忍容性と効果が臨床応用に足るか、そして最終的に hard endpoint を改善するかが明らかになることが期待される。

■ おわりに

PHD 阻害薬は低分子であることから、従来の ESA 製剤と比べて侵襲性、コスト、安定性に優れる。また、EPO 産生のみでなく多面的な効果を持ち、鉄剤投与量の減少を含めた別の効果も期待できる一方で、安全性は悪性腫瘍リスク増加の可能性を含め、確立していない。臨床試験を通じてこれらが明らかになり、腎性貧血治療がより一層発

表 PHD 酵素阻害薬の臨床試験

薬剤名	臨床試験 (相)	NCT reference	研究デザイン	患者	人数 (人)	control	治療期間	primary outcome
FG-2216	II	NA*	-	-	-	-	-	-
FG-4592 ASP1517 Roxadustat	III (US/EU)	02174731	randomized open label	HD or PD	1,425	エポエチン α	1~2 年 [†] (2014/7~2017/2)	有害心イベント
		02174627	randomized double-blind	保存期 CKD	2,600	placebo	1~2 年 [†] (2014/6~2017/2)	有害心イベント
		02021318 (DOLOMITES)	randomized open label	保存期 CKD	570	ダルベポエチン α	2 年 (2014/2~2017/7)	救済措置なく得られた Hb 値の反応
		01887600 (ALPS)	randomized double-blind	保存期 CKD	600	placebo	1~2 年 (2013/5~2016/6)	救済措置なく得られた Hb 値の反応
		0205231 (HIMALAYAS)	randomized open label	初回導入 HD or PD	750	エポエチン α	1~3 年 (2013/12~2017/6)	ベースラインからの平均 Hb 変化値
		02273726	randomized open label	維持 HD or PD	600	エポエチン α	1~3 年 (2014/12~2018/7)	ベースラインからの平均 Hb 変化値
		02278341 (PYRENEES)	randomized open label	維持 HD or PD	750	ダルベポエチン α	2 年 (2014/11~2018/7)	ベースラインからの平均 Hb 変化値
		01750190	randomized double-blind	保存期 CKD	600	placebo	≥1 年 (2012/11~2017/6)	救済措置なく得られた Hb 値の反応
	II (日本)	01964196	randomized double-blind	保存期 CKD	100	placebo	28 週 (2013/8~2015/3)	Hb 上昇の割合
BAY85-5934 Molidustat	II b	02021409 (DIALOGUE 2)	randomized open label	保存期 CKD	120	ダルベポエチン α	16 週 (2014/1~2015/9)	Hb 値の変化
		01975818 (DIALOGUE 4)	randomized open label	維持 HD	188	エポエチン α or β	16 週 (2013/1~2015/9)	Hb 値の変化
		02021370 (DIALOGUE 1)	randomized double-blind	保存期 CKD	170	placebo	16 週 (2014/2~2015/9)	Hb 値の変化
		02055482 (DIALOGUE 3)	NCT 02021409/ 02021370 の延長	保存期 CKD	290	エポエチン α or β , placebo	≤3 年 (2014/6~2018/11)	Hb 値の変化
		02064426 (DIALOGUE 5)	NCT 01975818 の 延長	維持 HD	188	ダルベポエチン α	≤3 年 (2014/6~2018/11)	Hb 値の変化
GSK1278863 Daprodustat	II b	01977573	randomized single-blind	保存期 CKD	252	エポエチン	24 週 (2013/10~2015/5)	Hb 値の変化
		01977482	randomized double-blind	維持 HD	217	placebo or rHuEPO	24 週 (2013/11~2015/2)	Hb 値の変化
	II a	02075463	open label	エポエチン抵抗性 HD	20 [‡]	なし	16 週 (2014/6~2016/3)	Hb 値の変化
	日本	02019719	randomized double-blind	維持 HD	97	placebo	4 週 (2013/11~2014/8)	Hb 値の変化
		01587924	randomized double-blind	保存期 CKD	86	rHuEPO	4 週 (2012/5~2013/5)	Hb 値の変化
		01587898	randomized double-blind	保存期 CKD	74	placebo	4 週 (2012/5~2013/5)	Hb 値の変化
		01047397	randomized single-blind	維持 HD or 保存期 CKD	107	placebo	4 週 (2010/3~2011/2)	Hb 値の変化
AKB-6548	II b	01906489	randomized double-blind	保存期 CKD	210	placebo	20 週 (2013/7~2014/10)	Hb ≥11.0 or ≥ + 1.2 g/dL を達成した割合
	II	02260193	non-randomized open label	維持 HD	90	なし	16 週 (2014/9~2015/7)	Hb 値の変化
JTZ-951	I	NA	-	-	-	-	-	-

NA : no active studies registered at ClinicalTrials. gov

* 先行した proof-of-concept (POC) 試験参加者が劇症肝炎で死亡したため中止 (後に薬剤との関連は否定された)

† 予測治療期間。イベントによって変更可能性あり, ‡ 予定患者人数

(文献 1) より引用, 改変)

展することが望まれる。

文 献

- 1) Semenza GL, Wang GL : A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12** : 5447-5454, 1992
- 2) Maxwell PH, Eckardt KU : HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anaemia and beyond. *Nat Rev Nephrol* **12** : 157-168, 2016
- 3) Semenza GL : Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol* **9** : 47-71, 2014
- 4) Zhang N, Fu Z, Linke S, et al : The asparaginyl hydroxylase factor inhibiting HIF-1 α is an essential regulator of metabolism. *Cell Metab* **11** : 364-378, 2010
- 5) Blumberg A, Keller H, Marti HR : Effect of altitude on erythropoiesis and oxygen affinity in anaemic patients on maintenance dialysis. *Eur J Clin Invest* **3** : 93-97, 1973
- 6) Brookhart MA, Schneeweiss S, Avorn J, et al : The effect of altitude on dosing and response to erythropoietin in ESRD. *J Am Soc Nephrol* **19** : 1389-1395, 2008
- 7) Aeberhard JM, Schneider PA, Vallotton MB, et al : Multiple site estimates of erythropoietin and renin in polycythemic kidney transplant patients. *Transplantation* **50** : 613-616, 1990
- 8) Paliege A, Rosenberger C, Bondke A, et al : Hypoxia-inducible factor-2 α -expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int* **77** : 312-318, 2010
- 9) Kojima I, Tanaka T, Inagi R, et al : Protective role of hypoxia-inducible factor-2 α against ischemic damage and oxidative stress in the kidney. *J Am Soc Nephrol* **18** : 1218-1226, 2007
- 10) Percy MJ, Zhao Q, Flores A, et al : A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** : 654-659, 2006
- 11) Takeda K, Ho VC, Takeda H, et al : Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol* **26** : 8336-8346, 2006
- 12) Kolk-Vegter AJ, Bosch E, van Leeuwen AM : Influence of serum hepatitis on haemoglobin level in patients on regular haemodialysis. *Lancet* **1** : 526-528, 1971
- 13) Minamishima YA, Kaelin WG Jr : Reactivation of hepatic EPO synthesis in mice after PHD loss. *Science* **329** : 407, 2010
- 14) Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, et al : Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol* **21** : 2151-2156, 2010
- 15) Tanaka T : Expanding roles of the hypoxia-response network in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*, 2016 Feb 9 [Epub ahead of print]
- 16) Gnarr JR, Tory K, Weng Y, et al : Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* **7** : 85-90, 1994
- 17) Clifford SC, Cockman ME, Smallwood AC, et al : Contrasting effects on HIF-1 α regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mol Genet* **10** : 1029-1038, 2001
- 18) Holdstock L, Meadowcroft AM, Maier R, et al : Four-week studies of oral hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor GSK1278863 for treatment of anemia. *J Am Soc Nephrol* **27** : 1234-1244, 2016
- 19) Smith TG, Brooks JT, Balanos GM, et al : Mutation of von Hippel-Lindau tumour suppressor and human cardiopulmonary physiology. *PLoS Med* **3** : e290, 2006
- 20) Hickey MM, Richardson T, Wang T, et al : The von Hippel-Lindau Chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice. *J Clin Invest* **120** : 827-839, 2010
- 21) Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, et al : Congenital disorder of oxygen sensing : association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. *Blood* **103** : 3924-3932, 2004

*

*

*