

## 博士論文要約

### 慢性腎臓病の発症と進展に対する一酸化窒素デリバリーシステムの有用性評価

熊本大学大学院薬学教育部 医療薬学専攻 HIGO プログラム 4 年コース 薬剤学分野 大城 俊

慢性腎臓病 (CKD)は、腎機能低下に伴う死亡率及び心血管疾患リスクの増大が問題となる病態であり、その最終経路である末期腎不全は、透析治療や腎移植を余儀なくされる。また、CKD の重大な合併症である“腎性貧血”及び“腎線維化”は、CKD 患者の腎機能低下及び生命予後悪化の危険因子となる。従って、腎性貧血と腎線維化に対する包括的な治療介入は、CKD 進展においては透析導入数を低減させる上で画期的な取組みとなる。また、近年、急性腎障害 (AKI)の発症が CKD への移行リスクを増加させるという事実から、“AKI to CKD transition”的概念が確立された。AKI to CKD transition の抑止は CKD 患者数の減少のみならず CKD 合併症の抑制にも直結するため、目下の重要課題である。しかしながら、腎性貧血、腎線維化並びに AKI to CKD transition の三者を包括的に改善する治療法は未だ確立されていない。一酸化窒素 (NO)は、低酸素誘導因子 (HIF)活性化、抗炎症・抗酸化作用、ミトコンドリア活性化作用を有しており、上述した三者の腎病態を改善することが期待される。そこで本研究では、アルブミンを担体とした NO デリバリーシステムである S-ニトロソ化アルブミン (SNO-HSA)の腎性貧血、腎線維化並びに AKI to CKD transition に対する治療介入効果を検証した。

#### 1. 腎性貧血病態に対する SNO-HSA の有用性評価

ヒト腎近位尿細管上皮細胞株 HK-2 細胞及びヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞に対する SNO-HSA の添加により、両細胞内の NO 量が持続的に増加したことから、SNO-HSA は NO の細胞内送達を可能とする薬剤であることが示された。正常酸素条件下の HK-2 細胞に対して、SNO-HSA の添加により HIF-1 $\alpha$  の発現増加が認められた。また、低酸素条件下の同細胞に対しても、SNO-HSA は添加濃度依存的に HIF-1 $\alpha$  の発現増加、並びにその核内移行を促進させ、HIF 標的遺伝子である eNOS の発現を増加させた。さらに、低酸素条件下の HepG2 細胞に対しても、SNO-HSA の添加により、HIF 標的遺伝子であるエリスロポエチン (EPO)の時間依存的な発現増加に加え、VEGF の添加濃度依存的な発現増加を認めた。健常ラットに対する SNO-HSA の投与により、投与 4 日後から血中の赤血球 (RBC)及びヘモグロビン (Hb)の値が増加した。また、このとき SNO-HSA は造血効果の指標である網状赤血球数を増加させた。シスプラチン誘発性腎性貧血モデルに対して SNO-HSA の投与を行ったところ、Saline 群と比較して、持続的な血中 RBC 値及び Hb 値の増加を認めたことから、SNO-HSA の貧血改善効果が示された。以上の結果から、SNO-HSA が NO による HIF 活性化を介した EPO 産生を促進することで、腎性貧血病態を改善することを見出した。

#### 2. 腎線維化病態に対する SNO-HSA の有用性評価

マウスに対し、片側尿管結紮 (UUO)処置を行うことで、腎線維化モデルマウス作成した。UUO 処置 14 日後において、SNO-HSA は腎臓中ヒドロキシプロリン量及び間質領域におけるコラーゲン蓄積を抑制したことから、SNO-HSA による腎線維化抑制効果を確認した。また、SNO-HSA は UUO 処置による上皮間葉転換 (EMT)関連因子の発現変動及び微小血管の脱落を抑制した。SNO-HSA は HK-2 細胞に対する TGF- $\beta$  誘発の  $\alpha$ -SMA (筋線維芽細胞マーカー)の増加を抑制し、抗線維化作用を発揮した。UUO 処置 7

日後において、SNO-HSA は腎線維化を抑制するとともに、UUO 処置に伴う TGF- $\beta$ 、IL-6 及び  $\alpha$ -SMA の mRNA 発現量の増加を抑制した。一方で、SNO-HSA は UUO マウスにおける EPO の mRNA 発現の低下を有意に回復させた。よって、SNO-HSA は UUO 処置による線維化関連因子の発現変化を改善することで抗線維化効果を発揮することが示された。また、SNO-HSA は UUO 処置による 8-OHdG (酸化ストレスマーカー)の発現増加を抑制した。加えて、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞に対する LPS 刺激により増加した活性酸素種 (ROS)は、SNO-HSA の添加により抑制された。さらに、SNO-HSA の EPO 増加作用の結果を踏まえ、UUO マウスに対して EPO 製剤を投与したところ、抗線維化作用を発揮することが明らかとなった。つまり、SNO-HSA による抗線維化作用の一部は、SNO-HSA によって誘導された内因的な EPO が担うと推察された。以上の結果から、SNO-HSA は腎線維化病態におけるコラーゲンの過剰蓄積を抑制することに加え、筋線維芽細胞への形質転換、炎症、酸化ストレス及び線維化関連因子の発現変動といった線維化増悪に働く種々のイベントを改善することを見出した。

### **3. AKI to CKD transition に対する SNO-HSA の有用性評価**

マウスの両腎動静脈をクランプすることで腎虚血再灌流誘発性 AKI to CKD transition モデルマウスを作成した。SNO-HSA 投与群では腎機能の回復傾向が認められた。腎線維化マーカーの発現増加は、SNO-HSA により抑制された。この結果と一致し、SNO-HSA 投与群では、線維化促進因子の発現量の増加を抑制した。また、SNO-HSA は腎組織障害を抑制した。さらに、SNO-HSA は炎症反応や酸化ストレスによる各病態マーカーの増加を抑制した。以上の結果より、SNO-HSA は AKI から CKD へと移行する過程の病態イベントを包括的に改善可能であることが示された。In vitro において、SNO-HSA は腎保護分子の発現を誘導した。また、SNO-HSA は腎 I/R マウスにおける腎保護分子発現を促進した。つまり、SNO-HSA はこれらの分子の発現増加を介して腎保護作用を発揮する可能性が示された。

以上、本研究では、SNO-HSA が NO に起因する HIF の活性化、炎症並びに酸化ストレスの軽減化を介して腎性貧血並びに腎線維化を制御することを初めて明らかにした。さらに SNO-HSA が CKD 移行リスクとなる AKI to CKD transition に対し、腎保護分子の発現増加作用を介して尿細管障害や線維化を抑制することを実証した。本邦では、超高齢社会を迎え、末期腎不全患者及び透析導入数の増加が危惧されている現状を鑑みると、本研究成果は、CKD の発症及び進展過程をシームレスに治療可能な新規治療薬を開発する上での有用な基礎資料になるものと思われる。