

インターロイキン1受容体関連キナーゼ4 (IRAK-4) 阻害剤
AS2444697 の腎疾患モデルにおける薬効評価および奏功機序の解析

2022年1月

近藤光量

インターロイキン1受容体関連キナーゼ4 (IRAK-4) 阻害剤
AS2444697 の腎疾患モデルにおける薬効評価および奏功機序の解析

筑波大学大学院
理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
生命産業科学学位プログラム
博士（生物工学）学位論文

近藤 光量

Abstract

Renal inflammation is a final common pathway of chronic kidney disease (CKD) including diabetic nephropathy (DN), which is the leading cause of end-stage renal disease and is associated with high cardiovascular risk and significant morbidity and mortality. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase 4 (IRAK-4) is a pivotal molecule for IL-1 receptor- and Toll-like receptor-induced activation of proinflammatory mediators. In this study, it has been hypothesized that if inflammation plays a key role in renal failure, then the anti-inflammatory effect of IRAK-4 inhibitor should be effective in improving CKD. The renoprotective properties of IRAK-4 inhibitor AS2444697 in 5/6 nephrectomized (Nx) rats as a model of CKD and in KK/Ay type 2 diabetic mice were investigated. The results showed that repeated administration of AS2444697 significantly reduced urinary protein excretion and prevented the development of glomerulosclerosis and interstitial fibrosis and showed beneficial effects on renal function in 5/6Nx rats. In addition, AS2444697 improved renal injury, tubular injury markers, and glomerular podocyte injury markers in KK/Ay mice. Furthermore, AS2444697 attenuated plasma levels of proinflammatory cytokines in both 5/6Nx rats and KK/Ay mice. These results suggest that AS2444697 attenuates the progression of CKD and DN mainly via anti-inflammatory mechanisms through inhibition of IRAK-4 activity and may therefore represent a promising therapeutic option for patients in CKD including DN.

目次

略語	iii
第一章：序論	1
第二章：慢性腎臓病モデルにおける IRAK-4 阻害剤 AS2444697 の薬効評価と奏功機序の検討	14
第一節：背景	15
第二節：材料と方法	17
第三節：結果	22
第四節：考察	24
第三章：糖尿病性腎症モデルにおける IRAK-4 阻害剤 AS2444697 の薬効評価と奏功機序の検討	38
第一節：背景	39
第二節：材料と方法	41
第三節：結果	46
第四節：考察	48
第四章：総括	64
参考文献	74
謝辞	83
発表論文目録	84

略語

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACEi	Angiotensin converting enzyme inhibitor
ACR	Albumin creatinine ratio
AER	Albumin excretion rate
ALT	Alanine transaminase
ARB	Angiotensin type II receptor blocker
AST	Aspartate aminotransferase
AUC	Area under the curve
BUN	Blood urea nitrogen
CAM	Cell adhesion molecules
CCr	Creatinine clearance
CKD	Chronic kidney disease
CRP	C-reactive protein
DN	Diabetic nephropathy
eGFR	Estimated GFR
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESKD	End stage kidney disease
GalN	D-Galactosamine
GFR	Glomerular filtration rate
HE	Hematoxylin-eosin
HPLC	High performance liquid chromatography
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
I κ B	Inhibitor of kappa B
IL	Interleukin
IRAK-4	Interleukin – 1 receptor associated kinase-4

JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC	Methylcellulose
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
NAG	N-acetyl- β -D-glucosaminidase
NEFA	Non-esterified fatty acids
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
Nx	Nephrectomy
PAS	Periodic acid-schiff
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PK	Pharmacokinetics
RAAS	Renin-angiotensin-aldosterone system
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SBP	Systolic blood pressure
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
SGLT2	Sodium glucose cotransporter 2
STZ	Streptozotocin
T2D	Type 2 diabetes
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
UAE	Urinary albumin excretion
UP	Urinary protein
ZDF	Zucker diabetic fatty

第一章：序論

腎臓は糸球体とそれに続く尿細管から成るネフロン集合体で構成されており、ヒトのネフロンは左右の腎にそれぞれ約 100 万個存在する。糸球体において、血液を濾過することにより原尿が生成され、それに続く尿細管において、水や電解質、グルコース、アミノ酸などの生体に必要な成分が原尿から再吸収され、不要な成分を原尿中に分泌することが腎臓の重要な機能の 1 つとして知られている。また、腎臓は老廃物の排泄、水・電解質のバランス維持だけではなく、骨代謝の調節、赤血球数の調節、血圧・体液量の調節なども担っており、生体の恒常性維持において重要な役割を果たしている（奥田, 2000; 飯野, 2007）。

腎臓の重要な機能である糸球体濾過機能すなわち糸球体濾過率（GFR）が、主に高血圧、糖尿病や糸球体腎炎などの背景疾患に起因して持続的に低下する状態は、慢性腎臓病（CKD）として知られている。糸球体機能の低下に先立ってまず、糸球体バリアー機能としての基底膜陰性荷電や糸球体上皮細胞、内皮細胞が障害されると、尿中にアルブミンが漏出するため尿中アルブミン排泄量の増加として検出される。また、糸球体バリアー機能の障害がさらに進行すると分子量の大きい成分が原尿中へ漏出するため、尿中タンパク排泄量の増加としても検出される。そして、GFR が低下すると血液中のクレアチニン濃度が上昇、または血液中クレアチニン濃度から概算される estimated GFR（eGFR）値が低下する。現在、生化学検査の項目には、主に血液中クレアチニン濃度および尿中タンパク排泄量が腎臓における糸球体機能の指標として用いられている。日本における CKD の定義（Table 1-1）と重症度分類（Table 1-2）は、血液クレアチニン濃度から算出される eGFR 値と尿中タンパク、アルブミン排泄量で規定されている（日本腎臓学会, 2018）。

先進国では、成人人口の 10% 以上は CKD であると推定されており（Lopez-Novoa et al., 2010）、新たな国民病とも言われている。そのうち、CKD ステージ 5（G5）は末期腎不全（ESKD）と呼

ばれ、人工透析などの腎代替療法が必要となる状態である。人工透析は医療費圧迫の要因の 1 つとなっており、人工透析の 1 人あたり月額医療費は約 40 万円、年間総額は約 1.57 兆円と推計されている（厚生労働省, 2019）。また、日本透析学会からの報告によれば（日本透析学会, 2021）、2020 年末で慢性透析治療を受けている患者数は 347,671 人とされている。また、人口 100 万人あたりの透析患者数（有病率）は年々増加傾向であり、2020 年は人口 100 万人あたり 2,754.3 人で、国民 363.1 人に 1 人が透析患者であることになると報告されている（Figure 1-1）。よって、CKD ステージ 5 である ESKD への移行の抑制すなわち CKD の進行抑制は、透析移行の抑制に直結することになり、健康寿命の延伸とともに医療費適正化の観点においても社会的なニーズが高いとされている。

CKD 発症や進展のリスクとなる背景疾患として、高血糖、高血圧、糸球体腎炎などが挙げられるが、これらの疾患のなかで特に糖尿病に関しては有病率が急速に上昇しており、現在の予測では、2030 年までに糖尿病患者の数は世界で 4 億 3,900 万人に増加すると予測されている（Shaw et al., 2010）。糖尿病は、脳卒中や心血管疾患などの大血管合併症や、腎症、網膜症、神経障害などの微小管合併症を引き起こしやすいことも大きな問題となっている。そのうち糖尿病性腎症（DN）、すなわち高血糖に起因した CKD は、糖尿病における最も一般的な合併症の 1 つであり、糖尿病患者の約 3 分の 1 が DN に罹患していると言われている（Akmal, 2001）。また、日本透析学会からの慢性透析患者の原疾患割合の推移についての報告によれば（日本透析学会, 2021）、2011 年以降、透析へ移行する原因疾患の第 1 位が糖尿病となっている（Figure 1-2）。今後、CKD 患者数は主に糖尿病の罹患率の上昇により、さらに増加すると予想されていることから（van Dieren et al., 2010）、DN の進行抑制すなわち、DN を含む CKD の進行抑制は、特に医療ニーズ

が高いとされている。

前述したとおり、CKD において ESKD に至る最終共通経路の入り口として、主に高血圧、糖尿病、糸球体腎炎が考えられる。高血圧、糖尿病において、それぞれ降圧薬、抗糖尿病薬による治療によって、CKD の進行を遅らせることはできるが、根治療法ではないためその効果は充分ではない。一方で、糸球体腎炎において、ステロイドや免疫抑制薬による治療は、その多様かつ非選択的な機序に由来する副作用によって十分な効果を得ることができていないと考えられる (Figure 1-3)。しかしながら、ステロイドのような特異性のない抗炎症薬や非特異的な免疫抑制薬ではなく、疾患に特異的な炎症のみを抑制する薬剤であれば、副作用の懸念が少ない治療となり、十分な効果が得ることができると考えられた。

CKD において、炎症性サイトカインや炎症性マーカーは増加しており (Silverstein, 2009; Ortega and Fornoni, 2010)、慢性的な低レベルの炎症状態を特徴としていることが知られている。一方で、CKD を適応症として開発が進められている薬剤のうち、炎症抑制を機序とするものは少なく、単一の炎症性サイトカインなどを標的とする薬剤が散見される程度であり、CKD を適応として承認に至った薬剤はない状況が続いている。CKD や DN においては、様々な要因によって炎症が惹起されると考えられているため、感染症や一部の自己免疫疾患のように炎症の原因を特定することは困難であると考えられる。つまり、特定の炎症性サイトカインやその受容体を標的とした薬剤によって、そのシグナルを抑制してもその効果は充分でないと考えられた。そこで本研究では、炎症性サイトカイン産生および炎症応答におけるシグナル伝達経路の主要な分子として重要な役割を果たすことが知られているインターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4 (IRAK-4: Interleukin-1 Receptor Associated Kinase-4) に着目した (Li et al., 2002)。IRAK-4 は、主に免

疫細胞において LPS や遊離脂肪酸 (FFA)、IL-1 β /IL-18 などのリガンドの受容体である TLRs と IL-1/IL-18 受容体の下流のシグナル伝達経路に必須のキナーゼであり (Figure 1-4)、LPS や FFA、IL-1 β /IL-18 などのリガンドやその受容体は、CKD や DN における炎症への関与が示唆されているため、CKD や DN の病態における複数の炎症シグナルを IRAK-4 阻害により同時に抑制することによって高い有効性が期待できると考え、IRAK-4 阻害剤である AS2444697 (N-[3-carbamoyl-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-2-(2-methylpyridin-4-yl)-1,3-oxazole-4-carboxamide hydrochloride (1:1))の創製に至った (Figure 1-5)。

TLRs と IL-1/IL-18 受容体が活性化されると、アダプター分子である MyD88 との結合により IRAK-4 が誘導され、IRAK-1 のリン酸化や抑制性タンパクである I κ B の分解を介して NF- κ B を活性化させることから、IRAK-4 の調節は関節リウマチ、炎症性腸疾患等の炎症性疾患の治療に有用である可能性が示されている。一方で、糸球体腎炎などを除いて一般的には炎症性疾患に該当しない CKD や DN などの腎疾患における IRAK-4 阻害剤の有用性はこれまでにほとんど検証されていなかったため、本研究では、CKD モデルである 5/6 腎臓摘出 (Nx) ラットおよび DN モデルである 2 型糖尿病 (T2D: Type 2 Diabetes) マウスにおいて IRAK-4 阻害剤である AS2444697 の腎保護作用を検証することによって、IRAK-4 阻害剤が抗炎症作用を介して、DN を含む CKD の進行を抑制する可能性について検討し、IRAK-4 阻害剤が CKD や DN 治療のための有望な治療選択肢となる可能性を明確にすることを目的とした (Figure 1-6)。

Table 1-1. Current CKD diagnostic criteria in Japan.

以下①、②のいずれかが3か月を超えて存在

①腎障害の指標	アルブミン尿 (AER \geq 30 mg/24 時間 ; ACR \geq 30 mg/gCr) 尿沈渣の異常 尿細管障害による電解質異常やその他の異常 病理組織検査による異常、画像診断による形態異常 腎移植
②GFR 低下	GFR $<$ 60 mL/分/1.73 m ²

エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン (日本腎臓学会, 2018) を基に作成.

AER : 尿中アルブミン排泄率

ACR : 尿中アルブミン/Cr 比

Cr : クレアチニン

GFR : 糸球体濾過率

Table 1-2. CKD classification based on cause, GFR category, and proteinuria and albuminuria category in Japan.

原疾患		蛋白尿区分		A1	A2	A3
糖尿病	尿アルブミン定量 (mg/日)			正常	微量アルブミン尿	顕性アルブミン尿
	尿アルブミン/Cr 比 (mg/gCr)			30 未満	30~299	300 以上
高血圧 腎炎多発性嚢胞腎 移植腎 不明、その他	尿蛋白定量 (g/日)			正常	軽度蛋白尿	高度蛋白尿
	尿蛋白/Cr 比 (g/gCr)			0.15 未満	0.15~0.49	0.50 以上
GFR 区分 (mL/分 /1.73 m ²)	G1	正常または高値	≥90			
	G2	正常または軽度低下	60~89			
	G3a	軽度~中程度低下	45~59			
	G3b	中程度~高度低下	30~44			
	G4	高度低下	15~29			
	G5	末期腎不全 (ESKD)	<15			

・重症度は原疾患・GFR 区分・蛋白尿区分を合わせたステージにより評価する

・CKD の重症度は死亡、末期腎不全、心血管死発症のリスクを緑のステージを基準に、黄、オレ

ンジ、赤の順にステージが上昇するほどリスクは上昇する

エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン（日本腎臓学会, 2018）を基に作成.

Cr：クレアチニン

GFR：糸球体濾過率

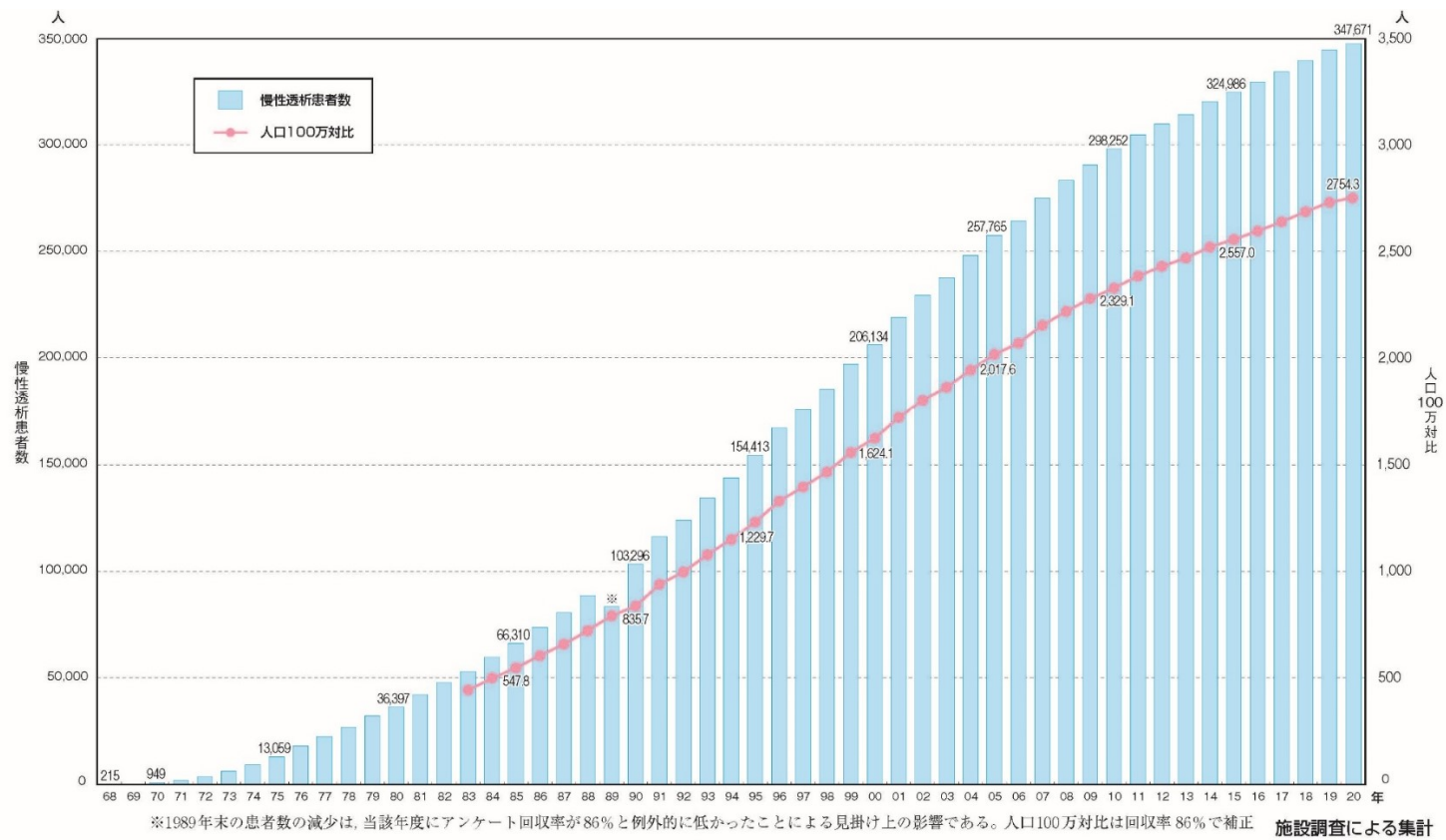


Figure 1-1. Changes in the number of chronic dialysis patients (1968-2020) and prevalence (compared to 1 million population, 1983-2020) in Japan (出典*：日本透析学会, 2021).

*日本透析医学会統計資料利用規程の順守の上で引用

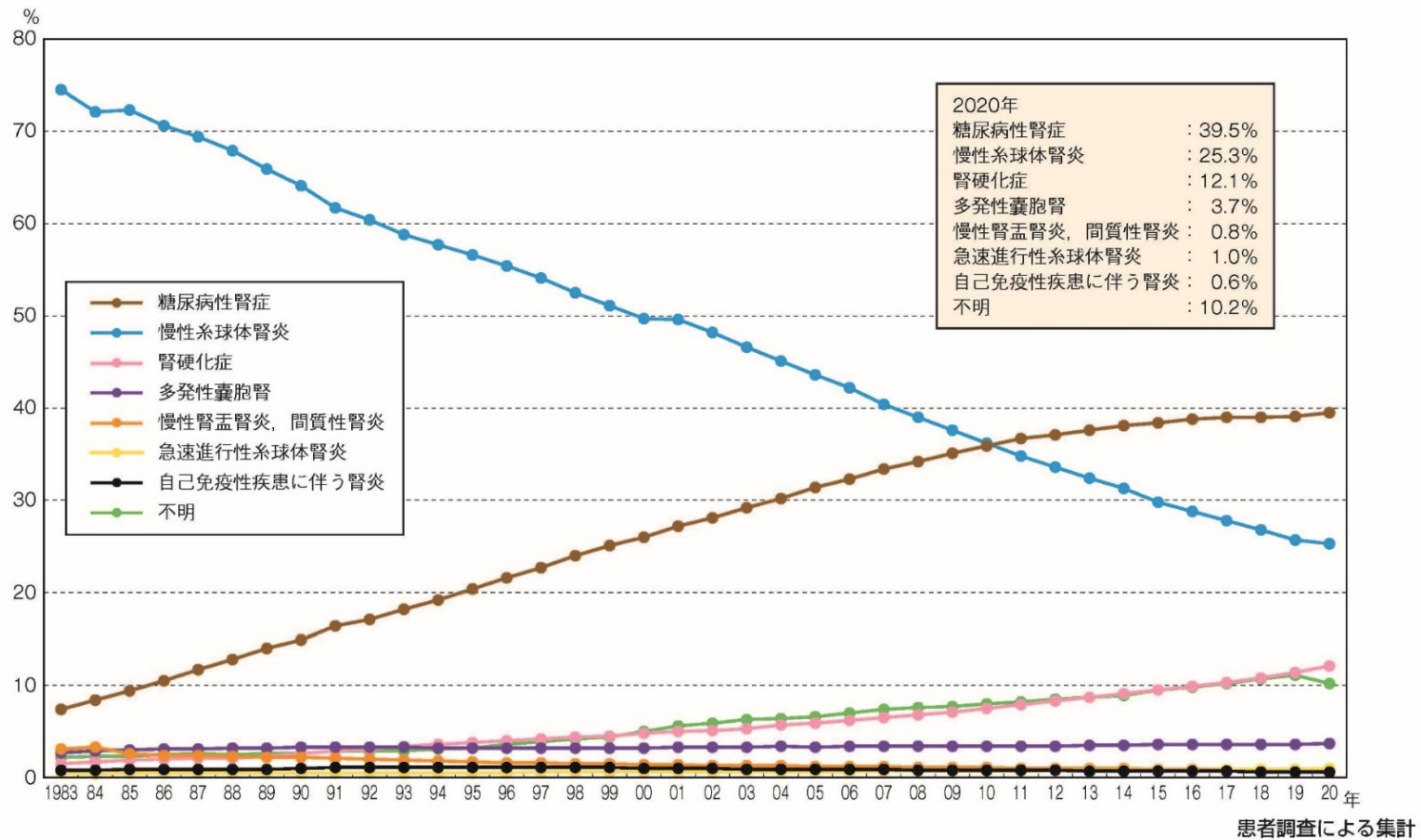


Figure 1-2. Changes in the primary disease ratio of chronic dialysis patients in Japan (出典*：日本透析学会, 2021).

*日本透析医学会統計資料利用規程の順守の上で引用

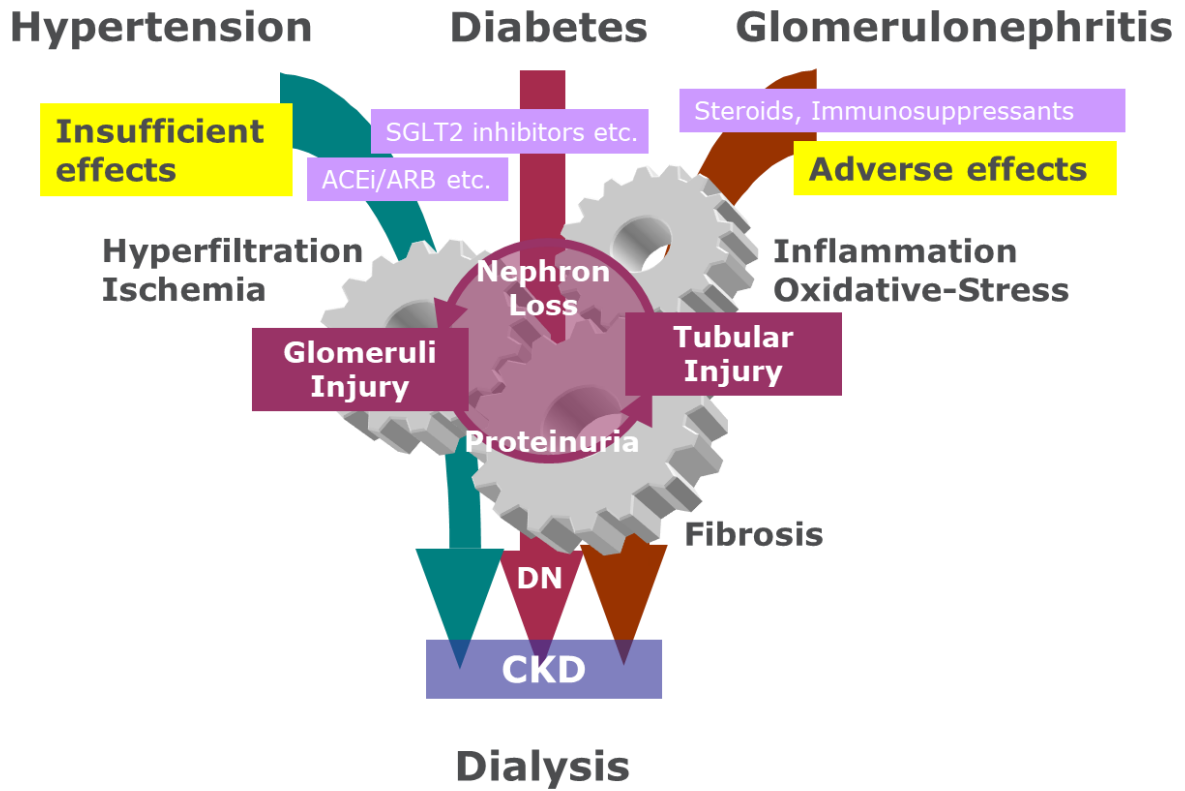


Figure 1-3. The development and progression of chronic kidney disease and positioning of current therapeutic agent.

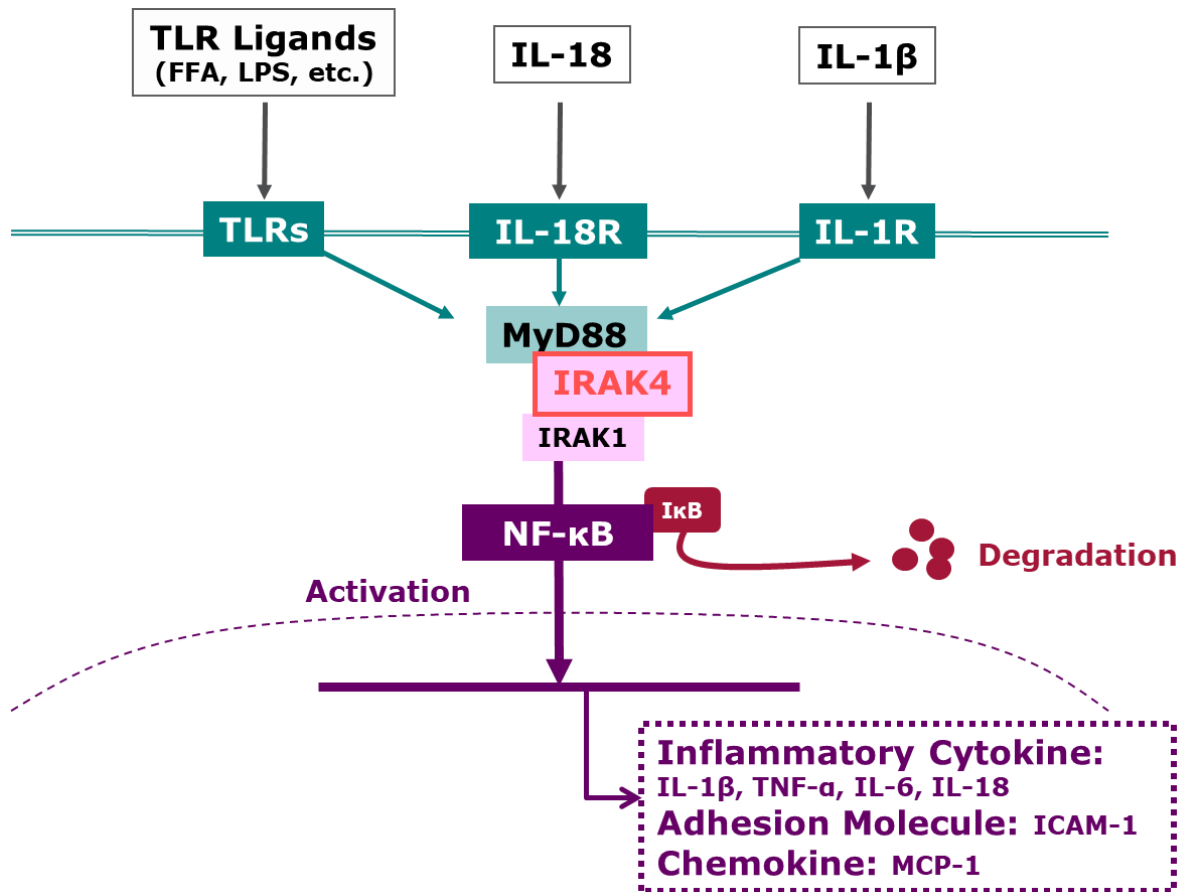


Figure 1-4. IRAK-4 signaling pathways.

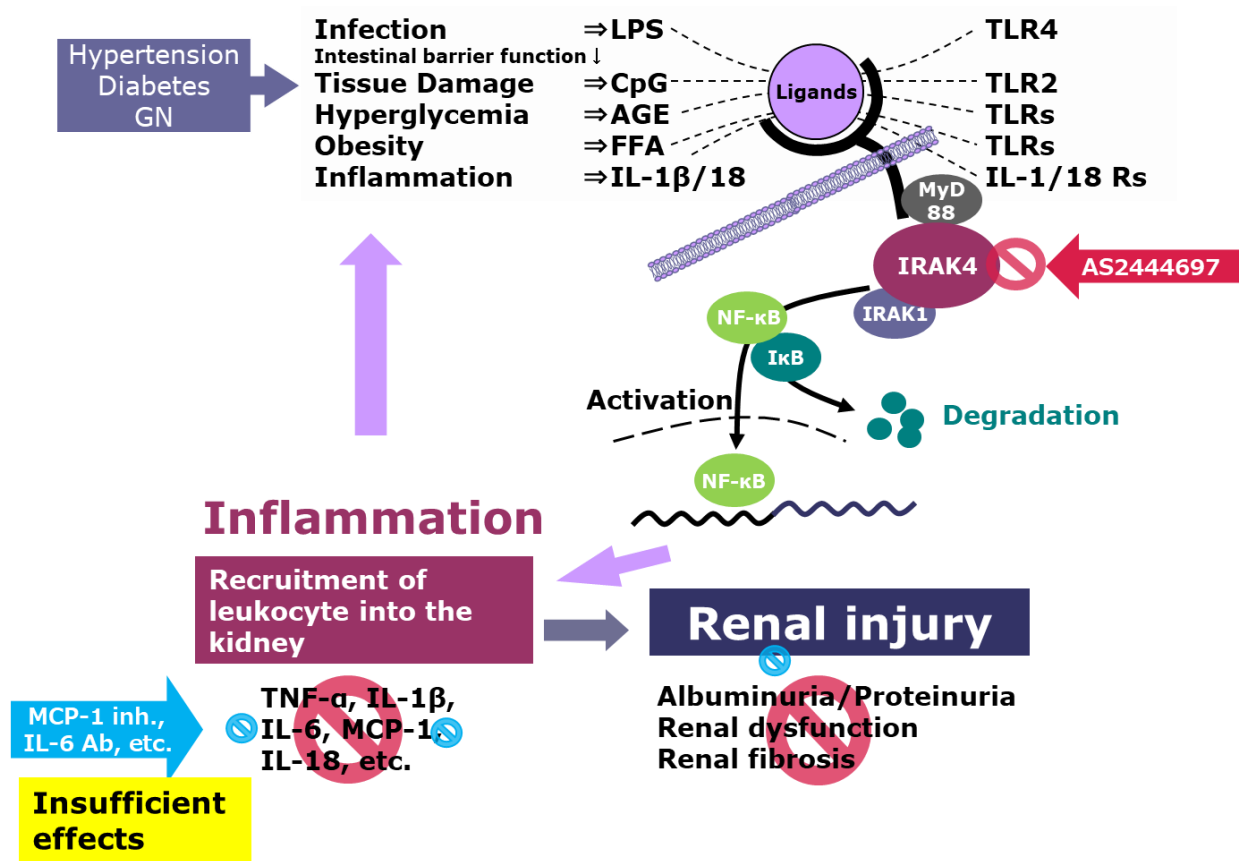


Figure 1-5. The hypothesis of superiority on renoprotective effect of ASP2444675 in the progression of CKD.

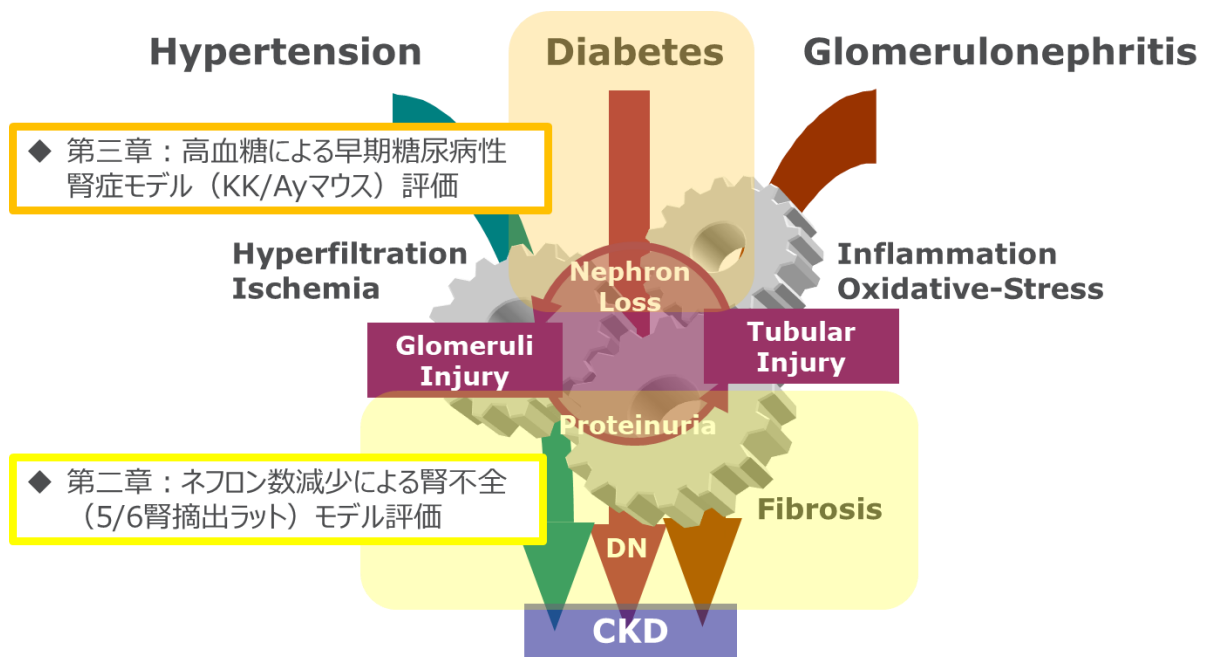


Figure 1-6. Positioning of the model in each section.

第二章：慢性腎臓病モデルにおける IRAK-4 阻害剤 AS2444697 の薬効

評価と奏功機序の検討

第一節：背景

慢性腎臓病（CKD）は、腎障害または糸球体濾過量の低下による腎機能の低下と定義されており、先進国では、成人人口の10%以上はCKDであると推定されている（Lopez-Novoa et al., 2010）。また、腎機能の低下すなわち CKD の進行は心血管疾患および全死亡率の独立した危険因子と考えられている。CKD の治療にはアンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACEi）やアンジオテンシン受容体拮抗薬（ARB）などの薬剤が使用され、CKD の進行をある程度遅らせることはできるもののその効果は充分ではなく、CKD 患者の心血管疾患の罹患率と死亡率のリスクは、依然として高い状態が続いている（Lambers and de Zeeuw, 2013）。ゆえに、CKD 患者の腎機能低下の進行を効果的に抑制するための新規薬剤が必要とされている。

CKD と末期腎不全（ESKD）は、腎不全の原因に関わらず、インターロイキン（IL）-1 β 、IL-6、腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）、C 反応性タンパク質（CRP）などの炎症性サイトカインや炎症性マーカーが増加していることからわかるように、慢性的かつ低レベルの炎症状態を特徴としていることが明らかになっている（Silverstein, 2009; Ortega and Fornoni, 2010）。さらに、CKD における持続的な炎症状態は、CKD の進行の危険因子であり、罹患率や死亡率に大きく影響するため、CKD は炎症による悪循環に陥っている可能性もある（Suliman and Stenvinkel, 2008）。しかしながら、様々な炎症性サイトカインや複数の炎症性シグナル伝達経路が複雑に絡み合っている可能性はあるため、CKD における炎症の原因は明らかにはなっていない。

インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ-4（IRAK-4）は、IL-1、IL-18、および Toll 様受容体（TLR）を介したシグナル伝達経路の重要な分子であり、炎症性サイトカインの産生や炎症反応に関与する c-Jun N-terminal キナーゼ（JNK）、核内因子（NF）- κ B、および p38 mitogen-activated

protein kinase (MAPK) の活性化に不可欠である (Li et al., 2002)。炎症反応において IRAK-4 が重要な役割を担っていることから、IRAK-4 キナーゼ活性を調節する薬剤は、関節リウマチ、変形性関節症、炎症性腸疾患、全身性エリテマトーデスなど、炎症が関与している様々な疾患に対する効果的な治療法となる可能性がある (Wang et al., 2009; Lin and Tang, 2014)。しかし、IRAK-4 阻害剤はいくつか報告されているものの、CKD における IRAK-4 の役割は解明されていない。もし炎症反応が CKD に重要な役割を果たしているのであれば、IRAK-4 阻害剤による抗炎症作用が CKD の進行を抑制できる可能性が考えられた。これまでに、経口投与可能な新規 IRAK-4 阻害剤として AS2444697 (N-[3-carbamoyl-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-2-(2-methylpyridin-4-yl)-1,3-oxazole-4-carboxamide hydrochloride (1:1))、(Figure 2-1) を同定した。AS2444697 は、ヒトおよびラットの IRAK-4 活性を強力に阻害し、ヒト肺胞上皮細胞、滑膜細胞、末梢血単核細胞において、各種刺激により誘導されるサイトカイン産生を阻害した (Imanishi et al., 2011)。本章の一連の研究では、AS2444697 の CKD に対する保護作用について、5/6 腎摘出 (Nx) ラットにおける進行性の腎機能障害に対する効果を評価し、保護作用のメカニズムと併せて検討した。

第二節：材料と方法

1. 試薬

AS2444697, N-[3-carbamoyl-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-2-(2-methylpyridin-4-yl)-1,3-oxazole-4-carboxamide hydrochloride (1:1) はアステラス製薬株式会社 (Ibaraki, Japan) にて合成された。薬物動態試験および in vivo 試験における薬効評価において、ASP244697 は経口投与用に 0.5% MC 溶液に懸濁した。AS2444697 の投与量は、フリー体換算で表記した。LPS (Escherichia coli 055:B5) および GalN は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

2. 動物

雄性 Wistar ラットおよび雄性 Balb/c マウスは 6 週齢でジャパン SLC (Shizuoka, Japan) から購入した。すべての動物は、温度 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$)、湿度 ($55 \pm 10\%$)、明度 (12 時間の明暗サイクル) が制御された条件かつ、標準的な市販の食餌と水を自由に摂取できる条件下で飼育した。すべての動物実験は the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International から認定を受けているアステラス製薬筑波研究センターの動物管理使用委員会から承認を受け実施した。

3. 5/6 腎摘出ラット (5/6Nx ラット) の作製

5/6 腎摘出 (Nx) ラットは、既報 (Kim et al., 2010) と同様の手法にて作製した。具体的には、イソフルラン麻酔下で、ラットの左腎臓の 3 分の 2 を切除し止血、その 1 週間後に右腎の全摘出

を行った。5/6 腎摘出の 2 週間後、動物を代謝ケージに入れ 24 時間の排泄尿を採取した。尿量を測定した後、尿中の蛋白質濃度と N-アセチル- β -D-グリコサミニダーゼ (NAG) 活性を、それぞれ蛋白質アッセイ試薬 (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) と NAG テスト Shionogi (Shionogi Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) を用いて測定した。また、尾静脈から血液を採取し、Detaminar L-CRE (Kyowa Medex, Tokyo, Japan) を用いて血漿クレアチニン値を測定した。腎症の発症を確認できた 5/6Nx ラットは、尿中タンパク質排泄量、NAG 活性および血漿クレアチニン濃度がグループ間で均一になるようにグループ分けしてから実験に用いた。

4. 薬物動態

AS2444697 (3 mg/kg) を飽食下で 5/6 Nx ラットに経口投与した後、腹部大静脈から採血し、イソフルラン麻酔下で組織 (肝臓、腎臓) を分離し、リン酸緩衝生理食塩水でホモジナイズした。血漿中および組織中の薬物濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。血漿または組織のホモジネート (100 μ L) にアセトニトリル (100 μ L) およびメチル tert-ブチルエーテル (100 μ L) を加えて混合し、遠心分離 (15,000 rpm、10 分) した。上清をチューブに移し、真空遠心濃縮機で蒸発させ、残渣を移動相に溶かしてアッセイ用の試料とした。アッセイ試料中の AS2444697 の濃度は、UV 検出器 (254 nm) と 4.6 \times 250 mm 逆相 ODS-80Ts カラム (Tosoh, Tokyo, Japan) を備えた HPLC を用いて分析した。カラムの温度は 60 $^{\circ}$ C に維持し、移動相は 20 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル (40/60 [v/v])、流速は 1 mL/min とした。薬物動態パラメーターには、 C_{max} (最高血中濃度)、 T_{max} (最高血中濃度に到達するまでの時間)、 AUC_{0-24h} (24 時間の薬物濃度-時間曲線下面積) を用いた。 C_{max} および T_{max} は、実測値の平均値から求めた。ま

た、 AUC_{0-24h} は平均値から台形法を用いて算出した。

5. マウスにおける LPS/GalN 誘発炎症反応に対する AS2444697 の効果の検討

Balb/c マウスを以下のグループ（各グループ n=4）に分けた。(1) Normal, (2) Vehicle, (3) AS2444697 (0.3 mg/kg), (4) AS2444697 (1 mg/kg), および(5) AS2444697 (3 mg/kg)とした。(1)のグループでは、Vehicle (0.5% MC 溶液) を経口投与し、生理食塩水を腹腔内に注入した。(2)~(5)のグループでは、Vehicle または AS2444697 (0.3-3 mg/kg) を経口投与し、薬剤投与の 0.5 時間後に LPS (100 μ g/kg) /GalN (500 mg/kg) を腹腔内に注射した。2 時間後に血液を採取し、TNF- α , IL-6, MCP-1 の濃度を測定し、8 時間後に IL-1 β , ALT, AST の濃度を測定した。IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 の濃度は、市販の酵素結合免疫吸着法 (ELISA) キット (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA) を、ALT および AST は、Transaminase CII テスト試薬 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて測定した。

6. 5/6 腎摘出 (Nx) ラットにおける AS2444697 の腎保護効果の検討

ラットを以下のグループ（各グループ n=8、Sham のみ n=6）に分けた。(1) Sham, (2) Vehicle, (3) AS2444697 (0.3 mg/kg), (4) AS2444697 (1 mg/kg), および(5) AS2444697 (3 mg/kg)とした。右腎摘出の 2 週間後に実施されたグループ分けの 4 日後から、AS2444697 を 5/6Nx ラットに 1 日 2 回、6 週間投与した。体重および摂餌量は 1 週間ごとに測定した。3 週目と 6 週目に尾静脈から血液を採取し、血漿クレアチニン値を測定し、24 時間尿中タンパク質排泄量と NAG 活性も測定した。6 週目には、クレアチニンクリアランスを算出するために、尿中クレアチニン濃度を測

定した。5週目には、収縮期血圧（SBP）はテールカフ法（BP-98A-L; Softron, Tokyo, Japan）を用いて測定した。6週目に薬物を最終投与した後、イソフルラン麻酔下で腹部大静脈から血液を採取し、左腎臓を分離して重量を測定した。腎組織は病理組織学的評価のために10%中性緩衝ホルマリン溶液中で固定し、残りの組織は液体窒素で凍結し、RT-PCRによる解析まで-80°Cで保存した。血液サンプルは遠心分離（15,000 rpm, 10分）し、上清を各種パラメーターの測定に使用した。血中尿素窒素（BUN）およびCRPの濃度は、尿素窒素BテストWAKO（Wako Pure Chemical Industries）および市販のELISAキット（R&D Systems Inc.）を用いて測定した。

7. 定量的リアルタイム RT-PCR

腎臓のRNAは、RNeasy Mini Kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を用いてメーカーの手順書に従って抽出した。相補的DNAは、TaqMan Reverse Transcription Reagents（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて合成した。MCP-1, TNF- α および IL-6 の遺伝子発現はリアルタイム RT-PCRにより測定した。反応は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System（Applied Biosystems）を用いて行った。データは、内因性のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT） mRNA コントロールで標準化した。

8. 免疫組織染色

標本の作製と組織病理学的検査は、アステラス製薬株式会社の安全性研究所（Ibaraki, Japan）で実施した。10%中性緩衝ホルマリンで固定された腎組織のスライスをパラフィンに包埋し、2 μ m の厚さの切片を作製した。これらの切片をヘマトキシリン・エオジン（HE）および過ヨウ素

酸シッフ (PAS) で染色した。すべての組織サンプルは、観察したサンプルのラットがどのグループに属しているかを知らされていない独立した研究者によって評価を実施した。各標本のすべての糸球体および顕微領域全体を観察し、半定量的なスコアリングシステムを用いて、変化の認められた腎組織の割合に応じて、以下のように組織病理学的変化を評価した。0：病変なし、1：ごく軽度 (10%未満)、2：軽度 ($10\% \leq x < 25\%$)、3：中等度 ($25\% \leq x < 50\%$)、4：著明 ($\geq 50\%$) (Uehara et al., 1992)。

9. 統計解析

実験結果は、平均値、平均値±平均値の標準誤差 (SEM)、または平均値±標準偏差 (SD) で表記した。2 群間の差の解析には Student's t test を、複数群間の比較には Dunnett's multiple comparison test を、相関性の検定には Pearson's correlation coefficient analysis を用いた。有意差検定は $p < 0.05$ の値を有意とした。統計・データ解析には GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いた。

第三節：結果

1. 薬物動態

AS2444697 (3 mg/kg) を 5/6 Nx ラットに経口投与したところ、血漿および組織（肝臓、腎臓）中の未変化体薬物濃度は 1 時間後にピークに達した後、徐々に減少し、半減期は 2.7-2.9 時間であった。また、肝臓および腎臓の 24 時間後の AUC は、血漿中の AUC の約 6 倍および 3 倍であった (Figure 2-2)。

2. マウスにおける LPS/GalN 誘発炎症反応に対する AS2444697 の効果の検討

LPS/GalN を投与したマウスにおいて、IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, ALT および AST の血漿中濃度が有意に上昇した。AS2444697 の単回投与 (0.3~3 mg/kg) は、これらすべてのパラメーターの血漿中濃度を低下させ、これらの効果は 1 mg/kg 以上の用量で統計学的に有意であった (Figure 2-3)。

3. 5/6 腎摘出 (Nx) ラットにおける AS2444697 の腎保護効果の検討

正常ラットと比較して、5/6 Nx ラットでは尿中タンパク質排泄量、NAG 活性、および血漿クレアチニン値の上昇が進行していた。AS2444697 の反復投与により、尿中タンパク質排泄量、NAG 活性および血漿クレアチニン値の上昇が抑制され、これらの効果は、尿中タンパク質排泄量および血漿クレアチニン値では 1 mg/kg 以上、尿中 NAG 活性では 3 mg/kg で有意であった (Figure 2-4)。5/6 Nx ラットでは、クレアチニンクリアランスと体重が有意に減少し、腎臓重量、BUN、SBP が上昇した。AS2444697 は、体重や収縮期血圧に影響を与えることなく、クレアチニンクリ

アランスの低下、腎臓重量および BUN の増加を有意に改善させた (Table 2-1)。なお、薬剤投与期間中、何れの群においても死亡例は認められなかった。5/6 Nx ラットでは、糸球体の硬化が観察され (Figure 2-5, right)、糸球体周辺の腎尿細管は高度に変性し、尿細管内腔は拡張していた (Figure 2-5, left)。また、間質には顕著な炎症細胞の浸潤が見られ、比較的軽度の線維化が認められた (arrows in Figure 2-5)。AS2444697 は、これらの病理学的変化を軽減させ、糸球体硬化や間質の線維化などの腎障害のスコアを有意に減少させた (Table 2-2)。5/6 Nx ラットでは、IL-6, TNF- α , MCP-1 の腎 mRNA の発現 (Figure 2-6)、および IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, CRP の血漿中濃度 (Figure 2-7) が有意に上昇した。AS2444697 は、これらの炎症性パラメーターの腎 mRNA 発現および血漿レベルに対して、有意な低下作用、もしくは低下傾向を示した。すべての実験群において、血漿中の炎症性パラメーターと尿中のタンパク質排泄量 (Figure 2-8, left) または糸球体硬化スコア (Figure 2-8, right) との間に統計的に有意な相関関係が認められた。さらに、血漿中の炎症性パラメーターと他の薬理学的パラメーター (クレアチニンクリアランス、血漿中クレアチニンおよび BUN、尿中 NAG 活性、間質の線維化) との間にも有意な相関関係が認められた (data not shown)。

第四節：考察

近年、多くの実験的・臨床的証拠から、CKD では慢性的な低レベルの炎症状態が存在し、末期腎不全 (ESKD) ではこの状態がさらに高まり、罹患率や死亡率に大きく影響するという見解が支持されている (Oberg et al., 2004; Carrero and Stenvinkel, 2009)。一方で、CKD の発症には、複数の炎症性因子が関与していると考えられているものの、炎症カスケードを引き起こす因子は充分には解明されていない。CKD 患者では、IL-1 β 、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインの血中濃度が上昇していることが知られており (Pereira et al., 1994)、これらの炎症性サイトカインは、炎症カスケードにおけるシグナル伝達経路に関与し、その結果、腎障害を引き起こすと考えられる。IRAK-4 は、IL-1 β をはじめとする炎症性サイトカインのシグナル伝達や細胞応答に必須の役割を果たしていることが、ノックアウトマウスを用いた複数の研究によって明らかにされている (Suzuki et al., 2002)。本章の一連の研究では、IRAK-4 阻害剤である AS2444697 について、5/6Nx モデルにおける進行性の腎機能障害に対する保護作用を評価し、その保護効果の奏功機序についても検討することを目的とした。

まず、AS2444697 の薬物動態について検証した。5/6 Nx ラットに単回で経口投与した際の薬物動態試験の結果から、AS2444697 は良好な経口吸収活性を有していることを確認した。また、肝臓および腎臓での薬物濃度は血漿濃度の約 6 倍および 3 倍であり、IRAK-4 阻害剤の標的臓器である肝臓および腎臓への高い移行性が示唆された。

続いて、LPS/GalN 投与マウスにおける急性炎症に対する AS2444697 の単回投与の薬理作用を検討した。LPS/GalN 投与後、サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1) および肝酵素 (ALT、AST) の血漿レベルは顕著に増加し、AS2444697 は、1 mg/kg 以上の用量で、これらのパラメー

ターをすべて有意に減少させた。IRAK-4 ノックアウトマウスでは、IL-1 β による IL-6 および TNF- α の血漿レベルの増加が抑制されると報告されている (Suzuki et al., 2002)。また、IRAK-4 ノックアウトマウスでは、LPS による IL-1 β 、IL-6、TNF- α の血漿レベルの上昇および敗血症性ショックが完全に消失することも報告されている (Kim et al., 2007)。これらの結果は、炎症性サイトカインや炎症反応において IRAK-4 が必須の役割を果たしていることを示しており、AS2444697 は IRAK-4 活性を阻害し、生体内の炎症反応を抑制できることが示唆された。

次いで、5/6 腎摘出 (Nx) ラットに AS2444697 を反復投与した際の効果を検討した。5/6 Nx ラットでは、血漿中のクレアチニンおよび BUN、尿中タンパク質排泄量、NAG 活性が徐々に上昇し、それに伴ってクレアチンクリアランスが著しく低下した。また、糸球体メサンギウム細胞の増殖やメサンギウムマトリックスの蓄積、分節性糸球体硬化、糸球体係蹄の癒着、尿細管上皮細胞の変性、萎縮、間質の線維化などの典型的な病理学的変化を伴っており、これらの異常は CKD 患者で観察されるものと同様であった (Kliem et al., 1996)。AS2444697 を反復投与することにより、収縮期血圧に影響を与えることなく、タンパク尿、腎機能障害、糸球体硬化や間質性線維化などが軽減された。さらに、5/6 Nx ラットでは、腎臓および血漿中の炎症性サイトカインや CRP の増加が認められ、炎症の存在が裏付けられた。AS2444697 はこれらすべての炎症パラメーターの増加を減少させた。腎臓の炎症はマクロファージを含む単核細胞が腎臓の間質に浸潤することによっても惹起されるが、AS2444697 は腎臓の間質への単核細胞の浸潤を有意に抑制した。5/6 Nx ラットにおける AS2444697 の腎保護作用および抗炎症作用は、1~3 mg/kg の用量で顕著であり、これは LPS/GalN 投与マウスにおける急性炎症において得られた結果と一致した。これらの結果から、AS2444697 は、全身的な炎症反応だけでなく、腎臓局所の炎症反応の抑制を

介して CKD の進行を抑制することが示唆された。

コルチコステロイド (Pozzi et al., 2013)、クルクミン (Ghosh et al., 2012)、ペントキシフィリン (Lin et al., 2005) などの抗炎症薬は、炎症を抑えることにより腎症の進行を遅らせることが報告されている。抗線維化薬であるピルフェニドンの腎保護作用は、炎症性メディエーターのレベルを低下させることによる抗炎症作用が部分的に寄与している可能性がある (Cho and Kopp, 2010)。一部の ACE 阻害剤は、マクロファージの流入を減少させ、マクロファージによるサイトカインおよび炎症性物質の刺激を抑制し、その結果、腎線維症を抑制することが報告されている (Ishidoya et al., 1995)。本章の研究では、炎症パラメーターは、尿中蛋白排泄量だけでなく、腎機能や腎傷害とも正の有意な相関が認められた。炎症は線維化促進因子の産生や糸球体濾過量の低下と密接に関連していることが報告されている (Lebleu et al., 2008; Fried et al., 2004)。末期腎不全は、蛋白尿、糸球体硬化、尿細管間質障害などによって至るネフロン数の減少の結果として生じるものであり、炎症はこれらに影響を与える主要な要因の 1 つと考えられた。これらのことから、AS2444697 による腎保護作用は、蛋白尿、糸球体硬化、尿細管間質障害における炎症の抑制によるものであることが強く示唆された。5/6Nx モデルにおける進行性の腎機能障害に対する IRAK-4 阻害剤の腎保護効果を検討したのは本章の試験が初めてであり、IRAK-4 阻害剤である AS2444697 は CKD の進行を抑制する薬剤となる可能性が初めて示された。

Table 2-1. Effects of repeated administration of AS2444697 on general parameters in 5/6 Nx rats.

Parameter	Normal	5/6 Nx			
	<i>Vehicle</i>	<i>Vehicle</i>	<i>0.3 mg/kg</i>	<i>1 mg/kg</i>	<i>3 mg/kg</i>
Body weight (g)	342 ± 6	287 ± 6*	284 ± 7	289 ± 8	291 ± 5
Food intake (g/day)	20.6	17.2	17.3	17.3	17.1
Kidney weight (g)	1.19 ± 0.02	2.00 ± 0.06*	1.85 ± 0.06	1.77 ± 0.07	1.54 ± 0.12**
Creatinine clearance (mL/day/100 g body weight)	366 ± 18	146 ± 9*	180 ± 19	230 ± 20**	256 ± 16**
Blood urea nitrogen (mg/dL)	20.8 ± 0.7	54.2 ± 1.8*	49.6 ± 2.5	44.7 ± 1.2**	36.4 ± 1.5**
Systolic blood pressure (mmHg)	135 ± 4	151 ± 6*	157 ± 6	151 ± 5	151 ± 1

AS2444697 was orally administered to 5/6 Nx rats twice daily for 6 weeks. Values are mean or mean ± SEM for 6-8 animals per group. * $p < 0.05$ vs.

normal group, ** $p < 0.05$ vs. 5/6 Nx vehicle group. (発表論文1の元データを基に再作成、二章のTable, Figureは以降、同様の対応)

Table 2-2. Effects of repeated administration of AS2444697 on glomerular and tubulointerstitial morphology in 5/6 Nx rats.

Index	Normal	5/6 Nx			
	<i>Vehicle</i>	<i>Vehicle</i>	<i>0.3 mg/kg</i>	<i>1 mg/kg</i>	<i>3 mg/kg</i>
Glomerulosclerosis	0.00 ± 0.00	3.25 ± 0.25*	2.00 ± 0.19	1.50 ± 0.27**	1.25 ± 0.16**
Interstitial fibrosis	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.33*	1.13 ± 0.13	0.75 ± 0.16**	0.75 ± 0.16**
Interstitial cell infiltration	0.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00*	1.75 ± 0.16	1.25 ± 0.16**	1.13 ± 0.13**
Tubular basophilic change	0.33 ± 0.21	3.13 ± 0.30*	2.25 ± 0.41	1.63 ± 0.26	1.13 ± 0.13**
Tubular dilatation	0.00 ± 0.00	3.25 ± 0.25*	2.50 ± 0.19	1.38 ± 0.18**	1.13 ± 0.13**

AS2444697 was orally administered to 5/6 Nx rats twice daily for 6 weeks. Values are mean ± SEM for 6-8 animals per group.

* $p < 0.05$ vs. normal group, ** $p < 0.05$ vs. 5/6 Nx vehicle group.

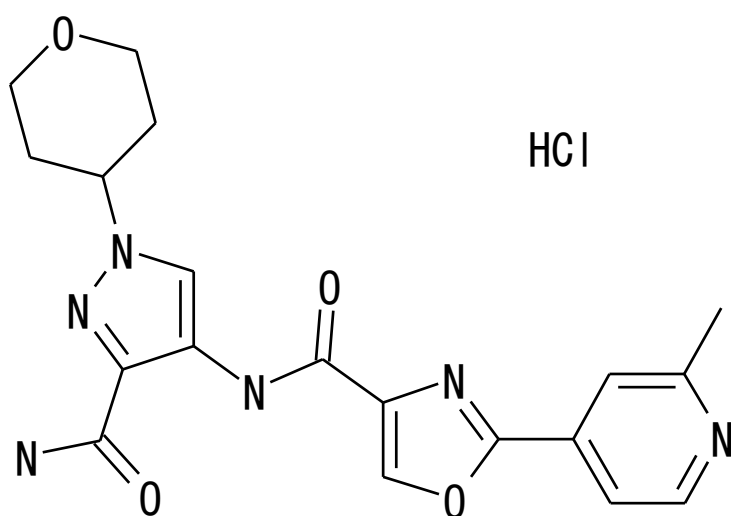


Figure 2-1. Chemical structure of AS2444697, *N*-[3-carbamoyl-1-(tetrahydro-2*H*-pyran-4-yl)-1*H*-pyrazol-4-yl]-2-(2-methylpyridin-4-yl)-1,3-oxazole-4-carboxamide hydrochloride (1:1).

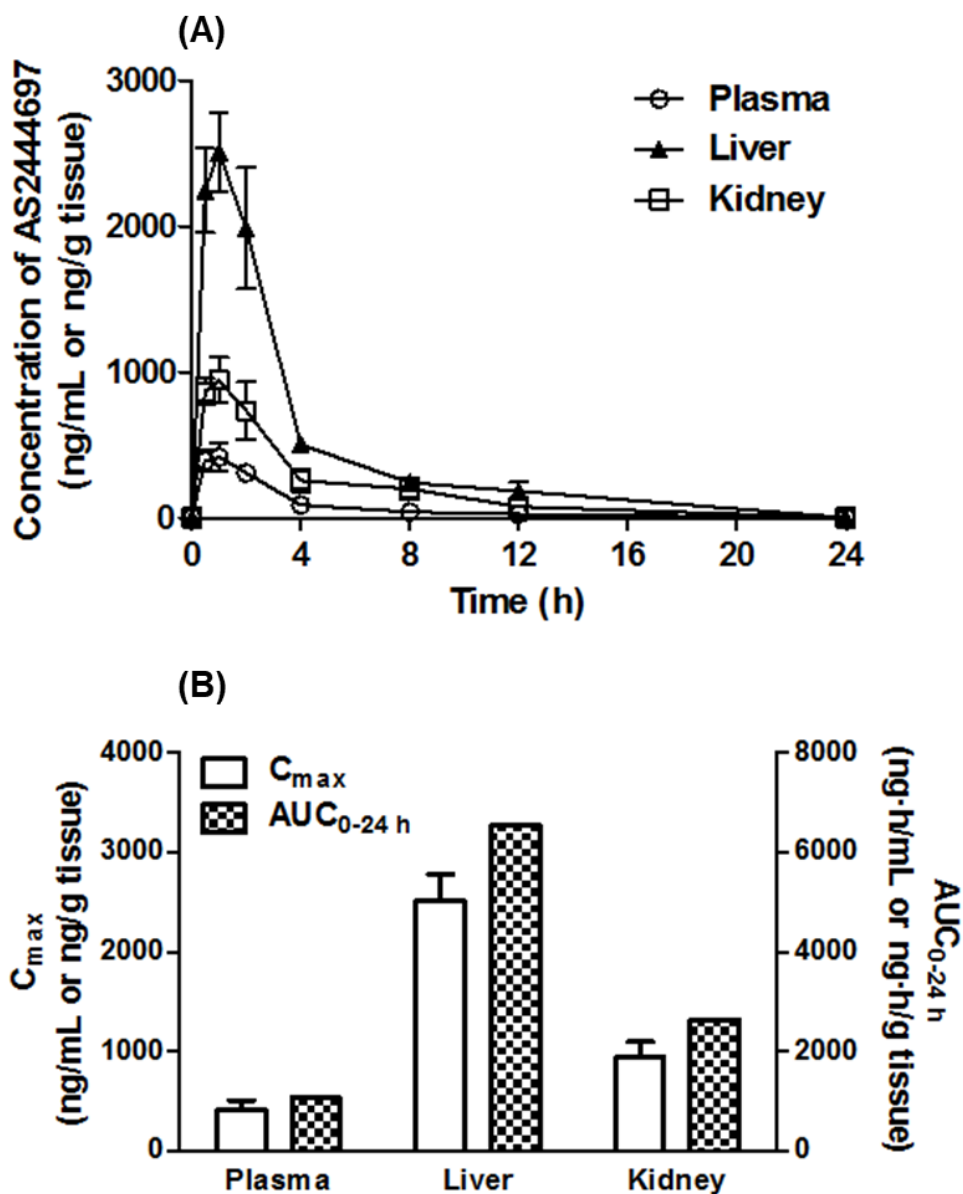


Figure 2-2. Pharmacokinetics of AS2444697 in 5/6 Nx rats. (A) Time course of changes in plasma, liver, and kidney concentrations of the unchanged drug; (B) C_{max} and AUC for 24 h after oral administration of AS2444697 (3 mg/kg). Data are expressed as the mean or mean ± SD for 3 animals per sampling point.

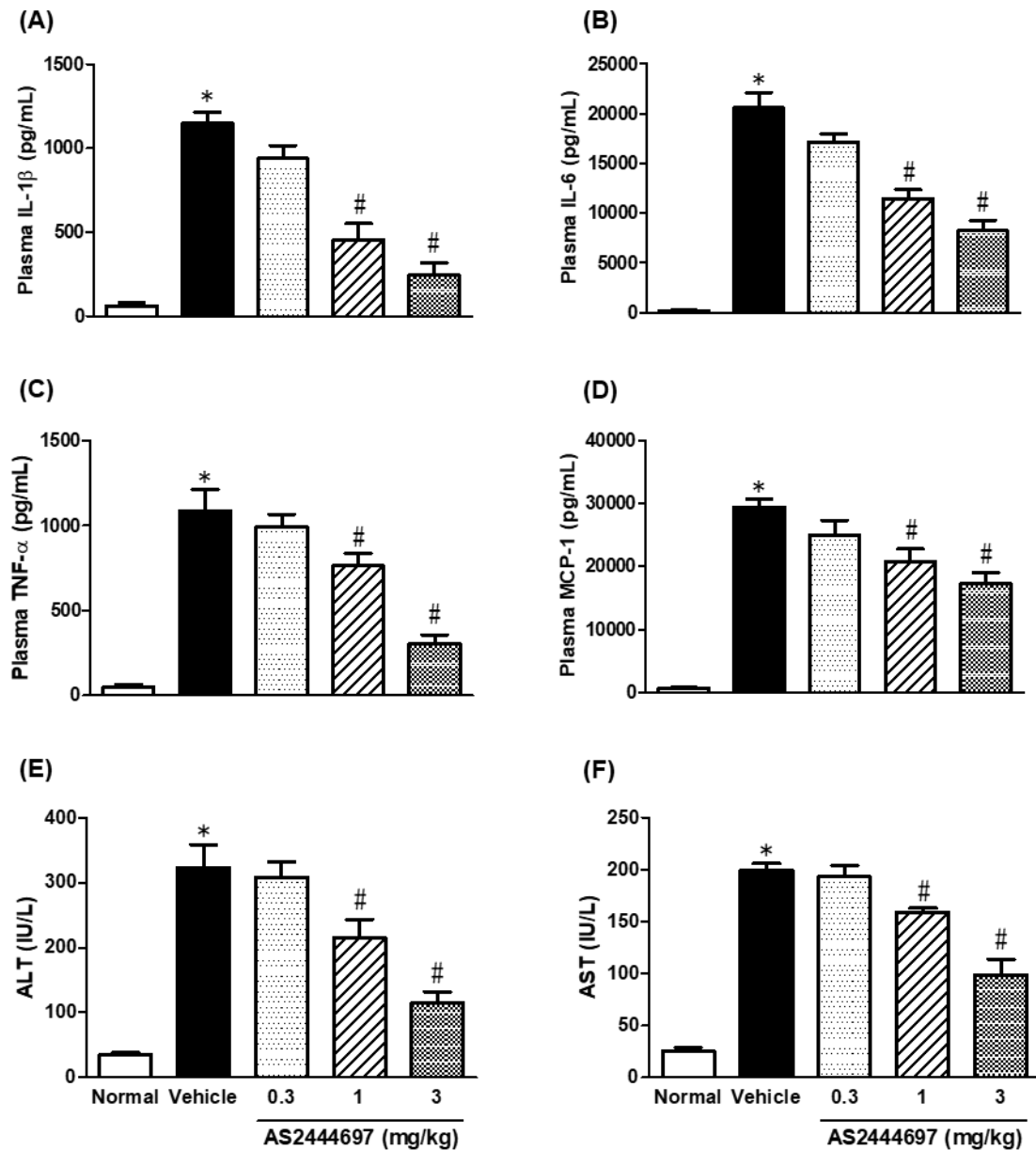


Figure 2-3. Effects of AS2444697 on LPS/GalN-induced increases in plasma (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) MCP-1, (E) ALT, and (F) AST. AS2444697 (0.3-3 mg/kg) was orally administered to mice, after which LPS/GalN was intraperitoneally injected 0.5 h post-dose. Blood samples were collected at 2 h for measuring plasma IL-6, TNF- α , and MCP-1 levels and at 8 h for measuring plasma IL-1 β , ALT, and AST levels. Values are mean \pm SEM for 4 animals per group.

* $p < 0.05$ vs. normal group, # $p < 0.05$ vs. vehicle group.

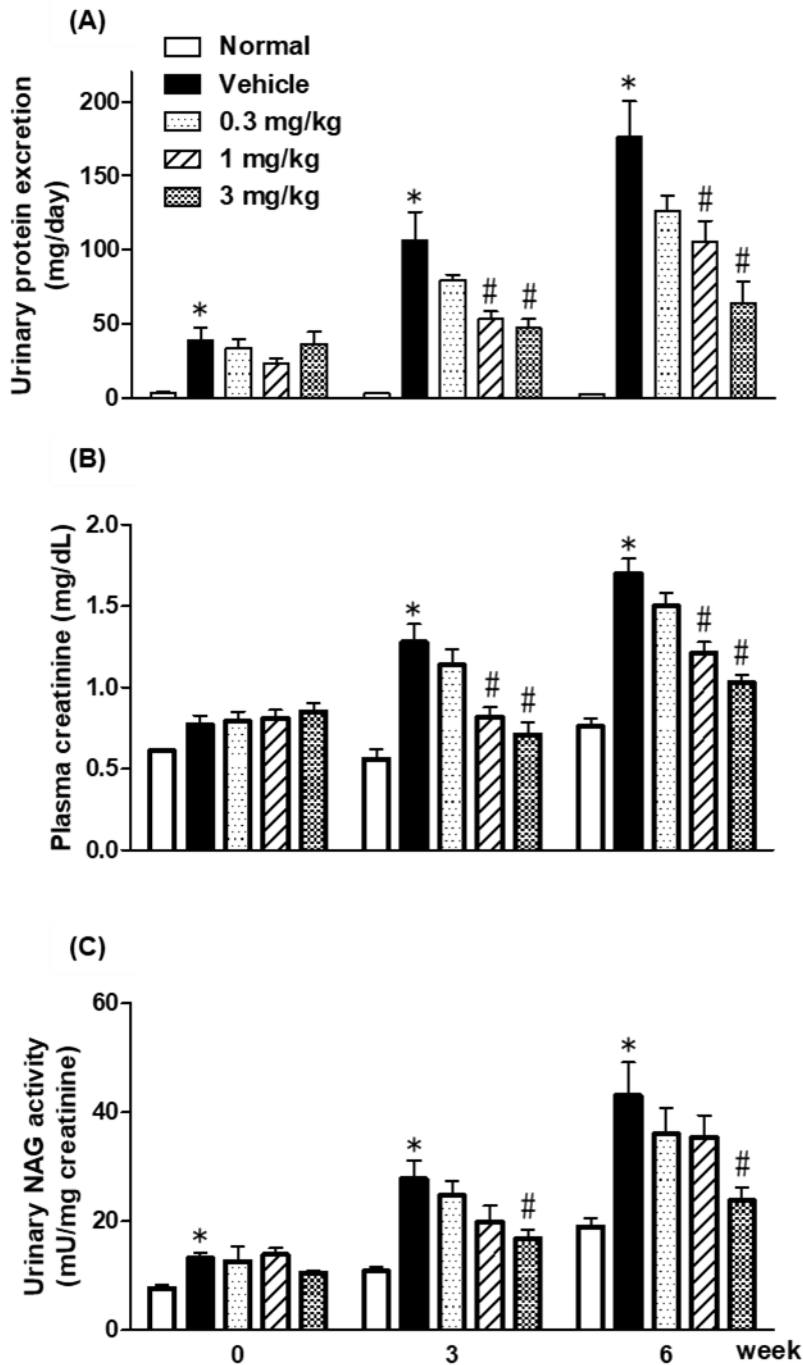
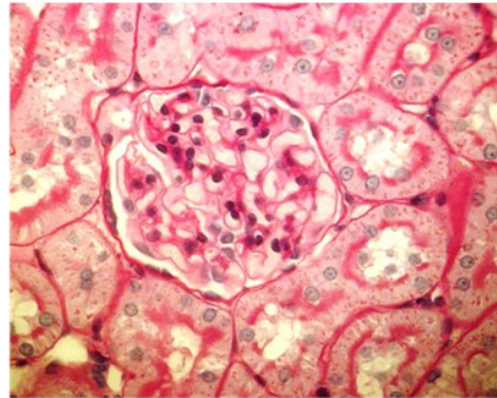
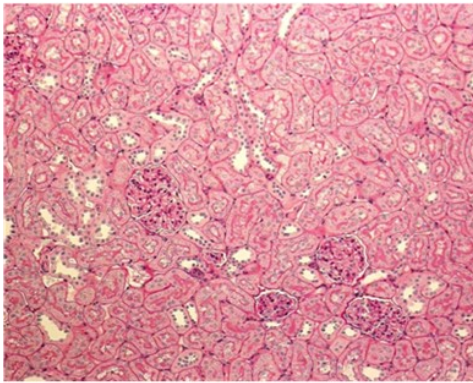
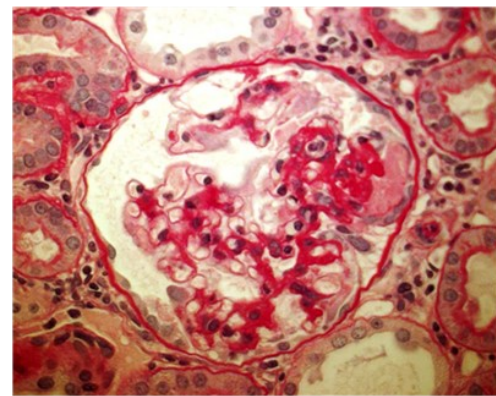
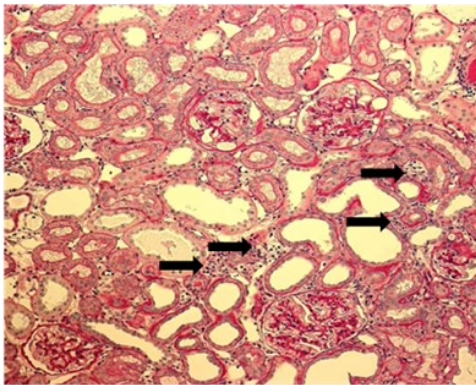


Figure 2-4. Effects of repeated administration of AS2444697 on (A) urinary protein excretion, (B) plasma creatinine level, and (C) urinary NAG activity in 5/6 Nx rats. AS2444697 was orally administered to 5/6 Nx rats twice daily for 6 weeks. Values are mean \pm SEM for 6-8 animals per group. * $p < 0.05$ vs. normal group, # $p < 0.05$ vs. vehicle group.

(A)



(B)



(C)

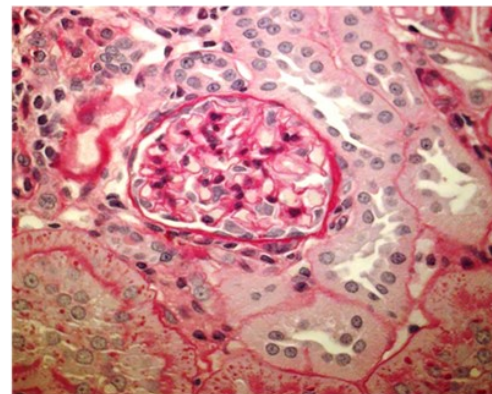
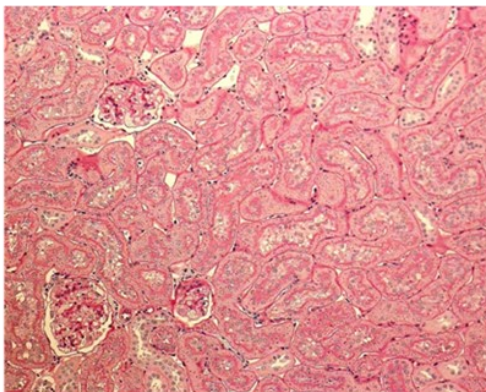


Figure 2-5. Representative light micrographs of PAS-stained sections of renal tissues obtained from (A) normal, (B) 5/6 Nx vehicle-treated, and (C) 5/6 Nx AS2444697 (3 mg/kg)-treated rats. Magnification: left, 25 \times ; right, 100 \times . Arrows indicate inflammatory cells which infiltrated into the cortical interstitium.

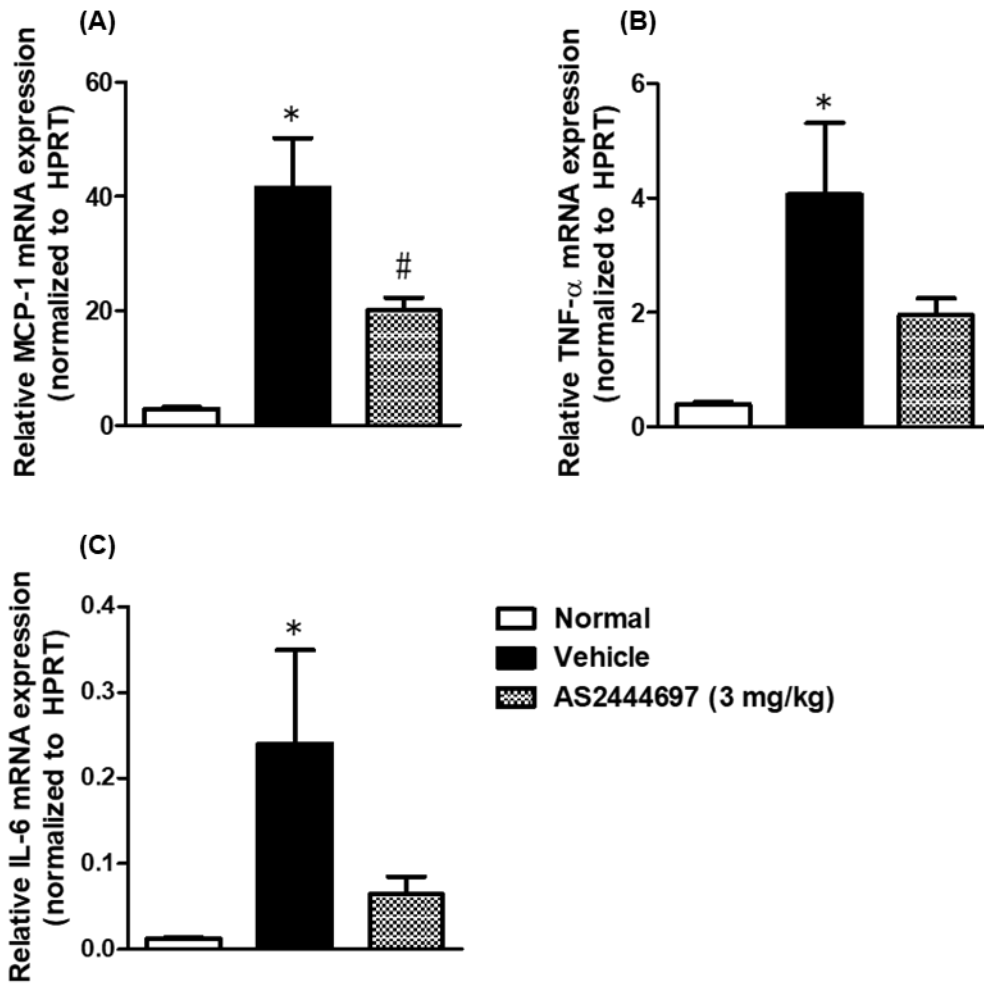


Figure 2-6. Effects of repeated administration of AS2444697 on renal (A) MCP-1, (B) TNF- α , and (C) IL-6 mRNA expression in 5/6 Nx rats. AS2444697 was orally administered to 5/6 Nx rats twice daily for 6 weeks. Values are mean \pm SEM for 6–8 animals per group. * $p < 0.05$ vs. normal group, # $p < 0.05$ vs. vehicle group.

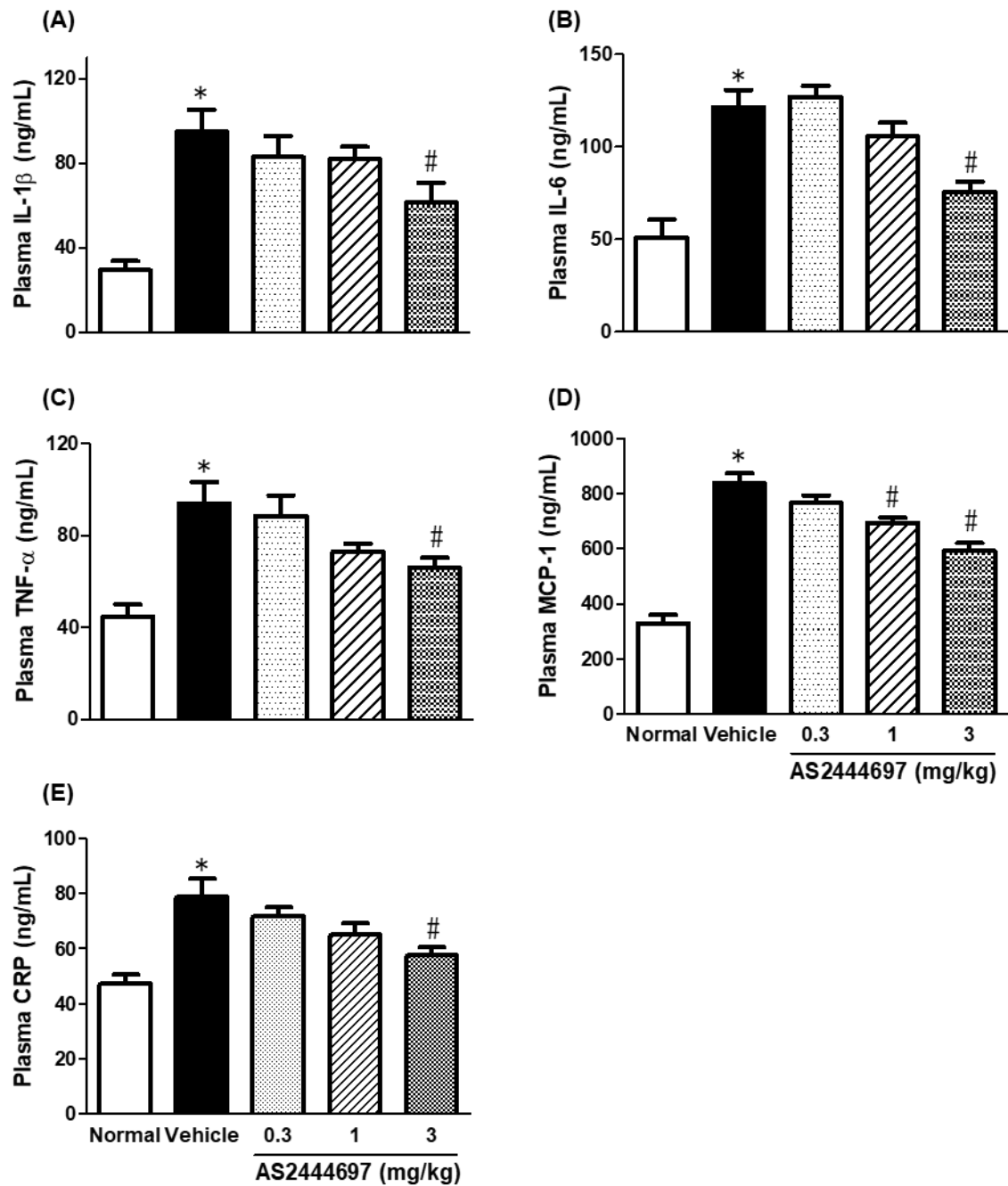


Figure 2-7. Effects of repeated administration of AS2444697 on plasma (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C), TNF- α , (D) MCP-1, and (E) CRP levels in 5/6 Nx rats. AS2444697 was orally administered to 5/6 Nx rats twice daily for 6 weeks. Values are mean \pm SEM for 6-8 animals per group. * p < 0.05 vs. normal group, # p < 0.05 vs. vehicle group.

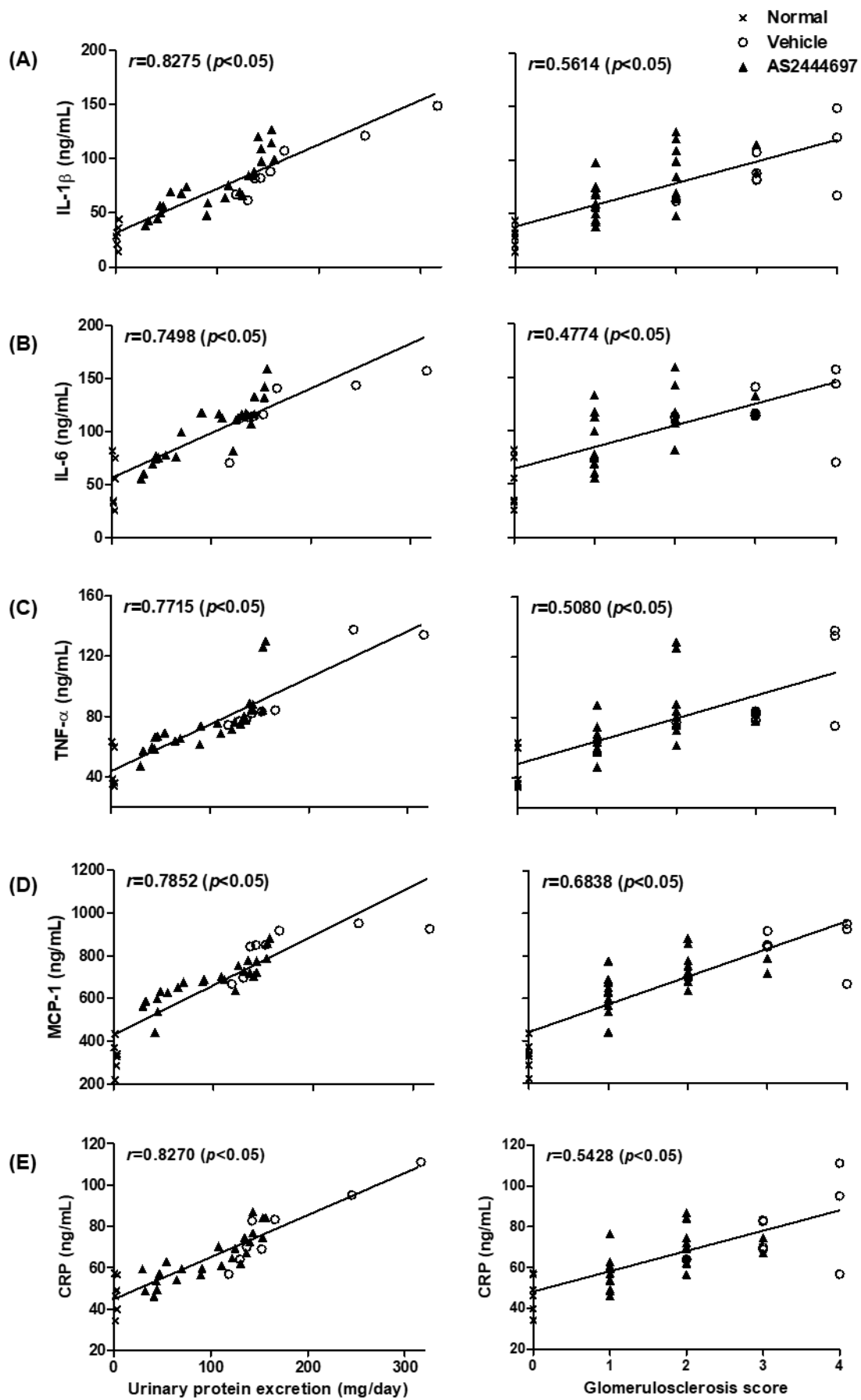


Figure 2-8. Correlations between inflammatory parameters, (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) MCP-1, and (E) CRP and urinary protein excretion (left) or glomerulosclerosis (right) in repeated administration study.

第三章：糖尿病性腎症モデルにおける IRAK-4 阻害剤 AS2444697 の薬

効評価と奏功機序の検討

第一節：背景

世界的に糖尿病の罹患率は急速に上昇しており、現在の予測では、2030年までに糖尿病患者数は4億3900万人に増加すると言われている (Shaw et al., 2010)。糖尿病は、脳卒中や心血管疾患などの大血管合併症や、腎症、網膜症、神経障害などの微小血管合併症を引き起こしやすいことが大きな問題となっている。糖尿病性腎症 (DN) は、糖尿病における最も一般的な合併症の1つであり、末期腎不全 (ESKD) の主要な原因となっている。また、心血管リスクが高く、世界的に見ても重大な罹患率と死亡率を伴う疾患としても知られている。糖尿病患者の約3分の1がDNに罹患していると言われており (Akmal, 2001)、DNの発症には、高血糖、高血圧、脂質異常症、肥満など多くの要因が関与すると報告されている (Tavafi, 2013)。これらの発症要因を考慮して、DNの予防や進行を遅らせるための現在の標準的な治療法は、血糖値と血圧の管理に基づいている。具体的には、血糖値をコントロールする糖尿病治療薬や、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAAS) 阻害薬、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) などの血圧をコントロールする治療薬が使用されているが、これらの薬剤はDNの進行を遅らせることはできるもののその効果は充分ではない (Fioretto et al., 2010)。そのため、DNの進行を十分に抑制するための代替療法の開発が強く求められている。

DNの発症・進展には、糸球体の過濾過、酸化ストレス、プロテインキナーゼCの活性化、ポリオール経路の促進、炎症などの複数のメカニズムが関与すると報告されている (Shikata and Makino, 2013)。また、DNは慢性的な低レベルの炎症状態を特徴とすることが、IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 、およびCRPなどの炎症性サイトカインやマーカーの増加によって証明されている (Kajitani et al., 2010)。このようなDNにおける低レベルの炎症は、プロテインキナーゼCの

活性化を含む様々なメカニズムを介して、高血糖による酸化ストレスによって誘発される。さらに、持続的な炎症状態は、DN を進行させる危険因子であり、罹患率や死亡率に大きく影響し、炎症による悪循環に陥っている可能性も指摘されている (Elmarakby and Sullivan, 2012)。しかしながら、様々な炎症性サイトカインや複数の炎症性シグナル伝達経路が複雑に絡み合っていると考えられており、DN における炎症の原因はまだ明らかにされていない。

第二章の結果のとおり、AS2444697 の反復投与は、5/6Nx ラットにおいて、抗炎症メカニズムを介して CKD の進行を抑制した。CKD 研究に用いられる代表的なモデルである 5/6Nx ラットにおける炎症は、少なくとも部分的には、RAAS が活性化した残存腎臓の適応変化によって誘導されると報告されている (Taal et al., 2000)。非糖尿病性 CKD だけでなく、糖尿病性 CKD の進行に共通するメカニズムとして低レベルの炎症が重要であることが知られていることや、これらの疾患を発症する様々な原因を考えると (Amdur et al., 2016)、IRAK-4 が DN を含む CKD の発症・進行に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。そこで、本章の一連の研究では、IRAK-4 阻害剤である AS2444697 が、DN の進行抑制にも有益であるという仮説に基づいて、2 型糖尿病マウスを用いて AS2444697 の腎保護作用を評価し、その保護効果の奏功機序についても併せて検討した。

第二節：材料と方法

1. 試薬

AS2444697, N-[3-carbamoyl-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-2-(2-methylpyridin-4-yl)-1,3-oxazole-4-carboxamide hydrochloride (1:1) はアステラス製薬株式会社 (Ibaraki, Japan) にて合成された。薬物動態試験および in vivo 試験における薬効評価において、ASP244697 は経口投与用に 0.5% MC 溶液に懸濁して経口投与した。AS2444697 の投与量は、フリー体換算で表記した。LPS (Escherichia coli 055:B5) および GalN は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

2. 動物

雄性 C57BL/6 (正常対照マウス) および KK/Ay (2 型糖尿病マウス) は、6 週齢でクレアジャパン (Kanagawa, Japan) から購入した。購入したすべての 2 型糖尿病マウスを各実験に使用し、7 週齢時に各グループが同様の血中グルコース濃度となるようにグループ分けした。すべての動物は、温度 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($55 \pm 10\%$)、明度 (12 時間の明暗サイクル) が制御された条件かつ、標準的な市販の食餌と水を自由に摂取できる条件下で飼育した。すべての動物実験は the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International から認定を受けているアステラス製薬筑波研究センターの動物管理使用委員会から承認を受け実施した。

3. 薬物動態

AS2444697 (3mg/kg) を絶食下で 2 型糖尿病マウスに経口投与し、0.5、1、2、4、8、および 12 時間後(各サンプリングポイントで n=3) に、イソフルラン麻酔下で腹部大静脈から採血した。また、組織(肝臓および腎臓) は単離した後、リン酸緩衝生理食塩水でホモジナイズした。血漿および組織中の薬物濃度は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC) を用いて測定した。血漿または組織のホモジネート(100 μ L) にアセトニトリル(100 μ L) およびメチル tert-ブチルエーテル(100 μ L) を加えて混合し、遠心分離(15,000 rpm, 10 分) した。上清をチューブに移し、真空遠心濃縮機で蒸発させ、残渣を移動相に溶かしてアッセイ用の試料とした。アッセイ試料中の AS2444697 の濃度は、UV 検出器(254 nm) と 4.6 \times 250 mm 逆相 ODS-80Ts カラム(Tosoh, Tokyo, Japan) を備えた HPLC を用いて分析した。カラムの温度は 60 $^{\circ}$ C に維持し、移動相は 20 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル(40/60 [v/v])、流速は 1 mL/min とした。薬物動態パラメーターには、 C_{max} (最高血中濃度)、 T_{max} (最高血中濃度に達するまでの時間)、 AUC_{0-12h} (12 時間の薬物濃度-時間曲線下面積) を用いた。 C_{max} および T_{max} は、実測値の平均値から求めた。また、 AUC_{0-12h} は平均値から台形法を用いて算出した。

4. 2 型糖尿病マウスにおける LPS/GalN 誘発炎症反応に対する AS2444697 の効果の検討

マウスを以下のグループ(各グループ n=4) に分けた。(1) Normal, (2) Vehicle, (3) AS2444697 (0.3 mg/kg), (4) AS2444697 (1 mg/kg), および(5) AS2444697 (3 mg/kg) とした。(1) のグループでは、正常なマウスに Vehicle (0.5% MC 溶液) を経口投与し、生理食塩水を腹腔内に注入した。(2)~(5) のグループでは、2 型糖尿病マウスに Vehicle または AS2444697 を経口投与し、その 0.5 時間後に LPS (100 μ g/kg) および GalN (500 mg/kg) を腹腔内に注射した。TNF- α , IL-6, IL-18,

および MCP-1 を測定するために、LPS/GalN の注射 2 時間後にイソフルラン麻酔下で腹部大静脈から血液を採取した。また、同じ実験方法で行った別の実験では、8 時間後に血液を採取し、IL-1 β , ALT, AST の濃度を測定した。IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α , MCP-1 の濃度は、市販の酵素結合免疫吸着法 (ELISA) キット (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA)、ALT および AST は、Transaminase CII テスト試薬 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて測定した。

5. 2 型糖尿病マウスにおける AS2444697 の腎保護効果の検討

マウスを以下のグループ (各グループ n=8) に分けた。(1) Normal, (2) Vehicle, (3) AS2444697 (0.3 mg/kg), (4) AS2444697 (1 mg/kg), (5) AS2444697 (3 mg/kg) とした。Vehicle または AS2444697 を 1 日 2 回、4 週間にわたってマウスに経口投与し、毎週体重を測定した。1 日の摂餌量は、食餌残量と食餌供給量の週差に基づいて算出した。4 週目に、マウスを代謝ケージに移して 1 日適応させ、24 時間の自然排泄尿を採取した。最終薬物投与後 (28 日目) にイソフルラン麻酔下で腹部大静脈から血液を採取し、腎臓も分離した。

6. 生化学パラメーター

血糖値は Glucose CII テスト試薬 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いて測定した。ヘモグロビン A1c (HbA1c) 濃度は、DCA2000 システム (Bayer Medical, Tokyo, Japan) を用いて測定した。血漿インスリン濃度は、超高感度マウスインスリン酵素結合免疫吸着法 (ELISA) キット (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Kanagawa, Japan) を用いて測定した。血漿

中の脂質（トリグリセリド、非エステル化脂肪酸、コレステロール）は、それぞれ Triglyceride E-test Wako, NEFA C-test Wako, Cholesterol E-test Wako キット（Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）を用いて測定した。血漿中の ALT および AST 濃度は、Transaminase CII test reagent (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いて測定した。血漿中のサイトカイン（IL-1 β , IL-6, IL-18, MCP-1, TNF- α , および CRP）および細胞接着分子（intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-1], vascular cell adhesion molecule-1 [VCAM-1], E-selectin, および P-selectin）の濃度は、市販の ELISA キット（R&D Systems Inc.）を、酸化ストレスバイオマーカー（チオバルビツール酸反応性物質 [TBARS] およびプロテインカルボニル）の血漿中濃度および腎中濃度は、市販の測定キット（Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA）を用いて、既報の方法（Atkinson and Eisenbarth, 2001; Nakhaee et al., 2009）に従って測定した。尿中のアルブミン排泄量は、マウスアルブミン ELISA を用いて測定した。血漿および尿中のクレアチニン濃度は Determiner L CRE（Kyowa Medex, Tokyo, Japan）を用いて測定し、クレアチニンクリアランス ($\mu\text{L}/\text{min}$) は、尿中および血漿のクレアチニン濃度と尿量から算出した。尿中のネフリンおよびポドカリキシン濃度は、ELISA キット（Exocell Inc. PA, USA）を用いて測定した。尿中の kidney injury molecule-1 (KIM-1) 濃度は、ELISA キット（R&D Systems Inc.）を、尿中の N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) 活性は、NAG テスト Shionogi (Shionogi Co. Ltd., Osaka, Japan) を用いて測定した。

7. 免疫組織染色

標本の作製および病理組織学的検査は、シミックバイオリサーチセンター株式会社 (Yamanashi, Japan) で行った。10%中性緩衝ホルマリンで固定した腎組織のスライスをパラフィンに包埋し、

形態学的検討のために 2 μm の厚さの切片を作製した。これらの切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) および過ヨウ素酸シッフ (PAS) で染色した。すべての組織サンプルは、グループ情報を知らされていない独立した研究者によって評価を実施した。各標本のすべての糸球体と顕微鏡領域全体を観察し、半定量的なスコアリングシステムを用いて、病理組織学的変化（糸球体硬化、尿細管拡張、細胞浸潤、好塩基性変化、尿道キャスト）を、変化の認められた腎組織の割合に応じて以下のように評価した。0：病変なし、1：ごく軽度（10%未満）、2：軽度（10% \leq ×25%未満）、3：中等度（25% \leq ×50%未満）、4：著明（50%以上）。

8. 統計解析

実験結果は、平均値 \pm 平均値の標準誤差 (SEM)、または平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。2群間の差は、Student's t test を用いて評価し、複数群間の差は、Dunnett's multiple comparisons test を用いて評価した。2群間の病理組織学的スコアの違いは、Mann-Whitney U 検定を用いて分析し、複数群間では Dunn's multiple comparisons test を用いて分析した。有意差検定は $p < 0.05$ を有意とした。統計およびデータ解析は GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行った。

第三節：結果

1. 薬物動態

AS2444697 (3 mg/kg) を2型糖尿病マウスに経口投与した後、未変化体の薬物の血漿および組織（肝臓および腎臓）濃度は0.5時間でピークに達し、その後徐々に減少し、半減期は2~4時間であった。さらに、肝臓と腎臓のAUCは、血漿中のAUCの約7倍および3倍であった (Figure 3-1)。

2. 2型糖尿病マウスにおけるLPS/GalN誘発炎症反応に対するAS2444697の効果の検討

LPS/GalNを投与したマウスでは、IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , MCP-1, ALT, およびASTの血漿レベルが有意に上昇した。AS2444697の単回投与(0.3~3mg/kg)は、これらすべてのパラメーターの血漿レベルを低下させ、これらの効果は1mg/kg以上の用量で統計学的に有意な作用であった (Figure 3-2)。

3. 2型糖尿病マウスにおけるAS2444697の腎保護効果の検討

糖尿病マウスは、高血糖、高インスリン血症、高脂血症、過食、中程度の肥満を示した。AS2444697を反復投与することで、高血糖、高インスリン血症、および高脂血症はわずかに抑制されたが、これらの効果は統計的に有意ではなかった (Table 3-1)。また、AS244697は摂餌量や体重に影響を与えず、実験期間中に状態の悪化や死亡した例はなかった。糖尿病マウスでは、正常マウスに比べて尿中アルブミン排泄量が著しく増加し、腎肥大とクレアチニンクリアランスの増加が認められ、糸球体濾過亢進を特徴とする糖尿病性腎症の存在が示唆された (Figure 3-3 A-D)。また、

尿細管傷害マーカー（尿中の NAG 活性と KIM-1 の排泄量）と糸球体ポドサイト傷害マーカー（尿中のネフリンとポドカリキシンの排泄量）の増加が認められた（Figure 3-3 E-H）。AS2444697 を反復投与することで、尿中アルブミン排泄量とクレアチニンクリアランスの増加が有意に減少し、腎肥大が緩和され、腎尿細管および糸球体ポドサイト傷害マーカーも減少した（Figure 3-3）。糖尿病マウスでは、腎組織病変、糸球体硬化、尿細管拡張、細胞浸潤、好塩基性変化が見られ、AS2444697 を反復投与すると、これら腎障害の指標が有意に改善された（Figure 3-4）。さらに、糖尿病マウスでは、血漿中の炎症性サイトカイン（IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , および MCP-1）や炎症マーカーである CRP の上昇など、炎症の兆候が認められたが、AS2444697 はこれらの血漿中の炎症性サイトカインおよび炎症マーカーの上昇を有意に減少させた（Figure 3-5）。また、糖尿病マウスでは、血漿中の内皮機能障害パラメーター（ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトイン、および P-セレクトイン）が上昇し（Figure 3-6）、血漿中および腎臓中の酸化ストレスバイオマーカー（TBARS、プロテインカルボニル）が上昇した（Figure 3-7）。AS2444697 は、これらの内皮機能障害パラメーターと酸化ストレスバイオマーカーの上昇を有意に減少させた。

第四節：考察

近年、DN の発症には、慢性的な低レベルの炎症と自然免疫系の活性化が深く関わっていることが示唆されている。さらに、多くの研究により、炎症すなわち IL-1 β 、IL-6、IL-18、および TNF- α などの炎症性サイトカインが、DN の発症における重要な因子であることが示されている (Donate-Correa et al., 2015)。また、炎症性サイトカインによるシグナル伝達やその細胞応答において IRAK-4 が必須の役割を果たしていることが明らかになっており (Wang et al., 2009)、IRAK-4 が DN の治療のための新たな標的となる可能性が示唆されている。本章の一連の研究では、IRAK-4 阻害剤である AS2444697 の 2 型糖尿病マウスにおける腎保護効果を評価し、その保護効果の奏功機序についても検討することを目的とした。

まず、2 型糖尿病マウスを用いて、AS2444697 の薬物動態について検証した。2 型糖尿病マウスに AS2444697 を単回で経口投与したところ、良好な経口吸収活性が確認された。また、肝臓および腎臓での薬物濃度は血漿濃度の約 7 倍および 3 倍であり、標的臓器である肝臓および腎臓への高い移行性が示唆された。

次に、LPS/GalN 投与糖尿病マウスの急性炎症に対する AS2444697 の単回投与の薬理作用を検討した。LPS/GalN 投与後、血漿中のサイトカイン (IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 、および MCP-1) および肝酵素 (ALT、AST) のレベルは顕著に上昇し、AS2444697 は、1 mg/kg 以上の用量で、これらのパラメーターを有意に減少させた。第二章で述べたように、IRAK-4 ノックアウトマウスでは、IL-1 β による IL-6 および TNF- α の血漿レベルの増加が抑制されると報告されており (Suzuki et al., 2002)、さらに IRAK-4 ノックアウトマウスでは、LPS による IL-1 β 、IL-6、および TNF- α の血漿レベルの上昇および敗血症性ショックが完全に消失することも報告されている

(Kim et al., 2007)。これらの結果は、炎症性サイトカインの産生や炎症反応に IRAK-4 が必須の役割を果たしていることを示しており、AS2444697 は IRAK-4 活性を阻害し、2 型糖尿病マウスにおける炎症反応も抑制できることが明らかになった。

続いて、2 型糖尿病マウスに AS2444697 を反復投与した際の効果を検討した。2 型糖尿病マウスは、高血糖、高インスリン血症、脂質異常症（血漿中のトリグリセリド、NEFAs、およびコレステロール濃度の上昇）、過食による肥満を示した。AS2444697 を反復投与することによって、これらの糖尿病症状はわずかに軽減されたが、有意ではなく、その効果はこれまでに報告されているナトリウム-グルコース共輸送体 2 (SGLT2) 阻害剤を含む幾つかの抗糖尿病薬の効果よりもはるかに弱かった (Tahara et al., 2013)。AS2444697 が糖脂質代謝を僅かに減衰させたメカニズムは明らかではないが、本剤の抗炎症作用に付随する可能性が考えられた (Donath and Shoelson, 2011)。

慢性的な高血糖は、微小血管合併症の高い発生率と関連しており、DN は、2 型糖尿病の主要な微小血管合併症であり、最終的には透析療法を必要とする末期腎不全 (ESKD) に進行する (Palsson and Patel, 2014)。DN は、メサンギウム基質における細胞外マトリックスタンパク質の蓄積や、糸球体基底膜の電荷バリアーの消失など、腎臓の形態学および構造上の変化を特徴とする。正常尿から微量アルブミン尿への進行は、DN 発症の初期段階と考えられており、腎機能の低下が続くと、さらに顕性アルブミン尿、タンパク尿へと進行する (Wolf and Ziyadeh, 2007)。本試験において、2 型糖尿病マウスは、初期腎症のパラメーターとして確立されている微量アルブミン尿、クレアチニンクリアランスを指標とした糸球体過濾過や、尿細管傷害のマーカーである尿中 NAG 活性および KIM-1 の排泄量の増加、糸球体ポドサイト傷害のマーカーであるネフリンおよ

びポドカリキシンの尿中排泄量の増加を示した。また、糸球体硬化、尿細管拡張、細胞浸潤、好塩基性変化など、糖尿病性腎症の初期段階に特徴的な病理組織像が認められた。AS2444697 を反復投与することにより、微量アルブミン尿、糸球体過濾過、尿細管および糸球体障害が有意に軽減された。AS2444697 の 2 型糖尿病マウスにおけるこれらの腎保護作用は、ARB であるロサルタン (Tahara and Takasu, 2018) など標準治療に用いられている薬剤と同様の効果であった。一方、本章の試験において、AS2444697 は血糖値に有意な影響を与えず、腎レニン活性にも影響を与えなかった (data not shown)。これらの結果から、抗糖尿病薬や抗高血圧薬とは異なり、AS2444697 の腎保護作用は、抗高血糖作用、血圧降下作用、RAAS 阻害作用に由来する作用ではないことが示唆された。さらに、AS2444697 は尿細管およびポドサイト傷害マーカーの増加を有意に減少させたことから、DN における尿細管および糸球体バリアー機能に対しても保護的な効果を有することが新たに示唆された。第二章において 5/6 腎摘出 (Nx) ラットへの AS2444697 の反復投与により、尿中タンパク質排泄量の増加が有意に減少し、糸球体硬化や間質の線維化などの腎障害の進展が抑制されており、本章の試験において観察された AS2444697 の同様の腎保護作用は、非糖尿病だけでなく糖尿病性 CKD の進行にも IRAK-4 を介した低レベルの炎症が重要な役割を果たしているという仮説を支持するものと考えられた。

多くの研究で、炎症性サイトカインや炎症マーカーが、DN の発症リスクと強く関連していることが報告されている (Navarro-Gonzalez and Mora-Fernandez, 2008)。高血糖や脂質異常症などの糖尿病状態は、様々な末梢組織において酸化ストレスや小胞体ストレスを誘発し、それによって様々な炎症性メディエーターの産生を誘導し、さらなる炎症を引き起こす。これによってインスリン抵抗性や膵臓 β 細胞の機能障害などの糖尿病症状の進行や悪化に寄与することが知られて

おり (Tahara et al., 2017)、炎症は 2 型糖尿病の主要な危険因子と考えられている。本章の試験において、2 型糖尿病マウスは、炎症性サイトカインおよび CRP の血漿レベルの上昇を示すことから、慢性的な炎症症状の存在が示唆され、AS2444697 の反復投与によってこれらの炎症マーカーの増加は有意に軽減された。これらの結果から、AS2444697 は低レベルの炎症環境を改善し、それによって DN の悪化を抑制することが示唆された。

DN を含む腎疾患の実験動物モデルにおいて、高血糖が細胞接着分子 (CAM) の発現を増加させることや (Booth et al., 2002)、腎 CAM の発現と進行性腎障害には直接的な関連性があることが報告されている (Matsui et al., 1996)。CAM の活性化は、内皮機能障害の重要なマーカーであり、DN の発症に極めて重要な役割を果たしている。本章の試験では、2 型糖尿病マウスにおいて、内皮機能障害を示唆する CAM (ICAM-1、VCAM-1、E-セレクチン、および P-セレクチン) の血漿レベルが上昇しており、AS2444697 はこれらの内皮機能障害マーカーの増加を有意に低下させた。これは、2 型糖尿病モデルにおける内皮機能障害に対する IRAK-4 阻害剤の効果を検証した初めての研究である。

高血糖はフリーラジカルの産生を増加させ、その結果、酸化ストレスが発生するという役割はよく知られている (Giacco and Brownlee, 2010)。酸化ストレスは、DN の主要な初期段階であり、酸化ストレスは、ほぼすべての腎細胞 (内皮細胞、メサンギウム細胞、上皮細胞、尿細管細胞、およびポドサイト) において、様々な経路を活性化させることから、酸化ストレスの増加が DN の発症および進行に関与することが示されている (Elmarakby and Sullivan, 2012)。酸化ストレスの増加は、炎症性サイトカインの産生を誘発する一方で、炎症性サイトカインの増加も、フリーラジカルの産生を誘発することが報告されている (Elmarakby and Sullivan, 2012)。したがって、酸

化ストレスによる炎症性サイトカインの産生は、酸化ストレスをさらに増加させることによって、酸化ストレスと炎症の悪循環を作り出している可能性が高いと考えられる。ACE 阻害剤や ARB は、様々な糖尿病モデルにおいて酸化ストレスの増加を抑制させることが示されている (Fiordaliso et al., 2006; Kurata et al., 2006)。本章の試験でも、AS2444697 は血漿および腎臓の酸化ストレスマーカーの増加を有意に低下させており、これらのデータから、糖尿病状態における酸化ストレスの上昇は、DN の潜在的な増悪因子であり、IRAK-4 阻害剤である AS2444697 の作用機序の 1 つは、この悪循環を抑制することであると考えられた。

以上の結果から、AS2444697 は炎症、酸化ストレス、内皮機能障害を軽減することにより、DN の進行を抑制することが明らかになった。これらの結果は、AS2444697 の腎保護作用が炎症の抑制に起因することを強く示唆している。2 型糖尿病マウスの早期 DN に対する IRAK-4 阻害剤の腎保護効果を検討したのは本章の試験が初めてであり、今回の結果は IRAK-4 阻害剤である AS2444697 は DN の進行を抑制する有望な薬剤であることが初めて示された。

Table 3-1. Effects of repeated administration of AS2444697 on general parameters in type 2 diabetic mice.

Parameter	Normal	Diabetic			
	Vehicle	Vehicle	0.3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg
Body weight (g)	26.3 ± 0.4	44.2 ± 0.6*	44.0 ± 0.6	44.5 ± 0.5	44.3 ± 0.5
Food intake (g/day)	3.69 ± 0.22	6.38 ± 0.27*	6.42 ± 0.16	6.49 ± 0.25	6.54 ± 0.24
HbA _{1c} (%)	3.64 ± 0.10	7.41 ± 0.23*	7.33 ± 0.24	7.19 ± 0.29	6.91 ± 0.31
Blood glucose (mg/dL)	144 ± 7	458 ± 28*	450 ± 29	426 ± 28	403 ± 25
Plasma insulin (ng/mL)	1.43 ± 0.15	68.8 ± 4.1*	68.9 ± 3.4	63.7 ± 3.7	55.7 ± 4.7
Plasma triglycerides (mg/dL)	162 ± 10	389 ± 31*	365 ± 25	357 ± 31	322 ± 24
Plasma NEFAs (mEq/L)	0.56 ± 0.04	1.15 ± 0.10*	1.02 ± 0.11	0.96 ± 0.08	0.91 ± 0.09
Plasma cholesterol (mg/dL)	73 ± 6	176 ± 9*	171 ± 11	167 ± 15	152 ± 10

AS2444697 was orally administered to type 2 diabetic mice twice daily for 4 weeks. Values are mean ± SEM for 8 animals per group. * $p < 0.05$ vs. normal

group. (発表論文 2 の元データを基に再作成、三章の Table, Figure は以降、同様の対応)

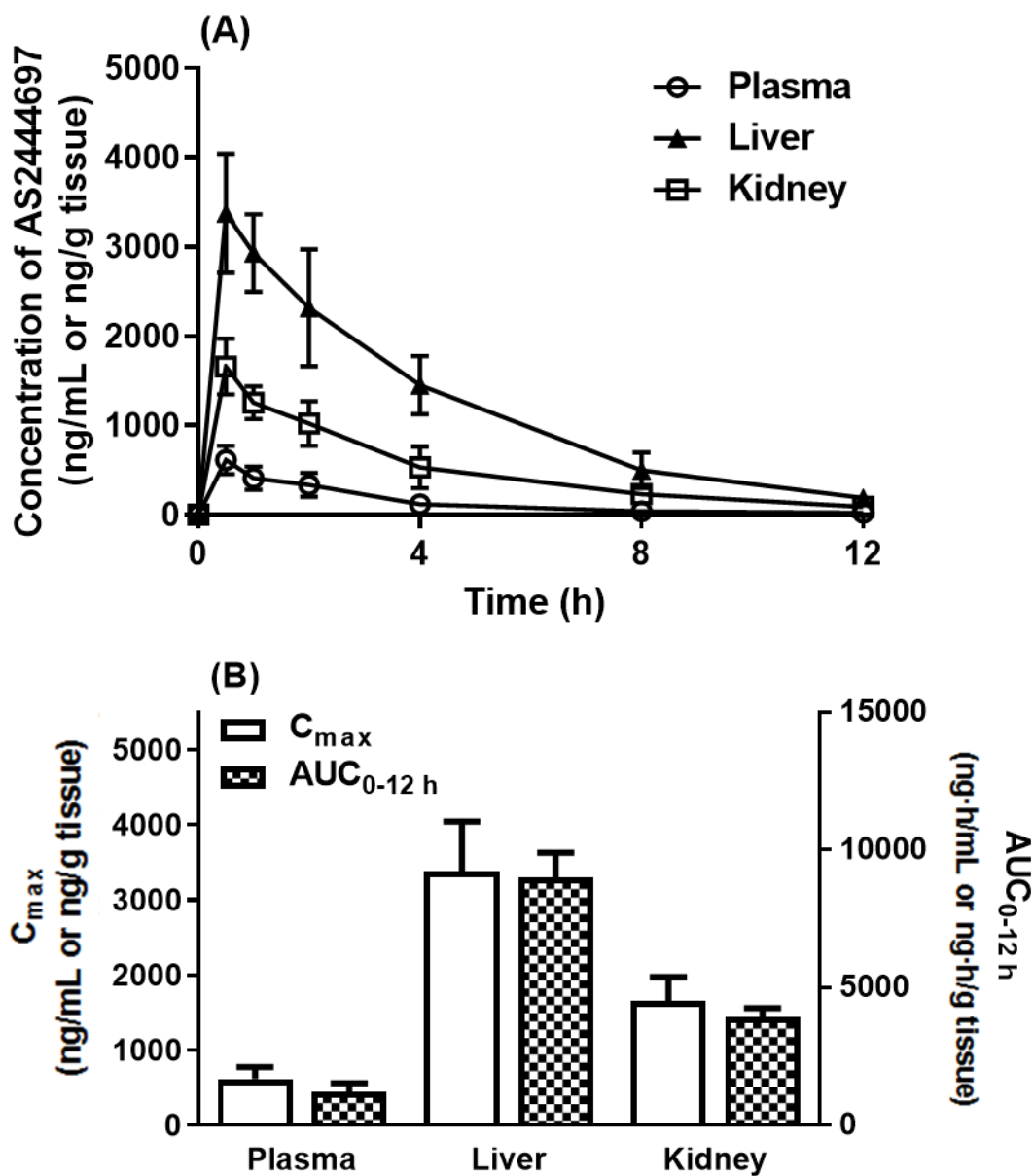


Figure 3-1. Pharmacokinetics of AS2444697 in type 2 diabetic mice. (A) Time course of changes in plasma, liver, and kidney concentrations of the unchanged drug; (B) C_{max} and AUC for 12 h after oral administration of AS2444697 (3 mg/kg). Data are expressed as the mean ± SD for 3 animals per sampling point.

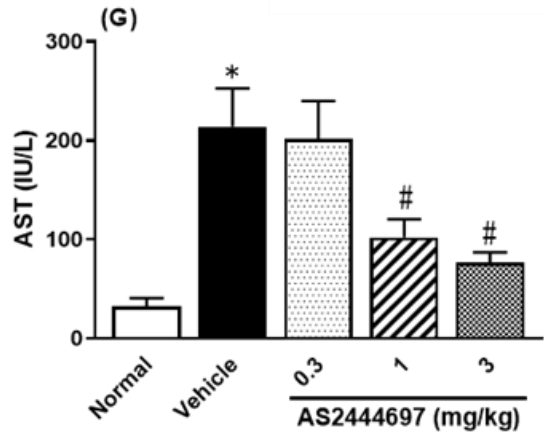
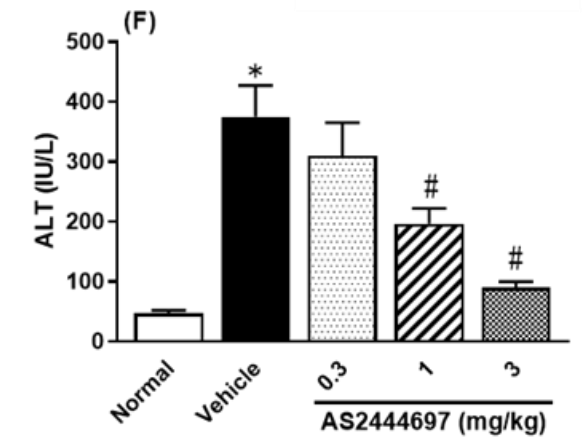
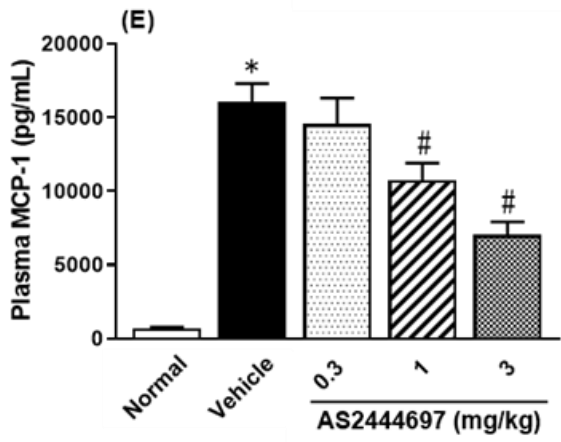
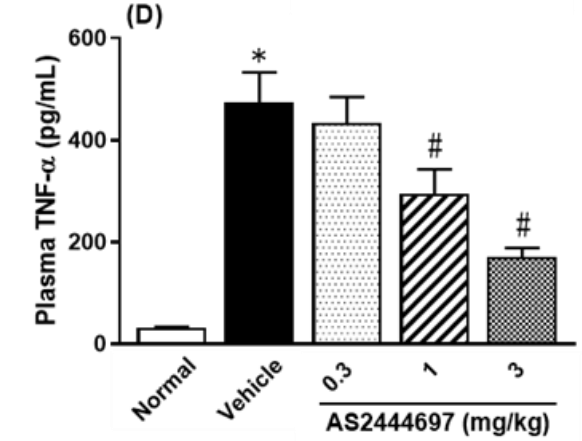
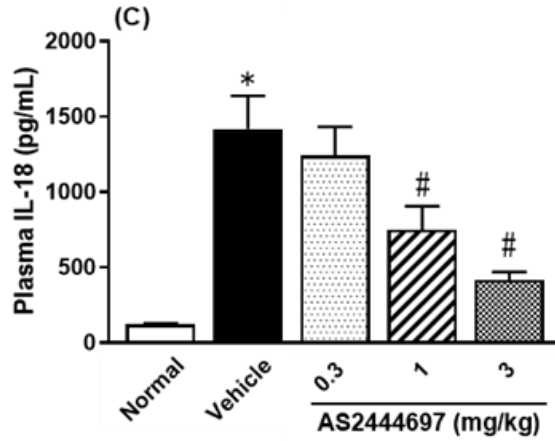
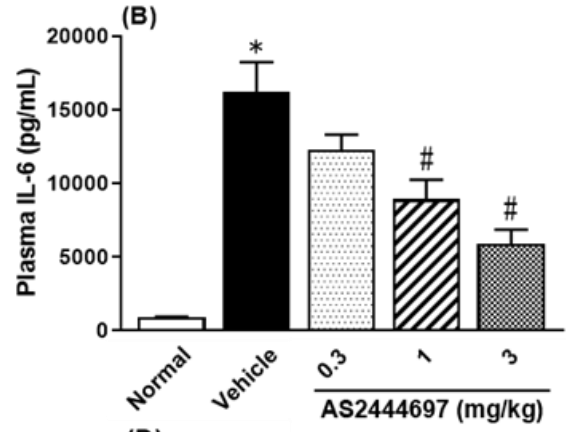
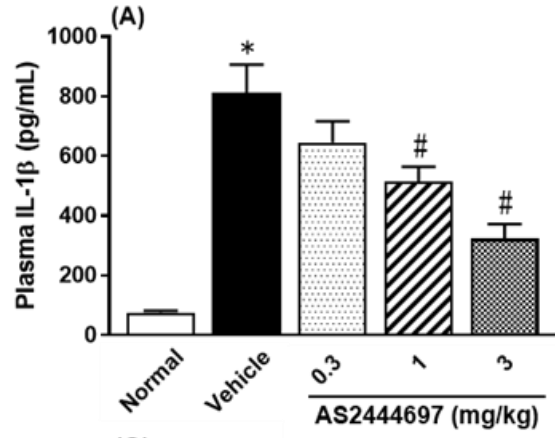


Figure 3-2. Effects of AS2444697 on LPS/GalN-induced increases in plasma levels of (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-18, (D) TNF- α , (E) MCP-1, (F) ALT, and (G) AST. AS2444697 (0.3–3 mg/kg) was orally administered to type 2 diabetic mice, and LPS/GalN was intraperitoneally injected 0.5 h later. Blood samples were collected at 2 h for the measurement of plasma IL-6, IL-18, TNF- α , and MCP-1 levels and at 8 h for the measurement of plasma IL-1 β , ALT, and AST levels. Values are mean \pm SEM for 4 animals per group. * p < 0.05 vs. normal group, # p < 0.05 vs. vehicle group.

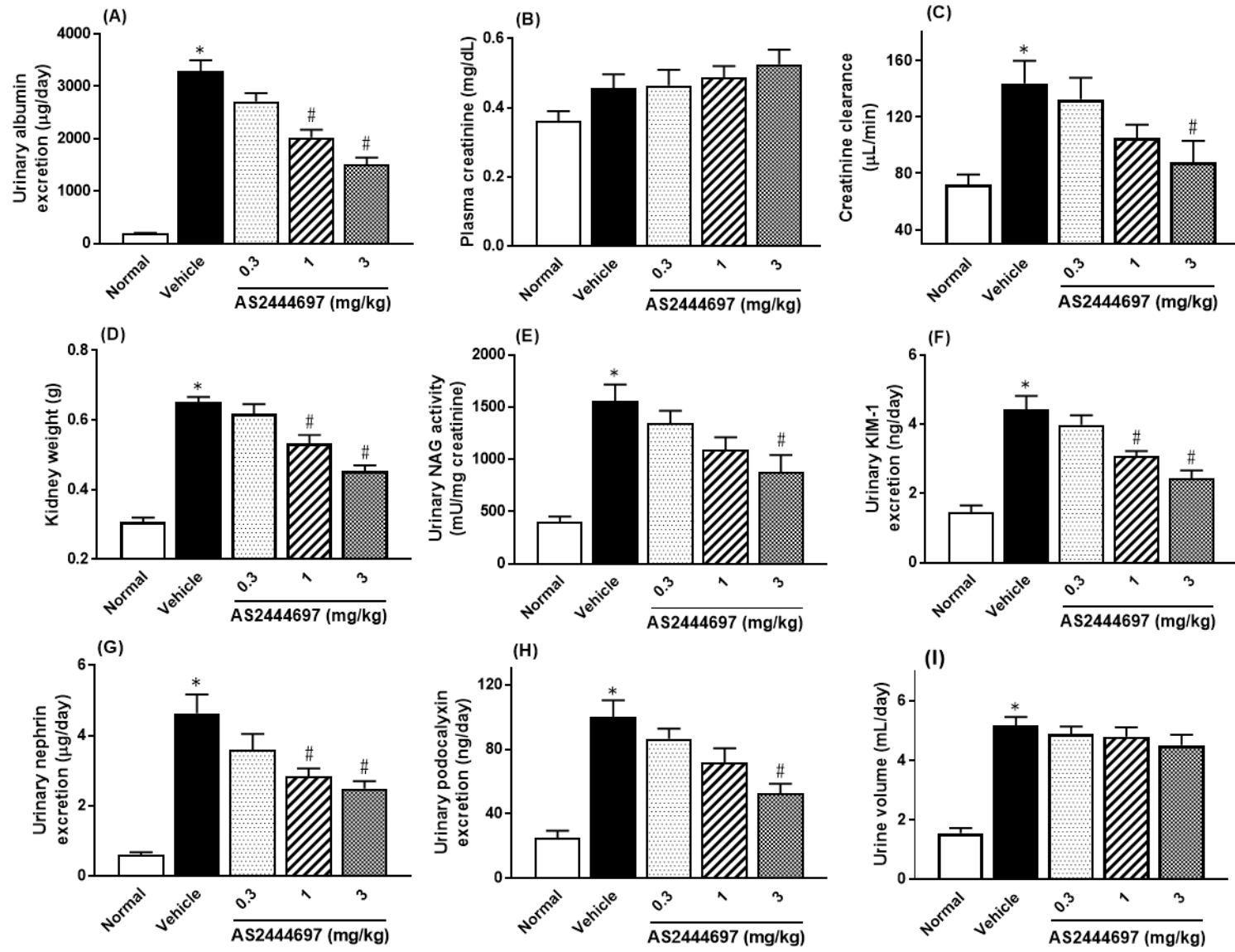
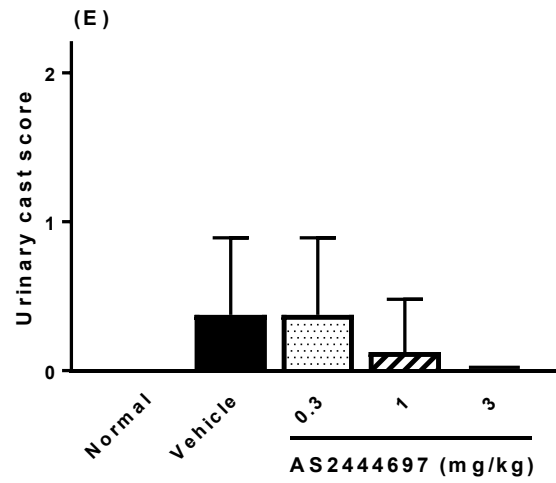
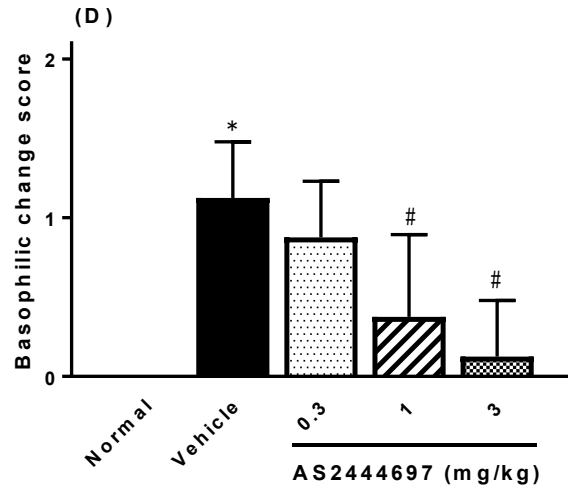
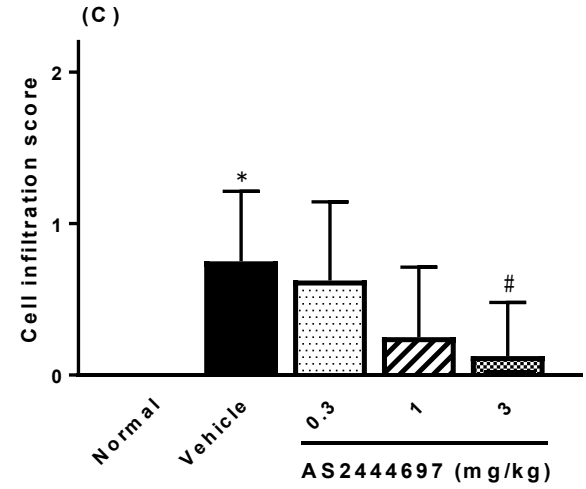
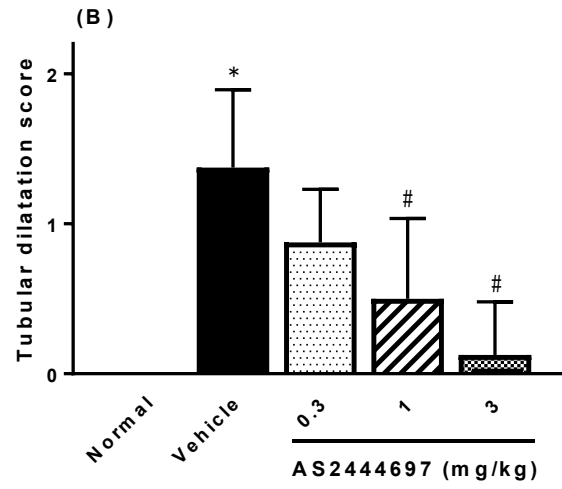
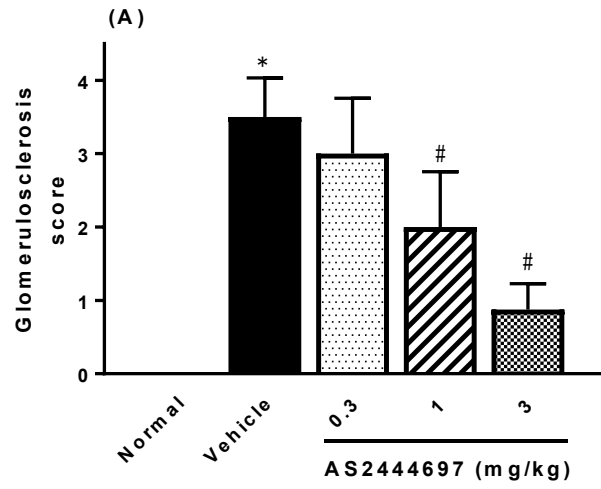


Figure 3-3. Effects of repeated administration of AS2444697 on renal parameters, (A) urinary albumin excretion, (B) plasma creatinine, (C) creatinine clearance, (D) kidney weight, (E) urinary NAG activity, and urinary excretion of (F) KIM-1, (G) nephrin, and (H) podocalyxin, in type 2 diabetic mice. AS2444697 was orally administered to diabetic mice twice daily for 4 weeks. Values are mean \pm SEM for 8 animals per group. * $p < 0.05$ vs. normal group, # $p < 0.05$ vs. vehicle group.



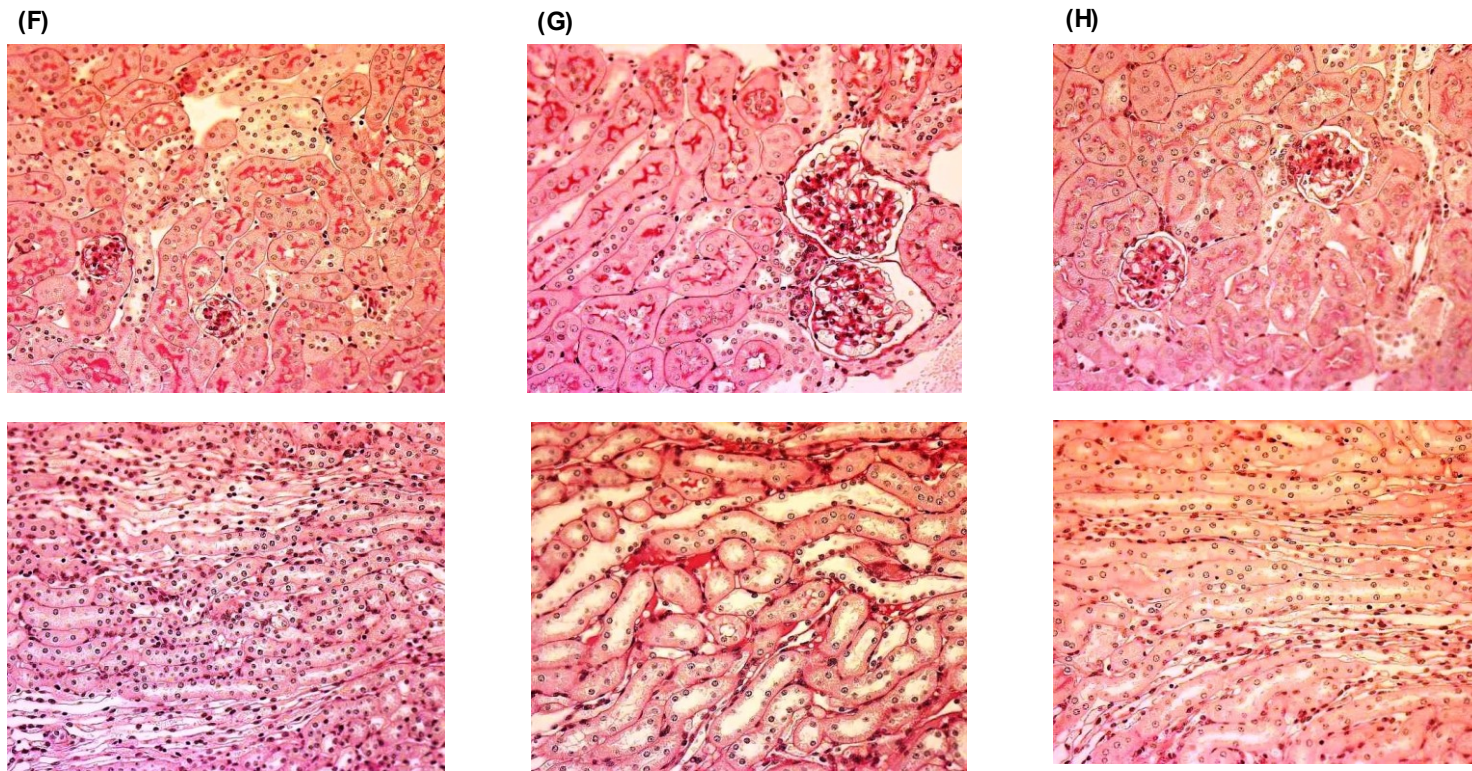


Figure 3-4. Improvement in renal injury by repeated administration of AS2444697 in type 2 diabetic mice. Effects of AS2444697 on histopathological scores for (A) glomerulosclerosis, (B) tubular dilatation, (C) cell infiltration, (D) basophilic change, and (E) urinary cast. Values are mean \pm SD for 8 animals per group. * $p < 0.05$ vs. normal group, # $p < 0.05$ vs. vehicle group. Representative light micrographs of PAS-stained sections of renal tissue obtained from (F) normal, (G) diabetic vehicle-treated, and (H) AS2444697 (3 mg/kg)-treated mice. Magnification: x25.

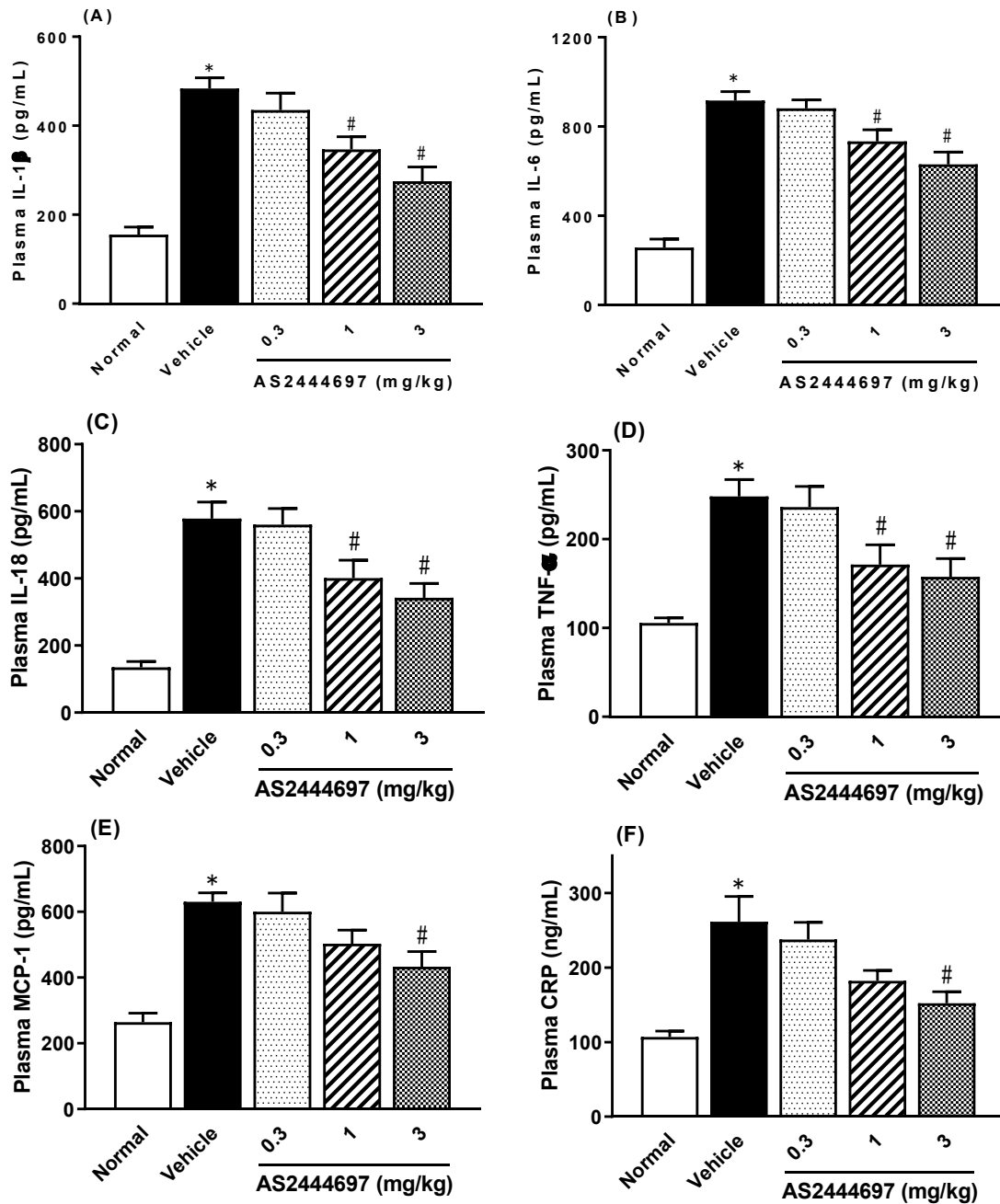


Figure 3-5. Effects of repeated administration of AS2444697 on plasma levels of proinflammatory cytokines, (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-18, (D) TNF- α , (E) MCP-1, and (F) CRP, in type 2 diabetic mice. AS2444697 was orally administered to diabetic mice twice daily for 4 weeks. Values are mean \pm SEM for 8 animals per group. * p < 0.05 vs. normal group, # p < 0.05 vs. vehicle group.

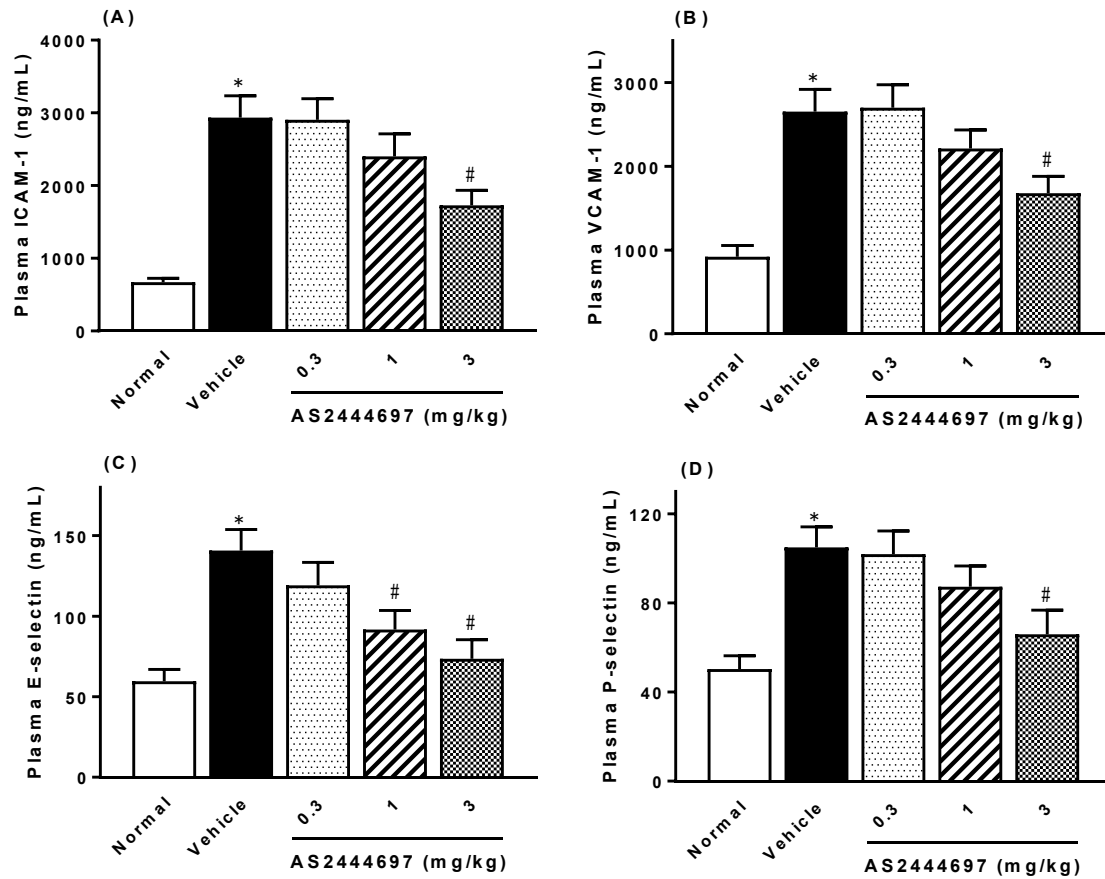


Figure 3-6. Effects of repeated administration of AS2444697 on endothelial dysfunction parameters, plasma (A) ICAM-1, (B) VCAM-1, (C) E-selectin, and (D) P-selectin levels, in type 2 diabetic mice. AS2444697 was orally administered to diabetic mice twice daily for 4 weeks. Values are mean \pm SEM for 8 animals per group. * $p < 0.05$ vs. normal group, # $p < 0.05$ vs. vehicle group.

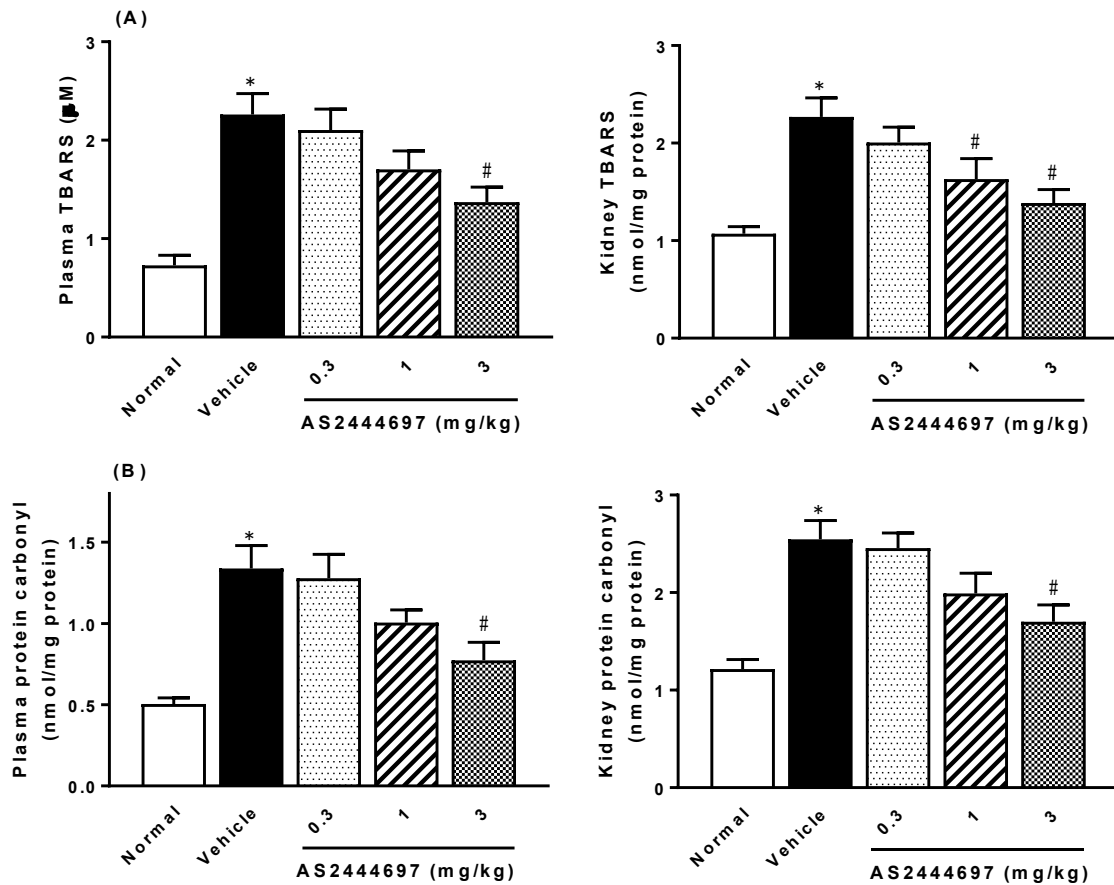


Figure 3-7. Effects of repeated administration of AS2444697 on oxidative stress biomarkers, plasma (left) and renal (right) levels of (A) TBARS and (B) protein carbonyl, in type 2 diabetic mice. AS2444697 was orally administered to diabetic mice twice daily for 4 weeks. Values are mean \pm SEM for 8 animals per group. * $p < 0.05$ vs. normal group, # $p < 0.05$ vs. vehicle group.

第四章：総括

本研究は、慢性腎臓病（CKD）に対する新規治療薬を創製し、CKD 患者に新しい治療選択肢を提供することを目指すものである。CKD に至る背景疾患として、主に高血圧（血行動態異常）、糖尿病（高血糖誘発血管障）、糸球体腎炎（免疫炎症反応）が考えられる。高血圧、糖尿病に対する降圧薬、抗糖尿病薬による治療によって、CKD の進行を遅らせることはできるが、その効果は充分ではない。糸球体腎炎に対するステロイドや免疫抑制薬による治療はその副作用によって充分な効果を得ることができていないと考えられる。しかしながら、既存の非特異的な抗炎症薬や免疫抑制薬ではなく、疾患特異的な炎症のみを抑制することができれば、副作用の懸念が少ない治療となり、充分な効果を得る可能性があるのではないかと考えた。ところが、CKD を適応症として開発が進められている薬剤のうち、炎症抑制を機序とするものは少なく、単一の炎症性サイトカインなどを標的とする薬剤が散見される程度であり、承認に至った薬剤はない状況が続いている。DN を含む CKD においては、特定の感染症や一部の自己免疫疾患のように炎症の原因を決定できないため、創薬標的として1つの炎症性サイトカインや受容体を同定するのは困難であり、また、仮に単一の炎症性サイトカインや受容体によるシグナルを抑制しても、その効果は充分でないと考えられた。そこで、CKD や DN における炎症性サイトカイン産生の引き金として考えられている LPS や遊離脂肪酸 (FFA)、IL-1 β /IL-18 などの複数のリガンド (Creely et al., 2007; Cha et al., 2013; Nakamura et al., 2005; Hasegawa et al., 1991) やその受容体である TLRs と IL-1 β /IL-18 受容体の下流のシグナル伝達経路は IRAK-4 を介していることに着目し、IRAK-4 を阻害することによって、この複数のリガンドによる炎症反応を効果的に抑制できるのではないかと考えた。以上のことから、DN を含む CKD 進行抑制の機序として IRAK-4 阻害剤が CKD 進展抑制薬と成り得るとの仮説 (Figure 1-5) を実証するための研究を開始した。

アステラス製薬株式会社（東京、日本）の化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングを実施し、IRAK-4 阻害活性を持つ化合物母核に対して基礎薬理的検討と修飾合成、最適化合成を組み合わせた検討により、新規 IRAK-4 阻害剤として AS2444697 の創製に至った。AS2444697 の *in vitro* の薬理的な作用として、ヒトとラットの IRAK-4 を 21 nM の IC₅₀ 値で阻害することが報告されている。また、IL-1 β および TNF α で刺激された A549 からの IL-6 産生を、それぞれ 250 nM および 3900 nM の IC₅₀ 値で阻害することも示されている。さらに AS2444697 は、LPS によって誘発される末梢血単核細胞 (PBMC) からの TNF α および IL-6 産生を阻害し、IC₅₀ 値はそれぞれ 47 nM および 59 nM と報告されている (Imanishi et al., 2011)。なお、DN および CKD における検証に際し、糖尿病マウスからの PBMC においても LPS 誘発による TNF α 産生の阻害について同程度の IC₅₀ 値が得られることを確認している (data not shown)。

AS2444697 は、5/6Nx ラットおよび糖尿病マウスへの反復投与試験においては、1 日 2 回の反復投与を行っている。しかしながら、正常マウスおよび糖尿病マウスへの単回投与試験において、有意な抗炎症作用効果は投与後最大 8 時間までしか確認しておらず、薬物動態学の評価においても、5/6Nx ラットおよび糖尿病マウスにおいて約 0.5~1 時間をピークに、半減期は約 2~4 時間であるため、反復投与期間中、24 時間持続的に抗炎症作用が維持されていることは確認できていない。また、1 日 3 回以上の反復投与での AS2444697 の薬理効果を検討していないことから、本研究で示された AS2444697 の 1 日 2 回投与による腎保護効果は、AS2444697 の最大効果を十分に評価できていない可能性があり、5/6Nx ラットおよび糖尿病マウスへの単回投与時よりも、連投時において抗炎症作用がやや減弱している原因の 1 つである可能性も考えられた。予備実験として別の *in vivo* 試験では 10 mg/kg までの抗炎症作用が確認できていることから (data not

shown)、臨床において AS2444697 の薬理効果を最大に発揮し得る投与用量や投与用法を達成するために、今後、10 mg/kg 以上の高用量での詳細な薬理評価や、薬効および薬物動態の向上を目指した追加研究が必要と考えられる。

CKD のなかでも特に医療ニーズの高い DN に対する有効性を検証することは重要である。高血圧を伴った DN に対する治療薬として既に ACE 阻害薬、ARB は適応を承認されており、その承認の根拠となった第 3 相臨床試験における対象は CKD ステージが G3-G4 に相当する患者であった (Brenner et al., 2001)。動物モデルのヒト臨床予測性の限界はあるものの、DN 治療薬としての臨床上的有効性を予見する観点では、CKD ステージ G3-G4 に相当する動物モデルでの有効性を評価することは有用であると考えられた。しかし、本研究で使用した 5/6Nx ラットモデルはタンパク尿の増加と高度な GFR の低下が観察され、CKD ステージ G3 に相当すると考えられるが、糖尿病を発症していないため DN モデルには該当せず、CKD のなかでも DN を対象と考えた際には臨床における薬効の予見性が充分ではない可能性がある。一方、本研究で用いた DN モデルである 2 型糖尿病の KK/Ay マウスはアルブミン尿の上昇が観察されることから糸球体バリアー機能障害が起きているものの GFR の低下は観察されず、CKD ステージとしては早期 DN の G1 に相当するため、CDK ステージ 3 に相当する DN に対する臨床における薬効の予見性としては不十分である可能性が考えられた (Figure 4-1)。現状では、GFR の高度低下を伴う標準的な DN モデルの報告は少ない状況であるが、CKD ステージ G3 以降の高度に GFR が低下した腎臓においては、CKD 発症、進展の要因となった原疾患に関係なく、糸球体の持続的な障害による糸球体硬化の増悪、または尿細管間質線維化による尿細管周囲の毛細血管動態の障害に起因した糸球体周辺の水行動態障害により、糸球体濾過機能のさらなる低下が引き起こされ、腎機能廃絶へ

至ると考えられている。本概念は final common pathway としても知られており (Nangaku, 2006)、本研究で用いた 5/6Nx ラットにおいて、final common pathway において認められる糸球体硬化や尿細管間質線維化が観察されたことから、本モデルは原疾患とは関係なく、CKD ステージ G3 以降の病態を反映、すなわち DN の CKD ステージ G3 以降の病態も含めて反映できると考えられた。ゆえに、本研究では、高度に GFR が低下した CKD における final common pathway を反映した病態と考えられる 5/6Nx ラットにおける腎保護作用、および早期 DN の病態を反映していると考えられる KK/Ay マウスにおける高血糖に起因した糸球体障害によるアルブミン漏出に対する抑制作用を評価し、これらのモデルにおける有効性の結果から、臨床における G3-4 相当の DN を含む CKD 患者における AS2444697 の有効性を検証した。

CKD ステージ G3 以降のモデルである 5/6Nx ラットにおいて、AS2444697 の反復投与は、全身血圧に顕著な影響を与えることなく、尿中タンパク排泄を有意に減少させ、炎症性細胞浸潤を含む尿細管障害、尿細管間質の線維化および糸球体硬化の CKD 進展における final common pathway と考えられる組織病変を有意に軽減した。さらに、血漿クレアチニンおよび血中尿素窒素濃度の減少傾向と CCr 値低下の改善によって示されるように、AS2444697 は糸球体濾過機能低下に対して保護的な効果をもたらす可能性が示唆された。高血圧は CKD 病態進展の重要な独立した危険因子であり、RAAS 阻害薬を含む降圧薬を使用した血圧の制御は、CKD の治療に有効であることが報告されている (Ravera et al., 2006)。一方で、AS2444697 は全身血圧を有意に低下させることなく腎保護効果を示したことから、既存の降圧薬が処方されている患者においても相加的に腎保護作用を発揮する可能性を示唆している。また、早期 DN モデルである KK/Ay マウスにおいて、AS2444697 は血糖値に影響を与えることなく、アルブミン尿を有意に減少させ

た。また、予備実験的ではあるが、KK/Ay と同様の早期 DN モデル db/db マウスにおいても AS2444697 は血糖値に影響を与えることなく、アルブミン尿を有意に減少させることを確認している (data not shown)。これは、AS2444697 が持続的な高血糖により引き起こされる糸球体バリアー機能障害に対し、その病因である血糖値には直接影響することなく、組織障害を直接的に抑制する、つまり、既存の血糖降下薬が処方されている患者においても相加的に腎保護作用を發揮する可能性を示唆している。これら CKD ステージ G3 以降のモデルである 5/6Nx ラットおよび早期 DN モデルである KK/Ay マウスにおける評価結果から、AS2444697 は CKD ステージ G3 以降の DN を含む CKD 患者において既存薬と相加的に腎保護作用を示す可能性が示唆された。ゆえに、AS2444697 は現行治療では十分な効果が得られていない CKD 患者にとって新たな治療選択肢となると考えられた。

今回、CKD ステージ G1 に相当する KK/Ay マウスと CKD ステージ G3 以降に相当する 5/6Nx ラットによる有効性を確認したが、2つのモデルにおける腎保護作用に顕著な違いは認められなかった。また、腎症の重症度は異なるものの、炎症性サイトカインやケモカイン量の増加の程度についても、2つのモデルにおいて明確な差異は認められなかったことから、CKD ステージ G1 および G3 において、IRAK-4 に由来する炎症反応の病態への寄与は同程度である可能性が考えられた。今後、CKD ステージ G2 に相当するモデル、例えば 3/4 腎摘出ストレプトゾトシン (3/4NxSTZ) ラットによる有効性や炎症反応の程度を評価することにより、各 CKD ステージの病態における IRAK-4 の寄与を明らかにするとともに、CKD ステージ G2 の CKD 患者にとっての新たな治療選択肢となる可能性についても検証する必要があると考えられる。また、KK/Ay マウスの結果より、本剤は CKD ステージ G1 の CKD 患者においても腎保護作用を示すと考えられ

るが、自覚症状の1つである蛋白尿の増加が認められないステージであるため、本剤による治療の対象となる患者の層別化マーカー（血漿中の炎症性サイトカイン、ケモカイン量）等、適切な患者選択の手法の開発も必要であると考えられる。

臨床の予見性をさらに高めるためには、動物モデルにおける IRAK-4 阻害剤と標準治療に使用される ACE 阻害薬や ARB などの既存薬剤との併用効果について検討する必要がある。具体的には、本研究で用いた 5/6Nx ラットや KK/Ay マウスにおいて、ACE 阻害薬や ARB の有効性について確認済みであるため、その条件下で AS2444697 を併用することでさらなる有効性が得られることを確かめる必要がある。また、高血圧や糖尿病に依存しない腎不全の動物モデル（例えば、糸球体腎炎モデルや薬剤誘発性腎障害モデル）は ACE 阻害薬や ARB が効きにくいいため、これらのモデルにおける有効性を確認することは臨床において既存薬が効きにくい患者に対する有効性を示唆できる可能性がある。最近では 2019 年 10 月に SGLT2 阻害剤 canagliflozin が DN を適応症として、2021 年 5 月に SGLT2 阻害薬 dapagliflozin、2021 年 7 月に鉍質コルチコイド受容体遮断薬 finerenone が CKD を適応症として承認されており、これらの新しく承認された薬剤に対する追加的有用性（上乗せ効果）についても検討していく必要がある。さらに、これらの 3 剤の費用対効果について、日本では評価対象にはなっていないが、イギリスの国立保健医療研究所（NICE: The National Institute for Health and Care Excellence）において現在（2021 年 12 月時点）評価中とされており、2022 年以降、評価結果が順次公開される予定とされている。近年の医療費抑制の観点と患者さんの医療アクセスの観点からも、今後の新薬開発においては追加的有用性だけでなく、affordability も重要な検討項目になると考えられる。

CKD は急性腎障害などとは異なり基本的には不可逆的な腎機能低下であるため、CKD や DN

を適応症とした既存薬や開発段階にあるほとんどの薬剤は基本的には進行抑制薬であり、腎機能低下を抑制することはできても腎機能を回復させることはできない。今回の 5/6Nx ラット評価においても、AS2444697 によって腎機能低下は抑制されているものの腎機能の回復は認められていない。将来的には、再生医療の発展により腎機能を回復させるような治療 (Osafune, 2021) が開発される可能性は高いが、もし、そのような薬剤が開発されても腎疾患の原因となる炎症状態を抑制できていなければ、その腎機能回復効果は十分に発揮されないと考えられる。したがって、IRAK-4 阻害剤は、近い将来に開発される腎機能を改善するような治療に対しても相加的な有効性を示す可能性があると考えられた。

IRAK-4 は、細菌または非細菌性の傷害によって惹起される正常な炎症反応において極めて重要な酵素である (Medvedev et al., 2003)。しかしながら、IRAK-4 欠損症の小児は、ある種の化膿性感染症にかかりやすいが、重篤なウイルスや寄生虫感染症は報告されていない (Picard et al., 2003)。また、IRAK-4 が IL-1 β 、IL-18、TLR を介したシグナル伝達に重要な役割を果たしているにもかかわらず、成人の IRAK-4 欠損患者は慢性的な感染症にかかりにくいことも報告されている (Ku et al., 2007)。これらのことから、IRAK-4 の活性を阻害することで、炎症反応を抑制しながらも、細菌や非細菌の感染症から身を守るための十分な防御免疫を損なうことなく、CKD に対する治療効果を発揮することが期待できると考えられた。しかしながら、生体の防御免疫の観点で、AS2444697 の有効性と安全性のバランスを正しく見極め、臨床開発に進めていくためには詳細な追加試験が必要である。

IRAK-4 阻害剤の開発動向を調査したところ、多くの開発品は関節リウマチと癌を適応症に臨床試験を実施しており、前臨床においても関節炎モデル (Umar et al., 2021) や癌細胞 (Giménez

et al., 2020) に対する IRAK-4 阻害剤の有用性が報告されている。関節炎モデルについては AS2444697 においても同様の有効性を予備実験的に確認しているため (data not shown)、今後、関節リウマチの治療薬としての可能性についても詳細に検討すべき項目の 1 つである。しかしながら、抗リウマチ薬としては抗 TNF 抗体や抗 IL-6 抗体などの抗サイトカイン抗体がすでに上市されて有効な治療方法として確立しているため、動物モデルにおけるこれらの抗体との薬効の比較や上乘せ効果の確認や、これらの抗体に対して応答しない患者セグメントを同定してそのセグメントに対する有効性を確認する等、これら抗体による治療に対して IRAK-4 阻害剤の追加的有用性を明確に示す必要があると考えられる。

近年、ユビキチンプロテアソーム系による分解を利用した標的タンパク質分解誘導化合物が注目を集めており (Mullard, 2020)、この技術を応用すると IRAK-4 タンパク質そのものを特異的に分解できるため、IRAK-4 分解誘導剤の方が IRAK-4 阻害剤よりも薬効が強い可能性が示唆されている。標的タンパク質分解誘導化合物においては IRAK-4 タンパクに結合する必要はあるものの酵素活性を阻害する必要がないことは利点となる一方で、E3 ユビキチリガーゼとのリガンドのデザインおよび標的タンパクとのリガンドとのリンカーの調節など、IRAK-4 阻害剤の創製とは異なる難しさも考慮しなければならないが、AS2444697 にも活用することができればさらなる有効性が期待できると考えられた。

以上より、IRAK-4 阻害剤 は CKD 以外の治療薬や新しいタイプの薬剤としての発展性も秘めており、今後も IRAK-4 研究の進展を継続して調査していく必要がある。

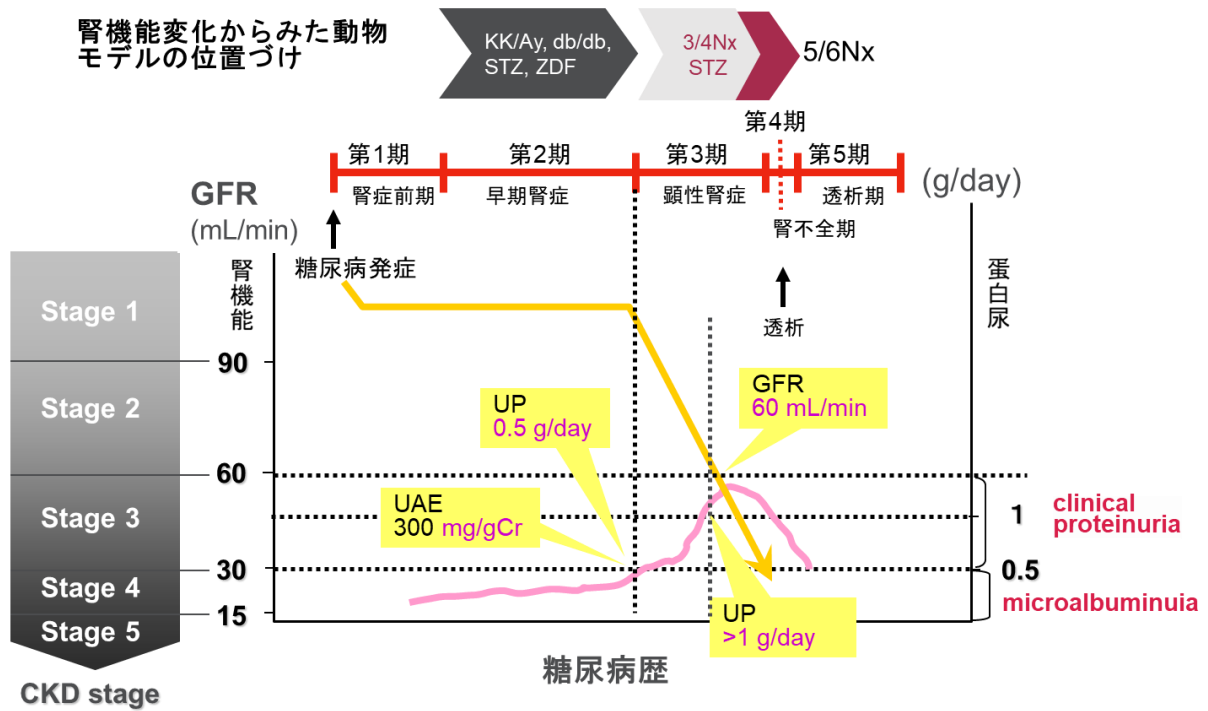


Figure 4-1. Positioning of various renal disease models in accordance with the clinical CKD grade

(槇野, 1999. 糖尿病性腎症-発症・進展機序と治療 診断と治療社を基に作成).

STZ: Streptozotocin, ZDF: Zucker diabetic fatty rat, Nx: Nephrectomy, UP: Urinary protein, UAE:

Urinary albumin excretion

参考文献

- Akmal M. 2001. Hemodialysis in diabetic patients. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation* 38: S195-S199.
- Amdur RL, Feldman HI, Gupta J, Yang W, Kanetsky P, Shlipak M, Rahman M, Lash JP, Townsend RR, Ojo A, Roy-Chaudhury A, Go AS, Joffe M, He J, Balakrishnan VS, Kimmel PL, Kusek JW, Raj DS. 2016. Inflammation and progression of CKD: The CRIC study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 11: 1546-1556.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS. 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet (London, England)* 358: 221-229.
- Booth G, Stalker TJ, Lefer AM, Scalia R, 2002. Mechanisms of amelioration of glucose-induced endothelial dysfunction following inhibition of protein kinase C in vivo. *Diabetes* 51: 1556-1564.
- Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S. 2001. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 345: 861-869.
- Carrero JJ, Stenvinkel P. 2009. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 4: S49-55.
- Cha JJ, Hyun YY, Lee MH, Kim JE, Nam DH, Song HK, Kang YS, Lee JE, Kim HW, Han JY, Cha DR. 2013. Renal protective effects of toll-like receptor 4 signaling blockade in type 2 diabetic mice. *Endocrinology* 154: 2144-2155.
- Cho ME, Kopp JB. 2010. Pirfenidone: an anti-fibrotic therapy for progressive kidney disease. *Expert*

Opinion on Investigational Drugs 19: 275-283.

Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher ff M, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL,

Kumar S. 2007. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 292: E740-E747.

Donate-Correa J, Martin-Nunez E, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernandez C, Navarro-Gonzalez JF.

2015. Inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Research* 2015: Article ID 948417, 9 pages

Donath MY, Shoelson SE. 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews*

Immunology 11: 98-107.

Elmarakby AA, Sullivan JC. 2012. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in

diabetic nephropathy. *Cardiovascular Therapeutics* 30: 49-59.

Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, Salio M, De Angelis N, Ghezzi P, Latini R, Masson

S. 2006. Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sciences* 79: 121-129.

Fioretto P, Dodson PM, Ziegler D, Rosenson RS. 2010. Residual microvascular risk in diabetes: unmet

needs and future directions. *Nature Reviews Endocrinology* 6: 19-25.

Fried L, Solomon C, Shlipak M, Seliger S, Stehman-Breen C, Bleyer AJ, Chaves P, Furberg C, Kuler L,

Newman A. 2004. Inflammatory and prothrombotic markers and the progression of renal disease in elderly individuals. *Journal of the American Society of Nephrology* 15: 3184-3191.

Ghosh SS, Krieg R, Massey HD, Sica DA, Fakhry I, Ghosh S, Gehr TW. 2012. Curcumin and enalapril

ameliorate renal failure by antagonizing inflammation in 5/6 nephrectomized rats: role of phospholipase and cyclooxygenase. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 15: F439-F454.

Giacco F, Brownlee M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research* 107: 1058-1070.

Giménez N, Schulz R, Higashi M, Aymerich M, Villamor N, Delgado J, Juan M, López-Guerra M, Campo E, Rosich L, Seiffert M, Colomer D. 2020. Targeting IRAK-4 disrupts inflammatory pathways and delays tumor development in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 34: 100-114.

Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, Uno K, Shibayama Y, Ienaga K, Kondo M. 1991. Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. *Kidney International* 40: 1007-1012.

Imanishi J, Ishikawa T, Imamura E, Mizuhara H, Iwaoka H, Evelyn B, Inami H, Mizutani T, Watanabe J, Usuda H, Nagashima S, Ito T, Kontani T, Shimizu Y, Mutoh S. 2011. Anti-inflammatory profile of AS2444697, a novel interleukin-1 receptor-associated kinase-4 inhibitor. *Arthritis & Rheumatology* 63: S390.

Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, Reyes A, Klahr S. 1995. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney International* 47: 1285-1294.

Kajitani N, Shikata K, Nakamura A, Nakatou T, Hiramatsu M, Makino H. 2010. Microinflammation is a common risk factor for progression of nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 88: 171-176.

- Kim HJ, Vaziri ND, Norris K, An WS, Quiroz Y, Rodriguez-Iturbe B. 2010. High-calorie diet with moderate protein restriction prevents cachexia and ameliorates oxidative stress, inflammation and proteinuria in experimental chronic kidney disease. *Clinical and Experimental Nephrology* 14: 536–547.
- Kim TW, Staschke K, Bulek K, Yao J, Peters K, Oh KH, Vandenburg Y, Xiao H, Qian W, Hamilton T, Min B, Sen G, Gilmour R, Li X. 2007. A critical role for IRAK-4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity. *Journal of Experimental Medicine* 204: 1025-1036.
- Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, Floege J. 1996. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney International*. 49: 666-678.
- Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghonaïm A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Marodi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. 2007. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *Journal of Experimental Medicine* 204: 2407-2422.
- Kurata A, Nishizawa H, Kihara S, Maeda N, Sonoda M, Okada T, Ohashi K, Hibuse T, Fujita K, Yasui A, Hiuge A, Kumada M, Kuriyama H, Shimomura I, Funahashi T. 2006. Blockade of Angiotensin II type-1 receptor reduces oxidative stress in adipose tissue and ameliorates adipocytokine dysregulation. *Kidney International* 70: 1717-1724.

- Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D. 2013. Novel drugs and intervention strategies for the treatment of chronic kidney disease. *British Journal of Clinical Pharmacology* 76: 536-550.
- Lebleu VS, Sugimoto H, Miller CA, Gattone VH 2nd, Kalluri R. 2008. Lymphocytes are dispensable for glomerulonephritis but required for renal interstitial fibrosis in matrix defect-induced Alport renal disease. *Laboratory Investigation* 88: 284-292.
- Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. 2002. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 16: 5567-5572.
- Lin M, Tang SC. 2014. Toll-like receptors: sensing and reacting to diabetic injury in the kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation* 29: 746-754.
- Lin SL, Chiang WC, Chen YM, Lai CF, Tsai TJ, Hsieh BS. 2005. The renoprotective potential of pentoxifylline in chronic kidney disease. *Journal of the Chinese Medical Association* 68: 99-105.
- Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Pena AB, Lopez-Hernandez FJ. 2010. Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives. *Pharmacology and Therapeutics* 128: 61-81.
- Matsui H, Suzuki M, Tsukuda R, Iida K, Miyasaka M, Ikeda H, 1996. Expression of ICAM-1 on glomeruli is associated with progression of diabetic nephropathy in a genetically obese diabetic rat, Wistar fatty. *Diabetes Research and Clinical Practice* 32: 1-9.
- Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JC, Salkowski C, Zhang S, Arditi M, Gallin JI, Vogel SN. 2003. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and

- interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *Journal of Experimental Medicine* 18: 521-531.
- Mullard A. 2020. IRAK-4 degrader to take on innate immunity. *Nature Biotechnology* 38: 1221-1223.
- Nakamura A, Shikata K, Hiramatsu M, Nakatou T, Kitamura T, Wada J, Itoshima T, Makino H. 2005. Serum interleukin-18 levels are associated with nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28: 2890-2895.
- Nakhaee A, Bokaeian M, Saravani M, Farhangi A, Akbarzadeh A. 2009. Attenuation of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by *Eucalyptus globulus*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 24: 419-425.
- Nangaku M. 2006. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: A final common pathway to end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 17: 17-25.
- Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. 2008. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 19: 433-442.
- Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, Himmelfarb J. 2004. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney International* 65: 1009-1016.
- Ortega LM, Fornoni A. 2010. Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* 2: 49-62.
- Osafune K. 2021. Regenerative treatments for kidney diseases: The closest and fastest strategies to solving related medical and economic problems. *Artificial Organs* 45: 447-453.

- Palsson R, Patel UD. 2014. Cardiovascular complications of diabetic kidney disease. *Advances in Chronic Kidney Disease* 21: 273-280.
- Pereira BJ, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, Dinarello CA. 1994. Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney International* 45: 890-896.
- Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammis D, Davies G, Al-Ghonaïm A, Al-Rayes H, Al-Jumrah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidallo MA, Ozinsky A, Casanova JL. 2003. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 299: 2076-2079.
- Pozzi C, Andrulli S, Pani A, Scaini P, Roccatello D, Fogazzi G, Pecchini P, Rustichelli R, Finocchiaro P, Del Vecchio L, Locatelli F. 2013. IgA nephropathy with severe chronic renal failure: a randomized controlled trial of corticosteroids and azathioprine. *Journal of Nephrology* 26: 86-93.
- Ravera M, Re M, Deferrari L, Vettoretti S, Deferrari G. 2006. Importance of blood pressure control in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 17: S98-S103.
- Shaw JE, Sicree RA, Zimme, PZ. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 87: 4-14.
- Shikata K, Makino H. 2013. Microinflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Investigation* 4: 142-149.
- Silverstein DM. 2009. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatric Nephrology* 24: 1445-1452.

- Suliman ME, Stenvinkel P. 2008. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 19: 329-345.
- Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC. 2002. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 18: 750-756.
- Taal MW, Zandi-Nejad K, Weening B, Shahsafaei A, Kato S, Lee KW, Ziai F, Jiang T, Brenner BM, MacKenzie HS. 2000. Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney. *Kidney International* 58: 1664–1676.
- Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y, Takasu T, Imamura M, Li Q, Tomiyama H, Kobayashi Y, Noda A, Sasamata M, Shibasaki M. 2013. Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice. *European Journal of Pharmacology* 715: 246-255.
- Tahara A, Takasu T. 2018. Prevention of progression of diabetic nephropathy by the SGLT2 inhibitor ipragliflozin in uninephrectomized type 2 diabetic mice. *European Journal of Pharmacology* 830: 68-75.
- Tahara A, Takasu T, Yokono M, Imamura M, Kurosaki E. 2017. Characterization and comparison of SGLT2 inhibitors: Part 3. Effects on diabetic complications in type 2 diabetic mice. *European Journal of Pharmacology* 809: 163-171.
- Tavafi M. 2013. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. *Journal of Renal Injury Prevention* 2: 59-62.
- Uehara Y, Kawabata Y, Shirahase H, Wada K, Hashizume Y, Morishita S, Numabe A, Iwai J, Matsuoka

- H, Sugimoto T. 1992. Radical scavenging properties of indapamide and renal protection in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension Research* 15: 17-26.
- Umar S, Palasiewicz K, Van Raemdonck K, Volin MV, Romay B, Amin MA, Zomorodi RK, Arami S, Gonzalez M, Rao V, Zanotti B, David A. Fox DA, Sweiss N, Shahrara, S. 2021. IRAK-4 inhibition: A promising strategy for treating RA joint inflammation and bone erosion. *Cellular & Molecular Immunology* 18: 2199-2210.
- van Dieren S, Beulens JW, van der Schouw YT, Grobbee DE, Neal B. 2010. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *The European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 17: S3-S8.
- Wang Z, Wesche H, Stevens T, Walker N, Yeh WC. 2009. IRAK-4 inhibitors for inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 9: 724-737.
- Wolf G, Ziyadeh FN. 2007. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiology* 106: 26-31.
- 飯野 靖彦. 2007. 一目でわかる腎臓 第2版. *メディカル・サイエンス・インターナショナル*: 2-5.
- 厚生労働省. 2019. 「自覚症状のない糖尿病の重症化を防ぐために。－国民健康保険における糖尿病性腎症重症化予防の取組に関する調査－」: 1-2.
- 楨野 博史. 1999. 糖尿病性腎症-発症・進展機序と治療. *診断と治療社*: 192-196.
- 日本腎臓学会. 2018. エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン. *東京医学社*: 2-3.
- 日本透析学会. 2021. わが国の慢性透析療法の現況. *透析会誌* 54: 611-657.
- 奥田 俊洋. 2000. わかりやすい腎臓の構造と機能. *中外医学社*: 1-13.

謝辞

本論文の作成にあたり、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系 中村幸治 教授、楊英男 教授、内海真生 教授、伊藤弓弦 教授に心より厚く御礼申し上げます。

創薬研究への多大なご指導とご助言をいただきました、田原敦生 博士、林一己 博士、阿部正樹 博士、伊東洋行 博士、アステラス製薬開発研究部門 戸村裕一 博士、永島亮 博士、鶴川徹 博士、アステラス製薬創薬アクセレーター部門 齊田裕治 博士に心より感謝致します。

本論文の作成の機会をお与えいただきましたアステラス製薬最高科学責任者 志鷹義嗣 博士、アステラス製薬創薬アクセレーター部門長 増永太郎 博士、前アステラス製薬創薬アクセレーター部門研究戦略グループリーダー 今里堯 博士に心より深謝致します。

本研究を行うにあたり、アステラス製薬創薬アクセレーター研究戦略グループの諸氏を含む多くの方々にお世話になりました。ここに深く御礼申し上げます。

発表論文目録

1. Kondo M, Tahara A, Hayashi K, Abe M, Inami H, Ishikawa T, Ito H, Tomura Y. 2014. Renoprotective effects of novel interleukin-1 receptor-associated kinase 4 inhibitor AS2444697 through anti-inflammatory action in 5/6 nephrectomized rats. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 387: 909-919.
2. Kondo M, Tahara A, Hayashi K, Inami H, Ishikawa T, Tomura Y. 2020. Therapeutic effects of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 inhibitor AS2444697 on diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 393: 1197–1209.