

# 抗CKD(慢性腎臓病)効果のある薬物のスクリーニングに有効なアッセイ系の構築

横浜市立大学 医学部 医学科  
循環器・腎臓・高血圧内科学  
准教授 石上 友章

2022年10月25日

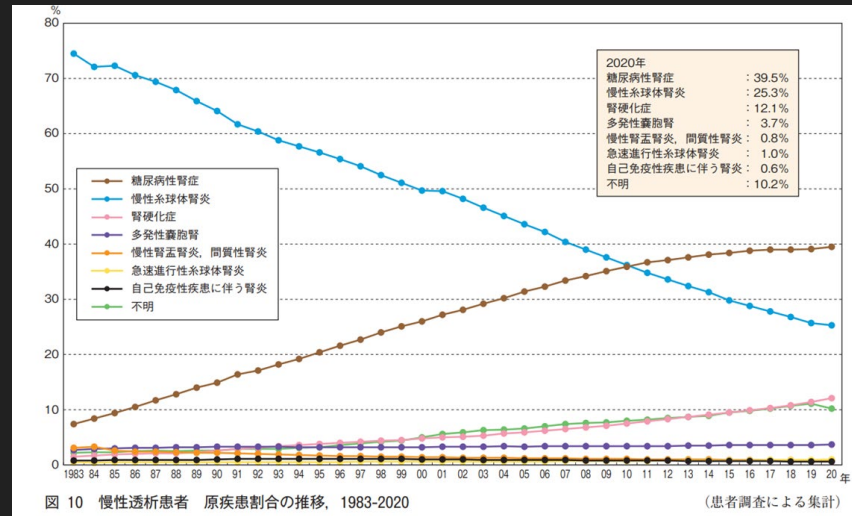
## 近位尿細管アンジオテンシノーゲン(AGT)を標的にした創薬 ～背景～

- 1, レニン・アンジオテンシン系は、体液・電解質の恒常性を維持する生理的なシステムである。
- 2, ヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子は、高血圧症・食塩感受性の原因遺伝子であり、real thrifty geneである。
- 3, レニン・アンジオテンシン系には、全身性レニン・アンジオテンシン系と尿細管レニン・アンジオテンシン系がある。
- 4, 既存のレニン・アンジオテンシン系阻害薬では、腎糸球体血行動態に対する作用と、尿細管に対する作用とを分離できないために、腎機能の恒常性の維持が破綻してしまうリスクがあり、複数の臨床試験によってその限界が示唆されている。
- 5, CKDは、成人の8人に1人が罹患しており、末期腎不全に至るまでの病態を修正・解消する有効な薬物に乏しく、典型的なUnmet Medical Needsといえる。
- 6, 代表的なCKDの一つ、多嚢胞性腎症(PKD)は、治療法がほとんどない。  
患者数は国内で3万人、欧州では約20万人、米国には約12万人と推定されている。  
PKDの原因遺伝子であるPC1/PC2は、尿細管上皮の繊毛(Cilia)の主要な構成成分であり、尿細管の拡張により、腎組織が嚢胞に置換されることで、腎機能が廃絶する。PKDの嚢胞には、尿細管由来の高濃度のレニン・アンジオテンシノーゲンが存在し、PKDモデル動物にAGT ASOによってAGT遺伝子を抑制すると、嚢胞が縮小することが判明した。

# 慢性腎臓病(CKD)は、Unmet Medical Needs- 有効な薬剤がない。

CKD 慢性腎臓病

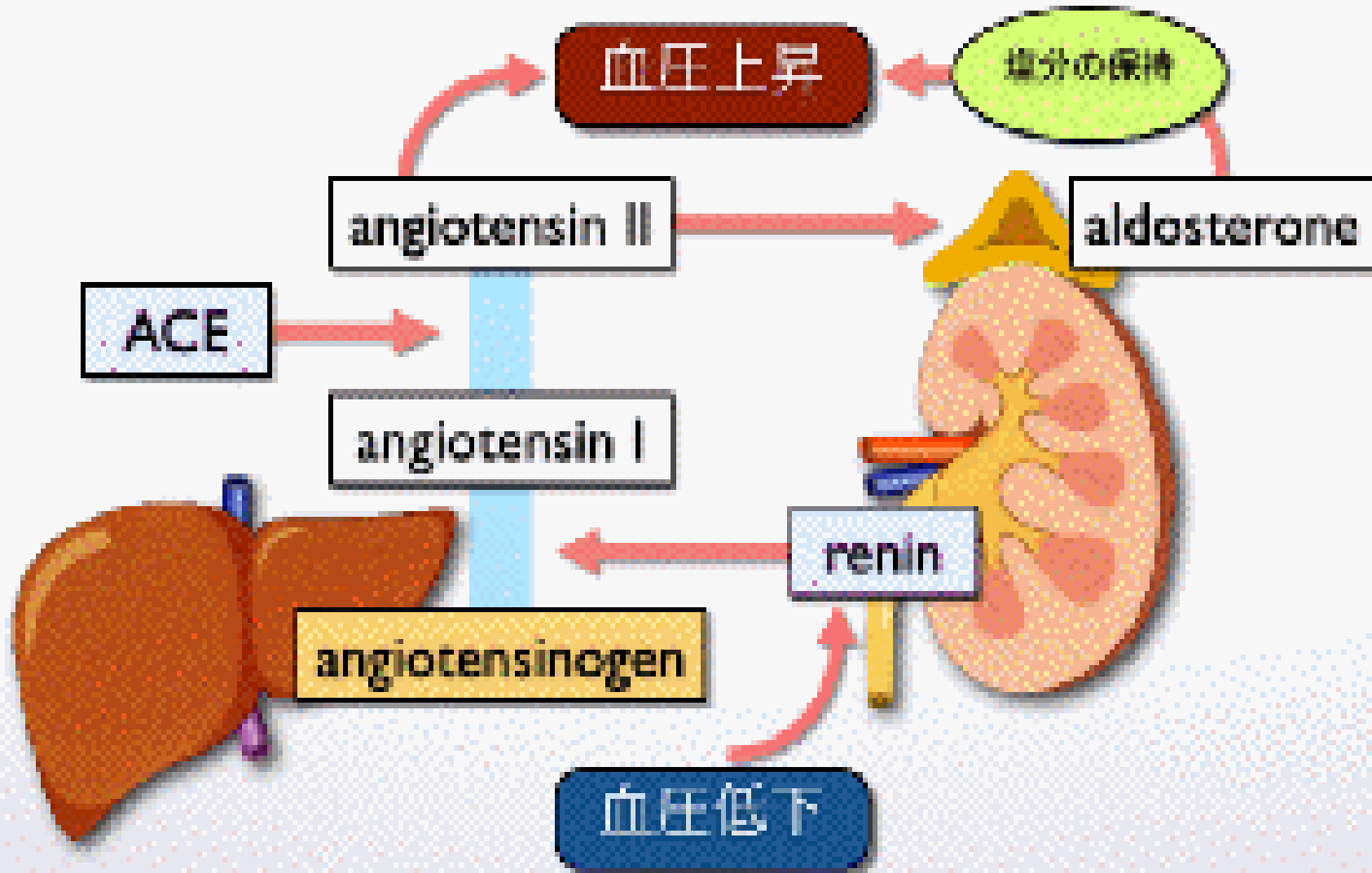
- ・ CKD(慢性腎臓病)は、健康長寿の脅威であり、典型的なUnmet Medical Needsである。
- ・ CKD(慢性腎臓病)は、本邦成人の8人に1人であり、約580万人弱を数える。(日本腎臓学会)
- ・ 代表的なCKDの一つである、PKD(多嚢胞性腎症)は、治療法がほとんどなく、患者数は、国内で約3万人・欧州には約20万人、米国には約12万人と推定されている。



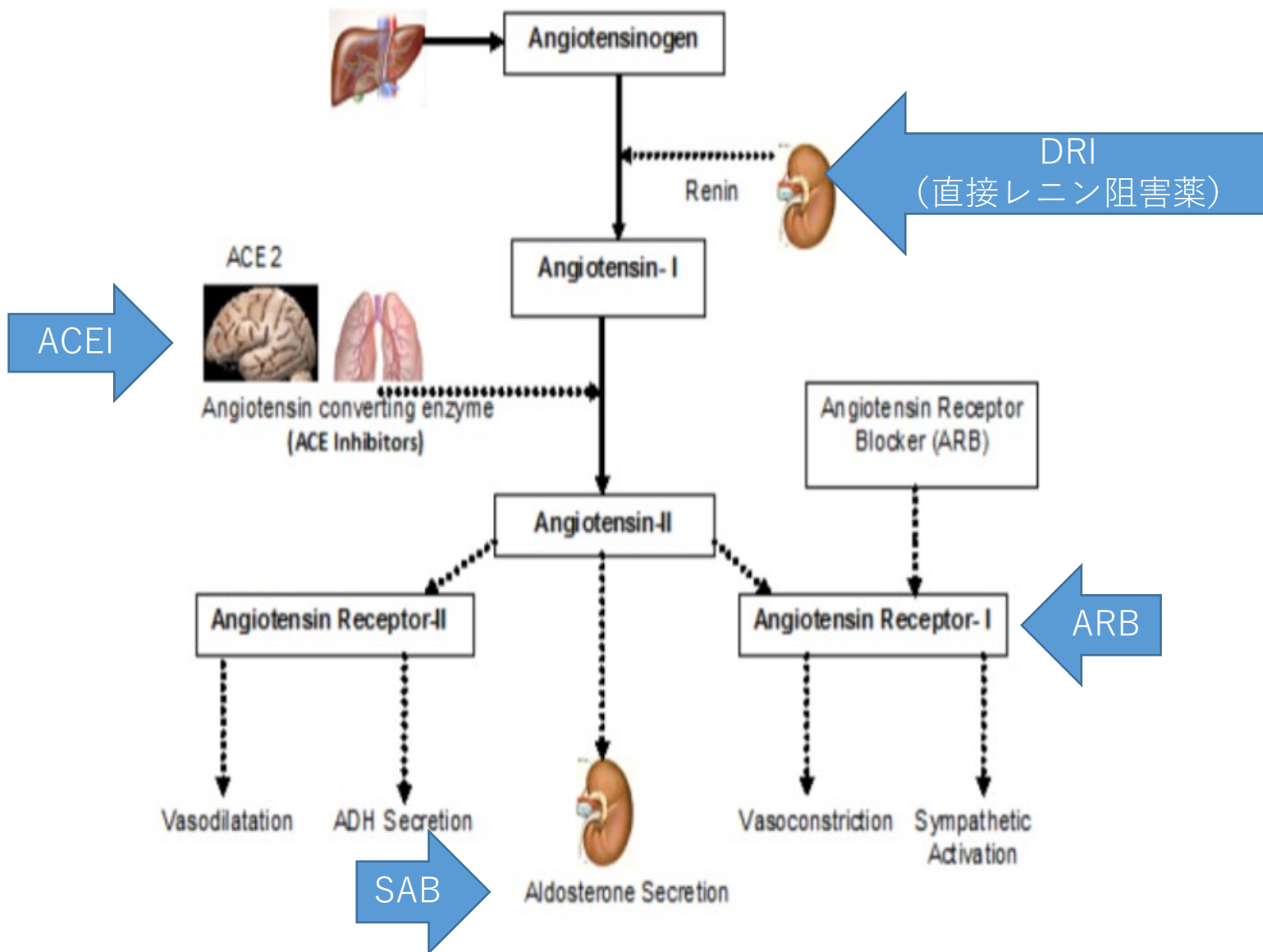
# 本技術が提供する、新技術・解決策

- 不死化ヒト近位尿細管細胞と、近接ホモジニアスアッセイをカスタム化した高感度・ハイスループットのアンジオテンシノーゲン(AGT)の測定系からなる、近位尿細管細胞からのAGT分泌抑制効果をもった物質・化合物を選択するアッセイ系を構築した。
- 東京大学・創薬機構から提供された、低分子化合物3000種類を対象に、本法を使ったスクリーニングを行った結果、同一クラスの低分子化合物 (Statin類)を特定することが出来た。
- StatinのAGT分泌抑制効果については、濃度依存性・細胞特異性を確認することができた。
- 尿細管レニン・アンジオテンシン系の基質である、近位尿細管AGTの産生・分泌を抑制する、抗CKD薬の創薬に有効・有用な技術である。
- HMGCoA還元酵素阻害薬であり、脂質代謝異常症治療薬であるスタチン類は、近位尿細管アンジオテンシノーゲン分泌阻害作用により、慢性腎臓病の治療剤となる。

# Renin-Angiotensin-Aldosterone System



“古典的”レニン・アンジオテンシン系





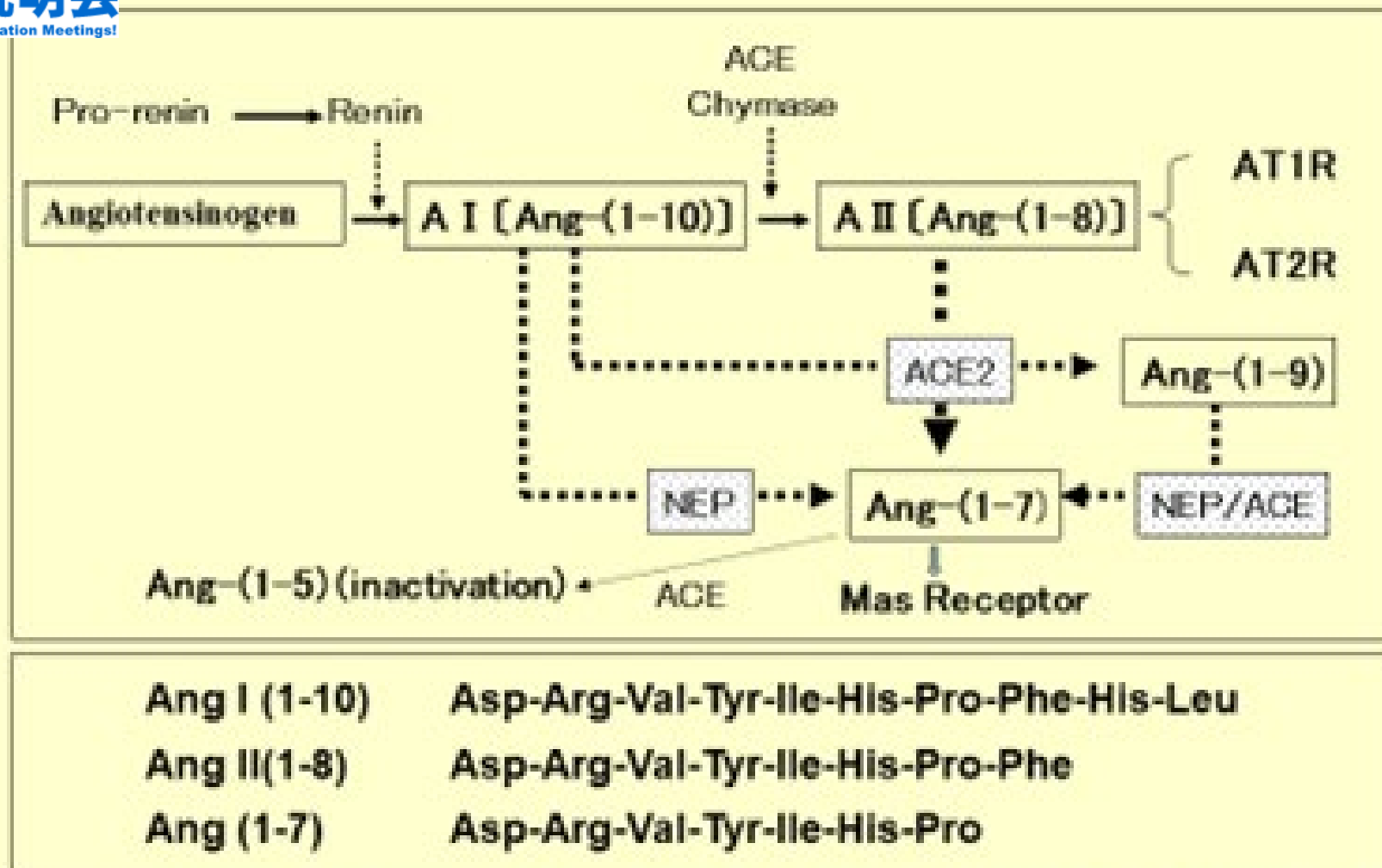
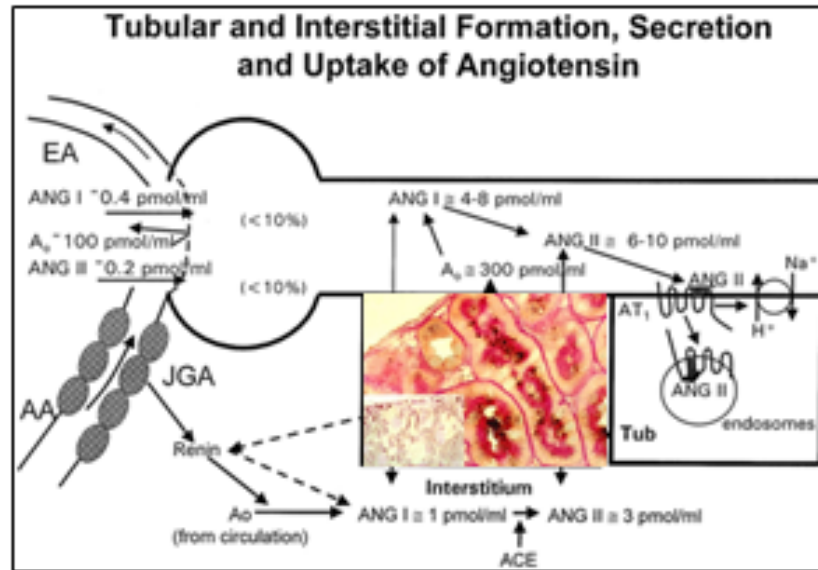


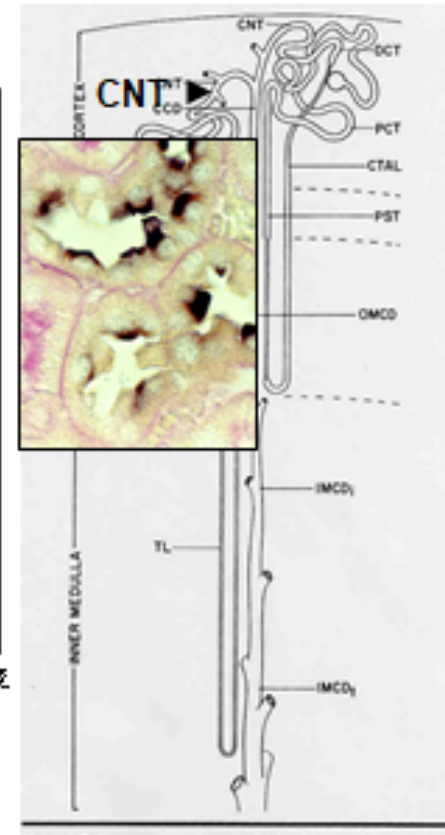
図1 Current metabolic map for RAS and Ang-(1-7)/ACE2 system and the structures of angiotensin peptides.

Modified from:  
Ferrario, C. M. et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 289:  
H2281-H2290 2005

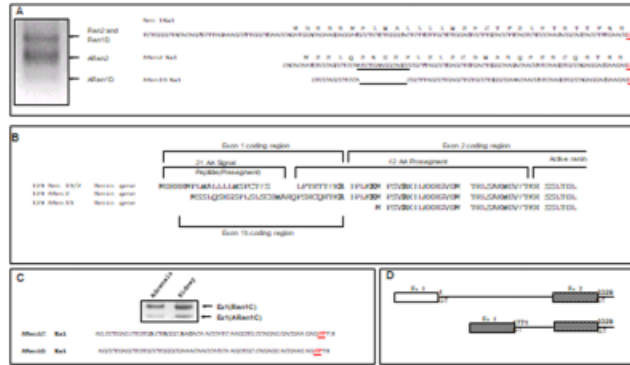
# Tubular renin-angiotensin system



L Gabriel Navar et al; Kidney Int.2004より改変



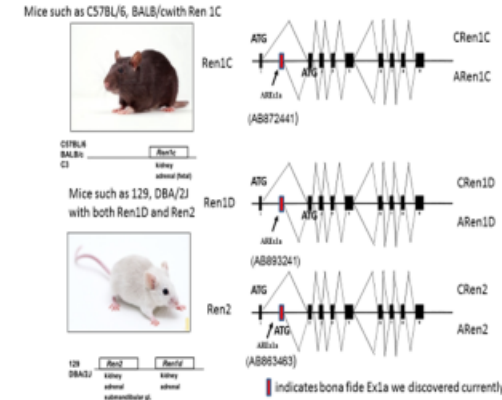
近位尿細管細胞(PT)には、アンジオテンシノーゲンが発現し、結合尿細管(CNT)/皮質集合管(CCD)には新規レニンが発現しており、尿細管レニン・アンジオテンシン系(Tubular RAS)として、生体のナトリウム代謝の恒常性の維持に働いています。Tubular RASの異常により、食塩感受性・高血圧症の病態がもたらされると考えられます。



Ishigami T, et al. Hypertension. 2014;64:125-133.

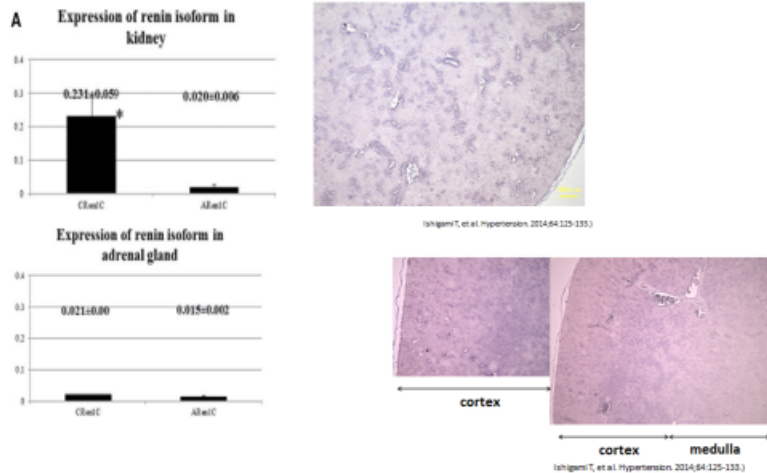
石上准教授らの研究グループは、5'RACE法を使って、第二のレニンを発見しました。マウスには、3種類のレニン遺伝子が存在することが知られており、それぞれに新規レニンを発見しました。

マウス遺伝子には、Ren1C, Ren1D, Ren2の3種類存在し、それぞれに新規レニンを発見した。  
(Ishigami T, Kino T, Chen L, Umemura S, et al. Hypertension 2014)

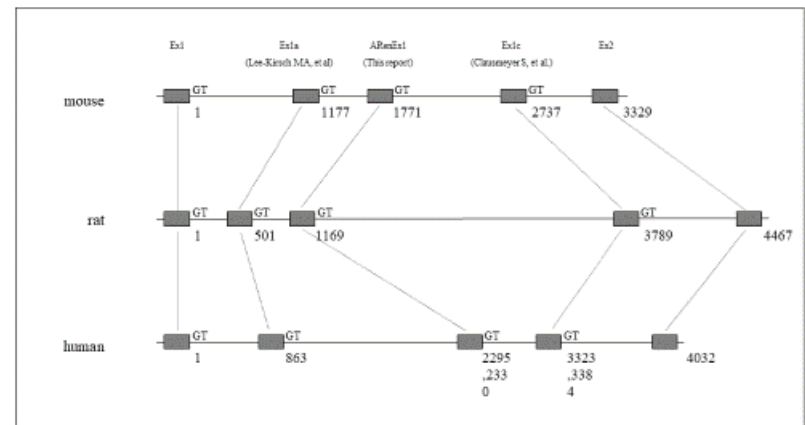


レニンは、レニン・アンジオテンシン系の律速酵素であり、高血圧症の成因として重要な物質です。従来から知られているレニンは、傍糸球体装置(JGA)に存在する分泌タンパクとされていました。石上准教授らは5'RACE法という、遺伝子の転写開始点を明らかにする手法を使って、レニン遺伝子が二つあることを発見しました。新しく発見されたレニンは、in situ hybridization法によって結合尿細管に局在することが明らかになり、尿細管レニン・アンジオテンシン(tubular RA)系の重要な構成要素であると考えられます。

新規レニン(Alternative Renin:ARen1C)は、結合尿細管・皮質集合管に局限して発現しており、古典的レニン(Classical Renin:CRen1C)の約10分の1の発現量である。



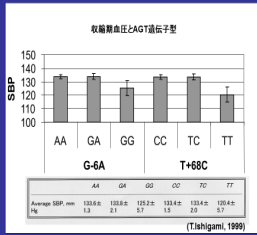
ヒト・ラット・マウスのレニン遺伝子イントロン1に認められるARen Exon 1a配列



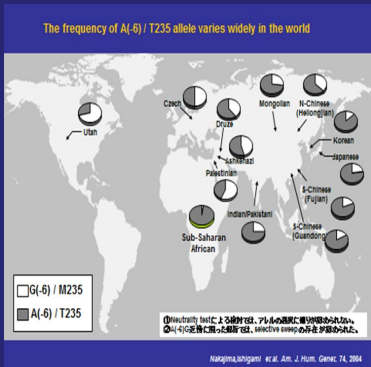
Multiple Comparisons for conserved sequence of alternative exon among rodents and human

Ishigami T, et al. Hypertension. 2014;64:125-133

# Tubular RAS and ENaC-Nedd4L-Proteasome system

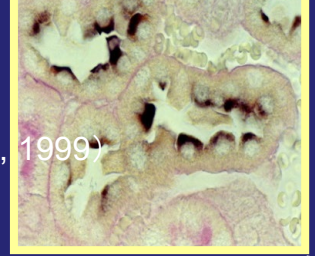


((AGT and HT, 1992, 1997, 1999))

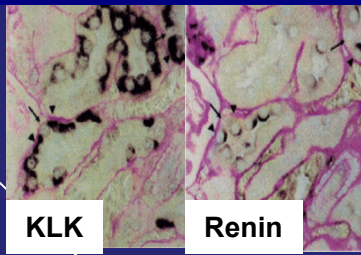


((AGT and HT, 2002, 2004))

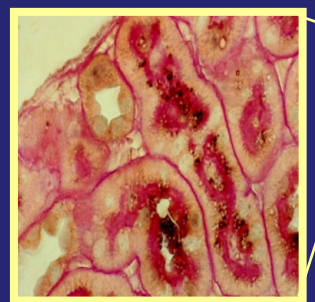
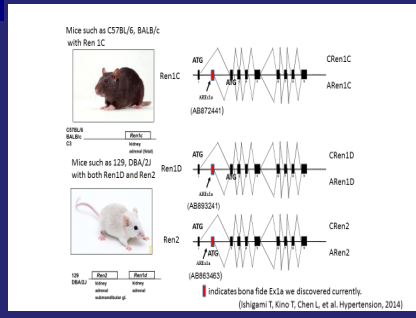
**Renin expressed in CNT(2003)**



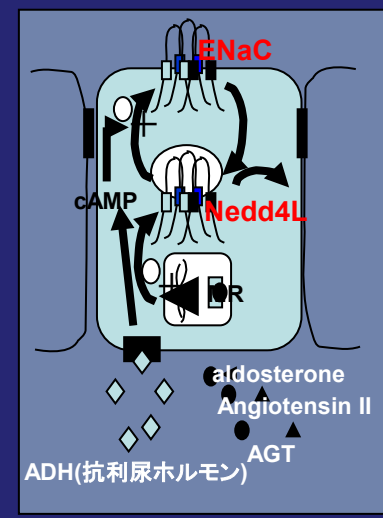
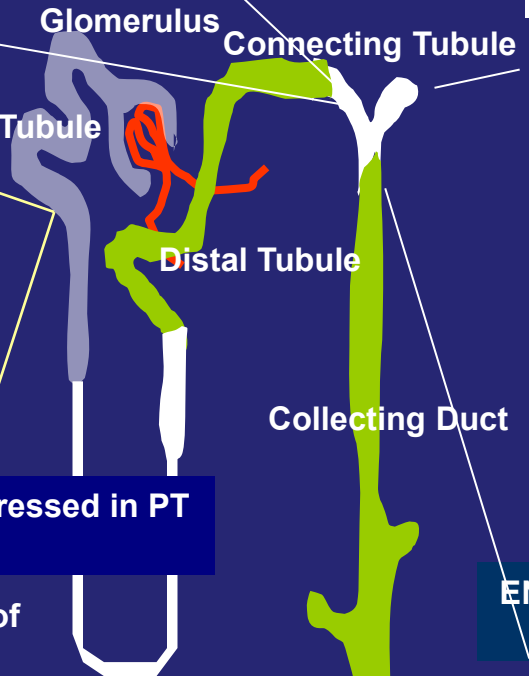
**Colocalization of renin and kallikrein in CNT**



**Alternative renin 2014**



**Angiotensinogen expressed in PT (1999, 2002, 2004)**



**ENaC-Nedd4L-Proteasome In ASDN**

(2002, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2012, 2014, 2016, 2020)



【第1位】

腎保護効果は、見せかけだった～RA系阻害薬は『万能の妙薬』ではない～（解説：石上 友章 氏）

[http://navi.mail.carenet.com/c0/ex/pScW6w5FY9rHPuyYe0\\_p98Nn8yEsqK3ZxV5VWhYmQvk/www.carenet.com/news/clear/journal/43805](http://navi.mail.carenet.com/c0/ex/pScW6w5FY9rHPuyYe0_p98Nn8yEsqK3ZxV5VWhYmQvk/www.carenet.com/news/clear/journal/43805)



臨床に役立つ医療情報をお届け！  
13万人の医師が利用する医療情報サイト

## 腎保護効果は見せかけだった～RA系阻害薬は『万能の妙薬』ではない～（解説：石上 友章 氏） -669

navi.mail.carenet.com

CKD診療のゴールは、腎保護と心血管保護の両立にある。CKD合併高血圧は、降圧による心血管イベントの抑制と、腎機能の低下の抑制を、同時に満たすことで、最善・最良の医療を提供したことになる。RA系阻害薬は、CKD合併高血圧の治療においても、ファーストラインの選

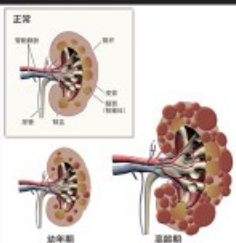
既存のRA系阻害薬の臓器保護効果（心血管保護、腎保護）には、限界がある。（BMJ, 2017）

「CLEAR!ジャーナル四天王」ランキング  
2017年トップ10を発表！

RA系阻害薬服用後のクレアチニン値上昇は、増大幅30%未満でも心・腎イベントや死亡リスクを漸増させることが明らかに。今年3月にBMJ誌に掲載された論文を受けて、RA系阻害薬の腎保護効果をめぐり石上氏の厳しい見解が述べられています。

## 多発性嚢胞腎(Polycystic Kidney Disease:ADPKD)

## 多発性嚢胞腎(Polycystic Kidney Disease:ADPKD)



ADPKD/多発性嚢胞腎は、遺伝性の腎臓の病気の中で患者さんの数が最も多い病気で、日本におけるADPKD/多発性嚢胞腎の患者数は約31,000人で、約4,000人に1人が発症すると推定されている。

60歳までにADPKD/多発性嚢胞腎の患者さんの約半数が末期腎不全となり、透析療法や腎臓移植が必要となる。

腎臓の嚢胞は生まれたときから少しずつ作られますが、30~40歳代まではほとんど症状がないといわれている。嚢胞が増えて大きくなると、腎臓の大きさは数倍になり、正常な腎臓の組織が圧迫され、腎機能が低下していく。

ADPKD/多発性嚢胞腎では、腎臓の他に肝臓にも肝嚢胞ができることがあり、嚢胞の感染や疼痛、腹部膨満の一因となる。嚢胞以外には、高血圧、心臓弁膜症、脳動脈瘤などの合併症が見られることもある。

厚生労働省により、第67番目の指定難病に認定されている。

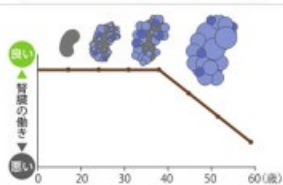


表 ADPKD 診断基準(厚生労働省進行性腎障害調査研究班「常染色体優性多発性嚢胞腎診療ガイドライン(第2版)」)

1. 家族内発生が確認されている場合
  - 1) 超音波断層像で両腎に各々3個以上確認されているもの
  - 2) CT, MRI では両腎に嚢胞が各々5個以上確認されているもの
2. 家族内発生が確認されていない場合
  - 1) 15歳以下ではCT, MRI または超音波断層像で両腎に各々3個以上嚢胞が確認され、以下の疾患が除外される場合
  - 2) 16歳以上ではCT, MRI または超音波断層像で両腎に各々5個以上嚢胞が確認され、以下の疾患が除外される場合

### 除外すべき疾患

多発性単純性腎嚢胞(multiple simple renal cyst)  
 尿管性アシドーシス(renal tubular acidosis)  
 多嚢胞腎(multicystic kidney)(多嚢胞性異形成腎(multicystic dysplastic kidney))  
 多房性腎嚢胞(multilocular cysts of the kidney)  
 髄質嚢胞性疾患(medullary cystic disease of the kidney)(若年性ネフロン病(juvenile nephronophthisis))  
 多嚢胞化萎縮腎(後天性嚢胞性腎疾患)(acquired cystic disease of the kidney)  
 常染色体劣性多発性嚢胞腎(autosomal recessive polycystic kidney disease)

エビデンスに基づく、多発性嚢胞腎(PKD)ガイドライン2017

## 多発性嚢胞腎(Polycystic Kidney Disease:ADPKD)

## 多発性嚢胞腎(Polycystic Kidney Disease:ADPKD)

### 原因

ADPKDの原因遺伝子は2つあり(*PKD1*, *PKD2*)、各々蛋白として Polycystin1 (PC1)と Polycystin2 (PC2) をコードしている。ADPKD患者の約85%が *PKD1* の遺伝子変異が原因で、残り約15%では *PKD2* 遺伝子変異が原因である。*PKD1* は *PKD2* より一般に臨床症状が重い、同じ家系でも個人差が大きい。ADPKDの原因遺伝子は1つ(*PKHD1*)であり、Fibrocystin, Polyductin をコードしている。

### 症状

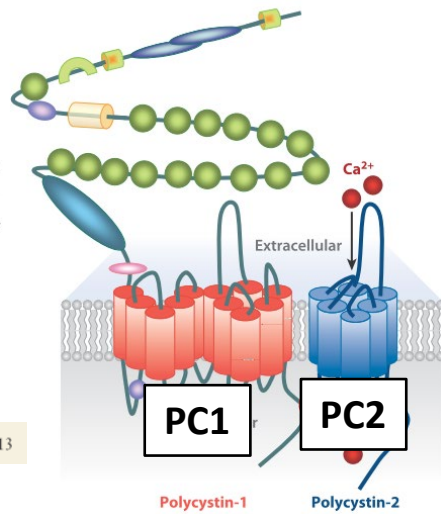
自覚症状として、肉眼的血尿(31%)、側腹部・背部痛(30%)、易疲労感(9%)、腹部腫脹(8%)、発熱(7%)、浮腫(6%)、頭痛(5%)、嘔気(5%)、腹部膨満(4%)がある。無症状でも家族に多発性嚢胞腎患者がいるから(11%)との理由で診断される。最近では、健診でのエコーや人間ドックで診断されることも多くなっている。

### 治療法

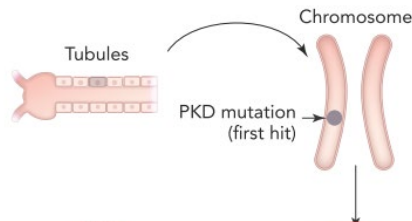
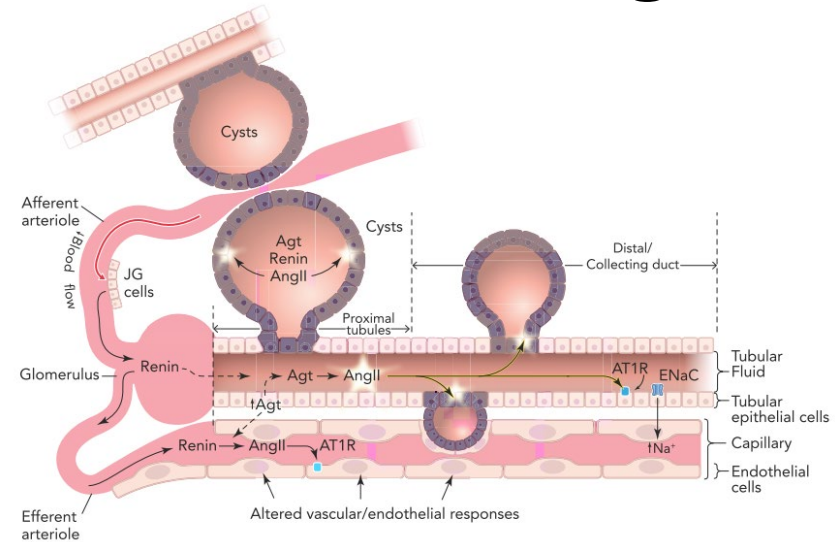
根本的な治療法はない。進行を遅らせる治療として、**バゾプレッシンV2受容体拮抗薬**である**トルバパタン**が2014年3月に保険適用となった。嚢胞増大を助長するとされるバゾプレッシンの作用を抑制するものであり、世界的な臨床試験において腎嚢胞の増大と腎機能の低下をプラセボと比較し有意に抑制することが報告された。また、多くの患者で高血圧を合併する。**降圧治療**が腎機能に対して、明らかな有効性は示されていないが、合併頻度の高い脳動脈瘤破裂など頭蓋内出血の危険因子を低下させることや心血管合併症の予防には有効と考えられている。透析に至った患者の腹部膨満を緩和する方法として、**両側腎動脈塞栓術**が行われ、良好な結果が得られている。

# PKD1/PKD2異常によるモデルPKD・Progression

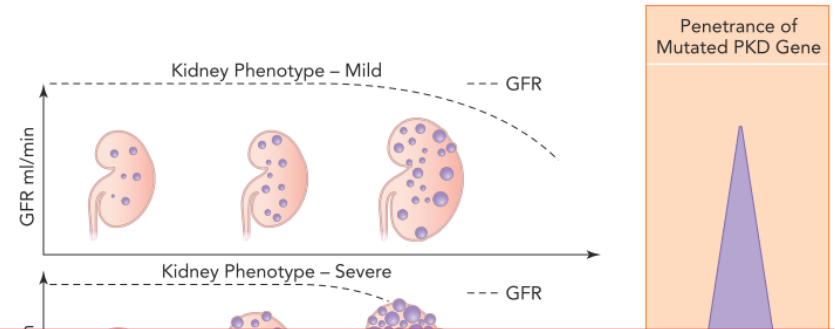
- Cysteine-rich domain
- Leucine-rich repeats
- ◡ WSC: cell wall integrity and stress response component
- PKD domain
- C-Lectin
- ◡ LDL-A: low-density lipoprotein A
- ◡ REJ: sperm receptor for egg jelly
- ◡ GPS: G protein-coupled receptor proteolytic site
- ◡ LH2: lipoxygenase homology
- ◡ Coiled-coil domain
- ◡ EF-hand: helix-loop-helix motif
- G protein heterotrimer complex



Annu. Rev. Physiol. 2009. 71:83-113



軽症PKD



遺伝性多発性嚢胞腎(ADPKD)は、繊毛(cilia)を構成する二つの重要なたんぱく質(PC1/PC2)の遺伝子変異(first hit)に、未知のsecond hit/third hit が加わることで、嚢胞形成・嚢胞の持続的な増大に至り、正常腎組織が嚢胞に置換されることで、腎機能の廃絶に至る。

# Torres et al. (1992)

*Kidney International*, Vol. 42 (1992), pp. 364–373

培養嚢胞上皮レニン

Synthesis of renin by tubulocystic epithelium in autosomal-dominant polycystic kidney disease

VICENTE E. TORRES, KATHLEEN A. DONOVAN, GLORIA SCICLI, KEITH E. HOLLEY, STEPHEN N. THIBODEAU, OSCAR A. CARRETERO, TADASHI INAGAMI, JAMES A. McATEER, and CHRISTOPHER M. JOHNSON

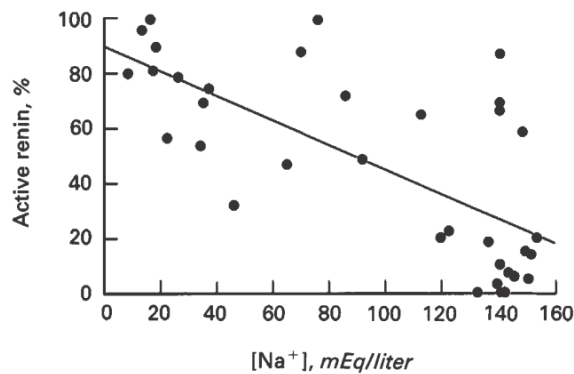
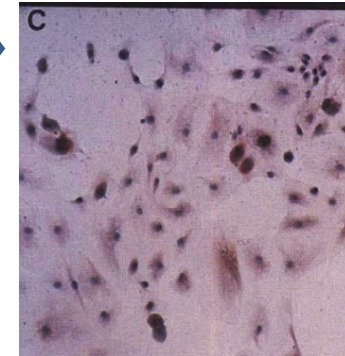
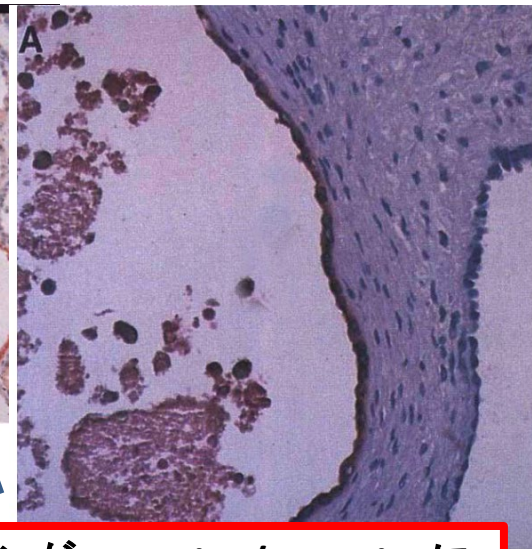
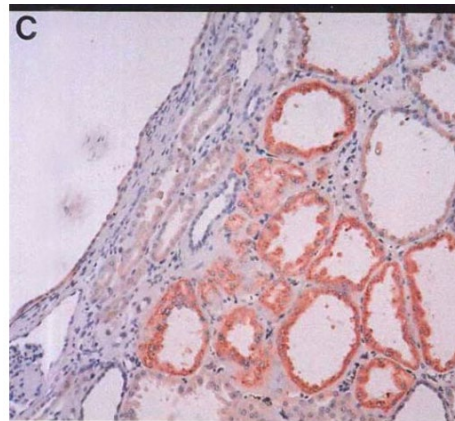


Fig. 3. Correlation between the sodium concentration and the percent of total renin that was active in the renal cyst fluids.  $r = 0.70$ ;  $P < 0.001$ .

嚢胞液中Na濃度とレニン活性の相関

嚢胞上皮レニン



PKD嚢胞上皮にレニンが存在する。PKDでは、嚢胞上皮レニンがAutocrine/Paracrineに嚢胞上皮の過形成を制御しており、嚢胞の増大をもたらしていると考えられた。

# PKD and RAS

The intrarenal renin-angiotensin system in autosomal dominant polycystic kidney disease

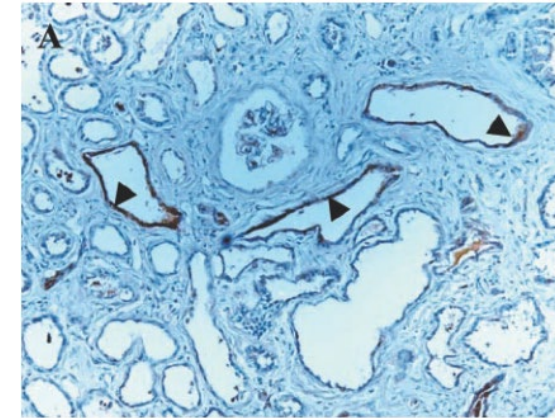
Mahmoud Loghman-Adham, Carlos E. Soto, Tadashi Inagami, and Lisa Cassis  
Department of Pediatrics and Pediatric Research Institute, Saint Louis University, St. Louis, Missouri 07920  
Submitted 21 October 2003; accepted in final form 1 June 2004

in ADPKD. We show that, in addition to renin, angiotensinogen (AGT) is produced by some cysts and dilated tubules. Angiotensin-converting enzyme, ANG II type 1 receptor, and ANG II peptide are also present within cysts and in many tubules; and some cyst fluids contain high ANG II concentrations. Additionally, cyst-derived cells in culture continue to express the components of the RAS at both the protein and mRNA levels. We further show that renin is expressed

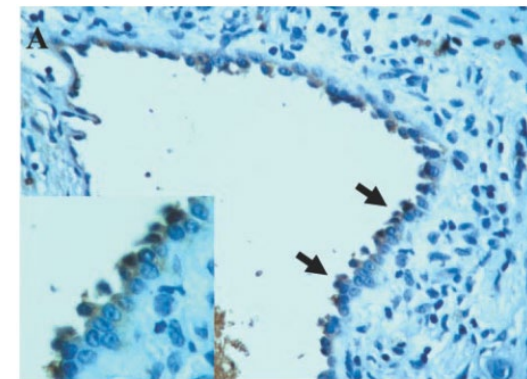
レニンに加えて、AGTが嚢胞及び、拡張した尿細管で発現していることを示した。ACE、ATR type I並びにANGIIも、嚢胞及び尿細管に認めることができた。嚢胞液中に、高濃度のANGIIが存在している。さらに、嚢胞由来の細胞を培養したところ、RA系の構成要素のタンパク・mRNAの発現を認めた。

*Am J Physiol Renal Physiol* 287: F775–F788, 2004.  
First published June 8, 2004; 10.1152/ajprenal.00370.2003.

嚢胞液中のANG II



ADPKD嚢胞のレニン



ADPKD嚢胞のAGT

Table 4. ANG II concentrations in cyst fluid and urine

Cyst Fluid	ANG II Concentration, pg/ml	Urine	ANG II Concentration, ng/ml
Cyst 6	BDL	U1*	BDL
Cyst 7	1,415	U2*	BDL
Cyst 8	1,223	U3*	88.2
Cyst 9	BDL		
Cyst 10	739		
Cyst 11	BDL		
Cyst 12	BDL	U1†	61.1
Cyst 13	BDL	U2†	101.3
Cyst 14	1,022		
Cyst 15	1,076		
Cyst 16	1,033		
Cyst 17	936		

BDL, below detection limit of the assay. Urine values are not corrected for Cr concentration. \*ADPKD urine. †Control urine.

# Urinary RAS in ADPKD ~1~ (Salih, et al. AJP, 2017)

ADPKD 60名・CKD 57名を、患者背景を揃えて比較検討した。

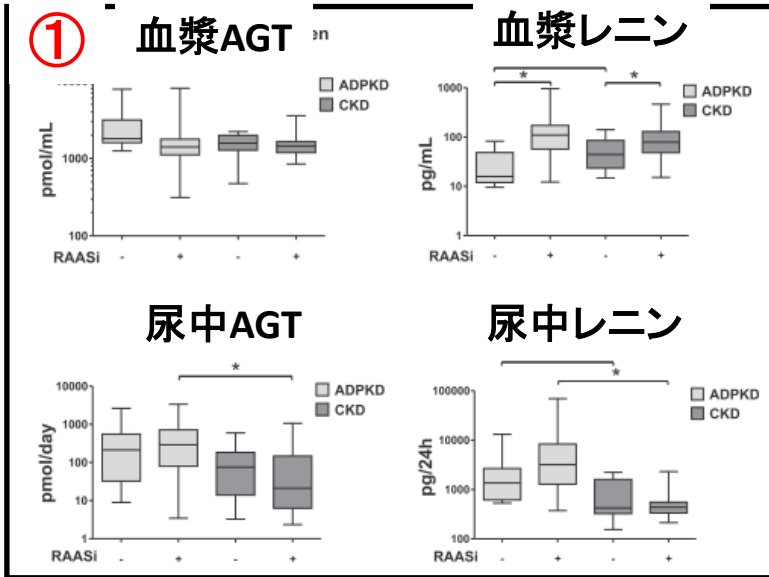
Table 2. Patient characteristics and renin-angiotensin-aldosterone system measurements

Category (Parameter)	ADPKD (n = 60)	CKD (n = 57)	P Value*	P Value**
<b>Clinical data</b>				
Age, yr	47 ± 8	68 ± 8	<0.001	
Male sex, n (%)	25 (42)	25 (44)	NT‡	
Height, cm	175 ± 10	169 ± 9	0.001	
Weight, kg	81.6 ± 17.0	81.2 ± 11.9	0.9	
Hypertension, n (%)†	56 (93)	49 (86)	NT	
SBP, mmHg	131 ± 14	134 ± 14	NT	
DBP, mmHg	79 ± 9	76 ± 7	NT	
RAAS inhibitors, n (%)	50 (83)	44 (77)	NT	
DDD RAAS inhibitors, n	1.9 ± 1.5	1.1 ± 0.9	<0.001	
<b>Plasma</b>				
Creatinine, mg/dl	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.4	0.6	
eGFR, ml·min <sup>-1</sup> ·1.73 m <sup>-2</sup>	48 ± 11	46 ± 9	NT	
Angiotensinogen, pmol/ml	1,599 (313–8,067)	1,455 (474–3,567)	0.3	
Renin, pg/ml	81.3 (9.6–950.0)	68.3 (14.8–464.5)	0.3	
Aldosterone, pg/ml	121.7 (16.5–470.1)	105.9 (16.6–546.4)	0.2	
<b>Urine</b>				
Volume, ml/day	2,233 (800–6,500)	1,652 (530–3,140)	<0.001	0.2
Creatinine, mmol/day	13.3 (5.2–21.2)	10.9 (6.0–18.2)	<0.001	0.8
Albumin, mg/day	40.0 (3.1–266.4)	26.7 (3.4–293.2)	0.05	
Sodium, mmol/day	150 (40–354)	142 (60–371)	0.5	
Angiotensinogen, pmol/day	194.4 (3.5–3,384.0)	36.0 (2.3–1,070)	<0.001	<0.001
Renin, pg/day	2,717 (375.7–69,248.0)	485.5 (154.7–2,293.0)	<0.001	<0.001
Aldosterone, µg/day	4.6 (0.9–32.8)	3.5 (1.0–18.0)	0.02	0.2

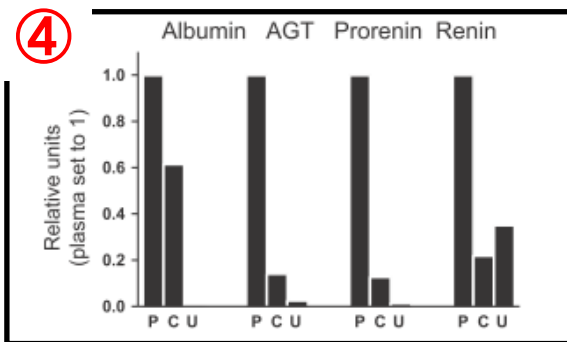
ADPKD, autosomal dominant polycystic kidney disease; CKD, chronic kidney disease; DBP, diastolic blood pressure; DDD, defined daily dose; eGFR, estimated glomerular filtration rate; SBP, systolic blood pressure. \*Using analysis of variance (ANOVA) with log-transformed data as appropriate. \*\*Using analysis of covariance (ANCOVA) with log-transformed data as appropriate and adjustments for age, height, defined daily dose, and albuminuria. ‡NT, not tested (matching criteria). †Defined by use of antihypertensive drugs.



# Urinary RAS in ADPKD ~ 2 ~ (Salih, et al. AJP, 2017)



尿中AGTは、RAS阻害薬使用群で有意にADPKD>CKD、尿中レニンはADPKD>CKDだった。



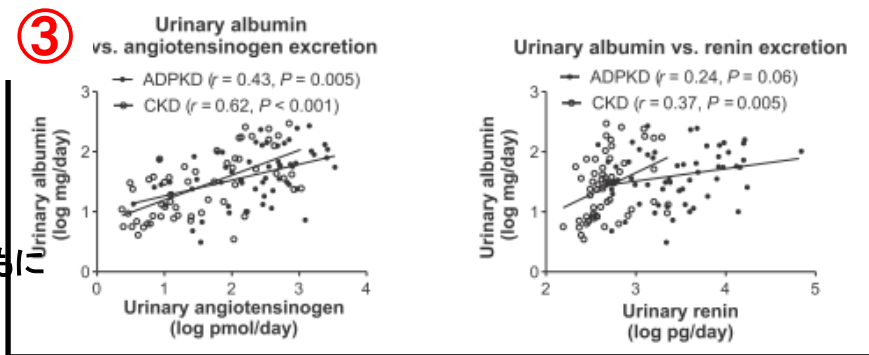
ADPKD患者では、AGT・プロレニンともに嚢胞液中で高値を示す。

② Table 3. Multivariable analysis of factors predicting urinary angiotensinogen and renin excretion

Variable	Urinary Angiotensinogen Excretion		Urinary Renin Excretion	
	$\beta$	P value	$\beta$	P value
Presence of ADPKD	9.6 (3.7–24.5)	<0.001	4.9 (2.6–9.0)	<0.001
eGFR, ml·min <sup>-1</sup> ·1.73 m <sup>-2</sup>	0.96 (0.94–0.99)	0.002	0.99 (0.98–1.01)	0.3
Age, yr	1.0 (0.9–1.1)	0.2	0.99 (0.97–1.02)	0.6
DDD RAAS inhibitors, n	0.8 (0.7–1.0)	0.1	0.9 (0.8–1.1)	0.2
Plasma renin, pg/ml	0.5 (0.3–1.0)	0.05	1.9 (1.2–2.9)	0.007
Plasma AGT, pg/ml	3.0 (0.9–10.7)	0.08	1.1 (0.5–2.4)	0.9
Urinary sodium, mmol/day	1.6 (0.4–7.1)	0.5	1.0 (0.4–2.8)	0.9
Albuminuria, mg/day	6.2 (3.6–10.7)	<0.001	1.6 (1.1–2.3)	0.01

ADPKD, autosomal dominant polycystic kidney disease; AGT, angiotensinogen; DDD, defined daily dose; eGFR, estimated glomerular filtration rate; RAAS, renin-angiotensin-aldosterone system.

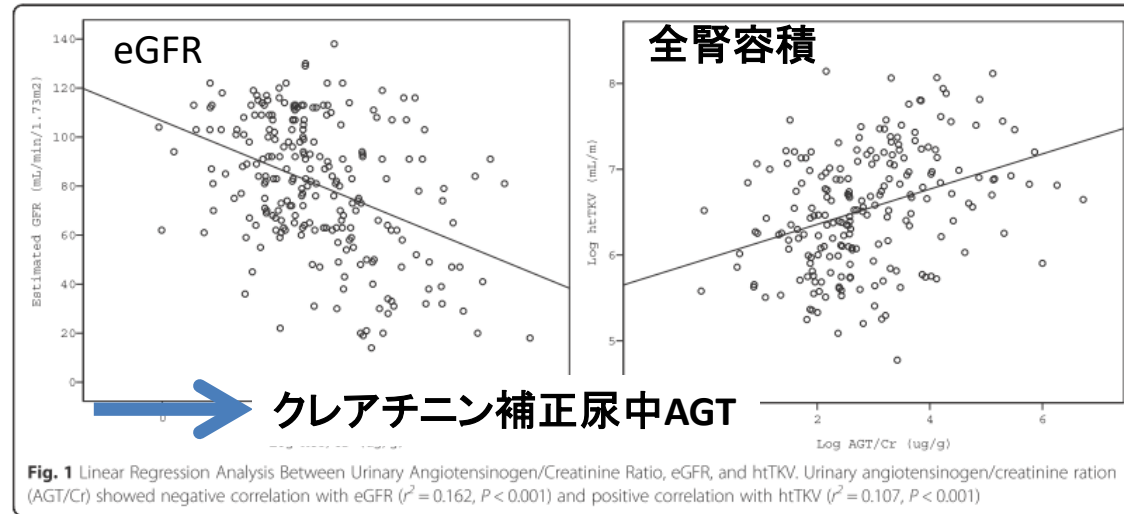
多変量回帰分析の結果、尿中AGT・尿中レニンは、ADPKD/血漿レニン/尿中アルブミン量と有意に相関した。



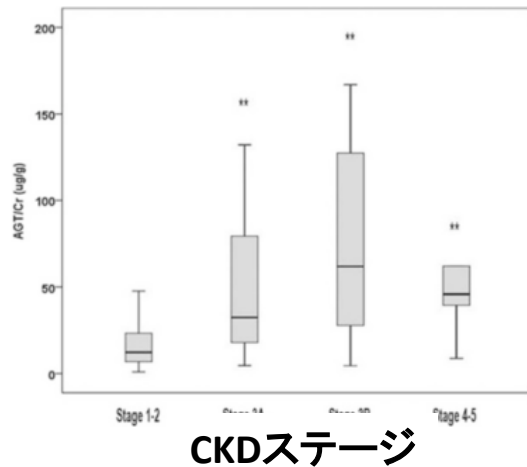
尿中AGTは、尿中レニンは、尿中アルブミン排泄量と有意に正相関している。

# Park et al. BMC Nephrology (2015) 16:86

①



②



233名のADPKD患者を対象にした解析の結果、クレアチニン補正した尿中AGTは、推定GFRと負の、htTKV(身長補正全腎容積)とは正の、それぞれ有意な相関関係が認められました。(①)CKDステージ分類に従って、比較検討したところ、Stage 3Bで最大値をとることが判明しました。(②)

# AGT-ASO投与により、PKDが解消する (Pkd2, AJP 2015)

*Am J Physiol Renal Physiol* 308: F349–F357, 2015  
First published December 23, 2014; doi:10.1152/ajprenal.00478.2015

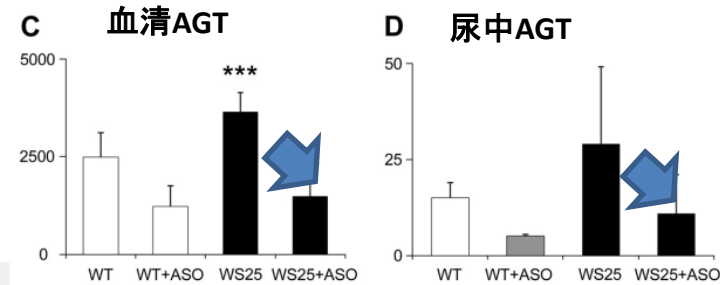
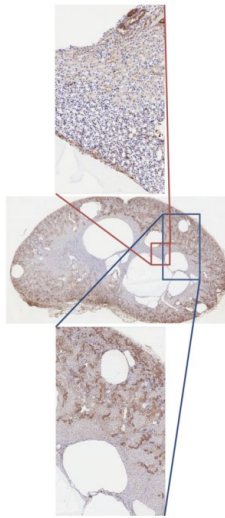
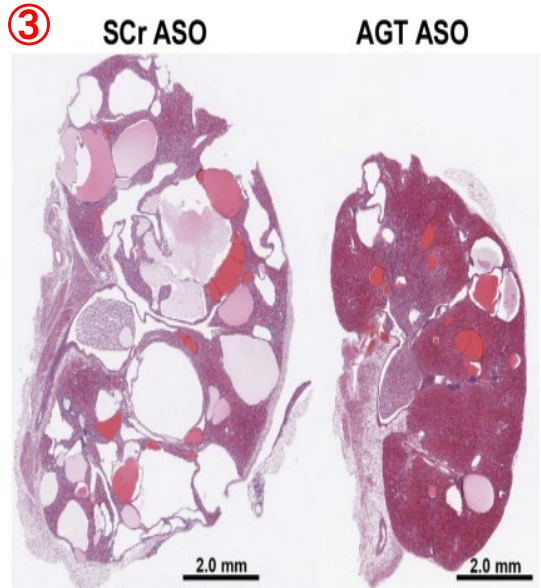
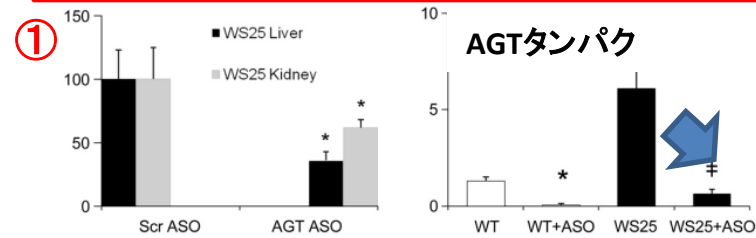
Antisense-mediated angiotensinogen inhibition slows polycystic kidney disease in mice with a targeted mutation in Pkd2

Kameswaran Ravichandran,<sup>1</sup> Abdullah Ozkok,<sup>1</sup> Qian Wang,<sup>1</sup> Adam E. Mullick,<sup>2</sup> and Charles L. Edelstein<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Renal Diseases and Hypertension, University of Colorado at Denver, Aurora, Colorado; and <sup>2</sup>ISIS Pharmaceuticals, Carlsbad, California

Submitted 25 August 2014; accepted in final form 16 December 2014

AGT-ASOは、血清AGT・腎内AGTを抑制する。

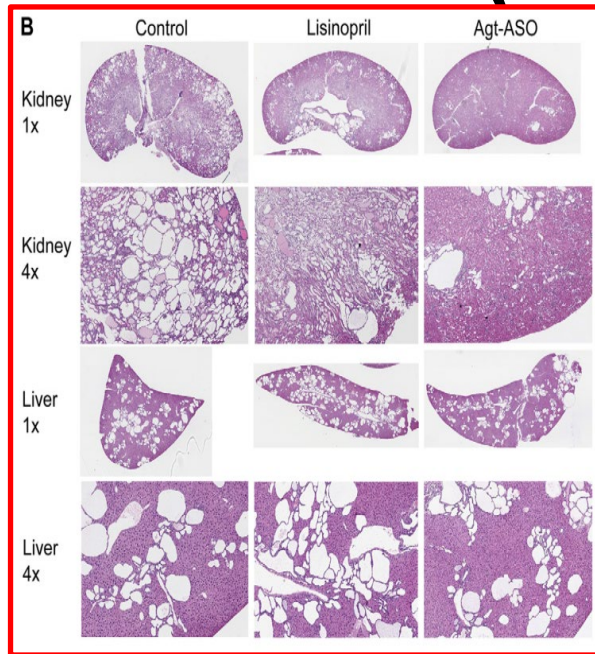


② Table 1. AGT ASO significantly reduced PKD and improved kidney function versus Scr ASO

	+/+ Mice		Pkd2 <sup>WS25/-</sup> Mice	
	Scr ASO	AGT ASO	Scr ASO	AGT ASO
<i>n</i>	11	14	10	7
Body weight, g	28.2 ± 1.4	29.4 ± 0.1	27.3 ± 1.7	29.4 ± 2.2
Kidney weight, g	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.67 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.07 <sup>c</sup>
Two kidney-to-total body weight ratio, %	1.2 ± 0.03	1.2 ± 0.02	2.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>c</sup>
Cyst volume density, %	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.4	34.1 ± 4.4 <sup>a</sup>	22 ± 2.9 <sup>d</sup>
Blood urea nitrogen, mg/dl	32 ± 3	29 ± 2	47 ± 5 <sup>b</sup>	34 ± 3 <sup>e</sup>

AGT-ASOは、腎重量・嚢胞容量・BUNを抑制する。

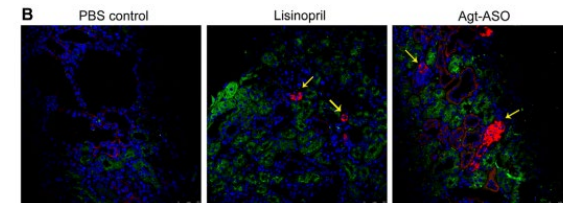
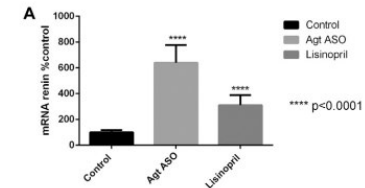
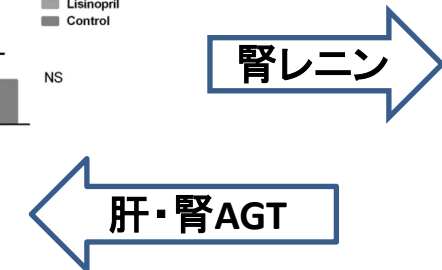
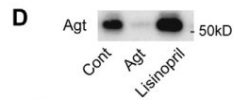
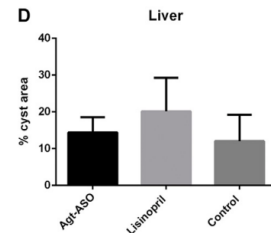
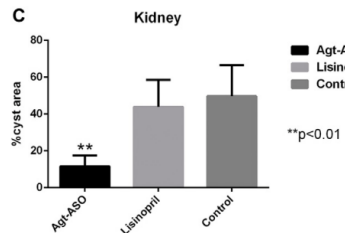
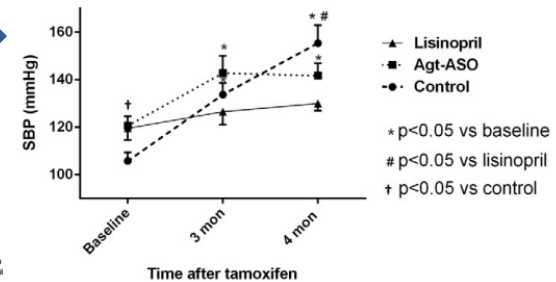
# AGT-ASO投与により、PKDが解消する (Pkd1, FASEB J 2016)



Suppressing angiotensinogen synthesis attenuates kidney cyst formation in a *Pkd1* mouse model

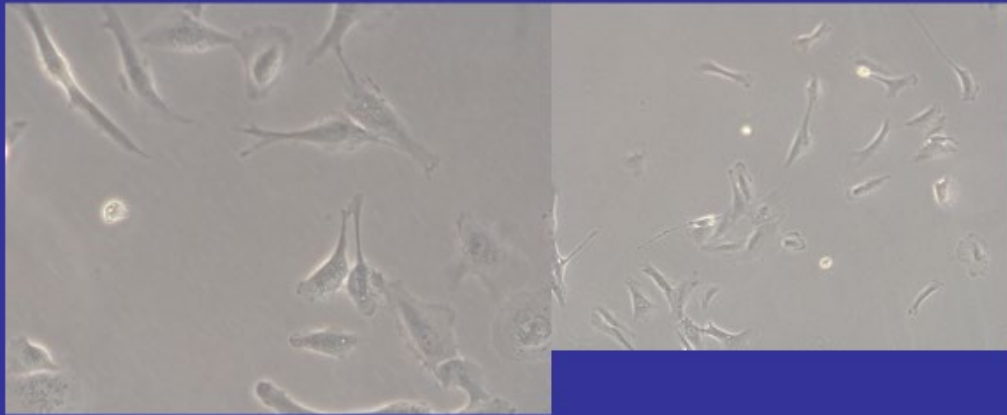
Takamitsu Saigusa,<sup>\*,†,‡</sup> Yujing Dang,<sup>\*,†</sup> Adam E. Mullick,<sup>‡</sup> Steve T. Yeh,<sup>‡</sup> Michael R. Zile,<sup>†,§</sup> Catalin F. Baicu,<sup>†,§</sup> and P. Darwin Bell<sup>\*,†,‡</sup>

<sup>\*</sup>Division of Nephrology and <sup>§</sup>Division of Cardiology, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina, USA; <sup>‡</sup>Ralph Johnson Veterans Affairs Medical Center, Charleston, South Carolina, USA; and <sup>‡</sup>Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, California, USA



# AGTを分泌する不死化近位尿細管細胞の樹立

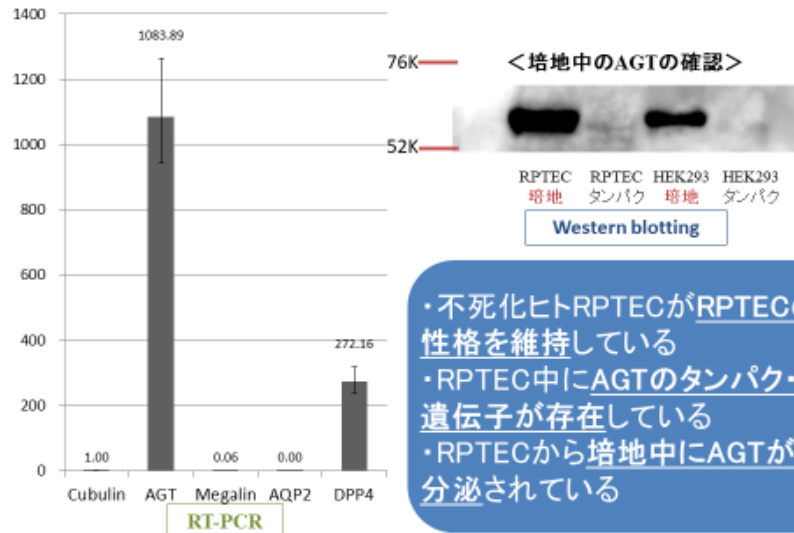
## Clonal Immortalized RPTEC (ciRPTEC)



20X

10X

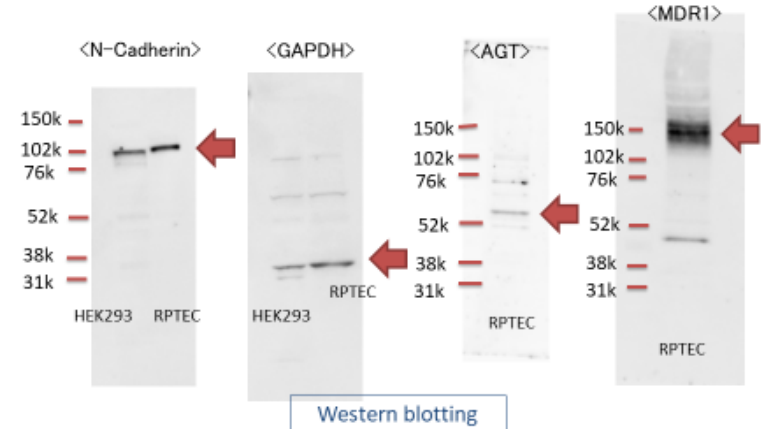
### -不死化ヒト近位尿細管細胞のCharacterization-



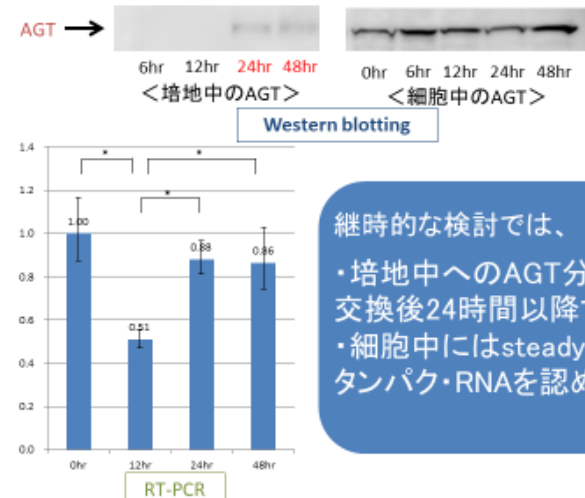
- ・不死化ヒトRPTECがRPTECの性格を維持している
- ・RPTEC中にAGTのタンパク・遺伝子が存在している
- ・RPTECから培地中にAGTが分泌されている



### -不死化ヒト近位尿細管細胞のCharacterization-



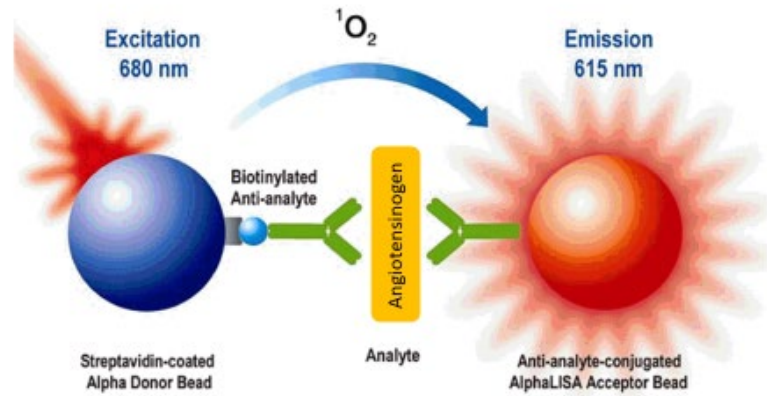
### -不死化ヒト近位尿細管細胞のCharacterization-



継続的な検討では、

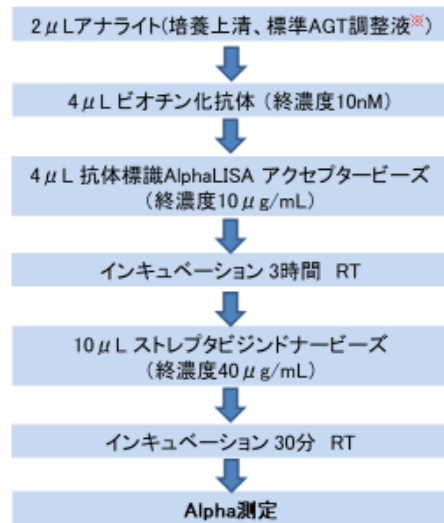
- ・培地中へのAGT分泌は、培地交換後24時間以降で確認された
- ・細胞中にはsteadyにAGTのタンパク・RNAを認めた

## -AGTに対する高感度ハイスルーブット法: AlphaLISA法の確立-



【AlphaLISAの原理】

## -AGTに対する高感度ハイスルーブット法: AlphaLISA法の確立-



\* human AGT protein (SIGMA Aldrich, USA)を FBS free DMEM (Life Technologies, New Zealand)で50μg/ml~10ng/mlに希釈

## -AGTに対する高感度ハイスルーブット法: AlphaLISA法の確立-

### 抗体のビオチン化

- AGT monoclonal antibody (Abnova, Taiwan) 100 μLに7.62 μLの1mg/mL NHS-ChromaLink-ビオチン溶液 (SoluLink Inc., USA)、PBSを加えて総量200 μLにする。
- 室温で2時間インキュベート
- 2本のZeba Desalt Spin Column (ThermoFisher Scientific, USA) をPBSで洗浄後、反応溶液を100 μLずつアプライシ、1500g×2分間遠心する
- 得られたビオチン化抗体の吸光度を測定し、下記計算式を用いて濃度を算出する  

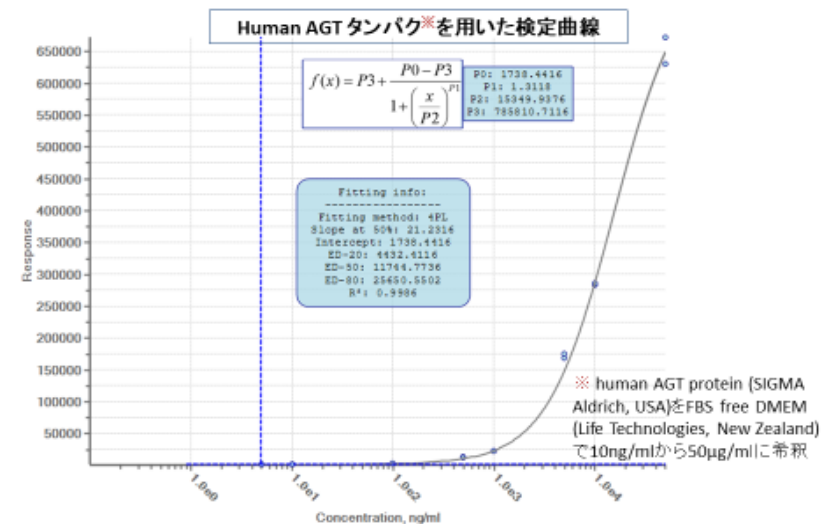
$$cAb\text{-biotin (mg/ml)} = (A_{290} - (A_{354} \times 0.23)) / 1.34$$

$$CAb\text{-biotin (}\mu\text{M)} = (cAb\text{-biotin} / 160000) \times 10^6$$
- PBSで終濃度500nMに調整後、-20°Cで保存

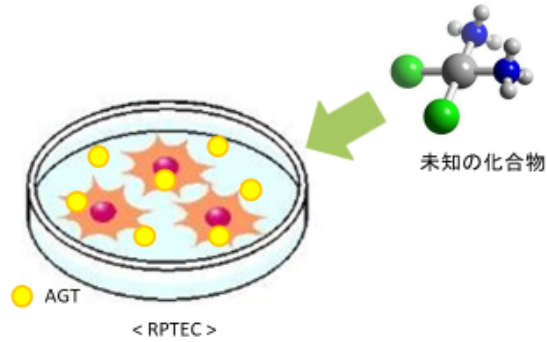
### アクセプタービーズへの抗体結合

- PBSで洗浄したUnconjugated AlphaLISA Acceptor beads (PerkinElmer, USA)にAGT monoclonal antibody (Sino Bio., USA)、10% Tween-20、400mM NaBH3CNを添加し、37°Cで48時間インキュベートする
- CMO溶液を添加後、37°Cで1時間インキュベートする。
- 4°C、16,000g、15分間遠心する。
- 上清を除去後、100mM Tris-HCLで2度洗浄する。
- 遠心後、沈殿したビーズを200 μLの保存バッファーに懸濁し、ソニケーション。不透明バイアルに移し、4°Cで保存する。

## -AGTに対する高感度ハイスルーブット法: AlphaLISA法の確立-



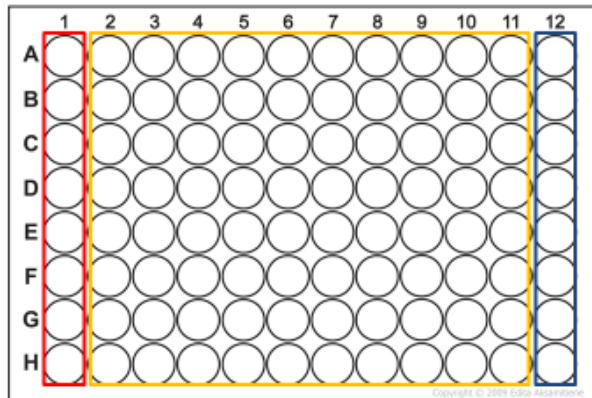
## 薬剤探索スクリーニング



RPTECからのAGT分泌を抑制する未知の化合物を探索

AlphaLISA法でAGT分泌を確認

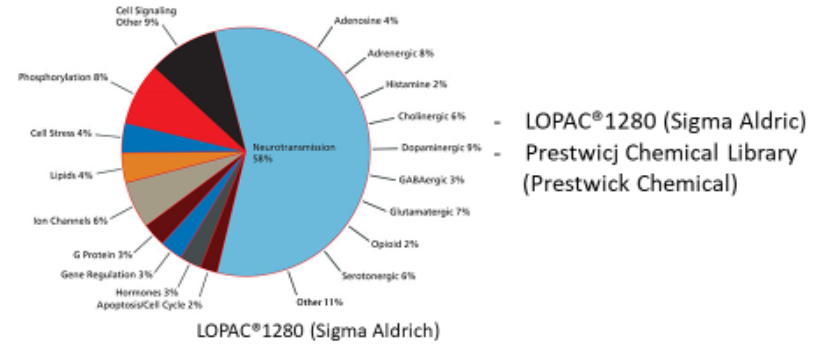
## 薬剤探索スクリーニング - 実験方法 -



Positive control : human AGT protein (SIGMA-Aldrich) 50, 100, 500, 1000ng/ml  
Negative control : compound freeでRPTECを培養した培地、未使用の培地  
Screening: 1プレートにつき80 compounds

## 薬剤探索スクリーニング

- Validated library -



既知活性化合物とoff patient 医薬品からなるライブラリー

3,399化合物を提供していただいた

## 薬剤探索スクリーニング - 実例 -

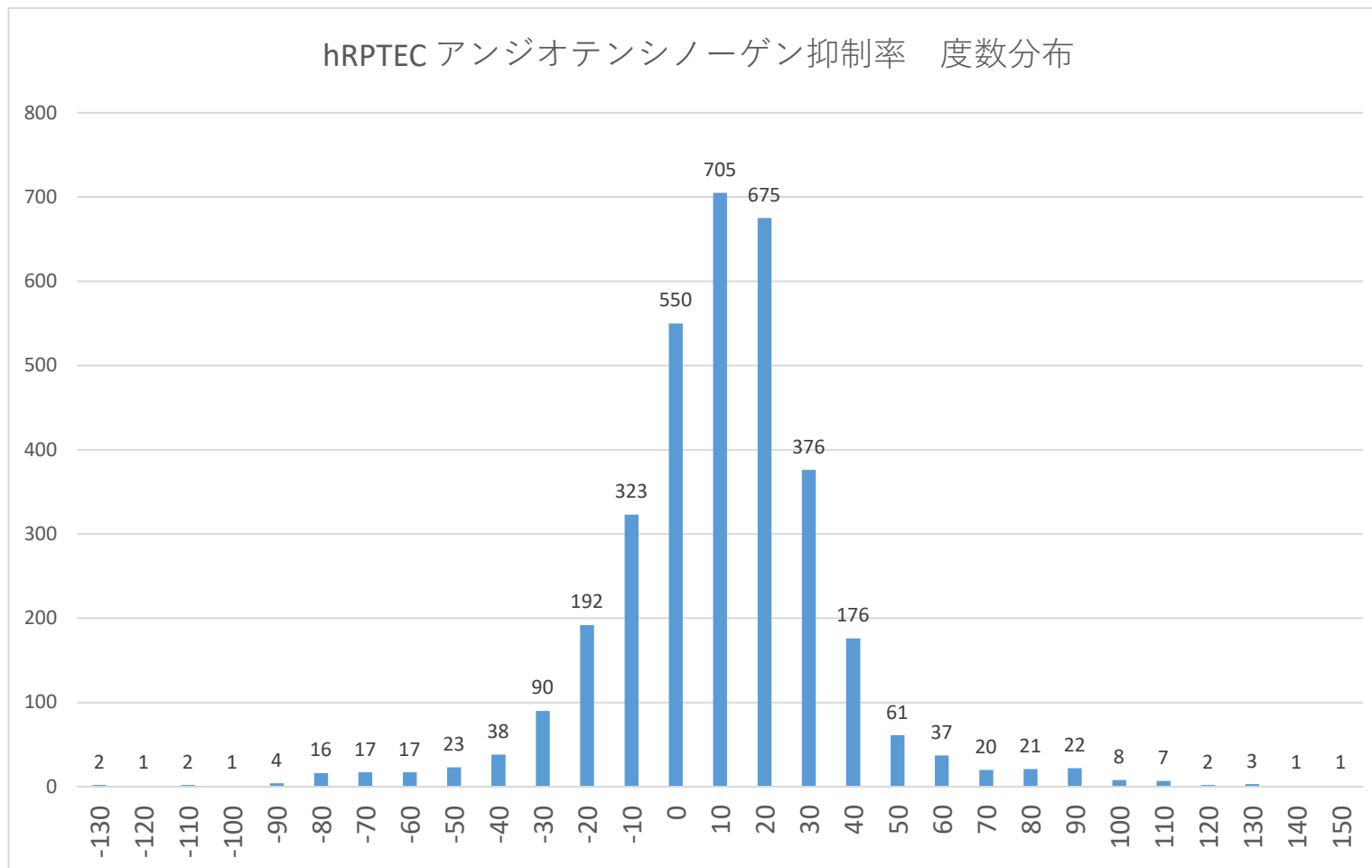
【Alpha signal】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1075	1194	1163	932	1077	924	958	872	572	896	591	533
B	1155	1434	1257	1058	1016	585	948	1177	1240	879	1212	580
C	1102	612	1082	957	1064	940	938	653	651	1159	1141	562
D	1124	1096	1354	1173	1113	895	1102	656	1099	1007	1115	563
E	1185	1075	1277	1122	1174	1145	1124	1309	1125	712	857	541
F	1255	1079	1309	1103	1206	1162	676	1067	1073	1097	1126	519
G	1084	1025	1060	608	611	991	1091	959	1129	1022	1112	511
H	996	743	1021	1028	827	914	983	876	798	1017	1044	501

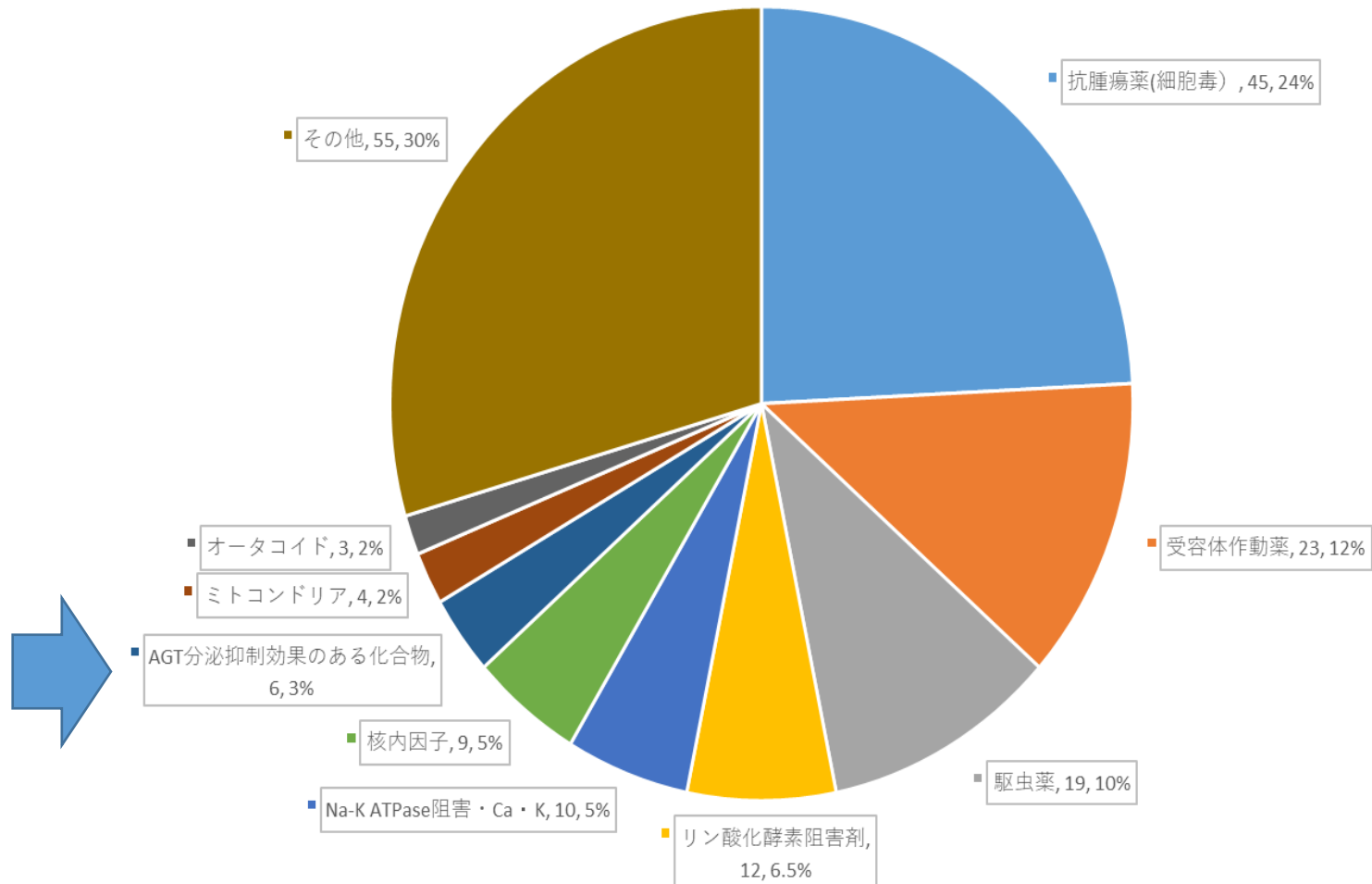
阻害率	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-12.345	-7.0296	32.5761	7.71539	33.9477	28.1183	42.8633	94.2992	38.7484	91.0416		
B	-53.493	-23.146	10.973	18.174	92.0703	29.8328	-9.4299	-20.231	41.6631	-15.431		
C	87.4411	6.85812	28.2898	9.94428	31.2045	31.5474	80.4115	80.7544	-6.3438	-3.2578		
D	4.45778	-39.777	-8.7441	1.54308	38.9198	3.42906	79.8971	3.94342	19.7171	1.20017		
E	8.05829	-26.575	0	-8.9156	-3.9434	-0.3429	-32.062	-0.5144	70.2958	45.4351		
F	7.37248	-32.062	3.25761	-14.402	-6.8581	76.4688	9.42992	8.4012	4.28633	-0.6858		
G	16.6309	10.6301	88.1269	87.6125	22.4604	5.31505	27.9468	-1.2002	17.1453	1.71453		
H	64.9807	17.3168	16.1166	50.5787	35.6622	23.832	42.1775	55.5508	18.0026	13.3733		

【アッセイ評価項目】

SD <sub>0%</sub>	SD <sub>100%</sub>	AV <sub>0%</sub>	AV <sub>100%</sub>	CV <sub>0%</sub>	CV <sub>100%</sub>	S/B	S/N	Z'
27.9	78.1	538.8	1122	5.18	6.96	2.08	20.9	0.45

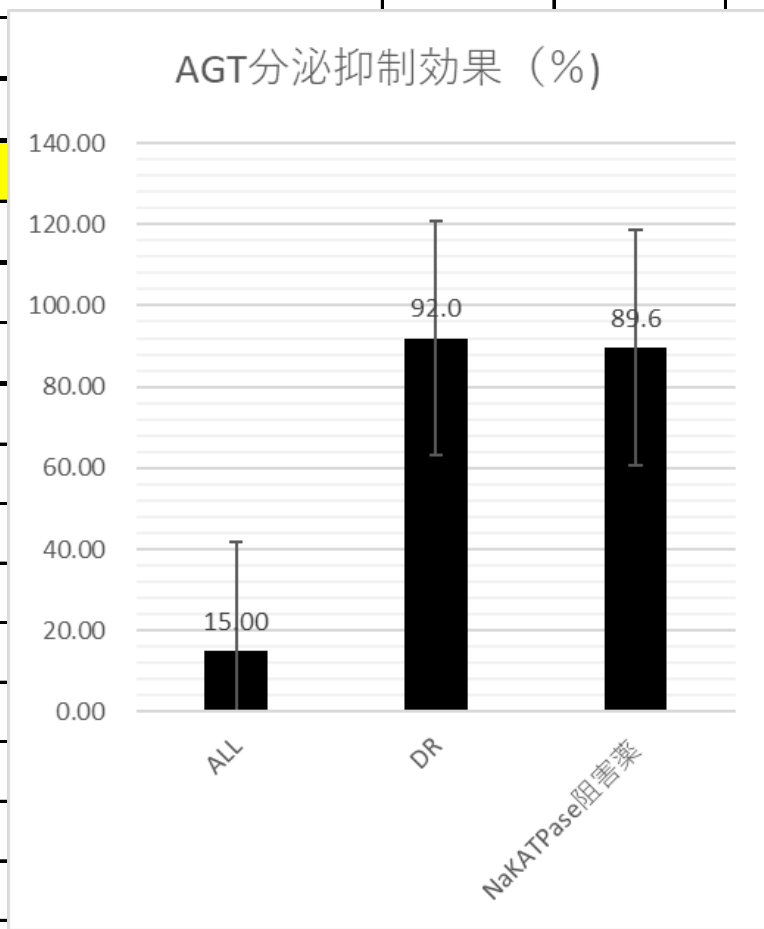


AGT抑制性低分子化合物(total 186)



# AGT分泌抑制効果(%)

DP4057-T9	E7	22202125	T-026139	100.2
DP4049-T9	C10	22201507	T-208506	54.1
DP4057-T9	C10	22202147	T-026145	80
DP4059-T9	A4	22202257	T-139732	132.1
DP4060-T9	H11	22202400	T-193245	113.7
			T-208130	71.8
			T-139769	78.8
			T-139883	50.7
			T-025718	91.6
			T-025752	106.7
			T-026028	95.8
			T-140866	57.6
			T-025936	65.6
			T-139860	111.8
			T-207123	72.7
			T-207235	81.8
			T-209229	72.8
DP4063-T9	G10	22202631	T-025490	140



## 従来技術とその問題点

CKD(慢性腎臓病)は、心血管リスクであり、有効な薬剤がなく、進行すると透析が必要になる。医療経済、患者負担から、対策が必要である。

# 新技術の特徴・従来技術との比較(1)

- レニン・アンジオテンシン系は、創薬に実績がある。しかし、尿細管レニン・アンジオテンシン系を選択的に制御する薬剤はなかった。
- 尿細管中のアンジオテンシンIIは、血漿より100倍から1000倍の高濃度と考えられており、従来薬であるアンジオテンシン受容体拮抗薬の効果は、尿細管腔側からは期待できない。

## 新技術の特徴・従来技術との比較(2)

- 代表的なCKDの一つである、PKDの患者数は、国内で3万人、欧州では約20万人、米国には約12万人と推定されている。治療法としては降圧薬による進展抑制が推奨されるが効果は弱い。
- 唯一バソプレシンV2受容体拮抗薬サムスカ(トルバプタン)は腎機能が良好で両腎容積が750 mL以上の遺伝性PKDの治療薬として認可されたが、安全性(肝障害)や腎機能の観点から新たな治療薬が求められている。

## 想定される用途

- 抗CKD薬の創薬にあたって、近位尿細管AGTの分泌抑制効果を持った化合物を特定するうえで、有用な技術である。
- 適切な動物モデル(ADPKDであれば、Pkd1 flox/flox・タモキシフェンCreマウス)への投与実験を行うことで、創薬の基盤を提供することが出来る。

## 実用化に向けた課題

- 近位尿細管AGTを抑制する、抗CKD薬の創薬にあたっては、これまでに特定することができたStatin類だけでなく、分子機序に基づいた創薬標的や、プロテイン・ノックダウン法による新規化合物の開発が必要である。
- 本技術は、低分子化合物ライブラリのスクリーニングに実績があり、こうした新規化合物の探索・効果確認のために、有用な技術である。

## 企業への期待

- 代表的なCKDのひとつである、ADPKDは稀少難病であり、ヒトおよび、実験動物を対象にした研究から、尿細管アンジオテンシノーゲンの分泌抑制効果を持った化合物が有効である。
- 典型的な、Unmet Medical NeedsであるCKDに対する創薬を可能にする、本技術を活用した、創薬研究での共同研究を希望する。

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 抗 CKD(慢性腎臓病)効果のある薬物のスクリーニングに有効なアッセイ系の構築
- 出願番号 : 特願2022-003795
- 出願人 : 横浜市立大学
- 発明者 : 石上友章、中島理恵  
杉山美智子、桑江明子

## 産学連携の経歴

- 2012年- 医療・健康機器メーカーA社と共同研究を実施
- 2012年 JST特許出願支援制度(指定国移行時)に採択
- 2014年 製薬企業B社からの支援を受けて、医師主導型臨床研究を実施
- 2018年 医療・健康機器メーカーC社と共同研究を実施
- 2019年 製薬企業C社と共同研究
- 2021年 公益財団法人Dと共同研究

# お問い合わせ先

**横浜市立大学 研究推進部**  
**研究・産学連携推進課**

**Tel 045-787-2061**

**Fax 045-787-2025**

**sangaku@yokohama-cu.ac.jp**