

# VKOR 阻害化合物と抗腎線維化作用の分離に関する研究

内田 将史

本学位論文は、以下の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. A novel vitamin K<sub>1</sub> 2, 3-epoxide reductase (VKOR) inhibitor, 3-acetyl-5-methyltetronic acid, reduces experimental glomerulonephritis.  
Masashi Uchida, Yuka Sakaguchi, and Yohei Miyamoto.  
J Vet Med Sci. 2012; 74: 863–869.
2. Pharmacological effects of a vitamin K<sub>1</sub> 2, 3-epoxide reductase (VKOR) inhibitor, 3-acetyl-5-methyltetronic acid, on cisplatin-induced fibrosis in rats.  
Masashi Uchida, Tomoya Miyoshi, and Yohei Miyamoto.  
J Vet Med Sci. 2017; 79: 1507–1515.
3. General toxicity of a vitamin K<sub>1</sub> 2, 3-epoxide reductase (VKOR) inhibitor, 3-acetyl-5-methyltetronic acid, in rats.  
Masashi Uchida, Yuka Sakaguchi, and Yohei Miyamoto.  
Fundam Toxicol Sci. 2017; 4: 285–293.

目次.....	2
緒論.....	6
第一章 VKOR 阻害化合物の作用解析	
第一節 抗血液凝固作用から VKOR 阻害化合物の発見.....	13
第二節 VKOR 阻害化合物の探索と作用解析.....	16
第三節 肝臓以外の組織 VKOR に対する作用.....	27
第二章 VKOR 阻害化合物の抗腎線維化作用と抗血液凝固作用との分離	
第一節 腎組織移行型 VKOR 阻害化合物 3-acetyl-5-methyltetronic acid (AMT) .....	30
第二節 AMT のラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルおよび CDDP 誘 発腎障害モデルにおける抗腎線維化作用.....	35
第三節 AMT のその他の作用と有効濃度に関する検討.....	47
第四節 VKOR 阻害化合物の作用分離と医薬品開発の可能性.....	52
結論.....	54
謝辞.....	56
実験の部.....	57
引用文献.....	77

## 略語表

ALB:	albumin
ALP:	alkaline phosphatase
ALT:	alanine aminotransferase
AMT:	3-acetyl-5-methyltetronic acid
APTT:	partial thromboplastin time
AST:	aspartate aminotransferase
AUC:	area under the curve
$\alpha$ -SMA:	$\alpha$ -smooth muscle actin
BA:	bioavailability
BSA:	bovine serum albumin
BUN:	blood urea nitrogen
Ccr:	creatinine clearance
CDDP:	cisplatin
CKD:	chronic kidney disease
CLogP:	calculated logP
CL <sub>tot</sub> :	total clearance
CMC:	carboxyl methyl cellulose
C <sub>max</sub> :	maximum concentration
Cre:	creatinine
DDS:	drug delivery system
DHA-S:	sodium dehydroacetate
DTT:	dithiothreitol
ECM:	extracellular matrix

EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF:	epidermal growth factor
EMT:	epithelial-mesenchymal transition
ESI:	electrospray ionization
Fib:	fibrinogen
FGF-2:	fibroblast growth factor-2
Gas6:	growth arrest-specific 6
GCX:	$\gamma$ -glutamylcarboxylase
GFR:	glomerular filtration rate
Gla:	$\gamma$ -carboxyglutamic acid
Glc:	glucose
HCT:	hematocrit
HE:	hematoxylin eosin
HGB:	hemoglobin
HPLC:	high-performance liquid chromatography
HPT:	hepaplantin test
IC <sub>50</sub> :	half maximal inhibitory concentration
$K_m$ :	Michaelis constant
LAP:	leucine aminopeptidase
LC-MS:	liquid chromatography-mass spectrometry
LMWP:	low molecular weight protein
MRT:	mean residence time
MW:	molecular weight
MCH:	mean cell hemoglobin

MCHC:	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV:	mean corpuscular volume
NEP25:	nephrin-hCD25
PAS:	periodic acid-schiff
PK:	pharmacokinetics
PT:	prothrombin time
RBC:	red blood cell
TCh:	total cholesterol
TG:	triglyceride
TGF- $\beta$ :	transforming growth factor- $\beta$
TK:	toxicokinetics
TP:	total protein
TTO:	thrombo test
UniProtKB:	UniProt Knowledgebase
UUO:	unilateral ureteral obstruction
VKO:	vitamin K epoxide
VKOR:	vitamin K epoxide reductase
VKORC1:	vitamin K epoxide reductase complex subunit 1
VKORC1L1:	VKORC1-like protein 1
$V_{\max}$ :	maximum rate of reaction
WBC:	white blood cell

## 緒論

線維化とは皮膚や内臓に I 型コラーゲンなどの細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) が増加、過剰集積し、皮膚や内臓が硬くなった状態を言う。組織の間質には結合組織を構成する線維芽細胞が存在しており、通常、コラーゲンやエラスチンなどのほか、ヒアルロン酸やグリコサミノグリカンなどの ECM を合成・分泌し、組織や臓器の機能維持や創傷治癒に重要な役割を果たす。図 1 で示す通り、通常、組織や細胞が障害されると、免疫細胞や線維芽細胞の活性化が起こる。免疫細胞の活性化は炎症亢進ならびに炎症性サイトカインの放出を促し、線維芽細胞を活性化すると共に、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) などの働きにより、線維芽細胞が  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) を発現する筋線維芽細胞へと形質転換した後、ECM を高産生し、線維化を促進する (1)。このように、線維化は炎症や障害から組織を守る生体適応反応である一方で、何らかの内的・外的要因によって炎症や障害が慢性化すると、過度な ECM 産生により修復不能な硬化状態に至る。線維化は多くの慢性炎症性疾患における共通の病理組織学的特徴であり、最終的に臓器不全による死に直結するリスクがあり、臓器線維化を伴う疾患には、肝硬変、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、間質性肺炎、特発性肺線維症や心筋梗塞などが知られている。しかしながら、これら疾患の組織・臓器線維化に対する明確な治療薬はなく、最終的には臓器移植を除いて未だ有効な治療法がない。このため、線維化メカニズムの解明と共に、治療薬の開発が強く望まれている (2, 3)。

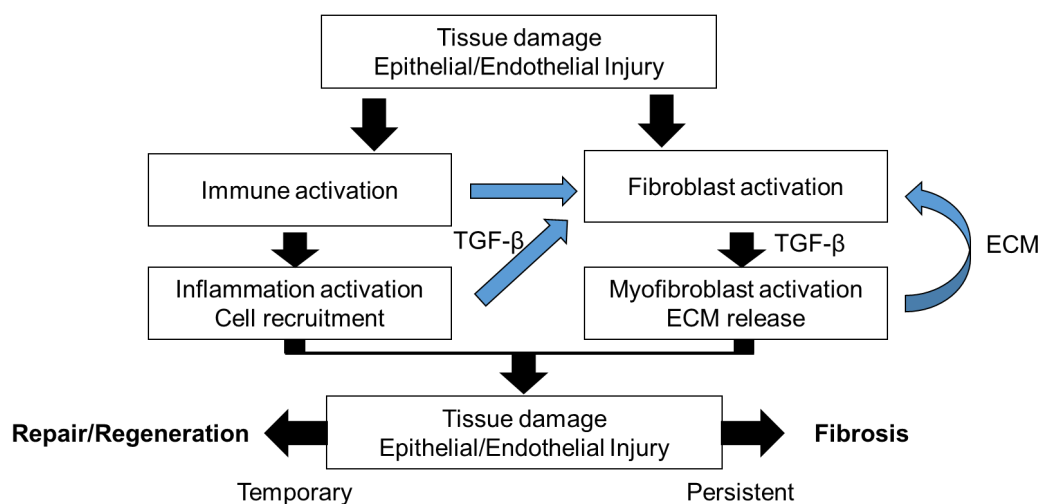


図1. 組織障害と線維化プロセス

組織・臓器線維化の正体はコラーゲンなどの ECM の異常沈着であり、コラーゲンは主に間葉性細胞に属する筋線維芽細胞などにより合成・分泌されている。筋線維芽細胞は線維化病変に集積し、ECM を産生する中心的な細胞であり、その起源としては主に 1) 局所の線維芽細胞の活性化と増殖、2) 上皮細胞からの移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT)、3) 骨髄細胞・末梢血前駆細胞などに由来するものが報告されている (3)。図2に示すように EMT とは、局所の組織障害や炎症性反応に応答して上皮細胞が上皮系の特異的形質を失い、代わりに間葉系細胞の形質を発現する現象であり、TGF- $\beta$ 、epidermal growth factor (EGF) や fibroblast growth factor-2 (FGF-2) などの液性因子の刺激により、上皮細胞が形質移行する (4)。このような変化は組織や臓器を問わず共通しているが、たとえば腎臓については、マウス片側尿管結紮 (unilateral ureter obstruction: UUO) モデル (5)、糖尿病性腎症モデル (6)、5 / 6 腎摘出モデル (7)、糸球体腎炎モデル (8) などの動物モデルを用いた研究において、組織の障害・線維化部位で EMT 現象の発生が報告されている。



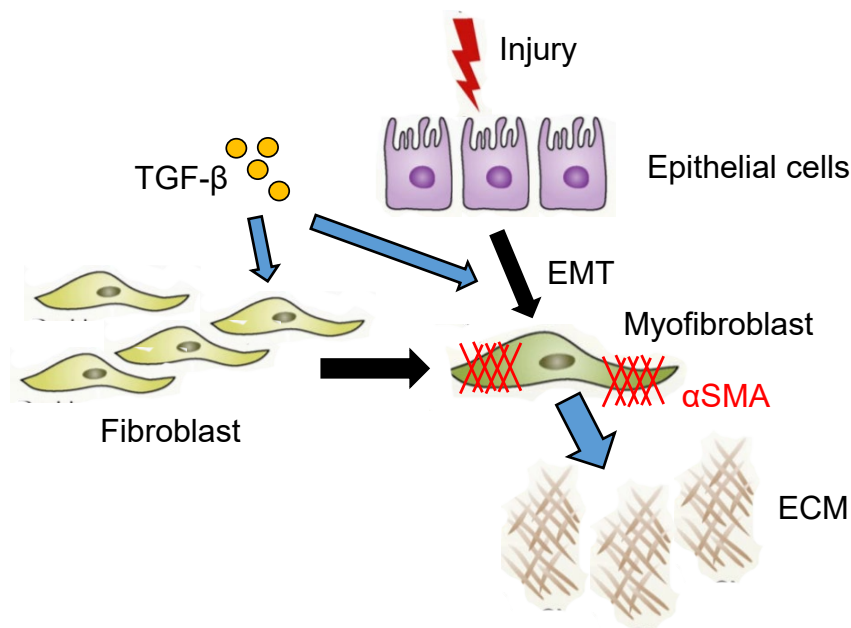


図2. EMT と ECM 分泌

腎臓は血液浄化を担う重要臓器であり、ネフロンと呼ばれる単位の微細構造が片腎 100 万個存在している。ネフロンは、主に血液を濾過する腎小体と、必要な栄養素を血液に再吸収する尿細管とに分かれており、腎小体の濾過機能は糸球体が担っている。その複雑な機能から、ネフロンは腎臓内で長く蛇行しており、血管が入り組んで並走している。その間隙を埋めるように線維芽細胞が発達しており、複雑な腎構造を維持している。また、腎糸球体においては、線維芽細胞だけでなく、メサンギウム細胞が支持細胞として毛細血管に囲まれている基底膜上で糸球体毛細血管係蹄を束ねる形で存在し、その構造維持の役割を担っている (図3)。メサンギウム細胞は糸球体全細胞数の 30~40% を占めており、線維芽細胞同様に、アクチンなどのマイクロフィラメントを有し収縮性があり、コラーゲンなどの ECM を分泌している (9)。糸球体の機能維持に重要なメサンギウム細胞の過剰増殖は、ECM の過剰な分泌に伴う組織線維化・硬化を導く (10)。たとえば、糸球体腎炎や糖尿病性腎症の病態は、糸球体基底膜の肥厚と

メサンギウム基質の増加を特徴としており、腎症の進展とともに ECM は徐々に増加し、やがて糸球体硬化に至る。

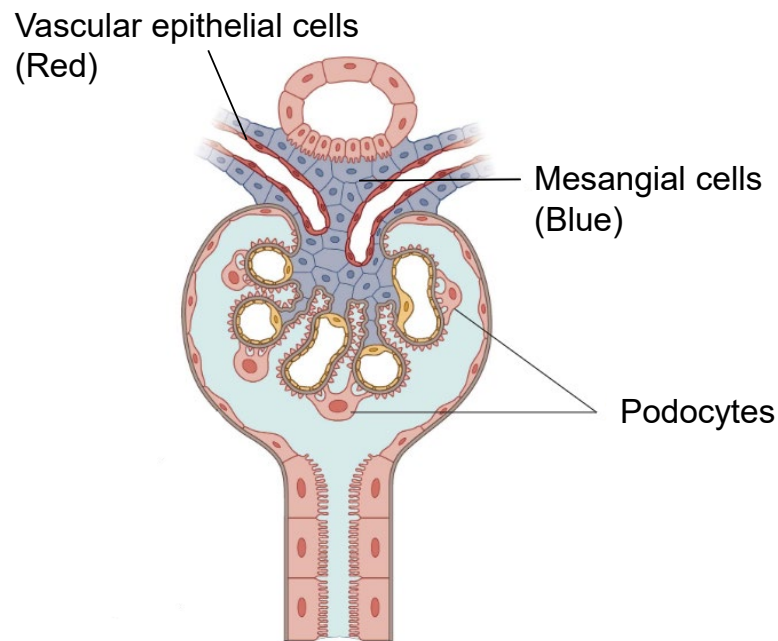


図3. 糸球体構造とメサンギウム細胞

Yanagita らは、図4に示すように、メサンギウム細胞に受容体チロシンキナーゼである Axl が発現し、腎組織障害による growth arrest-specific 6 (Gas6) の発現増加によって、Gas6/Axl 経路を介したメサンギウム細胞の増殖・活性化が起こること、それによって腎糸球体腎炎に至ることを明らかにした (11, 12)。また、Gas6 による活性化を抑制することが、メサンギウム細胞の増殖抑制、尿タンパクの減少、ひいては糸球体腎炎の抑制につながることを、ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルを用いて証明している (13, 14)。

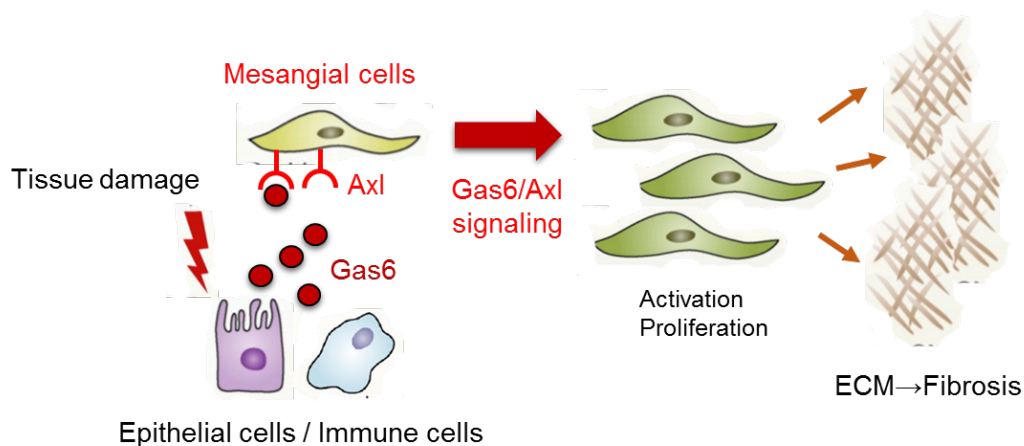


図4. 組織障害によるメサンギウム細胞の活性化と組織線維化

Gas6 は、抗血液凝固因子である protein S と類似した構造を有し、3種の受容体型チロシンキナーゼ Axl、Sky、Mer の共通リガンドとして機能するタンパク質である。Gas6/Axl 経路は、血管平滑筋細胞や線維芽細胞などの細胞増殖、走化、分化や、組織修復など、様々な生理作用において重要な役割を果たす(14)。動物モデルだけでなく、臨床においても Gas6 や Axl と腎疾患との関係性が検討されており、Fiebeler らは、腎臓病患者の腎組織の尿細管、刷子縁および糸球体における Gas6 や Axl の発現亢進を報告している(15)。また、Lee らは、慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)患者の血漿において、健常人に比べて Gas6 レベルが有意に高いこと、またその増加の腎障害進行との相関を報告している(16)。Gas6 は腎臓に限らず、肝臓、肺や心臓など他の組織における線維化にも関与しており、最近、線維芽細胞やがん細胞の EMT との関連も報告され、細胞の形質転換や組織線維化の重要因子として注目されている(17, 18, 19)。Gas6 のN末端部にはグルタミン酸側鎖が存在し、ここが vitamin K 依存的に  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla) 化され、Gas6 は活性化する(図5)。このため、vitamin K 依存的な還元酵素である vitamin K epoxide reductase (VKOR) が Gas6 の活

性化調節を担っており、先述の Yanagita らの研究は、VKOR 阻害による Gas6 活性化抑制が、糸球体腎炎の抑制につながることを、VKOR 阻害活性を有する抗血液凝固薬 warfarin を用いた動物実験によって示したものである (14)。

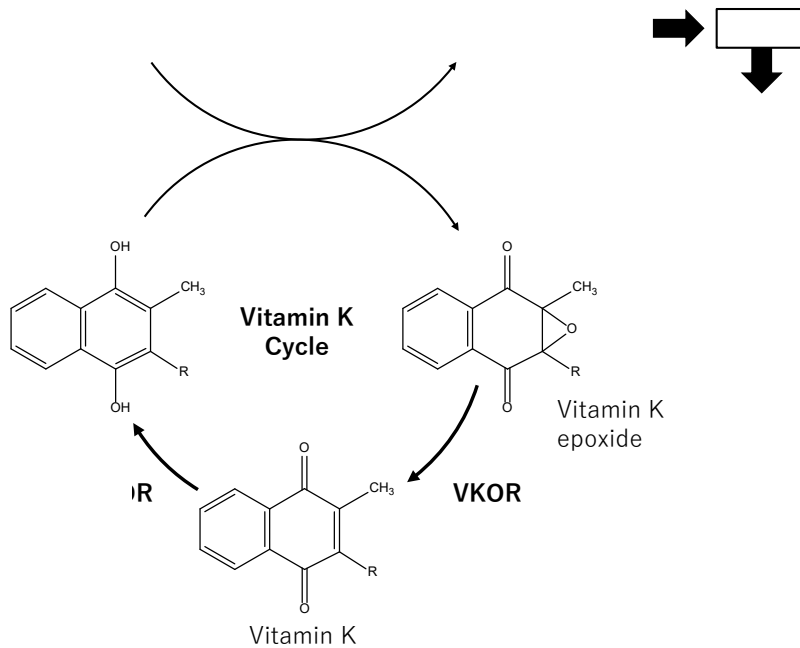


図5. Gas6/Axl 経路と VKOR による Gas6 活性化

CKD は糸球体濾過量の低下、尿タンパクの増加、病理組織学的な障害などにより定義される腎疾患であり、最終的に末期腎不全に至る。CKD につながる三大原疾患は、糖尿病性腎臓病、慢性糸球体腎炎および腎硬化症であり、いずれも慢性化の過程において、糸球体硬化と腎線維化という共通した組織変化を経る。世界的にも患者は増加傾向にあり、透析患者の増加による医療費の増加も、医療経済上の大きな問題になっている。国内において、成人人口の約 13%にあたる約 1400 万人が CKD 患者と見積もられており、このような状況下、線維化の憎悪を抑制し、CKD への進展抑制、末期腎不全・透析治療への移行を防ぐための

抗線維化治療薬の創出が望まれている。Pirfenidone や nintedanib は特発性肺線維症に対して承認されている薬剤であり、線維芽細胞の増殖や活性化抑制、細胞外基質の産生阻害などが動物実験レベルで確認されている (20)。しかしながら、効果や副作用の面で課題を有しており、腎臓における臨床上の長期の有効性は明らかにされていない。先述の warfarin は、腎組織中の VKOR 阻害により、腎線維化進展を抑制する。実際、臨床においても低用量の warfarin が糸球体腎炎に有効だとされている (21, 22)。しかしながら、warfarin は同時に肝臓中の VKOR をも阻害し、血液凝固因子の産生を抑制することで、出血作用を示す。すなわち、VKOR の生理学的機能は完全には明らかになっていないが、これら肝臓と腎臓の VKOR 阻害作用を分離できれば、新しい抗腎線維化治療薬の創出につながるものと考えられる。

本研究では、肝臓と腎臓の VKOR 阻害の分離を目的に、新規低分子ラクトン化合物を中心に、肝臓および腎臓などの主要臓器の VKOR 阻害作用を解析すると共に、動物モデルを用いた肝臓における抗血液凝固作用と腎臓における抗線維化作用を検討した。それら検討の結果、組織移行性に特徴のある 5 員環ラクトン VKOR 阻害化合物 3-acetyl-5-methyltetronic acid (AMT) を見出し、抗血液凝固作用と抗腎線維化作用が分離できることを明らかにした。さらに、本研究で得られた成果をもとに、VKOR 阻害による抗腎線維化治療の可能性を考察した。

## 第一章 VKOR 阻害化合物の作用解析

### 第一節 抗血液凝固作用から VKOR 阻害化合物の発見

東レ株式会社では5員環、あるいは6員環ラクトン低分子化合物に、血小板、白血球、および赤血球の増加作用があることを見出し、新たな低分子造血薬の研究開発に取り組んできた。その過程で実施されたラットを用いた毒性試験において、デヒドロ酢酸ナトリウム (sodium dehydroacetate: DHA-S) をはじめとした一部の6員環ラクトンに出血作用があることを見出した。DHA-S は抗菌剤、防腐剤として食品、化粧品用途などに広く使われている (図6)。一方、イヌにおける DHA-S の急性毒性試験において、嘔吐、痙攣、運動失調が見られ、またイヌを用いた亜急性毒性試験でも、体重減少、消化管出血、血中尿素窒素の増加などが見られていたものの、出血の機序は不明であった。

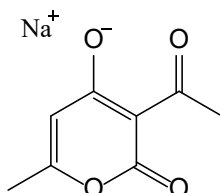


図6. DHA-S の化学構造

DHA-S はクマリン様の構造を有するラクトンである (図6)。クマリン系化合物の一種である warfarin は、肝臓の VKOR 阻害により、血液凝固因子の産生を抑制する (23)。DHA-S と warfarin の構造類似性から、ラットを用いて DHA-S の抗血液凝固作用を検証した。なお、一般に、warfarin の抗血液凝固作用は、組織因子の関与する外因系血液凝固反応の指標である prothrombin time (PT) および血中因子の関与する内因系血液凝固反応の指標である partial

thromboplastin time (APTT) などで評価されている。ラットに DHA-S (50～200 mg/kg) を 2 週間反復経口投与した結果、図 7 に示すように、DHA-S 投与量依存的な PT および APTT の延長が確認された (24)。

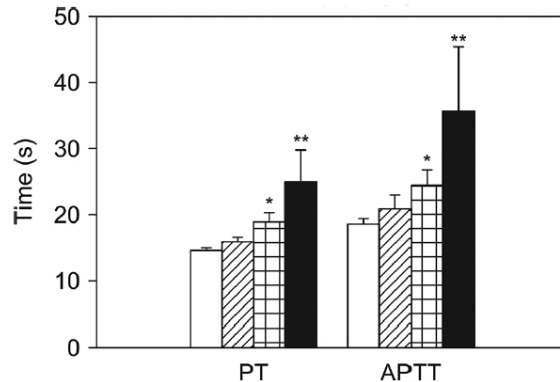


図 7. ラットにおける PT と APTT の延長

Effect on PT and APTT in male rats received the repeated oral administrations of DHA-S at doses of 50, 100, and 200 mg/kg/day. (□) vehicle; (▨) 50 mg/kg/day; (▧) 100 mg/kg/day; (■) 200 mg/kg/day. Each value is presented as the mean  $\pm$  S.D. (n=5). Significantly different from control, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01.

一方、ラットに DHA-S (200 mg/kg) を 5 日間反復経口投与した最終投与日に vitamin K (1 mg/kg) を同時皮下投与したところ、図 8 に示すように、DHA-S の投与により増加した vitamin K 依存的な凝固因子 PT、APTT、thrombo test (TTO) および hepaplastin test (HPT) の凝固時間延長は、vitamin K の同時投与によって有意に抑制された。さらに、ラットの肝臓ミクロソームを用いて *in vitro* VKOR 阻害活性を予備的に測定したところ、DHA-S には VKOR 阻害活性があることが確認された (肝 VKOR に対する  $IC_{50}$ : 3149  $\mu$ mol/L)。以上のことから、DHA-S のラットにおける出血作用が、warfarin 同様に、肝臓の VKOR 阻害による血液凝固因子の産生抑制に起因することが明らかになった (24)。

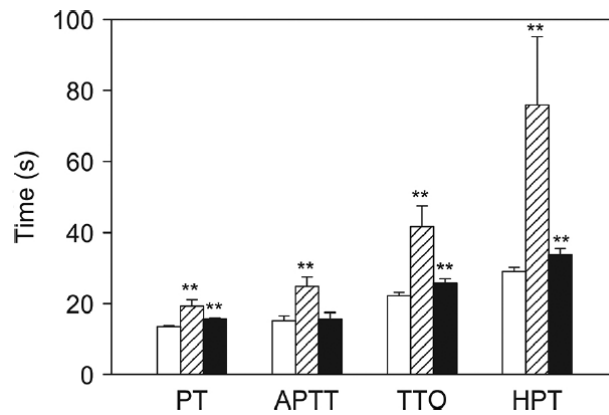


図8. ラットにおける抗血液凝固作用と vitamin K による抑制

Effect on blood coagulation parameters (PT, APTT, TTO, and HPT) in male rats received DHA-S for 5 days following a single subcutaneous injection of vitamin K<sub>2</sub> (VK<sub>2</sub>). (□) vehicle; (▨) DHA-S at 200 mg/kg/day for 5 days; (■) DHA-S at 200 mg/kg/day for 5 days and VK<sub>2</sub> at 1 mg/kg after the final DHA-S dosing on day 5. Each value is presented as the mean ± S.D. (n=5). Significantly different from control, \*\**P*<0.01.



## 第二節 VKOR 阻害化合物の探索と作用解析

前節で DHA-S の VKOR 阻害を介する抗血液凝固作用が明らかになったことから、次に、ラクトン化合物と VKOR 阻害作用との関係性を調べることにした。Warfarin 誘導体の抗血液凝固作用についてはよく調べられているが、いずれも 4-hydroxycoumarin (クマリン) 構造を有しており、DHA-S のような単環ラクトンではない。また VKOR による vitamin K epoxide (VKO) の還元反応や、warfarin による還元反応の阻害に関する多くの報告があるが、いずれも単環ラクトンに関するものはない (25, 26)。

血液凝固因子のうち、プロトロンビン (第 II 因子) を始めとする vitamin K 依存性タンパク質の N 末端近傍には、グルタミン酸側鎖が  $\gamma$ -カルボキシル化された Gla 残基が存在する。図 9 に示すように、グルタミン酸残基の Gla 化は、ミクロソーム小胞体膜に存在する  $\gamma$ -glutamylcarboxylase (GCX) により触媒される。この GCX は還元型 vitamin K を必要とし、vitamin K のエポキシド化に伴い血液凝固因子のグルタミン酸残基を Gla 化する。エポキシド化 (酸化) された vitamin K は、ミクロソーム小胞体膜酵素である VKOR によって再び還元型 vitamin K となり、GCX へと供給される。この一連のサイクルを vitamin K cycle と呼び、血液凝固因子の活性化を担っている。Warfarin は vitamin K epoxide および vitamin K の VKOR への結合に競合的に拮抗することで、VKOR による vitamin K 還元反応を阻害し、血液凝固因子の活性化を抑制する (図 9)。この阻害機構において、阻害剤の化学構造と VKOR 阻害活性はよく相関しており、VKOR 阻害活性を有する多くの化合物はクマリン構造を有する (27)。本研究では、クマリン様化合物だけでなく、DHA-S を始めとする単環ラクトン化合物の VKOR 阻害活性も調べ、構造と VKOR 阻害との関係性について考察した。

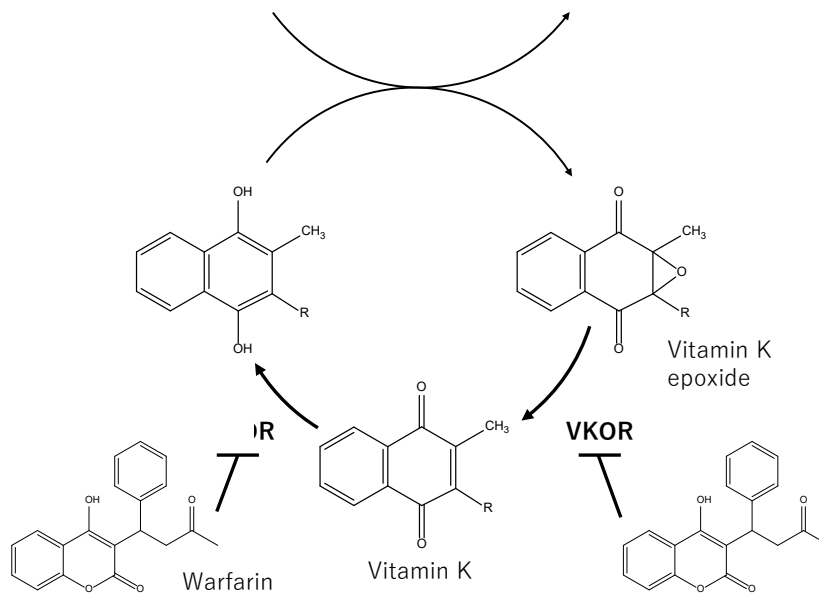


図9. Vitamin K cycle と warfarin による VKOR 阻害

まず正確で再現性の高い阻害活性測定のために、warfarin を基準とする *in vitro* VKOR 阻害評価系を構築した。なお、以後の実験動物での作用解析を見越し、ラットの各組織（肝臓、腎臓、肺）から調製したマイクロソーム画分を酵素源として用いることとした。基質として VKO を用い、補酵素として dithiothreitol (DTT) 存在下、37°C でインキュベーションしたところ、図 10 に示すように、high-performance liquid chromatography (HPLC) 上で vitamin K に相当する保持時間に溶出されるピーク強度が経時的に増加し、ラット肝、腎、肺のマイクロソーム画分により vitamin K が還元生成することが示された。なお、反応開始 20～30 分以降は生成速度が大きく落ちたため、測定感度を考慮し、以降の検討における反応時間は 30 分とした。

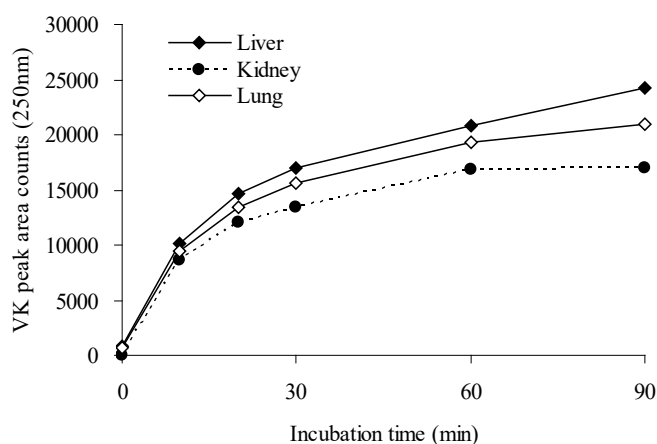


図 10. ラット肝、腎および肺ミクロソームを用いた vitamin K epoxide の還元反応 (vitamin K 生成) の経時推移

Values are mean of two samples. VKO (30  $\mu\text{mol/L}$ ) is incubated with rat microsome [1.5 mg/mL in liver (◆) and kidney (●), and 1.0 mg/mL in lung (◇)] for 0, 10, 20, 30, 60, and 90 minutes.

次に、基質濃度依存性を検討した。VKO 濃度を 3、10、30 または 100  $\mu\text{mol/L}$  として、それぞれのミクロソーム画分と共に DTT 存在下、37°C で 30 分間インキュベーションしたところ、いずれのミクロソーム画分においても、基質濃度 10  $\mu\text{mol/L}$  までは vitamin K 生成量が直線的に増加し、それ以上の濃度では飽和した (図 11)。得られた vitamin K 生成の基質濃度依存性を基に Lineweaver and Burk 式によって、ミカエリス・メンテン定数 (Michaelis constant:  $K_m$ ) と最大反応速度 (maximum rate of reaction:  $V_{\text{max}}$ ) を算出した (図 12、表 1)。 $K_m$  は任意の酵素反応条件下において、最大反応速度 ( $V_{\text{max}}$ ) の半分の速度が認められる基質濃度であり、基質と酵素の結合強度指標の一つである。 $K_m$  が低いほど親和性が高く、最大反応速度に必要な基質濃度が低いこと示す。本研究で得られた  $K_m$  は 6.0~11.9  $\mu\text{mol/L}$ 、ラット肝ミクロソーム中 VKOR の  $K_m$  は 4.3~16  $\mu\text{mol/L}$  と報告されていることから (28, 29, 30)、本試験結果は妥当であると考えた。ま

た、一般に酵素反応の競合阻害を定量的に検討する場合、 $K_m$ 付近もしくはそれ以下の基質濃度を用いることが推奨されるため、本評価系の基質濃度は  $5 \mu\text{mol/L}$  とした。

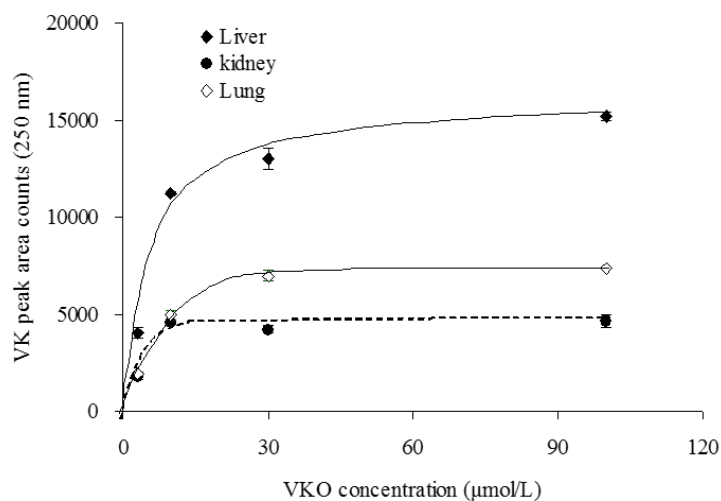


図 11. ラット肝、腎および肺ミクロソームを用いた vitamin K epoxide の還元反応 (vitamin K 生成) の基質濃度依存性

Values are mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). VKO (3, 10, 30, and 100  $\mu\text{mol/L}$ ) is incubated with rat microsome [1.5 mg/mL in liver ( $\blacklozenge$ ) and kidney ( $\bullet$ ), and 1.0 mg/mL in lung ( $\diamond$ )] for 30 minutes.

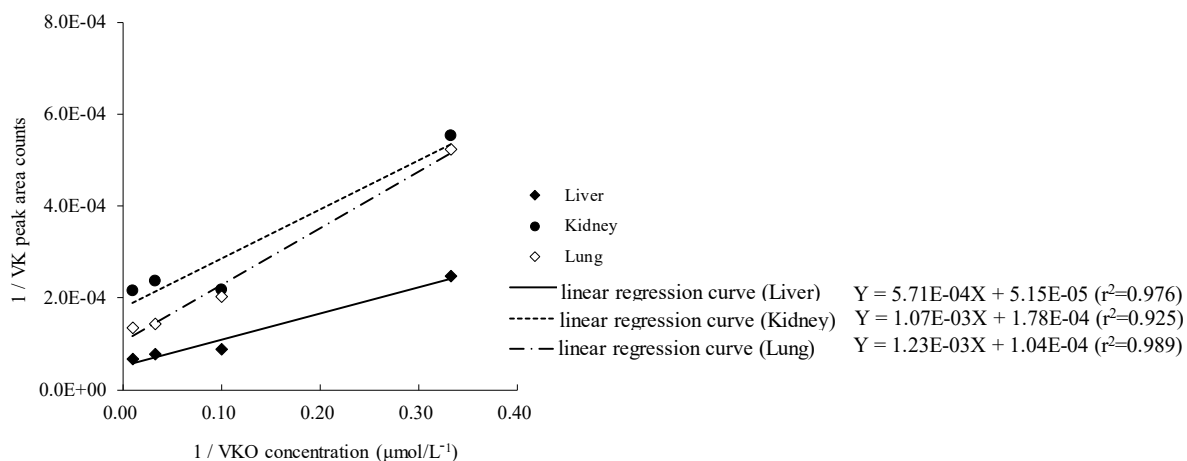


図 12. Vitamin K epoxide の還元反応 (vitamin K 生成) の基質濃度依存性 (Lineweaver and Burk plot)

Values are mean  $\pm$  S.D. (n=3). VKO (3, 10, 30, and 100  $\mu\text{mol/L}$ ) is incubated with rat microsome [1.5 mg/mL in liver (◆) and kidney (●), and 1.0 mg/mL in lung (◇)] for 30 minutes.

表 1. ラット肝、腎および肺ミクロソームを用いた vitamin K epoxide 還元反応 (vitamin K 生成) の  $K_m$  および  $V_{max}$

	$K_m$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$V_{max}$ (peak area counts/min/mg protein)
Liver	11.1	19413
Kidney	6.0	5628
Lung	11.9	9657

最適化した評価系において、warfarin を阻害剤として、濃度依存的な VKOR 阻害活性を確認した。なお、再現性を確認するため、異なる 3 日間連続して試験を実施した。VKO 濃度を 5  $\mu\text{mol/L}$ 、wafrain 濃度を 0、0.01、0.1、1 もしくは 10  $\mu\text{mol/L}$  とし、それぞれのミクロソーム画分と共に DTT 存在下、37°C で 30 分間インキュベーションした。Wafrain を含まない反応溶液における

vitamin K 生成量を 100%とした際の、50%生成阻害を示す warfarin 濃度(IC<sub>50</sub>)を求めた (図 13)。その結果、肝、腎および肺マイクロソーム中の VKOR に対する warfarin の平均 IC<sub>50</sub>は、0.154、0.134 および 0.302 μmol/L であり、日間再現性の精度はそれぞれ 16.4%、26.1% および 29.6%であった (表 2)。ラット肝マイクロソーム中の VKOR に対する warfarin の IC<sub>50</sub>は、0.07~1.7 μmol/L と報告されていることから、本評価系を用いることにより、VKOR 阻害活性を定量的に測定できると考えた (28, 29, 30)。

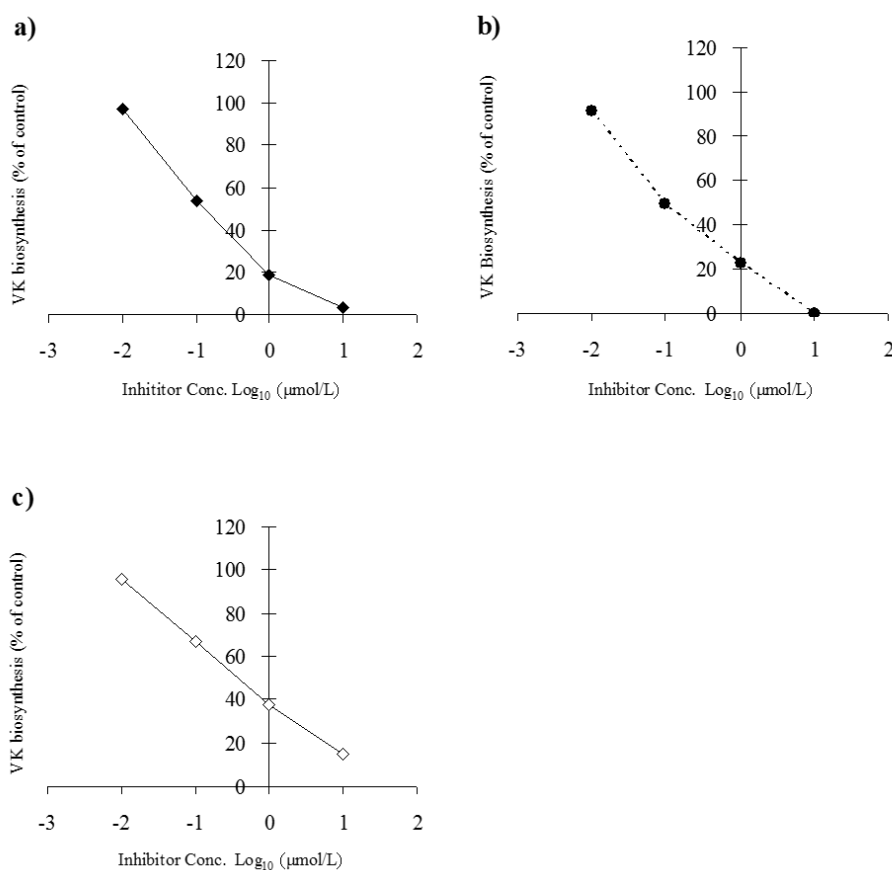


図 13. ラット肝、腎および肺マイクロソームを用いた warfarin 濃度依存的な VKOR 阻害

Values are mean of two sample. VKO (5 μmol/L) is incubated with rat microsome [1.5 mg/mL in liver (a, ◆) and kidney (b, ●), and 1.0 mg/mL in lung (c, ◇)] and warfarin (0, 0.01, 0.1, 1, and 10 μmol/L) for 30 minutes.

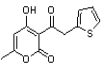
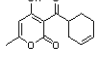
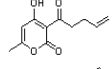
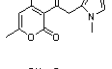
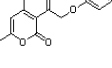
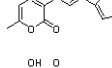
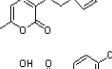
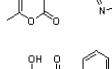
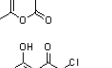
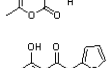
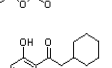
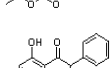
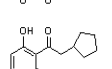
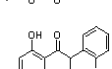
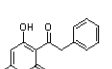
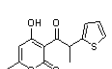
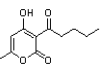
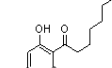
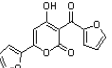
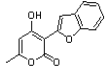
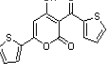
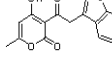
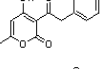
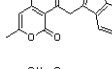
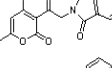
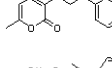
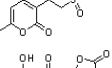
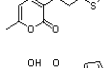
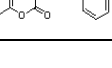
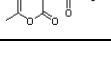
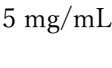

表 2. ラット肝、腎および肺ミクロソームを用いた warfarin を用いた *in vitro* VKOR 阻害評価系の再現性

Microsome	IC <sub>50</sub> (μmol/L)				S.D.	CV (%)
	Day 1	Day 2	Day 3	Mean		
Liver	0.127	0.157	0.178	0.154	0.025	16.4
Kidney	0.096	0.165	0.140	0.134	0.035	26.1
Lung	0.372	0.331	0.201	0.302	0.089	29.6

IC<sub>50</sub> values are mean of two sample. VKO (5 μmol/L) is incubated with rat microsome (1.5 mg/mL in liver and kidney, 1.0 mg/mL in lung) and warfarin (0, 0.01, 0.1, 1, and 10 μmol/L) for 30 minutes. Each experiment is conducted for three different days. Reproducibility are represented as mean ± S.D. (n=3). CV is calculated by S.D./mean of IC<sub>50</sub> values × 100 in each microsome.

次に、構築した本評価系を用いて、東レ株式会社で保有するラクトン化合物ライブラリの VKOR 阻害活性を測定した。なお、腎 VKOR 阻害活性の高い化合物のスクリーニングを目的に、まず腎 VKOR 阻害活性を網羅的に評価し、次いで活性が高いもしくは構造に特徴のある化合物について、肝および肺 VKOR 阻害活性を測定した (表 3)。その結果、阻害活性と化合物の化学構造について、warfarin を始めとするクマリン様化合物の阻害活性が最も高く、次いで 6 員環ラクトン化合物が高く、5 員環ラクトン化合物の阻害活性が最も低かった。加えて、6 員環ラクトン化合物であっても D222 (腎 VKOR に対する IC<sub>50</sub>: 0.25 μmol/L) や D287 (IC<sub>50</sub>: 0.24 μmol/L) のように、warfarin (IC<sub>50</sub>: 0.096 μmol/L) に匹敵する高い VKOR 阻害活性を有するものがあり、特に 3 位側鎖に平面性の高い芳香環を導入することで、VKOR 阻害活性が大幅に向上することが明らかになった。たとえば、側鎖に芳香環を有さない DHA-S (IC<sub>50</sub>: 3627 μmol/L) の 3 位側鎖にチオフエンを導入した D62 は、DHA-S に対して腎 VKOR 阻害活性 (IC<sub>50</sub>: 5.5 μmol/L) が 600 倍以上向上した。なお、今回のスクリーニングにおいて、6 員環ラクトンだけでなく 5 員環ラクトン (AMT の IC<sub>50</sub>: 3175 μmol/L) にも VKOR 阻害活性があることが初めて明らかになった。

表3. ラット肝、腎および肺ミクロソームを用いた *in vitro* VKOR 阻害活性

Compound	VKOR IC50 (μmol/L)			Chemical Structure	Compound	VKOR IC50 (μmol/L)			Chemical Structure
	Liver	Kidney	Lung			Liver	Kidney	Lung	
D62	5.5	5.5	7.9		D150	-	22	-	
D64	-	50	-		D158	-	17	-	
D71	-	14	-		D179	-	2.5	-	
D72	-	10	-		D180	-	19	-	
D91	-	6.3	-		D197	-	1.8	-	
D104	-	18	-		D200	28	25	38	
D109	-	1.4	-		D205	-	10	-	
D110	-	4.2	-		D208	-	82	-	
D111	-	3.1	-		D209	-	4.5	-	
D114	-	28	-		D212	-	6.9	-	
D119	-	40	-		D221	-	9.3	-	
D121	-	38	-		D222	0.35	0.25	-	
D127	-	4.2	-		D223	-	14	-	
D128	-	13	-		D224	-	2.7	-	
D146	-	71	-		D225	-	26	-	
D147	-	33	-		D233	-	12	-	

Mean values of two samples.

Microsomal concentrations: 1.5 mg/mL (liver and kidney), 1.0 mg/mL (lung).

-: not conducted.



表 3. ラット肝、腎および肺ミクロソームを用いた *in vitro* VKOR 阻害活性 (続き)

Compound	VKOR IC50 ( $\mu\text{mol/L}$ )			Chemical Structure	Compound	VKOR IC50 ( $\mu\text{mol/L}$ )			Chemical Structure
	Liver	Kidney	Lung			Liver	Kidney	Lung	
D234	-	11	-		D287	0.42	0.24	-	
D235	-	20	-		D329	-	33	-	
D237	-	13	-		D362	-	1.2	-	
D243	-	7.5	-		D364	-	1.3	-	
D245	-	2.5	-		D369	-	3.0	-	
D254	1.5	0.88	-		D381	0.10	0.060	-	
D262	-	0.65	-		D382	75	76	76	
D263	-	5.0	-		D383	-	1.5	-	
D264	-	12	-		D387	-	7.0	-	
D266	-	0.26	-		D439	0.23	0.11	-	
D267	2.3	0.98	-		DHA-S	4796	3627	4570	
D268	-	38	-		D480	>1000	>1000	>1000	
D269	-	2.0	-		AMT	3204	3175	3072	
D278	-	12	-		Warfarin	0.13	0.096	0.37	
D279	-	26	-						
D286	-	2.6	-						

Mean values of two samples.

Microsomal concentrations: 1.5 mg/mL (liver and kidney), 1.0 mg/mL (lung).

-: not conducted.

VKOR のアミノ酸変異体と *in silico* docking 解析から提唱されている VKOR

と warfarin との相互作用 (31) から、図 14 に示す通り、VKOR の 133 番 Ile および 134 番 Val 残基と相互作用する warfarin の環状エステル部分は競合阻害に重要である。同 *in silico* 解析では、VKOR の活性ポケット内の warfarin のクマリン部分近傍に 131 番 Phe 残基があり、結合の安定化に寄与している。また、VKOR の活性ポケットには、warfarin や vitamin K の側鎖と相互作用する疎水性ポケットがあり、warfarin と 55 番 Phe 残基との相互作用も阻害活性を考えるうえで重要である (32)。これらを総合すると、側鎖に疎水性官能基を有する単環ラクトンに VKOR 阻害活性があり、その活性が warfarin よりやや弱いことは、理に適っていると考えられる。なお、これら warfarin と VKOR の相互作用に重要な Ile、Val、Phe などのアミノ酸残基は、ヒトとラットでよく保存されていることから (表 4)、それらの空間的配置は大きく異ならないと推察される。

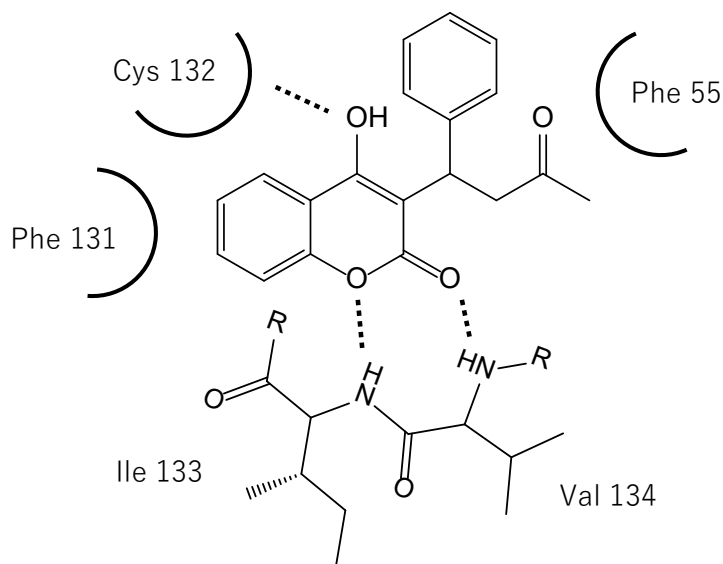


図 14. VKOR の活性中心と warfarin との相互作用 (模式図)

Blood (2013)<sup>31)</sup> および Nat Struct Mol Biol (2017)<sup>32)</sup> を一部改変

表4. ヒトおよびラット VKORs のアミノ酸配列

	Entry	51	55	131	132	133	134
h VKORC1	Q9BQB6	Cys	Phe	Phe	Cys	Ile	Val
h VKORC1L1	Q8N0U8	Asp	Trp	Leu	Tyr	Phe	Val
r VKORC1	Q6TEK4	Cys	Phe	Phe	Cys	Ile	Val
r VKORC1L1	Q6TEK3	Asp	Trp	Leu	Tyr	Phe	Val

タンパク質配列データベースである UniProt Knowledgebase (UniPortKB) より引用

上記要件は、6員環ラクトンだけでなく、5員環ラクトンにも共通すると考えられるが、5員環ラクトンのエステル部位と4位水酸基との分子内の位置関係は、VKO や warfarin および6員環ラクトンのそれとは異なる。VKO が VKOR によって還元される際には、warfarin 同様に上記の活性ポケットに納まり、4位水酸基が VKOR の 132 番 Cys と 135 番 Cys のジスルフィド基と相互作用すると想定されるため (33)、5員環ラクトンは活性ポケット内での分子固定に重要なエステル部分と、活性中心であるジスルフィド残基と相互作用する4位水酸基周辺の立体的な位置関係が warfarin と異なるため、5員環ラクトンの阻害活性が大きく低下したものと推察した (図 15)。

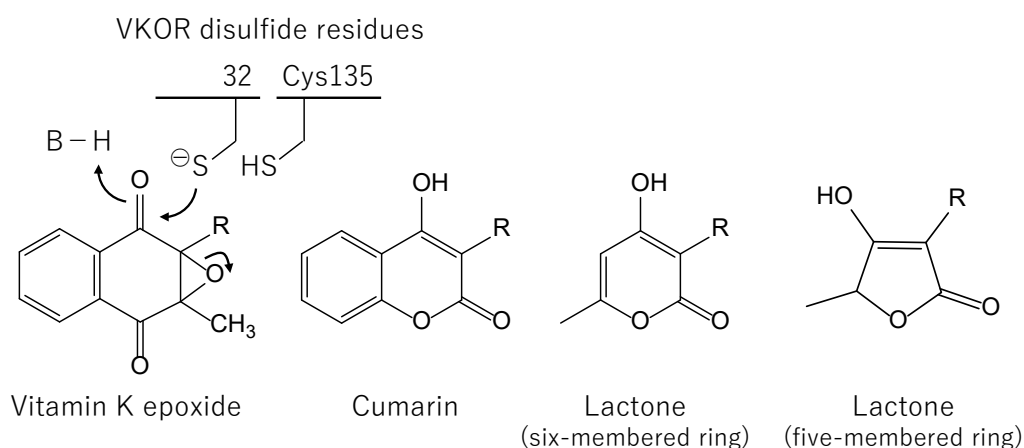


図 15. Vitamin K epoxide の還元反応 (模式図) と VKOR 阻害剤の化学構造  
Bioorg Med Chem (2007)<sup>33</sup>を一部改変

### 第三節 肝臓以外の組織 VKOR に対する作用

VKOR は、肝臓において血液凝固因子産生を支配する vitamin K cycle に関わる重要な酵素であるが、他方で Gas6 の活性化を介した腎臓メサンギウム細胞の増殖・活性化にも関与する (13, 14)。メサンギウム細胞は、糸球体の構造を形成する重要な支持細胞の一つであり、過剰な増殖が組織の線維化を招く。先述の通り、warfarin 投与によって Gax6/Axl 経路が抑制され、メサンギウム細胞の増殖および腎炎の発症が抑えられることが、実験動物を用いた抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルにて明らかにされている (11, 12, 13)。VKOR は体内の主要臓器 (肝臓、腎臓、肺など) に存在し、特に肝臓に多く分布しており (34)、warfarin は肝臓の VKOR に作用して、出血傾向をもたらすため、臨床においては慎重な投与が求められる (21, 22)。これらのことから、たとえば腎臓など任意の標的組織の VKOR に選択的に作用する化合物を取得できれば、標的組織における抗線維化作用を有し、かつ出血などの副作用と分離可能な治療薬の創出が期待できる。しかしながら、表 5 に示すように、今回検討した 5 および 6 員環ラクトン化合物においては、warfarin に比べ、特に肝臓に比べて腎臓の VKOR を強く阻害する化合物は認められなかった。

表5. ラット肝および腎ミクロソームを用いた *in vitro* VKOR 阻害活性

Compound	Liver		Kidney	
	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	ratio <sup>1)</sup>	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	ratio <sup>2)</sup>
Warfarin	0.13	1.00	0.096	0.74
DHA-Na	4796	1.00	3627	0.76
D62	5.5	1.00	5.5	1.00
D200	28	1.00	25	0.89
D222	0.35	1.00	0.25	0.71
D254	1.5	1.00	0.88	0.59
D267	2.3	1.00	0.98	0.43
D287	0.42	1.00	0.24	0.57
D381	0.10	1.00	0.060	0.60
D439	0.23	1.00	0.11	0.48
D480	>1,000	N.C.	>1,000	N.C.
AMT	3204	1.00	3175	0.99

Mean values of two samples

Microsomal concentration: 1.5 mg/mL (liver and kidney), 1.0 mg/mL (lung)

N.C.: not calculated

1) ratio = Liver IC<sub>50</sub> / Liver IC<sub>50</sub>

2) ratio = Kidney IC<sub>50</sub> / Liver IC<sub>50</sub>

VKOR には、アミノ酸配列と組織分布が異なる paralog が存在する。VKOR の本体が、Rost (23) および Li (35) らによって VKORC1 であることが同定され、Li (36) らによって立体構造が明らかになって以降、ヒトおよび各種動物において、VKORC1 に対する paralog である VKORC1L1 の存在が明らかにされた (37)。VKORC1 と L1 との関係性や、どのように分業しているかについては未だに詳細は不明であるが、vitamin K cycle の中心的機能である GCX によるタンパク質の Gla 化は VKORC1 体が担っており、また、VKORC1 は L1 に比べて肝臓、腎臓および肺組織において発現量が高く、特に肝臓で高発現している (37)。この事実は、図 16 で示した通りラットにおいても同様である (38)。なお、表 4 に示すように、VKORC1L1 では、先述の warfarin との相互作用部位である Phe や Ile に、ヒトおよびラットで同様の変異があり、いずれの種においても VKORC1L1 は VKORC1 に比べ warfarin に 50 倍近く抵抗性を示す (38)。

本研究の結果から、ラット腎臓に比べ、肝臓での vitamin K 生成速度 ( $V_{\max}$ ) は約 4 倍大きく、warfarin をはじめ今回検討した 5 および 6 員環ラクトン化合物において、ラット肝臓および腎臓の VKOR の  $IC_{50}$  の違いは 2 倍以内であった。このことから、少なくともラットにおいて VKO 還元反応に主に関わるのは、肝・腎ともに VKORC1 であると推察した。また、VKORC1L1 が VKORC1 に比べ腎臓や肺などの組織においてもマイナーである場合、例え VKORC1L1 を選択的に阻害する薬剤を創出しても、任意の組織における VKOR 活性全体の抑制は難しい。

以上のことから、肝臓 VKOR 阻害に伴う出血作用からの分離を目的に、腎臓などの臓器において VKOR を選択的に阻害するには、VKOR のサブタイプ選択性の異なる阻害剤を探索するよりも、阻害剤の組織移行性や分布をコントロールする方が得策であると考えた。

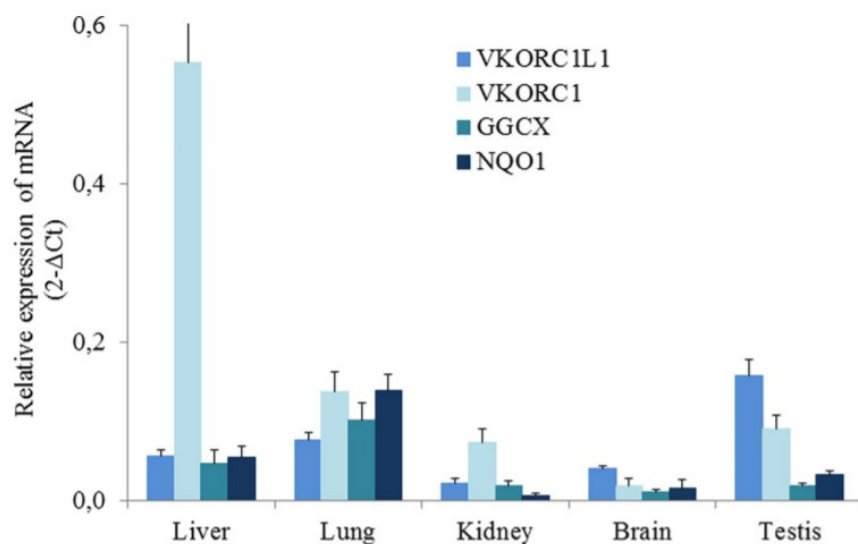


図 16. ラットにおける VKORC1 および VKORC1L1 の発現

J Biol Chem (2013)<sup>38</sup>から引用

## 第二章 VKOR 阻害化合物の抗腎線維化作用と抗血液凝固作用との分離

### 第一節 腎組織移行型 VKOR 阻害化合物 3-acetyl-5-methyltetronic acid (AMT)

前章において、warfarin を含め 62 種の化合物を用いて組織選択的な VKOR 阻害化合物を探索研究したが、これまでのところ期待できる結果を示せていない。実際、新規に見出された 6 員環ラク톤の中で、*in vitro* VKOR 阻害活性が高く、またラットにおいて血中動態の優れる D62 (図 17、calculated LogP (CLogP): 2.4, molecular weight (MW): 250) のラット反復経口投与後の抗血液凝固作用を確認したが、腎臓における抗線維化作用を発揮するより前に、肝臓における VKOR 阻害に伴うと考えられる血液凝固パラメータの変動、出血傾向が認められた (表 6)。なお、データは示さないが、warfarin も同様に、抗線維化作用より前に、血液凝固パラメータの有意な変化が確認された。

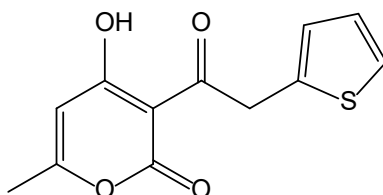


図 17. D62 の化学構造

表 6. D62 反復経口投与後ラットにおける血液凝固パラメータ

Dose	0 mg/kg	3 mg/kg	30 mg/kg
Prothrombin time (sec)	15.5 ± 0.8 (4)	14.2 ± 0.5 (4)	19.6 ± 9.1 (5)
Activated partial thromboplastin time (sec)	16.3 ± 0.2 (3)	15.7 ± 1.2 (4)	18.9 ± 3.6 (5)
Thrombotest (%)	21.3 ± 1.2 (4)	19.5 ± 1.0 (4)	26.3 ± 29.0 (5)
Hepaplastin (%)	29.7 ± 1.5 (4)	27.5 ± 1.7 (4)	41.7 ± 21.8 (5)

Values are mean ± S.E. for the numbers of rats indicated in parentheses.

このような状況下、阻害剤の組織移行性や分布が検討における鍵であるという視点から、物性の大きく異なる5員環ラクトンについて検討を行った。図18で化学構造を示したがAMT (CLogP: -0.25, MW: 156) は、今回評価した5員環ラクトン化合物の中で、唯一VKOR阻害活性を算出できた化合物であり、6員環ラクトン化合物に比べて *in vitro* VKOR 阻害活性が低いものの、溶解度が非常に高い化合物である (AMT の溶解度: >10 mmol/L)。AMT を、D62 および warfarin 同様に、ラットに反復経口投与した結果、D62 の10倍用量である300 mg/kg においても、血液凝固パラメータの変動、出血傾向は認められなかった (表7)。

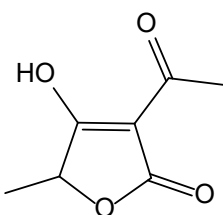


図18. AMT の化学構造

表7. AMT 反復経口投与後ラットにおける血液凝固パラメータ

Dose	0 mg/kg	300 mg/kg
Prothrombin time (sec)	15.5 ± 0.8 (4)	15.0 ± 0.6 (3)
Activated partial thromboplastin time (sec)	16.3 ± 0.2 (3)	16.0 ± 0.7 (3)
Thrombotest (%)	21.3 ± 1.2 (4)	20.2 ± 1.2 (3)
Hepaplastin (%)	29.7 ± 1.5 (4)	28.5 ± 1.7 (3)

Values are mean ± S.E. for the numbers of rats indicated in parentheses.

低曝露により出血傾向を示さなかった可能性が考えられたため、ラットにおける血中曝露を確認したところ、表8の通り、経口投与時のAMTの血中曝露は、D62に比べ低かった (同用量における血中 area under the curve (AUC)比: D62/AMT=186)。そこで、血中曝露量を上げるためにラットに反復静脈内投与



したが、経口投与と同様に有意な血液凝固パラメータの変動、出血傾向は認められなかった（表9）。

表8. D62 および AMT 単回経口投与後ラットにおける血中曝露

	D62	AMT
Dose (mg/kg)	30	300
C <sub>max</sub> (ng/mL)	243 ± 26	59.7 ± 42.7
AUC <sub>0-24h</sub> (ng·hr/mL)	3510 ± 135	188 ± 61

Values are mean ± S.D (n=3).

表9. AMT 反復静脈内投与後ラットにおける血液凝固パラメータ

Dose	0 mg/kg	3 mg/kg	30 mg/kg
Prothrombin time (sec)	15.3 ± 0.3 (6)	15.1 ± 0.18 (6)	15.5 ± 0.3 (6)
Activated partial thromboplastin time (sec)	17.9 ± 1.0 (6)	18.3 ± 0.7 (6)	16.9 ± 0.5 (6)
Thrombotest (%)	572 ± 61 (6)	709 ± 117 (6)	815 ± 100 (6)
Hepaplastin (%)	65.4 ± 3.9 (6)	72.1 ± 5.3 (6)	74.9 ± 4.1 (6)

Values are mean ± S.E. for the numbers of rats indicated in parentheses.

血液凝固パラメータの変動が見られなかった理由を確認するため、AMT をラットに単回静脈内投与したときの組織中濃度を直接測定したところ、腎臓中の AMT 濃度は肝臓に対して約 16 倍も高いことが明らかになった（表10）。

表 10. AMT 単回静脈内投与後ラットにおける腎臓および肝臓中 AMT 濃度 (30 mg/kg)

Time after administration (hr)	Tissue concentration (μmol/g tissue)			
	Kidney		Liver	
0.083	4.25 ±	0.29	0.26 ±	0.02
1	0.09 ±	0.00	<LLOQ <sup>a</sup>	
24	<LLOQ <sup>a</sup>		<LLOQ <sup>a</sup>	

The data were presented as a mean ± S.E. (n=3)

<sup>a</sup> Concentrations of AMT in all animals were under low limit of quantification (0.04 nmol/g tissue).

ラットに AMT を 30 mg/kg 単回静脈内投与し、5 分後の腎臓中濃度を測定したところ、4.25  $\mu\text{mol/g tissue}$  であり、AMT の腎 VKOR の  $\text{IC}_{50}$  である 3.2  $\mu\text{mol/mL}$  を超えていた。一方、肝臓中濃度は 0.26  $\mu\text{mol/g tissue}$  であり、肝 VKOR の  $\text{IC}_{50}$  である 3.2  $\mu\text{mol/mL}$  の 1/10 程度であった。

本研究では、AMT の腎移行性メカニズムを調べていないため、AMT の腎臓中濃度が肝臓に比べて高い理由は不明であるが、AMT (CLogP: -0.25, MW: 156) はテトロン酸構造を有する高極性の低分子化合物であり、内因性物質である 2-deoxytetronic acid (別名 3, 4-dihydroxybutyric acid, CLogP: -1.2, MW: 120) をはじめとする同類の高極性低分子のテトロン酸はヒトの尿中に排泄される (39)。図 19 で化学構造を示したがクレアチニン (Creatinine: Cre) (CLogP: -1.8, MW: 113) は、AMT と同程度の分子サイズの高極性 5 員環化合物であるが、ほぼ 100% が腎系球体で濾過され尿中に排泄される。一般に、分子量が小さく、中性付近でイオン化している高極性化合物は腎排泄されやすく、反対に脂溶性や分子量が増すと肝臓に移行し、胆汁排泄されやすくなる (40, 41)。これらのことから、AMT は肝臓にはあまり移行せず、腎排泄されやすいものと考えられた。一方、warfarin (CLogP: 2.9, MW: 308) は、経口投与後ほぼ 100% が消化管から吸収された後、主に肝臓で代謝・排泄され、未変化体の尿中排泄率は数%であると報告されている (42)。本研究では D62 の体内動態の詳細は調べてないが、warfarin に物性の近い D62 も同様の傾向と推察した。なお、Thijssen らは、ラットに warfarin を単回もしくは持続皮下投与した時の肝臓および腎臓中の薬物濃度を調べており、単回投与で 2.5~3.2 倍、持続投与で 5.2~6.3 倍肝臓中濃度が腎臓中濃度に比べて高いと報告している (43)。これらのことから、AMT は VKOR 阻害活性が低いものの、warfarin や D62 と異なり、腎臓に分布しやすいことから、腎において VKOR を選択的に抑制する可能性が示唆された。

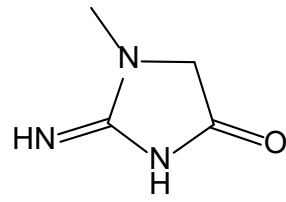


図 19. Creatinine の化学構造

## 第二節 AMT のラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルおよび CDDP 誘発腎障害モデルにおける抗腎線維化作用

前節で、弱い VKOR 阻害活性を有する 5 員環ラクトンである AMT は、ラットにおいて腎臓への移行性が高く、このことが肝 VKOR 阻害に基づく抗血液凝固作用を呈さずに、腎 VKOR 阻害による抗線維化を示す要因と考えられた。そこで、抗血液凝固作用と抗線維化作用を薬理作用として分離できるかを検証するために、warfarin の抗線維化作用が確認されているラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルを用い、AMT の抗血液凝固作用と抗腎線維化作用を評価した。

本モデルは、メサンギウム細胞膜に表出されている Thy-1.1 抗原に対する抗体を静脈内に投与し惹起される病態モデルである。抗体投与により障害されたメサンギウム細胞は細胞溶解を起こし、メサンギウム領域より消失する。その後、メサンギウム細胞障害の極型である糸球体係蹄の嚢状化がおこり、7 日前後を極期としてメサンギウム細胞を中心とする著しい線維芽細胞増殖が起こり、最終的に糸球体機能の低下と組織の線維化病変が形成される。VKOR は Gas6 の活性化を介した腎臓メサンギウム細胞の増殖にも関与しており、VKOR が阻害されることでメサンギウム細胞の増殖が抑制され、特に腎糸球体の線維化の進行が抑制されると考えられている。

本研究では、ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルにおいて、AMT を 12 日間反復静脈内投与（10～30 mg/kg）し、腎糸球体における抗線維化作用を確認した。その結果、AMT 投与群において、投与量依存的な腎糸球体の抗線維化作用が病理組織学的に認められた。図 20 の通り、コントロールの溶媒投与群では、メサンギウム細胞の増殖に伴うと考えられる糸球体基底膜の肥厚や線維細胞性半月体形成が認められたが、AMT を 30 mg/kg 反復静脈内投与することで、そ

れら所見が無くなった。その他、硝子様円柱、硝子滴、および尿細管拡張など、糸球体障害に伴って認められる病理組織学的変化も AMT 投与量依存的に抑制された (表 11)。このときの腎機能についても評価を行った結果、尿中クレアチニンおよびクレアチニンクリアランスは、投与量依存的に有意に増加していた (表 12)。クレアチニンクリアランスは、血清中 (血漿中) クレアチニンおよび尿中クレアチニンから算出されるパラメータであり、糸球体濾過能 (glomerular filtration rate: GFR) を定量する指標として臨床だけでなく、非臨床研究においても汎用されている (44, 45, 46)。総タンパク質量、アルブミン量、および尿中クレアチニンとアルブミンの比から算出される albumin creatinine ratio (ACR) は、糸球体障害のパラメータとして報告されているが (58)、表 12 の通り、本検討では投与量依存的な変化は確認されたものの、有意差はなかった。

ラット Thy-1 腎障害モデルにおいて、AMT 投与による腎糸球体の抗線維化が病理組織学的に認められ、それに伴い腎機能が維持された事も尿検査によって確認された。加えて、先述の通り、AMT をラットに反復静脈内投与 (~30 mg/kg) した際に、血液凝固パラメータへの影響は確認されず、出血傾向は認められなかった。以上、AMT は当初の推察通り、肝臓および腎臓への移行性だけでなく、薬理作用としても、抗血液凝固作用と抗線維化作用とを分離できる可能性が示された。

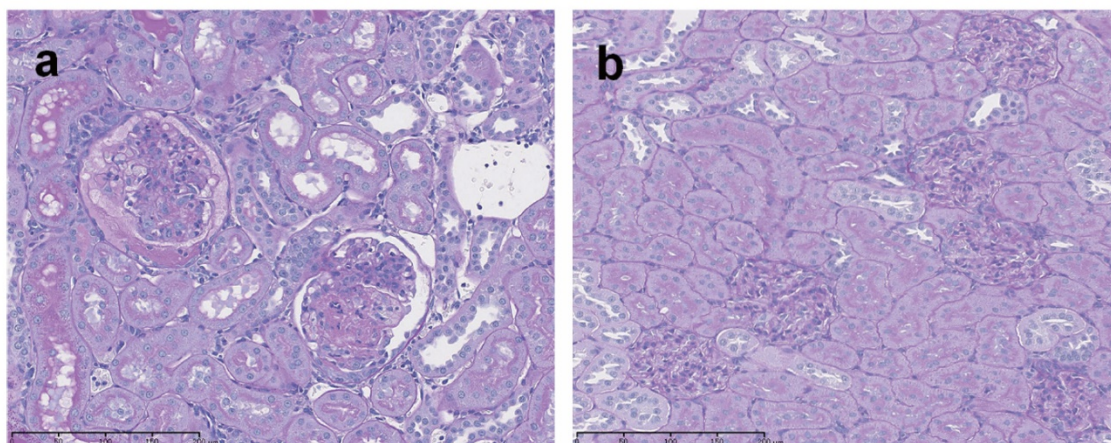


図 20. AMT 投与後ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルの代表的な糸球体周辺病理組織像

Representative light micrographs of kidneys following after 12-day repeated intravenous administrations of AMT in Thy-1 glomerulonephritis rats. Periodic acid-Schiff (PAS) stained sections showing a thickening of the glomerular basement membrane and fibro-cellular crescent of the glomerulus at 0 mg/kg of AMT (a), and no remarkable change in the glomerulus and tubule at 30 mg/kg of AMT (b).

表 11. AMT 投与後ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルの腎臓病理学的所見

Findings	Grade <sup>a</sup>	AMT		
		0 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg
Basophilic tubule	-	0/0	4/6	4/6
	-/+	4/6	2/6	1/6
	+	2/6	0/6	1/6
	++	0/6	0/6	0/6
	+++	0/6	0/6	0/6
Fibro-cellular crescent of glomerulus	-	0/6	1/6	2/2
	-/+	0/6	3/6	2/6
	+	5/6	2/6	2/6
	++	1/6	0/6	0/6
	+++	0/6	0/6	0/6
Hyaline cast	-	0/0	0/0	2/6
	-/+	0/6	4/6	2/6
	+	5/6	2/6	2/6
	++	1/6	0/6	0/6
	+++	0/6	0/6	0/6
Hyaline droplet	-	0/6	4/6	4/6
	-/+	3/6	2/6	2/6
	+	3/6	0/6	0/6
	++	0/6	0/6	0/6
	+++	0/6	0/6	0/6
Thickening of glomerular basement membrane	-	0/6	1/6	2/6
	-/+	0/6	0/6	1/6
	+	2/6	5/6	3/6
	++	4/6	0/6	0/6
	+++	0/6	0/6	0/6
Tubular dilatation	-	0/6	6/6	4/6
	-/+	1/6	0/6	2/6
	+	5/6	0/6	0/6
	++	0/6	0/6	0/6
	+++	0/6	0/6	0/6

The number of abnormal/normal of rats used.

a) -: not remarkable, -/+ : very slight, + : slight, ++ : moderate, +++ : marked

表 12. AMT 投与後ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルにおける尿検査パラメータ

	0 mg/kg			10 mg/kg			30 mg/kg		
Total protein (mg/day)	106	± 24	(6)	129	± 51	(6)	91	± 119	(6)
Albumin (mg/day)	74.8	± 9.1	(6)	75.9	± 22.9	(6)	59.8	± 19.1	(6)
Creatinine(mg/day)	8.10	± 0.19	(6)	10.5	± 0.9*	(6)	12.8	± 0.4***	(6)
ACR <sup>a</sup> (mg/mg)	9.26	± 1.18	(6)	6.98	± 1.69	(6)	4.77	± 1.61	(6)
Ccr <sup>b</sup> (mL/min/kg)	1.91	± 0.08	(6)	2.76	± 0.22**	(6)	2.87	± 0.20**	(6)

Values are mean ± S.E. for the numbers of rats indicated in parentheses. a) ACR is albumin-to-creatinine ratio. b) Creatinin clearance (Ccr) is calculated from the urine creatinine concentration, urine volume and the plasma creatinine concentration. \*, \*\* Significantly different from control,  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*).

次に、糸球体以外の腎組織線維化における AMT の抗線維化作用を確認した。評価には、急性腎障害モデルとして一般的なシスプラチン (cisplatin: CDDP) 誘発腎障害モデルを用いた。CDDP は強力な抗腫瘍作用を有する一方で、腎障害を誘発する。CDDP はフリーラジカルの形成などを介して特に腎尿細管細胞へ直接的な酸化ストレスをあたえ、細胞障害を引き起こし、炎症系細胞の増殖亢進を介して、最終的に腎障害、ならびに腎組織の線維化を引き起こす (47, 48, 49, 50)。ラットにおいても、CDDP の高用量投与によって、急性および慢性の腎障害を発症するため、薬剤性腎障害を評価する動物モデルとして汎用されている (51, 52)。

本研究では、ラット CDDP 誘発腎障害モデルを用いて、CDDP 投与直後から AMT を 28 日間連続反復静脈内投与 (10~30 mg/kg) した。表 13 に結果を示したが、CDDP 処理によって血中尿素窒素 (blood urea nitrogen: BUN) および血中クレアチニンが、Day 5 に、それぞれ 6.3 倍、5.8 倍に増加したが、AMT 投与 (30 mg/kg 群のみ) によって、完全ではないものの、それぞれ 1.5 倍および 1.2 倍まで回復し、Day 28 にはコントロールと同等の数値を示した。また、同様に尿検査パラメータの変動を確認したところ、表 14 に示すように、30 mg/kg 投



与群において、Day 28には腎障害が除去されているものと考えられた。通常、CDDP 処理されたラットでは、数日から一週間程度の短期間で急激に腎障害が発生し、その後徐々に障害が進行し、数週間～1ヶ月で線維化が進行して、慢性の病態を呈する。CDDP は投与後の急性期では、発生したラジカルの作用により、腎尿細管で直接的な細胞膜の過酸化とミトコンドリアの機能障害が進行し、さらに CDDP の主作用であるタンパク質合成阻害や DNA 損傷も寄与し、局所的な細胞障害が発生する (47, 48)。細胞障害の進行に伴い、炎症性細胞の増殖、組織の炎症亢進を経て、組織障害が起こり、最終的に急性の腎機能低下に至る (47)。VKOR は、炎症反応などに伴う細胞増殖にドライバーとして関与する Gas6/Axl 経路の活性化に関わる因子である (12, 13)。Axl は筋線維芽細胞だけでなく、マクロファージなどにも発現しており、Axl の欠損は炎症反応の阻害や筋線維芽作用の活性化抑制をもたらす。Fourcot らは、Gas6<sup>-/-</sup>欠損マウスにおいて炎症性反応が抑制され、結果として脂肪代謝や筋線維芽作用の活性化が抑制されることを報告している (53)。CDDP 誘発腎障害モデルにおける Gas6 の発現上昇や、warfarin などの VKOR 阻害化合物の抗炎症作用の直接的な報告はないが、ラット CDDP 誘発腎障害モデルにおいて、初期の炎症や、組織障害に伴うマクロファージや好中球の浸潤と活性化が認められている (54)。これらのことから、AMT 投与による Gas6/Axl 経路の活性化の抑制によりマクロファージや筋線維芽細胞の活性化が抑制され、CDDP 処置による初期の炎症反応の進行が抑えられたことで、結果として組織障害が進まず、腎機能が維持されたと考えた。なお、データは示していないが、AMT に CDDP 処置に伴い発生する活性酸素種に対する直接的な抗酸化 (ラジカルスカベンジ) 作用がないことは別に確認している。

最終評価時点である Day 28 において、血液および尿検査の他に、病理組織学

的検査を実施した。その結果、表 15 に示すように、CDDP 処置によって、尿細管の膨張や、外髄質および皮質組織の間質において顕著な線維化が認められたが、いずれも AMT 投与によって用量依存的に軽微になり、AMT の抗線維化作用が確認された。CDDP 処理されたラットでは、急性期の腎障害が発生した後、尿細管を中心とした組織の炎症が亢進し、筋線維化細胞の増殖、細胞外マトリックスの増加を経て組織線維化が起り、最終的に慢性の腎障害に至る (55)。そこで、次に、筋線維化細胞の指標である  $\alpha$ -SMA、および ECM の collagen III の発現量の変化についても、免疫組織学的に検証した。図 21 に示すように、CDDP 処置により腎臓外髄質および皮質の  $\alpha$ -SMA の発現が亢進し、画像解析エリアに占める  $\alpha$ -SMA 陽性エリアの割合がコントロールの CDDP 未処置群に対して 3.4 ~ 8.7 倍増加し、特に外髄質 (8.7 倍) で高い発現亢進が認められた。尿細管は皮質から髄質まで広く分布しているため、腎臓の広い範囲で CDDP による障害が発生したと考えられた。AMT 投与群においては、この皮質および外髄質の  $\alpha$ -SMA 陽性エリアは投与量依存的に減少し、30 mg/kg 投与により 1.2~1.3 倍となり、コントロールと同程度の発現まで低下した。また、図 22 に示すように、collagen III についても、CDDP 処置により外髄質および皮質で発現が亢進し、コントロールに対して 3.0~3.4 倍増加したが、AMT 投与量依存的に抑制され、30 mg/kg 投与により 1.2~1.7 倍となり、コントロールと同程度の発現まで低下した。皮質においては、AMT 投与による低下が緩やかで、30 mg/kg 投与群においても、コントロール比で 1.7 倍高かったが、その要因は不明であった。なお、Kawai らは、CDDP の処置によりラットの腎外髄質の  $\alpha$ -SMA および collagen III の発現量が、それぞれ約 10 および 5 倍増加することを報告しており、本研究で用いたモデルの腎障害はこれと同程度であった (52)。

Gas6/Axl 経路は、免疫細胞の活性化だけでなく、線維芽細胞の走化や増殖へ

の関与も報告されており (14)、本研究の結果から、VKOR 阻害活性を有する AMT は、Day 5 で認められた急性期の抗炎症作用だけでなく、線維芽細胞増殖の抑制によって、慢性期における組織線維化も抑制しているものと推察された。なお、本モデルにおいても血液凝固パラメータへの影響は確認されず、出血傾向は示されなかった。以上、本節の検討によって、AMT の腎臓への良好な移行性により、抗血液凝固作用と抗線維化作用とを薬理作用として分離できることを、ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデル、およびラット CDDP 誘発腎障害モデルで検証した。

表 13. AMT 投与後ラット CDDP 誘発腎障害モデルにおける血液化学パラメータ

Group	AMT	Total Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	BUN (mg/mL)	Creatinine (mg/mL)
(A) Day 5					
Control	-	5.84 ± 0.07	4.48 ± 0.05	12.3 ± 0.7	0.19 ± 0.00
CDDP-treated rat	0 mg/kg	6.02 ± 0.12	4.39 ± 0.09	77.7 ± 12.4	1.11 ± 0.26
	10 mg/kg	5.76 ± 0.12	4.12 ± 0.07	28.8 ± 5.6	0.47 ± 0.09
	30 mg/kg	5.73 ± 0.11	3.85 ± 0.16 *	18.1 ± 0.8	0.23 ± 0.01
(B) Day 28					
Control	-	5.69 ± 0.04	4.19 ± 0.04	17.6 ± 0.4	0.23 ± 0.01
CDDP-treated rat	0 mg/kg	5.40 ± 0.21	3.94 ± 0.13	107.8 ± 25.8	1.22 ± 0.22
	10 mg/kg	5.61 ± 0.08	3.97 ± 0.07	22.2 ± 3.7	0.39 ± 0.05
	30 mg/kg	5.60 ± 0.03	3.91 ± 0.10	19.0 ± 0.4	0.25 ± 0.01

These data were represented as means ± S.E. (n=6). Comparison to control group, ### $P<0.001$ . Comparison to AMT 0 mg/kg/day group, \*\*\* $P<0.001$ ; \*\* $P<0.01$ ; \* $P<0.05$ .

表 14. AMT 投与後ラット CDDP 誘発腎障害モデルにおける尿検査パラメータ

Group	AMT	Total Protein (mg/day)	Albumin (mg/day)	Creatinine (mg/day)	Albumin/Creatinine (mg/mg)	Creatinine Clearance (mL/min)
(A) Day 5						
Control	-	3.26 ± 0.46	0.85 ± 0.27	4.6 ± 0.3	0.19 ± 0.06	1.68 ± 0.08
CDDP-treated rat	0 mg/kg	8.86 ± 1.33 ##	39.22 ± 7.08 ###	6.6 ± 0.5 ##	6.02 ± 1.20 ###	0.55 ± 0.14 ###
	10 mg/kg	7.72 ± 1.69	31.92 ± 11.45	4.7 ± 0.5	6.54 ± 1.64	0.87 ± 0.23
	30 mg/kg	2.84 ± 0.66 **	4.73 ± 2.42 ***	4.0 ± 0.3	1.15 ± 0.54 **	1.22 ± 0.10 **
(B) Day 28						
Control	-	4.31 ± 0.25	0.83 ± 0.22	7.53 ± 0.38	0.11 ± 0.03	2.34 ± 0.13
CDDP-treated rat	0 mg/kg	1.77 ± 0.29 ##	1.08 ± 0.40	4.46 ± 0.54 ###	0.25 ± 0.09	0.33 ± 0.09 ###
	10 mg/kg	3.36 ± 0.43 **	1.06 ± 0.39	6.14 ± 0.59 *	0.19 ± 0.06	1.22 ± 0.22 ***
	30 mg/kg	3.52 ± 0.33 **	0.94 ± 0.28	7.68 ± 0.18 ***	0.12 ± 0.04	2.13 ± 0.09 ***

These data were represented as means ± S.E. (n=6). Comparison to control group, ### $P<0.001$ . Comparison to AMT 0 mg/kg/day group, \*\*\* $P<0.001$ ; \*\* $P<0.01$ ; \* $P<0.05$ .

表 15. AMT 投与後ラット CDDP 誘発腎障害モデルにおける腎臓病理組織学的検査

	Test article Dose (mg/kg/day) No. of animals	Saline		AMT	
		-	0	10	30
		(6)	(6)	(6)	(6)
Not remarkable		6	0	0	0
Hyaline cast	+	0	6	5	0
	-/+	0	0	0	3
	None	6	0	1	3
Tubular dilatation, cortico-medullary junction	+++	0	3	0	0
	++	0	3	4	0
	+	0	0	0	1
	-/+	0	0	2	0
	None	6	0	0	5
Interstitial fibrosis, outer medulla	++	0	6	2	0
	+	0	0	3	1
	-/+	0	0	1	5
	None	6	0	0	0
Interstitial fibrosis, cortex	+	0	6	3	0
	-/+	0	0	3	2
	None	6	0	0	4

Grade; -/+ : very slight, + : slight, ++ : moderate, +++ : marked.

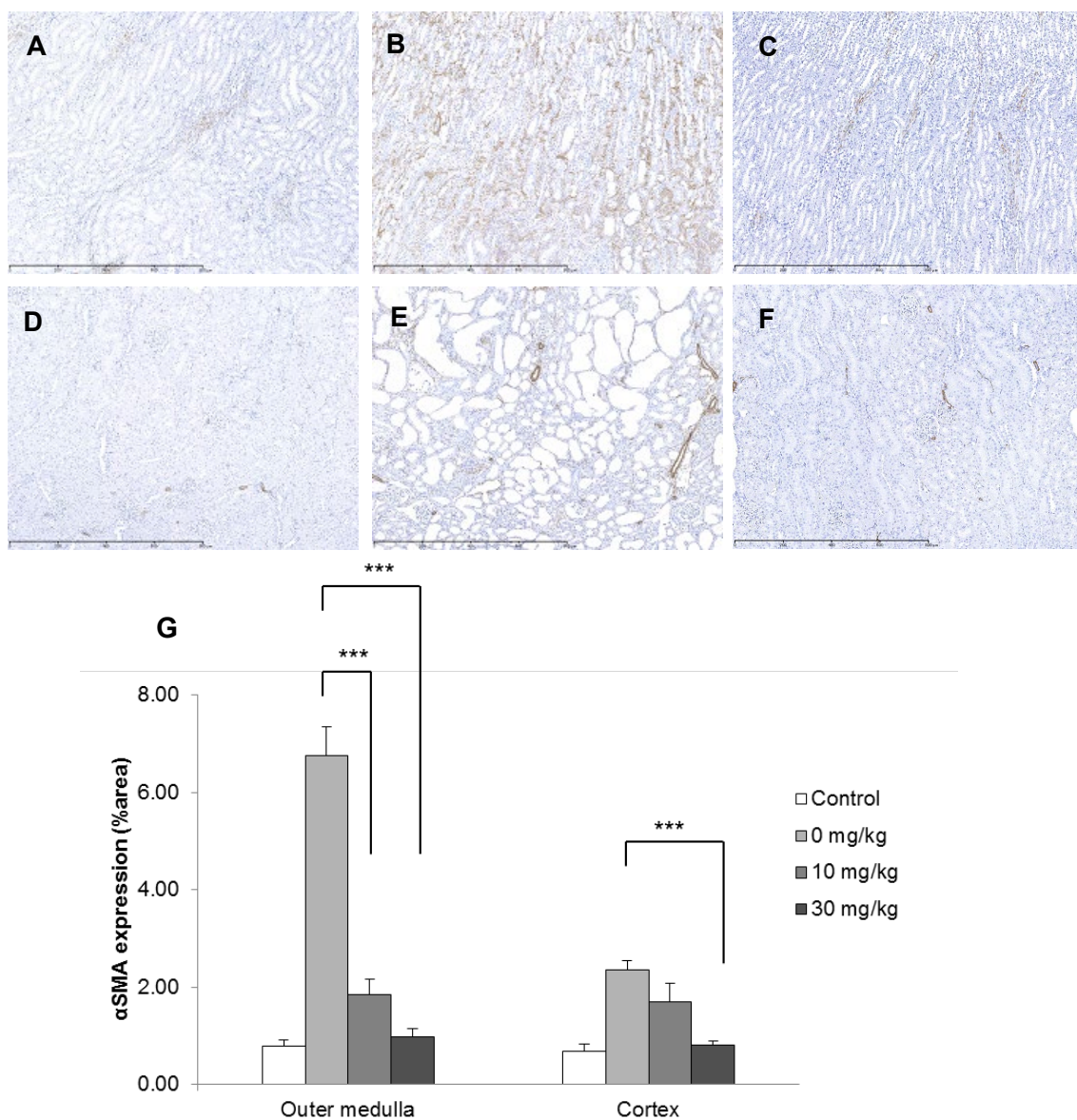


図 21. AMT 投与後ラット CDDP 誘発腎障害モデルにおける腎外髄質および皮質の免疫組織学的検査 ( $\alpha$ -SMA)

Immunohistochemistry of  $\alpha$ -SMA in the outer medulla (A–C) and cortex (D–F) of kidneys 28 days after the administration of CDDP in saline-treated control rats (A and D), CDDP-treated rats with the saline treatment (AMT 0 mg/kg/day) (B and E) and CDDP-treated rats with the AMT treatment (30 mg/kg/day) (C and F). The expression areas of  $\alpha$ -SMA-positive cells in the outer medulla and cortex were quantified by an imaging analysis (G). Each bar shows 800  $\mu$ m. These data were represented as means  $\pm$  S.E. (n=6). Comparison to control group, ### $P$ <0.001. Comparison to AMT 0 mg/kg/day group, \*\*\* $P$ <0.001.

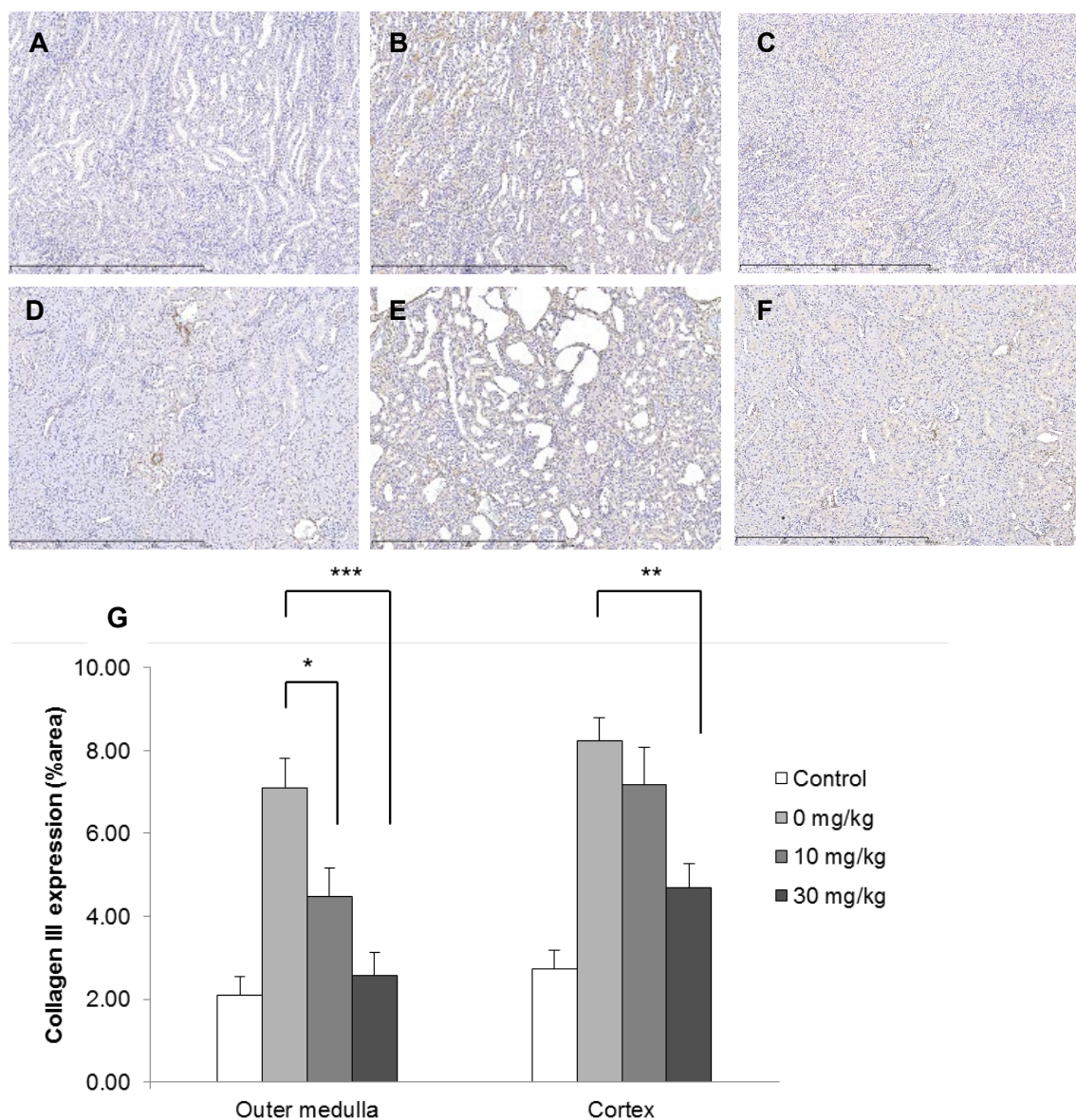


図 22. AMT 投与後ラット CDDP 誘発腎障害モデルにおける腎外髄質および皮質の免疫組織学的検査 (collagen III)

Immunohistochemistry of collagen III in the outer medulla (A–C) and cortex (D–F) of kidneys 28 days after the administration of CDDP in saline-treated control rats (A and D), CDDP-treated rats with the saline treatment (AMT 0 mg/kg/day) (B and E) and CDDP-treated rats with the AMT treatment (30 mg/kg/day) (C and F). The expression areas of the extracellular matrix in the outer medulla and cortex were quantified by an imaging analysis (G). These data were represented as means  $\pm$  S.E. (n=6). Comparison to control group, ### $P$ <0.001. Comparison to AMT 0 mg/kg/day group, \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001.

### 第三節 AMT のその他の作用と有効濃度に関する検討

これまでの研究で、VKOR 阻害活性を有する AMT の良好な腎移行性により、抗血液凝固作用の本質である肝臓中 VKOR を阻害せずに、腎臓中 VKOR を阻害し、抗腎線維化作用を薬理作用として分離できることを明らかにした。本節では、AMT の抗血液凝固作用および抗線維化作用以外の薬理作用の有無を、正常ラットを用いた高用量の毒性試験を実施して確認すると共に、これまで確認された作用と化合物濃度との関係性について精査した。なお、本検討では、肝臓における血液凝固因子の抑制に伴う出血などの副作用を最大限考慮するため、肝臓中濃度を上げる目的で、経口投与にて試験を実施した。

まず単回投与毒性試験を実施した。AMT をラットに 1500 mg/kg の用量まで単回経口投与した結果、1000 mg/kg 以上の用量群において、投与直後に不活発、自発運動の減少、腹臥、呼吸不整などの一般状態変化が観察され、またそれに伴う摂餌量の減少と体重増加抑制が観察された (図 23)。これらの変化は一過性であり、死亡例はなかった。DHA-S などの 6 員環ラクトンで認められた、出血、蒼白など出血に関連した変化 (24) は観察期間中全くみられなかった。

次に、反復投与毒性試験として、AMT をラットに 400 mg/kg の用量まで 14 日間連日経口投与した。表 16 に血液学的検査、表 17 に血液生化学的検査の結果をまとめたが、AMT のラット反復経口投与において、最高用量 400 mg/kg で血小板数の有意な増加が確認された。これは他の 5 員環および 6 員環ラクトン化合物でも認められており、ラクトン化合物特有の薬理作用と考えられた。一方で、400 mg/kg 投与群において、軽微ではあるが、赤血球 (red blood cell: RBC)、ヘモグロビン (hemoglobin: HGB) およびヘマトクリット (hematocrit: HCT) 値の有意な減少が認められた (表 16)。先述の通り、今回評価したラクトン化合



物は、低分子造血作用を有するライブラリに属しており、一部の 6 員環ラク톤においては赤血球増加作用が認められたが、高用量の AMT 投与において逆の作用が見られたことは非常に興味深い。なお、warfarin には造血系への影響が報告されていないことから、これら作用は VKOR 阻害とは関係ないものと考えられるが、要因の検討は出来ていない。ラットにおける本毒性試験において、AMT には上記以外の重篤な副作用は認められず、alkaline phosphatase (ALP)、aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT) などの肝機能パラメータ、および、BUN、Cre、total protein (TP) などの腎機能パラメータに、有意な変化は確認されなかった。また、AMT は DHA-S と異なり、PT、APTT、TTO および HPT などの血液凝固に関するパラメータに有意な変化は認められず、出血傾向を示さなかった (表 16)。

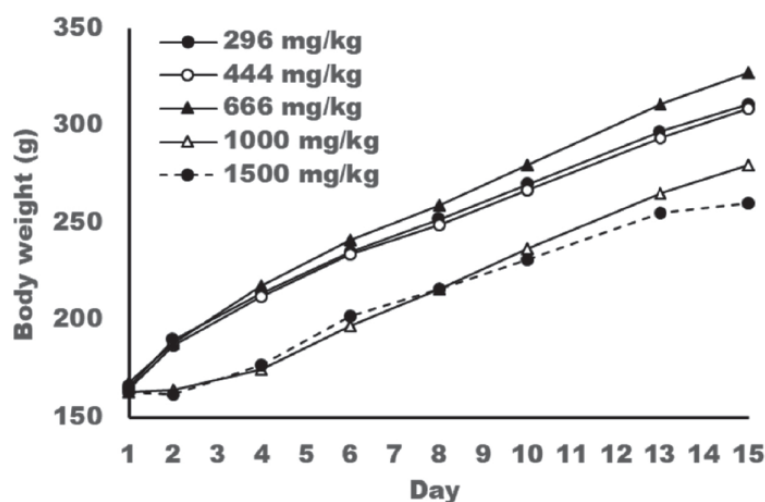


図 23. AMT のラット単回経口投与後の観察期間中の体重推移  
Two weeks observation after the single dosages of AMT in rats.  
These data were represented as means (n=5).

表 16. AMT のラット反復経口投与後の血液学的検査

Dose (mg/kg/day)	AMT					
	0 (control)	50	100	200	400	
RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	644 $\pm$ 34	619 $\pm$ 26	612 $\pm$ 10	597 $\pm$ 96	564 $\pm$ 22	**
HGB (g/dL)	14.1 $\pm$ 0.8	13.9 $\pm$ 0.5	13.5 $\pm$ 0.5	12.9 $\pm$ 1.7	12.1 $\pm$ 0.6	**
HCT (%)	40.2 $\pm$ 2.5	38.8 $\pm$ 1.6	38.4 $\pm$ 1.3	37.5 $\pm$ 5.6	35.1 $\pm$ 1.8	**
MCV (fl)	62.3 $\pm$ 2.5	62.7 $\pm$ 1.6	62.8 $\pm$ 1.5	62.9 $\pm$ 1.7	62.2 $\pm$ 1.1	
MCH (pg)	21.8 $\pm$ 0.7	22.0 $\pm$ 0.5	22.1 $\pm$ 0.6	21.7 $\pm$ 0.7	21.5 $\pm$ 0.5	
MCHC (g/dL)	35.0 $\pm$ 0.3	35.0 $\pm$ 0.3	35.2 $\pm$ 0.5	34.4 $\pm$ 0.6	34.6 $\pm$ 0.5	
PLT ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ )	97.9 $\pm$ 15.2	100.5 $\pm$ 10.0	98.4 $\pm$ 17.1	101.2 $\pm$ 21.5	123.7 $\pm$ 11.2	
PT (sec.)	14.3 $\pm$ 0.5	14.0 $\pm$ 0.4	13.6 $\pm$ 0.2	13.8 $\pm$ 0.6	13.5 $\pm$ 0.3	
APTT (sec.)	20.3 $\pm$ 4.2	17.0 $\pm$ 0.6	16.6 $\pm$ 0.8	17.7 $\pm$ 0.7	16.6 $\pm$ 1.1	
FIB (mg/dL)	224.6 $\pm$ 15.9	223.0 $\pm$ 7.2	231.6 $\pm$ 16.6	227.8 $\pm$ 8.9	224.8 $\pm$ 17.0	
WBC ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )	58 $\pm$ 25	49 $\pm$ 14	48 $\pm$ 11	44 $\pm$ 13	58 $\pm$ 5	
TTO (sec.)	23.5 $\pm$ 0.6	23.8 $\pm$ 1.1	22.6 $\pm$ 1.2	25.1 $\pm$ 3.2	22.5 $\pm$ 0.4	
HPT (sec.)	29.7 $\pm$ 2.1	31.0 $\pm$ 0.8	29.0 $\pm$ 2.0	27.7 $\pm$ 3.8	29.1 $\pm$ 0.6	

These data were represented as means  $\pm$  S.D. (n=5).

表 17. AMT のラット反復経口投与後の血液生化学的検査

Dose (mg/kg/day)	AMT					
	0 (control)	50	100	200	400	
ALP (U/L)	751 $\pm$ 157	734 $\pm$ 87	699 $\pm$ 127	632 $\pm$ 78	683 $\pm$ 169	
AST (U/L)	63 $\pm$ 12	59 $\pm$ 4	135 $\pm$ 168	72 $\pm$ 31	72 $\pm$ 18	
ALT (U/L)	31 $\pm$ 10	31 $\pm$ 3	81 $\pm$ 114	49 $\pm$ 47	38 $\pm$ 10	
LDH (U/L)	348 $\pm$ 370	192 $\pm$ 50	639 $\pm$ 989	210 $\pm$ 62	269 $\pm$ 129	
LAP (U/L)	72 $\pm$ 5	70 $\pm$ 4	70 $\pm$ 6	69 $\pm$ 6	64 $\pm$ 10	
GLC (mg/dL)	169 $\pm$ 13	171 $\pm$ 8	180 $\pm$ 16	182 $\pm$ 22	164 $\pm$ 12	
TC (mg/dL)	64 $\pm$ 14	64 $\pm$ 7	70 $\pm$ 7	74 $\pm$ 10	79 $\pm$ 9	
TG (mg/dL)	76 $\pm$ 47	97 $\pm$ 29	92 $\pm$ 10	85 $\pm$ 29	96 $\pm$ 51	
PL (mg/dL)	129 $\pm$ 27	135 $\pm$ 10	143 $\pm$ 12	147 $\pm$ 7	157 $\pm$ 13	
NEFA (mcEq/L)	390 $\pm$ 107	397 $\pm$ 107	455 $\pm$ 177	377 $\pm$ 88	356 $\pm$ 142	
TB (mg/dL)	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	
BA (mg/dL)	11.6 $\pm$ 6.6	8.8 $\pm$ 4.3	10.5 $\pm$ 7.4	15.5 $\pm$ 7.4	15.3 $\pm$ 8.3	
BUN (mg/dL)	15.8 $\pm$ 1.3	14.8 $\pm$ 2.1	16.5 $\pm$ 1.8	16.7 $\pm$ 4.5	14.7 $\pm$ 1.8	
CRE (mg/dL)	0.39 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.05	
UA (mg/dL)	1.11 $\pm$ 1.05	0.82 $\pm$ 0.71	1.01 $\pm$ 0.44	1.53 $\pm$ 1.50	0.95 $\pm$ 0.61	
TP (g/dL)	5.15 $\pm$ 0.24	5.03 $\pm$ 0.05	5.13 $\pm$ 0.13	4.87 $\pm$ 0.31	4.95 $\pm$ 0.19	
ALB (g/dL)	2.07 $\pm$ 0.10	2.05 $\pm$ 0.05	2.07 $\pm$ 0.11	2.04 $\pm$ 0.06	1.97 $\pm$ 0.07	
BLP (mg/dL)	119 $\pm$ 56	148 $\pm$ 38	144 $\pm$ 13	140 $\pm$ 28	154 $\pm$ 61	
Ca (mg/dL)	10.2 $\pm$ 0.4	10.0 $\pm$ 0.2	10.2 $\pm$ 0.2	10.2 $\pm$ 0.3	10.0 $\pm$ 0.4	
P (mg/dL)	7.10 $\pm$ 0.43	7.41 $\pm$ 0.90	7.55 $\pm$ 0.74	8.56 $\pm$ 1.46	8.15 $\pm$ 0.68	
Na (mEq/L)	144.1 $\pm$ 2.7	143.6 $\pm$ 2.5	143.6 $\pm$ 1.6	145.0 $\pm$ 3.0	142.2 $\pm$ 3.3	
K (mEq/L)	4.28 $\pm$ 0.62	4.11 $\pm$ 0.43	4.09 $\pm$ 0.36	4.48 $\pm$ 0.61	4.01 $\pm$ 0.30	
Cl (mEq/L)	103.8 $\pm$ 0.9	103.4 $\pm$ 1.3	103.0 $\pm$ 1.7	102.9 $\pm$ 1.5	101.8 $\pm$ 2.1	
CRE (mg/dL)	0.12 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02	

These data were represented as means  $\pm$  S.D. (n=5).

最後に、本毒性試験の結果を AMT 濃度との関係から考察するため、ラットにおける AMT の血中濃度を調べ、各種薬物動態学的 (Pharmacokinetics: PK) パラメータを算出した (表 18)。その結果、経口投与された AMT は速やかに吸収され、0.25 時間で最大となり、300 mg/kg 経口投与時の最大血漿中濃度 (maximum concentration:  $C_{\max}$ ) は 59.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。加えて、静脈内投与

した際の全身クリアランス (total clearance:  $CL_{tot}$ ) は 750 mL/hr/kg であり、また消失半減期  $t_{1/2}$  は 0.227 時間および平均滞留時間 (mean residence time: MRT) は 0.223 時間であることから、クリアランスが大きく血漿中から速やかに消失していることが明らかになった。一方で、経口投与と静脈内投与の血漿中曝露の比から算出される生物学的利用率 (bioavailability: BA) が 56.7% と比較的高いことから、AMT は肝臓でなく、主に腎臓など肝臓以外の臓器で代謝・排泄されることが明らかになり、先述の通り、AMT が肝臓に対して腎移行性が高い化合物であることを、薬物動態学的解析からも示した。

AMT の投与量と曝露量との間に線形成性があると仮定すると、ラット毒性試験における、400 mg/kg および 1000 mg/kg 投与時の  $C_{max}$  は、それぞれ凡そ 79.6  $\mu\text{g/mL}$  (0.510  $\mu\text{mol/mL}$ ) および 199  $\mu\text{g/mL}$  (1.275  $\mu\text{mol/mL}$ ) と外挿される。AMT の肝 VKOR に対する  $IC_{50}$  が 3.20  $\mu\text{mol/mL}$  であることを考えると、1000 mg/kg 単回経口投与および 400 mg/kg 反復経口投与した時の AMT 濃度は、肝組織中の VKOR 阻害を起こす濃度に達しておらず、これにより AMT は抗血液凝固作用を示さなかったものと考えられた。なお、AMT をラットに 30 mg/kg 単回静脈内投与した際の 5 分後の血漿中濃度は 113  $\mu\text{g/mL}$  であり、これは AMT を 300 mg/kg 経口投与した際の  $C_{max}$  である 59.7  $\mu\text{g/mL}$  の約 2 倍であった (表 18)。ラット腎障害モデルにおいて、AMT の 30 mg/kg 静脈内投与により、腎 VKOR 阻害を介する抗腎線維化作用が確認されている。これらのことから、同モデルにおいて AMT を 300 mg/kg の 2 倍の 600 mg/kg 以上経口投与することで、腎臓中 AMT が腎 VKOR を阻害するのに十分な濃度に達し、30 mg/kg 静脈内投与した場合と同様に抗線維化作用を示す可能性が考えられた。実際、データは示していないが、AMT の抗腎線維化の検討においては、静脈内投与だけでなく経口投与での検討も行っており、ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障

害モデルを用いた予備的な薬効試験において、AMT を 300 mg/kg 反復経口投与すると、有意差はないものの、抗線維化作用の傾向が確認されている。

表 18. AMT のラット単回投与後の薬物動態学的パラメータ

PK parameters	oral		intravenous	
	30 mg/kg		300 mg/kg	
C <sub>5min</sub> (µg/mL)	113	± 21	-	
C <sub>max</sub> (µg/mL)	-		59.7	± 42.7
T <sub>max</sub> (hr)	-		0.250	± 0.00
AUC <sub>0-24hr</sub> (µg·hr/mL)	39.9	± 7.0	188	± 61
AUC <sub>0-∞</sub> (µg·hr/mL)	40.8	± 7.0	231	± 109
MRT <sub>0-∞</sub> (hr)	0.223	± 0.026	5.70	± 2.71
V <sub>d, ss</sub> (mL/kg)	185	± 9	-	
CL <sub>tot</sub> (mL/hr/kg)	750	± 120	-	
t <sub>1/2</sub> (hr)	0.227	± 0.077	6.98	± 5.21
BA (%)	-		56.7	± 26.8

These data were represented as means ± S.D. (n=3).

$$BA (\%) = ((AUC_{0-\infty,po})/Dose_{po})/((AUC_{0-\infty,iv})/Dose_{iv}) \times 100.$$

#### 第四節 VKOR 阻害化合物の作用分離と医薬品開発の可能性

高極性な 5 員環ラクトン化合物である AMT は、warfarin や他の 6 員環ラクトン化合物に比べ VKOR 阻害活性は弱いものの、ラットに投与後の腎臓中濃度が肝臓中濃度に比べて高いという特徴を有していた。これにより、ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデル、およびラット CDDP 誘発腎障害モデルにおいて、肝臓における VKOR 阻害を呈さない投与量で腎臓における VKOR を阻害することが判明し、それらは AMT の VKOR 阻害活性とそれぞれの組織中における AMT 濃度でよく説明された。AMT にはその他毒性所見も認められなかったことから、本節では、VKOR 阻害化合物の抗血液凝固および抗腎線維化の作用分離に基づく、医薬品開発の可能性について考察する。

本研究では、化合物の肝および腎 VKOR 阻害活性とそれぞれの組織中濃度を指標に、抗血液凝固作用と抗腎線維化作用を分離できることを、実験動物を用いて初めて明らかにすると共に、腎糸球体だけでなく尿細管障害モデルにおける抗線維化作用も検証し、VKOR 阻害による腎障害治療の新たな可能性を示した。AMT で認められた静脈内投与後の高い腎臓中濃度は、warfarin などの他の VKOR 阻害化合物に対する AMT の差別化ポイントであり、肝臓における血液凝固因子の産生抑制を副作用と考えた場合の AMT の顕著な優位性である。本研究では、AMT の特徴的な腎組織移行性の機序を調べておらず、主に化合物の物性により高い腎組織移行性と、対象組織間での薬効分離が達成されていると考察している。しかし、物性コントロールによる化合物の組織移行性の最適化、およびヒトにおける薬物動態予測には限界がある。腎への薬物送達を目的とした場合、低分子量質 (low molecular weight protein: LMWP) やナノパーティクルなどのキャリアを活用する方法や、糖・アミノ酸・葉酸などを使ったプロドラ

ック化も有用と考えられる (56)。これらキャリアやプロドラッグを使った drug delivery system (DDS) は、送達メカニズムが明確であり、広く化合物に適応できるという意味で有利である。一方で、いずれのケースにおいても、標的組織で活性体を定量的に放出する必要があるため、薬効発現の観点からは注意が必要である。また、本研究では、ラット由来の VKOR 阻害に焦点を当てており、ヒトにおいて同様の現象が観察される保証はない。ヒトにおける有効性および安全性を予測するうえで、今後、ヒト由来組織を用いた肝および腎 VKORs に対する阻害活性の測定と、各組織への取り込み速度を評価し、最終的に生理学的薬物速度論モデルなどによってヒトにおける肝および腎組織中濃度の予測が必要となる (57)。

Gas6/Axl 経路の抑制という観点では、最近、Axl 阻害のアプローチによる抗腎線維化が報告されている (19)。CH5451098 は Axl を選択的に阻害する低分子化合物であり、腎糸球体構成細胞の一つである糸球体足細胞ポドサイト障害モデルである nephrin-hCD25 (NEP25) マウスに投与することで、Gas6/Axl 経路の抑制により腎尿細管細胞の EMT とそれに伴う線維化進展が抑制され、結果的に腎糸球体障害を改善する。Gas6 は血小板凝集反応への関与も報告されているが、VKOR 阻害に伴う vitamin K 依存性凝固因子の産生抑制と異なり、阻害や欠損に伴う極度の出血傾向は報告されていない。これらのことから、Gas6/Axl 経路を利用した抗腎線維化治療としては、受容体 Axl の阻害も大変興味深く、今後、線維化治療標的として注目される。

## 結論

本研究では、抗血液凝固作用の本質である肝臓中の VKOR を阻害せずに、腎臓中の VKOR 阻害を基にした抗腎線維化作用を薬理作用として分離することを目的に、新規な低分子ラクトン化合物を中心に、肝臓および腎臓などの主要臓器の VKOR 阻害作用を解析した。まず、warfarin を含め 62 種の化合物を用いて、肝、腎および肺の VKOR 阻害の作用解析を行ったところ、臓器選択的な VKOR 阻害活性を有する化合物は見いだされなかったが、それぞれの化合物の阻害活性は、VKOR の立体構造と化合物の化学構造との関係性から説明された。VKOR にはアミノ酸配列が僅かに異なる paralog が存在するものの、VKOR は肝臓において特に発現量が高いため、腎臓などの VKOR を選択的に阻害するには、VKOR のサブタイプ選択性の異なる阻害剤を探索するよりも、阻害剤の組織移行性や分布をコントロールする方が得策であると考えた。5 員環ラクトンの AMT は高極性な低分子化合物であり、肝臓に比べ腎移行性が高く、他の VKOR 阻害化合物と異なり、ラット経口および静脈内投与後に出血傾向が認められなかった。AMT の物性と薬物動態的な特徴に着目し、ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルおよび CDDP 誘発腎障害モデルにおいて AMT の抗腎線維化作用を確認した結果、抗血液凝固作用を示さない投与量で抗腎線維化作用および腎機能低下の抑制が確認された。これら作用は、AMT の肝臓および腎臓中濃度でよく説明され、AMT は他の毒性も認められなかったことから、これら作用が VKOR 阻害に伴うものであることが示された。本研究により、腎臓の VKOR の選択的阻害によって、薬理作用として抗血液凝固作用と抗腎線維化作用を分離できることを明らかにし、また腎移行性の高い化合物の腎障害治療薬としての可能性を示した。今後、ヒト由来の試験材料を用いた AMT の肝および腎 VKOR

阻害の解析、ならびに肝、腎臓中濃度の予測の研究により、腎移行型 VKOR 阻害剤の腎障害治療薬としての検証が望まれる。



## 謝辞

本研究にあたり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 眞野成康教授に謹んで感謝致します。また、本論文に対し有益な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 大江知行教授、ならびに高橋信行教授に深く感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて下さり、また、研究において種々御指導をいただきました東レ株式会社 医薬・医療事業本部 医薬開発部門長 宮本庸平博士に感謝致します。また、動物実験において多大な御協力を賜りました、東レ株式会社 医薬研究所 三好智也博士、ならびに東レ株式会社 先端材料研究所 阪口有佳研究員に厚く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究の遂行、および学位論文作成の機会を与えてくれた東レ株式会社 医薬研究所の上司、職場の同僚および研究関係者、ならびに自身を精神面から支えてくれた家族に心から感謝します。

## 実験の部

### 重要試薬

AMT を含む 5 および 6 員環ラクトン化合物、ならびに VKO は東レ株式会社医薬研究所にて合成した。warfarin、DHA-Na および CDDP は和光純薬工業から購入した。抗ラット Thy-1.1 モノクローナル抗体（製品番号：05123）は CEDARLANE Laboratories 社から購入した。抗ヒト/マウス/ラット  $\alpha$ -SMA 抗体（製品番号：M0851）は DAKO 社から、抗マウス/ラット Collagen III 抗体（製品番号：2150-1950）は Serotec 社から、それぞれ購入した。

### 動物

雄性 Wistar 系ラット（Crj:Wistar）および雄性 SD 系ラット（Crj:CD(SD)）は日本チャールス・リバー株式会社から 6 週齢および 5 週齢で購入し、1 週間馴化を行った後、7 週齢および 6 週齢で実験に供した。飼育施設は、常時 19~25°C に室温を維持し、12 時間毎の明暗サイクルであり、実験期間中の動物は、自由摂餌（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）および自由摂水（水道水）とした。全ての動物実験は、東レ株式会社研究本部動物実験指針に基づき、研究本部動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

### マイクロソーム画分の調製

#### 1. 緩衝液の調製

A. 緩衝液 A：7.26 g TRIZMA Base、33.56 g 塩化カリウムおよび 256.8 g sucrose を約 2 L の超純水（Toray Pure；東レ株式会社）にて溶解した。濃塩酸にて pH を 7.4 に調整した後、超純水にて 3 L までメスアップした。

B. 緩衝液 B : 29.2 g 塩化ナトリウムを緩衝液 A 500 mL に加え、完全に溶解した。

## 2. 組織摘出

A. エーテル麻酔下のラットの門脈へ、ペリスタポンプを用い緩衝液 A を灌流し (10~20 mL/分、2~3 分)、灌流後直ちに腹大静脈より放血させ、そのまま屠殺した。

B. 肝臓、腎臓および肺を摘出した後、緩衝液 A で洗浄した。

C. 電子天秤を用い、摘出した各組織の湿重量を測定した。

## 3. ミクロソーム分画の調製

A. 各組織をハサミでよく細断した後 (数 mm 程度)、湿重量の 3 倍容の緩衝液 A を加え、氷冷下、ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。

B. 遠心器にて、4°C、700 × g、10 分間遠心分離後、上清を採取した。

C. 超遠心機にて、4°C、9,000 × g、20 分間遠心分離後、上清を採取した。

D. 超遠心機にて、4°C、105,000 × g、60 分間遠心分離後、上清を除去し、沈殿を採取した。

E. 緩衝液 A に再懸濁し、超遠心機にて、4°C、105,000 × g、60 分間遠心分離後、上清を除去し、沈殿を採取した。

F. 緩衝液 B に再懸濁し、超遠心機にて、4°C、105,000 × g、60 分間遠心分離後、上清を除去し、沈殿をミクロソーム分画として得た。

G. ミクロソーム分画に緩衝液 B を加え、再懸濁した後、各組織のミクロソーム分画懸濁液ごと、タンパク質濃度を測定した。

H. タンパク質濃度が 10 mg/mL (肺) および 15 mg/mL (肝臓、腎臓) になるよう、各マイクロソーム分画懸濁液に緩衝液 B を加え、再懸濁した。調製したマイクロソーム分画懸濁液は使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 4. タンパク定量

調製したマイクロソームのタンパク定量は、BCA Protein Assay Kit を用い、標準溶液には bovine serum albumin (BSA) を使用した。

#### ブランク血漿の調製

雄性 Wistar 系ラット (Crj:Wistar) をイソフルラン麻酔下、ヘパリン処理した注射針を装着した注射筒を用いて、腹部大動脈から全採血を行い、放血致死させた。得られた血液を遠心機にて、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $1,500 \times g$ 、10 分間遠心分離後、上清を採取し、ブランク血漿を得た。ブランク血漿は $-30^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

#### ブランク組織

雄性 Wistar 系ラット (Crj:Wistar) をイソフルラン麻酔下、ヘパリン処理した注射針を装着した注射筒を用いて、腹部大動脈から全採血を行い、放血致死させた。肝臓および腎臓を採取した後、生理食塩水で洗い、湿重量を測定した。2 倍容の蒸留水を添加した後、細切し、ポリトロン型ホモジナイザーでホモジナイズした。ブランク組織は $-30^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

#### in vitro VKOR 活性評価

##### 1. 反応時間依存的 VKO の還元反応 (vitamin K 生成)

###### A. 反応準備

96 ウェルプレートの全てのウェルに、各マイクロソーム分画懸濁液 [最終タンパク質濃度：1.5 mg/mL (肝臓および腎臓)；1.0 mg/mL (肺)]、20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、VKO 基質溶液 (最終濃度：30  $\mu$ mol/L) を入れ、37°C で5分間プレインキュベートした。

#### B. 反応開始と停止

反応を開始する全てのウェルに 0.02 mmol/L DTT 溶液 (最終濃度：0.02 mmol/L) を添加した後、よく攪拌し、37°C でインキュベートした。反応開始後 10、20、30、60 および 90 分後において、該当ウェルに氷冷した 2-プロパノールを 3 倍容加え、よく攪拌し、反応停止した。

#### C. 除タンパクおよび抽出

反応停止後のプレートを 4°C で十分に冷却した後、ガラスフィルタープレートを用いて、反応液を遠心濾過し、得られたろ液を分析用試料とした。

#### D. HPLC 分析

分析には Acquity UPLC システム (Waters 社) を用い、VKO の還元により生成される vitamin K のピーク面積 (検出波長：250 nm) を測定した。分析カラムには Acquity UPLC BEH-C18, 1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm (Waters 社) を用い、カラム温度は 40°C とし、移動相 A (アセトニトリル/2-プロパノール/DW = 100/8/100) および移動相 B (アセトニトリル/2-プロパノール/DW = 100/8/2) のグラジエント送液 (流速：0.8 mL/min) により分析した。

## 2. 基質濃度依存的 VKO の還元反応 (vitamin K 生成)

#### A. 反応準備

96 ウェルプレートの全てのウェルに、各マイクロソーム分画懸濁液 [最終タンパク質濃度：1.5 mg/mL (肝臓および腎臓)；1.0 mg/mL (肺)]、20 mmol/L

Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、VKO 基質溶液 (最終濃度：3、10、30 または 100  $\mu\text{mol/L}$ ) を入れ、37°C で 5 分間プレインキュベートした。

#### B. 反応開始と停止

反応を開始する全てのウェルに 0.02 mmol/L DTT 溶液 (最終濃度：0.02 mmol/L) を添加した後、よく攪拌し、37°C でインキュベートした。反応開始後 30 分後において、該当ウェルに氷冷した 2-プロパノールを 3 倍容加え、よく攪拌し、反応停止した。

#### C. 除タンパクおよび抽出

同上

#### D. HPLC 分析

同上

### 3. Warfarin による VKOR 阻害活性評価

#### A. 反応準備

96 ウェルプレートの全てのウェルに、各マイクロソーム分画懸濁液 [最終タンパク質濃度：1.5 mg/mL (肝臓および腎臓)；1.0 mg/mL (肺)]、20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、VKO 基質溶液 (最終濃度：5  $\mu\text{mol/L}$ ) および warfarin (最終濃度：0、0.01、0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ ) を入れ、37°C で 5 分間プレインキュベートした。

#### B. 反応開始と停止

同上

#### C. 除タンパクおよび抽出

同上

#### D. HPLC 分析

同上

#### 4. 社内ライブラリの VKOR 阻害活性評価

##### A. 反応準備

96 ウェルプレートすべてのウェルに、各マイクロソーム分画懸濁液 [最終タンパク質濃度：1.5 mg/mL (肝臓および腎臓)；1.0 mg/mL (肺)]、20 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)、VKO 基質溶液 (最終濃度：5  $\mu\text{mol/L}$ ) および評価対象化合物 (最終濃度：0、0.01、0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ ※) を入れ、37°C で 5 分間プレインキュベートした。

※10  $\mu\text{mol/L}$  で  $\text{IC}_{50}$  を示さなかった化合物は最大 10 mmol/L まで評価を行った (析出した場合は未評価)。

##### B. 反応開始と停止

同上

##### C. 除タンパクおよび抽出

同上

##### D. HPLC 分析

同上

#### $K_m$ の算出

$K_m$  の算出には Microsoft Excel 2003 を用いた。基質濃度の逆数を X 軸、反応速度の逆数を Y 軸とし、肝、腎および肺 VKOR ごと散布図を作成し、最小二乗法により回帰直線式 ( $Y = aX + b$ ) を算出した。Lineweaver and Burk 式に従い、この直線の傾き  $a$  を  $K_m/V_{\text{max}}$ 、切片  $b$  を  $1/V_{\text{max}}$  とし、 $K_m$  を算出した。

## IC<sub>50</sub>の算出

IC<sub>50</sub>の算出には Microsoft Excel 2003 を用いた。各被験物質（阻害化合物）について、被験物質を含まない場合の vitamin K のピーク面積（vitamin K の最大生成量）を 100%として、各被験物質濃度における vitamin K 生成量を百分率で表した。被験物質濃度の対数を X 軸、VK 生成量の百分率を Y 軸として、各被験物質ごと、散布図を作成した。VK 生成量 50%を挟む直近の 2 濃度を結ぶ直線式 ( $Y = aX + b$ ) から、IC<sub>50</sub>を算出した。

## ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルの作製

抗ラット Thy1.1 モノクローナル抗体（CEDARLANE Laboratories 社）の凍結乾燥品をリン酸緩衝液（PBS(-)）で溶解し、濃度 0.1 mg/mL となるよう調製した。7 週齢 Wistar 系雄性ラットに 0.1 mg/mL の抗ラット Thy-1.1 モノクローナル抗体溶液を、AMT（連日静脈内投与）初回投与日を Day 1 として Day 6 に 1 回、1 mg/10 mL/kg の用量で単回尾静脈内投与した。

## ラット抗 Thy-1 抗体誘発腎障害モデルにおける抗線維化評価

### 1. 被験物質の投与

#### A. Warfarin

0.5%(w/v) carboxymethyl cellulose (CMC) 溶液に懸濁した warfarin を 0 mg/5 mL/kg および 0.5 mg/5 mL/kg の用量にて、1 日 1 回 12 日間反復経口投与した（各群 5 例）。

#### B. D62



0.5%(w/v) CMC 溶液に懸濁した D62 を 0 mg/5 mL/kg、3 mg/5 mL/kg および 30 mg/5 mL/kg の用量にて、1 日 1 回 12 日間反復経口投与した（各群 5 例）。

### C. AMT

生理食塩水に溶解した AMT を 0 mg/5 mL/kg、300 mg/5 mL/kg の用量にて、1 日 1 回 12 日間反復経口投与した（溶媒群 5 例、AMT 投与群 3 例）。

生理食塩水に溶解した AMT を 0 mg/1 mL/kg、10 mg/1 mL/kg、30 mg/1 mL/kg の用量にて、1 日 1 回 12 日間反復尾静脈内投与した（各群 6 例）。

## 2. 採血

被験物質の初回投与日を Day 1 として Day 13 にイソフルラン麻酔下、ヘパリン処理した注射針を装着した注射筒を用いて、腹大動脈より全採血し、放血致死させた。

## 3. 観察、測定および検査

被験物質の初回投与日を Day 1 として Day 13 にイソフルラン麻酔下、ヘパリン処理した注射針を装着した注射筒を用いて、腹大動脈より全採血し、放血致死させた。以下の項目について観察、測定および検査を実施した。

### A. 一般状態観察および死亡状況確認

観察期間は、被験物質の初回投与日を Day 1 として Day 12 までの 12 日間とし、投与前に生死確認のみ行った。

### B. 体重測定

被験物質の初回投与日を Day 1 として、Day 1 および Day 6 に測定した。  
 なお、Day 13 には最終体重を測定した。

### C. 尿検査

生存例について、被験物質の初回投与日を Day 1 として Day 12 の投与後に動物を代謝ケージに収容し、約 24 時間採尿した。メスシリンダーを用いて尿量測定を行った後、4°C、1,500 × g、10 分間遠心分離し上清尿を得た。N-マルティスティックス (バイエルメディカル) を用いて pH、タンパク、ブドウ糖、ケトン体、潜血、ビリルビン、亜硝酸塩、ウロビリノーゲンを測定した。また、7070 型自動分析装置 (株式会社日立製作所) にて総タンパク、電解質 (Na, K, Cl)、クレアチニン、アルブミンを測定した。総タンパク、電解質、クレアチニンおよびアルブミンは、測定値に尿量を乗じ、1 日排泄量を算出した。

### D. 血液学的検査

生存例について、被験物質の初回投与日を Day 1 として Day 13 にイソフルラン麻酔下で腹大動脈より採血した。このうち、抗凝固剤として ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) -2K 処理した血液を血球計測に、残りを抗凝固剤として 3.13% クエン酸ナトリウム処理し、凝固能測定に用いた。  
 なお、血球計測および凝固能測定は即日実施した。測定項目および測定機器を以下に示す。

検査項目 (略号)	検査方法	測定機器
RBC	DC 検出法	Sysmex K-4500
WBC	DC 検出法	Sysmex K-4500
PLT	DC 検出法	Sysmex K-4500
HGB	ラウリル硫酸ナトリウム ヘモグロビン法	Sysmex K-4500
HCT	赤血球パルス波高値検出法	Sysmex K-4500
MCV	算出式: $HCT(\%) \times 1000 / RBC(\times 10^4 / \mu L)$	Sysmex K-4500
MCH	算出式: $Hb(g/dl) \times 1000 / RBC(\times 10^4 / \mu L)$	Sysmex K-4500

MCHC	算出式：Hb(g/dl) × 100/HCT(%)	Sysmex K-4500
PT	凝固点検出方法	Sysmex CA-1000
APTT	凝固点検出方法	Sysmex CA-1000
Fib	光散乱検出方法	Sysmex CA-1000
TTO	凝固点検出方法	Sysmex CA-1000
HPT	凝固点検出方法	Sysmex CA-1000

#### E. 血液化学的検査

生存例について、被験物質の初回投与日を Day 0 として Day 12 にイソフルラン麻酔下で腹大動脈から採血を行い、ヘパリンナトリウム入り採血管に入れ、4°C、1,500 × g、15 分間遠心分離して血漿を得た。これを試料として、7070 形自動分析装置にて血液化学検査を実施した。なお、採血日に測定を実施しない場合には、血漿は遠心分離後速やかに -80°C で保存し、1 週間以内に測定した。測定項目および測定方法を以下に示す。

検査項目 (略号)	測定方法
ALP	4-ニトロフェニルリン酸基質法 (GSCC 法)
AST	リンゴ酸脱水素酵素共役・UV 法 (IFCC 法)
ALT	乳酸脱水素酵素共役・UV 法 (IFCC 法)
LAP	L-ロイシル-p-ニトロアニリド法
Glc	ヘキソキナーゼ RATE 法
TG	GK・GPO・POD 遊離グリセロール消去法 (酵素法)
TCh	コレステロールエステラーゼ・コレステロールオキシダーゼ・パーオキシダーゼ法 (酵素法)
TP	ビウレット法
ALB	BCG 法
BUN	ウレアーゼ・GLDH 法
Cre	ヤッフエ法
Ca	OCPC 法
P	フィスケ・サバロー法
Na	イオン選択電極法
K	イオン選択電極法
Cl	イオン選択電極法

#### F. 病理解剖学的検査

AMT の静脈内投与群は、初回投与日を Day 0 として Day 12 にイソフルラン麻酔下で放血により安楽死させ、観察を行った。

#### G. 器官重量測定

被験物質の初回投与日を Day 0 として Day 12 に、生存例全例について、病理解剖学的検査終了後、肝臓および腎臓重量を測定した。また、最終体重で補正した体重比重量をそれぞれ求めた。

#### H. 病理組織学的検査

AMT の静脈内投与群は、初回投与日を Day 0 として Day 12 に、肝臓、腎臓および異常の見られた器官を 10% 中性緩衝ホルマリン液により 4°C にて約 24 時間固定した。常法に従ってパラフィン包埋し、必要に応じて 5  $\mu$ m 切片作製後 hematoxylin eosin (HE) 染色または periodic acid-schiff (PAS) 染色を施し、光学顕微鏡観察に供した。

#### I. 統計学的手法

得られた計量値データは、統計解析ソフト SAS 前臨床パッケージ (version 9.1.3、株式会社 SAS インスティテュートジャパン) を用いて統計学的処理を行った。各投与群について、対照群 (0 mg/kg 投与群) に対する  $t$  検定を行い、有意差を求めた。

### ラット CDDP 誘発腎障害モデルの作製

CDDP を生理食塩水で溶解し、濃度 3 mg/mL となるよう調製した。7 週齢 Wistar 系雄性ラットに 3 mg/mL の CDDP 溶液を、AMT (連日静脈内投与) 初回投与直前に 1 回、6 mg/2 mL/kg の用量で単回尾静脈内投与した。

## ラット CDDP 誘発腎障害モデルにおける抗線維化評価

### 1. 投与

生理食塩水に溶解した AMT を 0 mg/1 mL/kg、10 mg/1 mL/kg、30 mg/1 mL/kg の用量にて、1 日 1 回 28 日間反復尾静脈内投与した（各群 6 例）。

### 2. 採血

AMT 初回投与日を Day 0 として Day 5 にイソフルラン麻酔下、ヘパリン処理した注射針を装着した注射筒を用いて、頸静脈より採血した（各個体 0.4 mL 程度）。Day 28 にイソフルラン麻酔下、ヘパリン処理した注射針を装着した注射筒を用いて、腹大動脈より全採血し、放血致死させた。

### 3. 観察、測定および検査

以下の項目について観察、測定および検査を実施した。

#### A. 一般状態観察および死亡状況確認

観察期間は、Day 28 までの 29 日間とし、投与前に生死確認のみ行った。

#### B. 体重測定

Day 5 および Day 28 に測定した。

#### C. 尿検査

Day 4 および Day 27 の AMT 投与後に動物を代謝ケージに収容し、約 24 時間採尿した。メスシリンダーを用いて尿量測定を行った後、4°C、1,500 × g、10 分間遠心分離し上清尿を得た。7070 型自動分析装置にて総タンパク、電解質 (Na)、クレアチニン、アルブミンを測定した。総タンパク、電解質 (Na)、

クレアチニンおよびアルブミンは、測定値に尿量を乗じ、1日排泄量を算出した。

#### D. 血液学的検査

Day 5 および Day 28 に、イソフルラン麻酔下、頸静脈および腹大動脈よりそれぞれ採血した。抗凝固剤として 3.13%(w/v)クエン酸ナトリウム処理し、凝固能測定に用いた。なお、凝固能測定は即日実施した。測定項目および測定機器を以下に示す。

検査項目 (略号)	検査方法	測定機器
PT	凝固点検出方法	Sysmex CA-1000
TTO	凝固点検出方法	Sysmex CA-1000

#### E. 血液化学的検査

Day 5 および Day 28 に、イソフルラン麻酔下、頸静脈および腹大動脈よりそれぞれ採血を行い、ヘパリンナトリウム入り採血管に入れ、4 °C、1,500 × g、15 分間遠心分離して血漿を得て、これを試料として 7070 形自動分析装置を用いて測定した。なお、採血日に測定を実施しない場合には、血漿は遠心分離後速やかに -80 °C で保存し、1 週間以内に測定した。測定項目および測定方法を以下に示す。

検査項目 (略号)	測定方法
TP	ビウレット法
ALB	BCG 法
BUN	ウレアーゼ・GLDH 法
Cre	ヤッフエ法

#### F. 病理解剖学的検査

Day 28 に、イソフルラン麻酔下、腹大動脈より全採血し放血致死させ、上記と同様に観察を行った。

#### G. 器官重量測定

Day 28 に、病理解剖学的検査終了後、腎臓重量を測定した。また、最終体重で補正した体重比重量をそれぞれ求めた。

#### H. 病理組織学的検査

Day 28 に、腎臓を 10% 中性緩衝ホルマリン液により 4°C にて約 24 時間固定した。常法に従ってパラフィン包埋し、必要に応じて 5  $\mu$ m 切片作製後 HE 染色を施し、光学顕微鏡観察に供した。

#### I. 免疫組織学的検査

⑧で得られた病理組織標本を用い、 $\alpha$ -SMA および collagen III の免疫組織化学染色を実施し、光学顕微鏡観察に供した。

#### J. 画像解析

免疫組織染色を行った標本は、画像解析ソフト WinROOF (version 6.3、三谷商事) を用い染色部位の定量解析を実施した。

#### K. 統計学的処理

得られた計量値データは、統計解析ソフト EXSAS を用いて統計学的処理を行った。各投与群 (10 および 30 mg/kg) について、対照群 (0 mg/kg) に対する  $t$  検定を行い、有意差を求めた。

### AMT および D62 の濃度測定

血漿中の D62、ならびに血漿および組織中の AMT 濃度は以下の手順で測定した。

#### 1. 前処理

D62 もしくは AMT 投与後ラットより得られた血漿もしくは組織ホモジナイズ (湿重量の 2 倍容の生理食塩水でホモジナイズ) 試料に対して、10 倍容量のメタノール:アセトニトリル=1:1 (v/v) 混合液を添加し、よく攪拌した。

4°Cにて十分冷却後、4°C、1,500×g、10分間遠心分離した後、上清をガラスフィルターでろ過し、得られたろ液を分析溶液とした。

## 2. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) 分析

分析には 1200 series LC system (Agilent 社) と API-5000 MS/MS system (SCIEX 社) を連結した LC-MS システムを用い、試料中の AMT 濃度を測定した。分析カラムには CAPCELLPAK C18 MGIII (2.0 mm I.D.×50 mm) (株式会社資生堂) を用い、カラム温度は 40°C とし、移動相 A (0.1%(v/v)ギ酸水溶液) および移動相 B (アセトニトリル) のイソクラティック送液 (A/B = 2/8;流速:0.6 mL/min)により分析した。なお、MS の Scan type は Q1 Multiple Ion (Ion source: electrospray ionization (ESI); Polarity : positive ; IS : 5500V ; Heater temperature : 650°C) として、AMT のプロトン化分子イオン[M+H]<sup>+</sup> に相当する  $m/z$ 251.27 (D62) もしくは  $m/z$ 157.12 (AMT) をモニターした。

## 3. 定量

実測濃度は、同時に作成した AMT の検量線を用いて算出し、小数点以下 2 桁に丸めた。算出には Microsoft Excel 2003 を用いた。検量線の下限未満であった場合は 0 とした。得られた血漿もしくは組織中濃度の群平均値を平均組織中濃度として算出した。群内に濃度値が 0 の個体があった場合は、残りの個体から平均組織中濃度を算出した。検量線試料について、調製濃度に対する実測濃度の相対誤差が±15%であり、かつ決定係数 0.998 以上の直線性が得られた範囲内で定量を行った。

## ラット毒性試験



## 1. 投与

0.5%(w/v) CMC 溶液に溶解した AMT について、単回投与試験では、296、444、666、1000 および 1500 mg/5 mL/kg、反復投与試験（1日1回14日間連日）では、0、50、100、200 および 400 mg/5 mL/kg、6週齢 SD 系雄性ラットに経口投与した。

## 2. 一般状態および死亡状況の観察

単回投与試験の観察期間は、投与日を Day 1 として Day 15 まで、死亡の有無のみを観察した。反復投与試験の観察期間は、初回投与日を Day 1 として Day 14 までの 14 日間とし、生死の確認および一般状態観察とした。

## 3. 体重測定

単回投与試験には、投与日を Day 1 として、Day 1、Day 2、Day 4、Day 6、Day 8、Day 10、Day 13 および Day 15 に、反復投与試験では、初回投与日を Day 1 として、Day 1、Day 3、Day 7、Day 10、Day 14 および Day 15 に測定した。

## 4. 摂餌量および摂水量測定

反復投与試験において実施した。初回投与日を Day 1 として、Day 2~3、Day 6~7、および Day 13~14 に測定した。

## 5. 尿検査

反復投与試験において実施した。初回投与日を Day 1 として Day 14 に、ラット代謝ケージを使用して、給餌、給水下で新鮮尿（約 4 時間尿）を採取し、

肉眼観察により色調を、デジタル尿比重屈折計（株式会社アタゴ）を用いて尿比重を、クリニテック 200+（バイエルメディカル株式会社）を用いて、pH、タンパク、ケトン体、潜血、ビリルビン、亜硝酸塩、ウロビリノーゲンを測定した。引き続き蓄積尿（約 17 時間尿）を採取し、尿量測定を行った後、上清尿（4°C、1,500 × g、10 分間遠心分離）を試料として、Na、K、Cl、Ca および Cre を自動分析装置により測定し、尿量を乗じ一日排泄量を算出した。

## 6. 血液学的検査

反復投与試験において実施した。初回投与日を Day 1 として Day 15 に、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液、大日本製薬株式会社）麻酔下で腹大動脈から採血した。このうち、抗凝固剤として EDTA-2K 処理した血液を血球計測に、抗凝固剤として 3.13%クエン酸ナトリウム処理した血液を凝固能測定に用いた。測定方法および使用機器は、先述に準じた。

## 7. 血液化学的検査

反復投与試験においてのみ実施した。初回投与日を Day 1 として Day 15 に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹大動脈から採血した。血液をヘパリンナトリウム入り採血管に入れ、4°C、1,500 × g、15 分間遠心分離して血漿を得た。遠心分離後血漿は速やかに -80°C で凍結保存した。測定方法および使用機器は先述に準じた。

## 8. 病理解剖学的検査

単回投与試験では、Day 15 に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血により安楽死させた後、解剖し、体表、開孔部、頭蓋、胸腔、腹腔の器官お

よび組織を観察した。単回投与試験で解剖に供さなかった生存動物は、窒素ガス暴露により安楽死させた。反復投与試験では、Day 15 に、生存例について単回投与試験と同様に解剖した後、脳、下垂体、甲状腺、肺、心臓、胃、胸腺、脾臓、副腎、前立腺、精巣上体、精巣および大腿骨（骨髄を含む）を 10%中性緩衝ホルマリン液に固定した。肝臓および腎臓は、10%中性緩衝ホルマリン液により 4°C にて約 24 時間固定した。大腿骨は固定後、10%EDTA (pH7.4) により脱灰した。

## 9. 器官重量測定

反復投与試験において実施した。初回投与日を Day 1 として Day 15 に、病理解剖学的検査終了後、以下の器官について重量を測定した。対象器官は、脳、下垂体、甲状腺、肺、心臓、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、前立腺、精巣上体および精巣とした。

## 10. 病理組織学的検査

反復投与試験において実施した。初回投与日を Day 1 として Day 15 に、病理解剖学的検査終了後、以下の器官について重量を測定した。ホルマリン固定器官を常法に従ってパラフィン包埋した。肝臓、腎臓、胸腺、脾臓および骨髄について、5  $\mu$ m 切片作製後、HE 染色を施し、光学顕微鏡観察に供した。

## 11. 統計学的手法

反復投与試験で得られた体重、摂餌・摂水量、尿検査（尿量、比重、尿中電解質、尿中 Ca およびクレアチニン）、血液学的検査および血液化学的検査のデータは、溶媒（0 mg/kg）投与群を対照群とした多群の検定を実施した。ま

ず Bartlett 法により測定値の分散を 95%信頼限界で検定し、等分散の場合は一元配置分散分析を実施した。その結果、群間で有意差が認められた場合にのみ、Dunnett の方法による平均値の比較を行った。分散が等しくない場合には、Kruskal-Wallis の検定を行った。その結果、群間で有意差が認められた場合にのみ、Dunnett 型の平均値の比較を行った。尿検査（定性検査および色調）のデータについては、 $a \times b$  カイ 2 乗検定を行った。

## ラット Toxicokinetics (TK) 試験

### 1. 投与

7 週齢 Wistar 系雄性ラットに、0.5%(w/v) CMC 溶液に懸濁した D62 を 30 mg/5 mL/kg、もしくは 0.5%(w/v) CMC 溶液に溶解した AMT を 300 mg/5 mL/kg の用量にて単回経口投与した。AMT については、生理食塩水に溶解した後、30 mg/1 mL/kg の用量にて単回尾静脈内投与した。

### 2. 採血

経口投与後 0.25、0.5、0.75、1、2、4、8、24 時間に、静脈内投与後 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24 時間に、イソフルラン麻酔下、ヘパリン処理したシリンジを用いて頸静脈より血液を採取した。血液は、4°C、 $1,500 \times g$ 、10 分間遠心分離し、上清を血漿として得た。得られた血漿は、-20°C で保管した。

### 3. LC-MS 分析

血漿中 D62 もしくは AMT 濃度分析における試料の前処理および分析条件は先述の方法に準じた。

#### 4. PK 解析

個体ごとに得られた血漿中 AMT 濃度から、WinNonlin (Pharsight, Ver. 6.2) を用い、ノンコンパートメントモデルにて PK 解析を実施し、以下のパラメータを得た。

略語	WinNonlin パラメータ	略語	WinNonlin パラメータ
$AUC_{0-24hr}$	AUCall	$C_{max}$	Cmax
$AUC_{0-\infty}$	AUCINF_obs	$T_{max}$	Tmax
$MRT_{0-\infty}$	MRTINF_obs	$AUC_{0-24hr}$	AUCall
$V_{d,SS}$	Vss_obs	$AUC_{0-\infty}$	AUCINF_obs
$CL_{tot}$	Cl_obs	$MRT_{0-\infty}$	MRTINF_obs
$t_{1/2}$	HL_Lambda_z	$t_{1/2}$	HL_Lambda_z

## 引用文献

1. Arti V. Shinde, Claudio Humeres, and Nikolaos G. Frangogiannis (2017) The role of  $\alpha$ -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1863: 298–309.
2. Xiaoyi Li, Lixin Zhu, Beibei Wang, Meifei Yuan, and Ruixin Zhu (2017) Drugs and targets in fibrosis. *Front Pharmacol.* 8: 855.
3. Saleh Yazdani, Ruchi Bansal, and Jai Prakash (2017) Drug targeting to myofibroblasts: Implications for fibrosis and cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 121: 101–116.
4. Rivka C. Stone, Irena Pastar, Nkemcho Ojeh, Vivien Chen, Sophia Liu, Karen I. Garzon, and Marjana Tomic-Canic (2016) Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res.* 365: 495–506.
5. Tsutomu Inoue, Akihiro Umezawa, Tsuneo Takenaka, Hiromichi Suzuki, and Hirokazu Okada (2015) The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models. *Kidney Int.* 87: 233–238.
6. John Holian, Weier Qi, Darren J. Kelly, Yuan Zhang, Ellein Mreich, Carol A. Pollock, and Xin-Ming Chen (2008) Role of kruppel-like factor 6 in transforming growth factor- $\beta$ 1-induced epithelialmesenchymal transition of proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295: 1388–1396.
7. Hui Y. Lan (2003) Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 12: 25–29.
8. Maki Shimizu, Shuji Kondo, Maki Urushihara, Masanori Takamatsu, Katsuyoshi Kanemoto, Michio Nagata, and Shoji Kagami (2006) Role of integrin-linked kinase

- in epithelial-mesenchymal transition in crescent formation of experimental glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 21: 2380–2390.
9. Yogesh M. Scindia, Umesh S. Deshmukh, and Harini Bagavant (2010) Mesangial pathology in glomerular disease: targets for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev*. 62: 1337–1343.
  10. Maria Fragiadaki, and Roger M. Mason (2011) Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis – evidence for and against. *Int J Exp Pathol*. 92: 143–150.
  11. Motoko Yanagita, Hidenori Arai, Toru Nakano, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Atsushi Fukatsu, Toshio Doi, and Toru Kita (2001) Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3. *J Biol Chem*. 276: 42364–42369.
  12. Motoko Yanagita, Hidenori Arai, Kenji Ishii, Toru Nakano, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Brian Varnum, Atsushi Fukatsu, Toshio Doi, and Toru Kita (2001) Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 158: 1423–1432.
  13. Motoko Yanagita (2004) The role of the vitamin K-dependent growth factor Gas6 in glomerular pathophysiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 13: 465–470.
  14. Motoko Yanagita (2004) Gas6, warfarin, and kidney diseases. *Clin Exp Nephrol*. 8: 304–309.
  15. Anette Fiebeler, Joon-Keun Park, Dominik N. Muller, Carsten Lindschau, Michael Mengel, Saskia Merkel, Bernhard Banas, Friedrich C. Luft, and Hermann Haller (2004) Growth arrest specific protein 6/Axl signaling in human inflammatory renal diseases. *Am J Kidney Dis*. 43: 286–295.
  16. Iris J. Lee, Brendan Hilliard, Abhishek Swami, John C. Madara, Swati Rao, Tapan

- Patel, John P. Gaughan, Jean Lee, Crystal A. Gadegbeku, Eric T. Choi, and Philip L. Cohen. (2012) Growth arrest-specific gene 6 (Gas6) levels are elevated in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 27: 4166–4172.
17. Jane Antony, and Ruby Yun-Ju Huang (2017) Axl-driven EMT state as a targetable conduit in cancer. *Cancer Res*. 77: 3725–3732.
18. Milena S. Espindola, David M. Habel, Rohan Narayanan, Isabelle Jones, Ana L. Coelho, Lynne A. Murray, Dianhua Jiang, Paul W. Noble, and Cory M. Hogaboam (2018) Targeting of TAM receptors ameliorates fibrotic mechanisms in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 197: 1443–1456.
19. Atsuo Kurata, Yukako Tachibana, Tadakatsu Takahashi, and Naoshi Horiba. (2020) Novel Axl-specific inhibitor ameliorates kidney dysfunction through the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition of renal tubular cells. *PLoS One*. 15: e0232055.
20. Larissa Knüppel, Yoshihiro Ishikawa, Michaela Aichler, Katharina Heinzmann, Rudolf Hatz, Jürgen Behr, Axel Walch, Hans Peter Bächinger, Oliver Eickelberg, and Claudia A. Staab-Weijnitz (2017) A novel antifibrotic mechanism of nintedanib and pirfenidone. Inhibition of collagen fibril assembly. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 57: 77–90.
21. Robert G. Hart, Lesly A. Pearce, Richard W. Asinger, and Charles A. Herzog (2011) Warfarin in atrial fibrillation patients with moderate chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 6: 2599–2604.
22. Christine Perret-Guillaume, and Denis G. Wahl (2004) Low-dose warfarin in atrial fibrillation leads to more thromboembolic events without reducing major bleeding when compared to adjusted-dose: a meta-analysis. *Thromb Haemost*. 91: 394–402.



23. Simone Rost, Andreas Fregin, Vytautas Ivaskevicius, Ernst Conzelmann, Konstanze Hörtnagel, Hans-Joachim Pelz, Knut Lappegard, Erhard Seifried, Inge Scharrer, Edward G. D. Tuddenham, Clemens R. Müller, Tim M. Strom, and Johannes Oldenburg (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. 427: 537–541.
24. Yuka Sakaguchi, Sachiko Suga, Keiyu Oshida, Keiko Miyamoto-Kuramitsu, Kohei Ueda, and Yohei Miyamoto (2008) Anticoagulant effect of sodium dehydroacetate (DHA-S) in rats. *J Appl Toxicol*. 28: 524–529.
25. Sangwook Wu, Xuejie Chen, Da-Yun Jin, Darrel W. Stafford, Lee G. Pedersen, and Jian-Ke Tie (2018) Warfarin and vitamin K epoxide reductase: a molecular accounting for observed inhibition. *Blood*. 132: 647–657.
26. Carville G. Bevans, Christoph Krettler, Christoph Reinhart, Hélène Tran, Katja Koßmann, Matthias Watzka, and Johannes Oldenburg (2013) Determination of the warfarin inhibition constant  $K_i$  for vitamin K 2, 3-epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) using an in vitro DTT-driven assay. *Biochim Biophys Acta*. 1830: 4202–4210.
27. Nicholas Au, and Allan E. Rettie. (2008) Pharmacogenomics of 4-hydroxycoumarin anticoagulants. *Drug Metab Rev*. 40: 355–375.
28. Henk H. Thijssen. (1987) Warfarin resistance. Vitamin K epoxide reductase of Scottish resistance genes is not irreversibly blocked by warfarin. *Biochem Pharmacol*. 36: 2753–2757.
29. Christina R. Wilson, John-Michael Sauer, Gary P. Carlson, Reidar Wallin, Michael P. Ward, and Stephen B. Hooser (2003) Species comparison of vitamin K<sub>1</sub> 2, 3-epoxide reductase activity in vitro: kinetics and warfarin inhibition. *Toxicology*.

189: 191–198.

30. Louise A. Begent, Anthony P. Hill, Glyn B. Steventon, Andrew J. Hutt, Christopher J. Pallister, and David C. Cowell (2001) Characterization and purification of the vitamin K<sub>1</sub> 2, 3 epoxide reductases system from rat liver. *J Pharm Pharmacol.* 53: 481–486.
31. Katrin J. Czogalla, Arijit Biswas, Ann-Christin Wendeln, Philipp Westhofen, Clemens R. Müller, Matthias Watzka, and Johannes Oldenburg (2013) Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and affect putative warfarin binding interfaces. *Blood.* 122: 2743–2750.
32. Katrin J. Czogalla, Arijit Biswas, Klara Höning, Veit Hornung, Kerstin Liphardt, Matthias Watzka, and Johannes Oldenburg (2017) Warfarin and vitamin K compete for binding to Phe55 in human VKOR. *Nat Struct Mol Biol.* 24: 77–85.
33. Markus Gebauer (2007) Synthesis and structure-activity relationships of novel warfarin derivatives. *Bioorg Med Chem.* 15: 2414–2420.
34. Susan E. Hazelett, and Peter C. Preusch (1988) Tissue distribution and warfarin sensitivity of vitamin K epoxide reductase. *Biochem Pharmacol.* 37: 929–934.
35. Tao Li, Chun-Yun Chang, Da-Yun Jin, Pen-Jen Lin, Anastasia Khvorova, and Darrel W. Stafford (2004) Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature.* 427: 541–544.
36. Weikai Li, Sol Schulman, Rachel J. Dutton, Dana Boyd, Jon Beckwith, and Tom A. Rapoport (2010) Structure of a bacterial homolog of vitamin K epoxide reductase. *Nature.* 463: 507–512.
37. Philipp Westhofen, Matthias Watzka, Milka Marinova, Moritz Hass, Gregor Kirfel, Jens Müller, Carville G. Bevans, Clemens R. Müller, and Johannes Oldenburg

- (2011) Human vitamin K<sub>1</sub> 2, 3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J Biol Chem.* 286: 15085–15094.
38. Abdessalem Hamed, Benjamin Matagrín, Gabriele Spohn, Caroline Prouillac, Etienne Benoit, and Virginie Lattard (2013) VKORC1L1, an enzyme rescuing the vitamin K 2, 3-epoxide reductase activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. *J Biol Chem.* 288: 28733–28742.
39. Jahmar Thompson, Sanford Markey, and Paul V. Fennessey (1975) Gas-chromatographic/mass-spectrometric identification and quantitation of tetronic and deoxytetronic acids in urine from normal adults and neonates. *Clin Chem.* 21: 1892–1898.
40. Christian Fleck, and Helmut Bräunlich (1990) Factors determining the relationship between renal and hepatic excretion of xenobiotics. *Arzneimittelforschung.* 40: 942–946.
41. Gang Luo, Stephen Johnson, Mei-Mann Hsueh, Joanna Zheng, Hong Cai, Baomin Xin, Saeho Chong, Kan He, and Timothy W. Harper (2009) In silico prediction of biliary excretion of drugs in rats based on physicochemical properties. *Drug Metab Dispos.* 38: 422–430.
42. Mike Ufer (2005) Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clin Pharmacokinet.* 44: 1227–1246.
43. Henk H. Thijssen, Catharina A. Janssen, and M. J. Drittij-Reijnders (1986) The effect of S-warfarin administration on vitamin K<sub>1</sub> 2, 3-epoxide reductase activity in liver, kidney and testis of the rat. *Biochem Pharmacol.* 35: 3277–3282.

44. Thorir D. Bjornsson (1979) Use of serum creatinine concentrations to determine renal function. *Clin Pharmacokinet.* 4: 200–222.
45. Inger M. Darling, and Marilyn E. Morris (1991) Evaluation of “true” creatinine clearance in rats reveals extensive renal secretion. *Pharm Res.* 8: 1318–1322.
46. M. Robertshaw, Kar N. Lai, and Ramyasuda Swaminathan (1989) Prediction of creatinine clearance from plasma creatinine: comparison of five formulae. *Br J Clin Pharmacol.* 28: 275–280.
47. Wilfred Lieberthal, Veronica Triaca, and Jerrold S. Levine (1996) Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol.* 270: 700–708.
48. Satoru Sugiyama, Mika Hayakawa, Tomoko Kato, Yoshihiro Hanaki, Kazuyuki, Shimizu, and Takayuki Ozawa (1989) Adverse effects of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: disturbances in glutathione peroxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 159: 1121–1127.
49. Sarah Faubel, Eli C. Lewis, Leonid Reznikov, Danica Ljubanovic, Thomas S. Hoke, Hilary Somerset, Dong-Jin Oh, Lawrence Lu, Christina L. Klein, Charles A. Dinarello, and Charles L. Edelstein (2007) Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 322: 8–15.
50. Ganesan Ramesh, and Willam B. Reeves (2002) TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest.* 110: 835–842.
51. James E. McDuffie, Marciano Sablad, JingY. Ma, and Sandra Snook (2010) Urinary parameters predictive of cisplatin-induced acute renal injury in dogs.

- Cytokine. 52: 156–162.
52. Yoshiko Kawai, Tomohiko Satoh, Daisuke Hibi, Yukihiro Ohno, Yuka Kohda, Katsuyuki Miura, and Munekazu Gemba (2009) The effect of antioxidant on development of fibrosis by cisplatin in rats. *J Pharmacol Sci.* 111: 433–439.
  53. Agnès Fourcot, Dominique Couchie, Marie-Noele Chobert, Elie-Serge Zafrani, Philippe Mavier, Yannick Laperche, and Arthur Brouillet (2011) Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 300: 1043–1053.
  54. Martina Perše, and Željka Večerić-Haler (2018) Cisplatin-induced rodent model of kidney injury: characteristics and challenges. *Biomed Res Int.* 2018: 1462802.
  55. Emi Yamamoto, Takeshi Izawa, Osamu Sawamoto, Vetrizah Juniantito, Mitsuru Kuwamura, and Jyoji Yamate (2012) Amelioration of cisplatin-induced rat renal lesions by a cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor. *Exp Toxicol Pathol.* 64: 625–631.
  56. Peng Zhou, Xun Sun, and Zhirong Zhang (2014) Kidney-targeted drug delivery systems. *Acta Pharm Sin B.* 4: 37–42.
  57. Yusuke Kamiya, Shohei Otsuka, Tomonori Miura, Manae Yoshizawa, Ayane Nakano, Miyu Iwasaki, Yui Kobayashi, Makiko Shimizu, Masato Kitajima, Fumiaki Shono, Kimito Funatsu, and Hiroshi Yamazaki (2020) Physiologically based pharmacokinetic models predicting renal and hepatic concentrations of industrial chemicals after virtual oral doses in rats. *Chem Res Toxicol.* 33: 1736–1751.
  58. Shona Methven, Mark S. MacGregor, Jamie P. Traynor, Denis St J. O'Reilly, and Christopher J. Deighan (2010) Assessing proteinuria in chronic kidney disease:

protein-creatinine ratio versus albumin-creatinine ratio. *Nephrol Dial Transplant.*

25: 2991–2996.