第 2 部 CTD の概要

JAN あるいは販売名：	エンパグリフロジン
剤形・含量：	錠剤 ・ 10mg
文書名：	2.4 非臨床試験の概括評価
文書作成日：	23 December 2022

Proprietary confidential information
© 2022 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved.
This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission

目　次

目　次 2
略号一覧表 3
1.　非臨床試験計画概略 4
2.　薬理試験 5
3.　薬物動態試験 10
4.　毒性試験 11
5.　総括及び結論 12
6.　参考文献 14

略号一覧表

1,3-BD	1,3-butanediol	1,3－ブタンジオール
Ang II	angiotensin II	アンジオテンシン II
ApoE	apolipoprotein E	アポリポタンパク E
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
α-SMA	alpha smooth muscle actin	アルファ平滑筋アクチン
βOHB	β-hydroxybutyrate	β－ヒドロキシ酪酸
CKD	chronic kidney disease	慢性腎臓病
CCL	CC-chemokine ligand	CC－ケモカインリガンド
CsA	cyclosporine A	シクロスポリン A
DKD	diabetic kidney disease	糖尿病性腎臓病
DM	diabetes mellitus	糖尿病
eGFR	estimated glomerular filtration rate	推算糸球体濾過量
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition	上皮間葉転換
GFR	glomerular filtration rate	糸球体濾過量
HFD	high-fat diet	高脂肪食
HFpEF	heart failure with preserved ejection fraction	左室駆出率が保たれた心不全
HFrEF	heart failure with reduced ejection fraction	左室駆出率が低下した心不全
HK-2	human kidney 2	-
HPTC	human proximal tubular cells	ヒト近位尿細管細胞
IL	Interleukin	インターロイキン
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	単球走化性タンパク－1
ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
SD	Sprague Dawley	-
SGLT2	sodium-dependent glucose co-transporter 2	ナトリウムーグルコース共役輸送担体 2
SNGFR	single nephron glomerular filtration rate	単一ネフロン糸球体濾過量
T2DM	type 2 diabetes mellitus	2 型糖尿病
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	腫瘍壊死因子アルファ
UGE	urinary glucose excretion	尿中グルコース排泄（量）
WT	wild type	野生型

1. 非臨床試験計画概略

エンパグリフロジンは，食事及び運動療法では効果不十分な成人 2 型糖尿病（T2DM）患者の血糖コントロールの改善を適応として，世界各国で承認を受けている。また，日本を除く多くの国では，確立された心血管疾患を合併する T2DM 患者の心血管死のリスク減少を適応としても承認されている。さらに，慢性心不全患者を対象とした試験の結果からエンパグリフロジンは左室駆出率が低下した心不全（HFrEF）及び左室駆出率が保たれた心不全（HFpEF）を含む慢性心不全の治療薬としても多くの国で承認されている。

心血管リスクの高い T2DM 患者を対象としたエンパグリフロジンの心血管アウトカム試験（EMPA-REG OUTCOME）において，標準治療に上乗せしたエンパグリフロジンは，T2DM 患者の心不全による入院, 心血管死, 及びすべての原因による死亡のリスクを低下させた［P15-09840］。本試験では，アルブミン尿及び推算糸球体濾過量（eGFR）による糖尿病性腎臓病（DKD）のカテゴリーにかかわらず，エンパグリフロジンにより DKD の進行が抑制された。さらに，急性腎障害を含む急性腎不全を発現した患者の割合は，エンパグリフロジン群の方がプラセボ群よりも低く，腎機能についてもエンパグリフロジン群の方がより保たれていた［P20-07032］。

また，HFrEF 患者を対象としたエンパグリフロジンのアウトカム試験（EMPEROR-Reduced）及び HFpEF 患者を対象にしたエンパグリフロジンのアウトカム試験（EMPEROR-Preserved）において，エンパグリフロジンが心不全患者における心血管及び腎関連アウトカムのリスクを有意に低下した［P20-07681，P21-08234］

慢性腎臓病（CKD）におけるエンパグリフロジンの作用を，様々な *in vitro* 及び *in vivo* 薬理学的モデルで検討した。*In vitro* モデルにはヒト近位尿細管細胞（HPTC）株を使用し，高濃度グルコース誘導酸化ストレスと炎症［P19-11904］，及びインターロイキン（IL）-1β を介した炎症［P20-10198］に対するエンパグリフロジンの作用を検討した。*In vivo* モデルでは，臨床試験で確認された有益な作用をマウス及びラットの動物モデルで再現し，腎臓でのエンパグリフロジンの作用機序をよりよく理解するため，糖尿病（DM）動物だけでなく非 DM 動物を用いて試験を行った。DM マウスの血行動態機能，及び単一ネフロン糸球体濾過量（SNGFR）に対するエンパグリフロジンの作用は *in vivo* イメージングを用いて検討した［P19-07273］。糖尿病性腎肥大，アルブミン尿及び糸球体過剰濾過に対するエンパグリフロジンの作用は DM Ins2+/Akita マウスを用いて検討した［P13-15161］。CKD 発症に対するエンパグリフロジンの作用は高脂肪食（HFD）を与えた非タンパク尿性 DKD モデルアポリポタンパク E 欠損マウス（ApoE-/-）を用いて検討した［P20-06846］。非 DM 動物でもエンパグリフロジンの作用を検討した。マウスのリポ多糖（LPS）誘導急性敗血症性腎障害モデル［P20-05733］及び 5/6 腎摘によって誘導した腎障害に対するエンパグリフロジンの作用を検討した［P20-06846］。また，Sprague Dawley（SD）ラットを用いたアンジオテンシン II（Ang II）依存性高血圧モデルを用いて腎線維化に対するエンパグリフロジンの作用を検討した［P20-00333］。最後に，ラットを用いて，シクロスポリン誘導腎線維症に対するエンパグリフロジンの作用を検討した［P21-03075］。

2. 薬理試験

エンパグリフロジンはヒトナトリウムーグルコース共役輸送担体 2（SGLT2）の強力かつ選択的な阻害剤である。エンパグリフロジンは腎臓の近位尿細管に発現している SGLT2 を阻害することにより，グルコースの再吸収を減少させ，それにより尿中グルコース排泄（UGE）を促進し，その結果，血中グルコースを低下させる。

また，エンパグリフロジンは SGLT2 のナトリウムイオンとの共輸送（グルコース／ナトリウム比 1:1）としての働きを阻害するため，ナトリウムの再吸収を低下させることで，遠位尿細管及び緻密斑でのナトリウム濃度を増加させ，ナトリウム利尿をもたらす［P18-04268］。

エンパグリフロジンの腎に対する有益な作用を明らかにするために，*in vitro* 試験並びに様々な動物モデルを用いた *in vivo* 薬理試験を実施した。試験は，異なる動物種を用いて DM，非 DM 両方で実施し，そのなかには腎障害を直接誘導する試験も含んでいる。非 DM 動物を用いた試験では，5/6 腎摘，シクロスポリン，Ang II，LPS 投与又は肥満高血圧動物を用いて腎障害を誘導した。

様々な動物モデルにおいて，エンパグリフロジン投与により腎機能の改善又は腎障害の抑制が示された。

<u>慢性腎臓病におけるエンパグリフロジンの血行動態への作用</u>

DM Ins2+/Akita マウスでは，非 DM 野生型（WT）対照マウスと比較して *in vivo* で顕微鏡を用いて SNGFR を測定したところ糸球体濾過量(GFR)が増加していた。エンパグリフロジン投与は，インスリン投与と同様にマウスにおいて血糖値を低下させた。しかし，インスリンとは対照的に，エンパグリフロジンは SNGFR で測定した腎臓の過剰濾過を有意に抑制した。これらの *in vivo* イメージングと同様の結果はクレアチニンクリアランスでも確認された。

さらに，エンパグリフロジンは付随する腎臓の細動脈血管拡張を改善した。この作用は緻密斑細胞のアデノシン生成の回復によると推測される。エンパグリフロジンの腎血行動態改善作用はアデノシン A1 受容体拮抗剤により阻害された。

このようにエンパグリフロジンは，尿細管－糸球体フィードバック機構を回復させることにより，SNGFR と糸球体血行動態を正常化した［P19-07273］。

別の試験では，DM Ins2+/Akita マウス（$Ins2^{+/C96Y}$; Akita/+，以下，Akita/+マウスと示す）に GFR マーカーとしてフルオレセインイソチオシアナート（FITC）-Sinistrin を単回静脈内投与した後，GFR を測定した。Akita/+マウスは，WT マウスと比較して，血漿中のインスリン濃度の顕著な減少と血中グルコース濃度の 5 倍の上昇を示した。

GFR は，Akita/+マウスにおいて WT マウスと比較して 30%大きく，これは糖尿病性糸球体過剰濾過の値と同程度である。エンパグリフロジンは，尿中グルコース／クレアチニン濃度比及び尿中グルコース絶対濃度の持続的な上昇を誘導し，エンパグリフロジンの曝露が十分であることが示された。エンパグリフロジンにより Akita/+マウスの糖尿病性過剰濾過は完全に抑制され，GFR は WT マウスと同等のレベルまで低下した。さらに，Akita/+マウスで WT マウスと比較して有意に増加する尿中のアルブミン濃度は，エンパグリフロジンにより減少した。加えて，エンパグリ

フロジンは心拍数を増加させることなく Akita/+マウスの収縮期血圧を低下させたが，この現象はこれらのマウスにおける交感神経活性の低下に関連する可能性がある［P13-15161］。

DKD に対するエンパグリフロジンの作用を BTBR ob/ob T2DM マウスを用いて検討した。BTBR ob/ob マウスは，レプチンの産生を担う遺伝子に突然変異があり，その結果，重度の肥満及び T2DM を示す。DM BTBR ob/ob マウスでは，過剰濾過及び糸球体肥大により重度のアルブミン尿が認められた。エンパグリフロジン投与群は，エンパグリフロジンを含まない通常食を対照食として与えた群と比較して，アルブミン尿が有意に減少した。Ang II を 6 週間投与すると，DM BTBR ob/ob マウスは重度の高血圧を示した。高血圧 BTBR ob/ob マウスでは，Ang II 投与により糸球体肥大がさらに増大し，アルブミン尿症は正常血圧 BTBR ob/ob マウスに比べて 2 倍増悪した。エンパグリフロジンは，正常血圧マウスと比較した場合，高血圧マウスにおいてさらに顕著な UGE を誘導し，尿中アルブミン濃度を 70%減少させた［P14-12076］。

アテローム性動脈硬化症を伴う非タンパク尿性 DKD のモデルとして，HFD を与えた ApoE-/-マウスを用いて，CKD 発症に対するエンパグリフロジンの作用を検討した。ApoE-/-マウスは，リポタンパク受容体のリガンドである ApoE を欠損しており，リポタンパククリアランスが低下し，その結果，高リポタンパク血症及び異常リポタンパク血症，重度の高コレステロール血症，並びにアテローム性動脈硬化病変を発症する。溶媒を投与した ApoE-/-マウスに HFD を 24 週間与えた試験では，アルブミン尿は軽度であったが，高濃度の血漿中シスタチン C によって定義される腎機能障害を伴う DM が誘導された。HFD を与えた ApoE-/-マウスにエンパグリフロジンを 8 週間投与すると，血漿中シスタチン C の増加が抑制され，腎機能が改善した［P20-06846］。

非 DM 動物の腎機能に対するエンパグリフロジンの作用を，マウスとラットの CKD モデルで試験した。

5/6 腎摘により誘導した C57BL/6 マウスの腎障害では，血圧上昇，アルブミン尿及び血漿中シスタチン C の増加により測定される GFR の低下が認められた。エンパグリフロジンを 4 週間投与すると血圧，アルブミン尿及び血漿中シスタチン C 濃度が低下し，ポドサイト及び尿細管間質組織における腎障害の改善がみられた［P20-06846］。

臓器移植の術後管理に広く用いられているシクロスポリン A（CsA）の臨床使用は，その潜在的腎毒性により制限される。低塩食と併用して 4 週間 CsA で処置した SD ラットは，クレアチニンクリアランスを指標とした GFR の有意な減少を示した。CsA 投与と並行して 4 週間にわたってエンパグリフロジンを混水投与すると，GFR の低下が抑制された。また，CsA 誘導高血圧と腎症に寄与する交感神経系の活性化マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ発現は，CsA 投与ラットの腎臓で増加したが，エンパグリフロジン投与によりその増加は抑制された［P21-03075］。

結論として，エンパグリフロジンは様々な動物モデルにおいて GFR を正常化した。エンパグリフロジンは DKD のモデルにおいて糸球体過剰濾過を抑制した。GFR の低下を伴う CKD の様々なモデルにおいて，エンパグリフロジンはアルブミン尿の抑制によって示されるように，様々な動物種における糸球体障害を抑制した［P19-10736］。

マウスの急性腎障害モデルにおいて，エンパグリフロジンは腎機能のマーカーである血中尿素窒素（BUN）と腎組織中尿素窒素（KUN）の増加を抑制した。さらにエンパグリフロジンを投与したマウスでは溶媒投与群と比較して死亡率が低下した［P20-05733］。

<u>腎障害の炎症に対するエンパグリフロジンの作用</u>

炎症は，CKD の病態生理学において重要な役割を果たしている［R22-2946］。エンパグリフロジンは，糸球体保護機能に加えて *in vitro* と *in vivo* で炎症を減少させた。

In vitro で DM と同様の病態生理学的な高濃度グルコースの条件において，HPTC（human kidney 2［HK-2］細胞）株から炎症性メディエーターである IL-1β，IL-6，腫瘍壊死因子アルファ（TNF-α）及び単球走化性タンパク－1（MCP-1）／CC－ケモカインリガンド（CCL）2 の発現が誘導された。高濃度グルコースに曝露する 15 分前にエンパグリフロジンを添加すると，高濃度グルコースにより誘導された IL-1β，IL-6，TNF-α 及び MCP-1／CCL-2 の発現増加が抑制された［P19-11904］。

2 つの異なる HPTC 株（HK-2 及び renal proximal tubule epithelial cell/TERT-immortalized 1［RPTEC/TERT1］）を炎症性刺激として IL-1β （10 ng/mL）に曝露し，mRNA 及びタンパク質レベルでの遺伝子発現変化を検討した。両方の細胞株においてエンパグリフロジンは IL-1β による MCP-1／CCL-2 及びエンドセリン-1（ET-1）の発現を mRNA 及びタンパク質レベルで抑制した［P20-10198］。

DM Akita/+マウスモデルにおいて，エンパグリフロジンは，前述した SNGFR への作用に加えて病態生理学的に増加した核内因子 κB（NF-κB），CD14，炎症メディエーターである MCP-1／CCL2，IL-6 及び組織メタロプロテアーゼ阻害因子 2（TIMP2）の発現を抑制した［P13-15161］。

さらに別の DKD モデルとして，BTBR ob/ob マウスでのエンパグリフロジンの抗炎症作用を検討した。エンパグリフロジンを 12 週間投与したところ，炎症性サイトカインである MCP-1／CCL2，regulated on activation, normal T cell expressed and secreted（RANTES），IL-6 の mRNA 発現量が有意に低下し，腎臓の炎症が抑制された［P14-12076］。

ApoE-/-マウスに HFD を与え誘導した非タンパク尿性 DKD モデルにおける腎臓の組織学的評価では，エンパグリフロジン投与による尿細管間質性炎症の抑制が示された［P20-06846］。

非 DM C57BL/6N マウスへの LPS 投与による急性腎障害モデルでは，TNF-α，Toll 様受容体 4（TLR4），IL-6，IL-18，及びカスパーゼ-1 といった多くの炎症マーカー，並びに F4/80，CD68，macrophage differentiation antigen（Mac）3，及びガレクチン-3 といったマクロファージ浸潤マーカーが増加した。エンパグリフロジンはこれらすべての分子の発現を有意に抑制した［P20-05733］。

エンパグリフロジンは CsA により誘導されるラットの腎実質における炎症細胞浸潤を完全に阻害した［P21-03075］。

他の *in vivo* 試験においても，エンパグリフロジンによる抗炎症作用が観察された［P20-00869，P18-10661，P19-11151，P17-13884，P14-15469］。

要約すると，エンパグリフロジンは，様々な刺激により誘導された腎疾患を有する DM 動物並びに非 DM 動物における炎症応答を抑制し，糸球体及び尿細管間質の保護作用を示した。

腎障害のリモデリングに対するエンパグリフロジンの作用

線維化はCKD患者における病態生理学の主要要素であり，臨床での疾患進行の相関因子である［R22-2947］。組織線維化を含む腎リモデリングに対するエンパグリフロジンの作用を，*in vitro*の細胞システム並びにT2DM又は非DMの様々な動物モデルで検討した。

高濃度グルコースの曝露によってHK-2細胞において上皮間葉転換（EMT）が示され，上皮マーカーであるE-カドヘリンの発現は抑制され，線維化マーカーであるフィブロネクチン，アルファ平滑筋アクチン（α-SMA）及びビメンチンCの発現は増加した。この*in vitro*の条件において，エンパグリフロジンの添加により，正常なE-カドヘリン発現が回復し，高濃度グルコース誘導フィブロネクチン，α-SMA及びビメンチンCの発現が抑制された［P19-11904］。

糸球体障害，尿細管細胞の変性及び尿細管間質線維化を，DKDモデルであるApoE-/-マウスへのHFD投与により誘導した。エンパグリフロジンは，上述のように血漿中シスタチンC濃度を低下させることによる有益な作用に加えて，尿細管間質線維化と同様に，糸球体障害と尿細管細胞変化を抑制し，腎機能改善した［P20-06846］。

非DM C57BL/6Nマウスに LPSを投与して誘導した急性腎障害モデルでは，腎機能障害に加えて，メサンギウム基質及びメサンギウム細胞の拡大，並びに糸球体及び間質のコラーゲン沈着の増加が認められた。加えて，腎線維化マーカーであるI型コラーゲン及びIV型コラーゲンが，健常対照マウスと比較して有意に発現増加した。さらに，エンパグリフロジンはメサンギウム基質及びメサンギウム細胞の拡大並びに糸球体及び間質のコラーゲン沈着を阻害した［P20-05733］。

浸透圧ミニポンプにより2週間Ang IIを投与したSDラットでは，主に尿細管間質及び糸球体に局在するI型コラーゲン及びIV型コラーゲン発現がそれぞれ増加した。エンパグリフロジンは，Ang IIにより誘導されるI型コラーゲン及びIV型コラーゲン発現を抑制した［P20-00333］。

CsAと低塩食との併用は，SDラットにおいて，主に尿細管－間質及び糸球体におけるI型コラーゲン及びIV型コラーゲン発現の増加を特徴とする尿細管間質性線維化を含む腎障害を誘導した。エンパグリフロジンの投与は，CsA投与ラットにおけるI型コラーゲン及びIV型コラーゲン発現の上昇を抑制し，線維性リモデリングを阻害した［P21-03075］。

線維化に対するエンパグリフロジンの作用は，様々な*in vivo*試験においてDM動物［P19-07532，P19-01258，P14-15469］並びに非DM動物［P19-10933，P20-00978，P19-03653，P19-02786］においても認められている。

要約すると，エンパグリフロジンは*in vitro*でEMTの線維化の過程を阻害した。さらに，*in vivo*において，DMの有無にかかわらず，エンパグリフロジンの投与によってマトリックスの増加とコラーゲン沈着を含む腎臓のリモデリングが阻害された。

酸化ストレスに対するエンパグリフロジンの作用

活性酸素種（ROS）の細胞内レベルの上昇は，CKDの病因において主要な役割を果たしている［R22-2945］。高濃度グルコースの曝露によって，*in vitro*でHK-2細胞におけるスーパーオキシド生成と過酸化水素生成が有意に上昇した。エンパグリフロジンは高濃度グルコースに曝露した

HK-2 細胞においてスーパーオキシド生成を有意に抑制した［P19-11904］。つまり，エンパグリフロジンは高濃度グルコースに曝露された HK-2 細胞の酸化ストレスを阻害した。

さらに別の試験では，エンパグリフロジンは様々な動物モデルにおいて生体内の酸化ストレスを阻害した［P19-07532，P19-03653，P18-10661，P19-10833，P19-01258，P14-15469］。

腎障害における交感神経活性化に対するエンパグリフロジンの作用

収縮期血圧は，WT マウスに対して Akita/+マウスでわずかに上昇した。エンパグリフロジンは心拍数を増加させることなく Akita/+マウスの収縮期血圧を低下させたが，この現象はこれらのマウスにおける交感神経活性の低下に関連する可能性がある［P13-15161］。

交感神経系の活性化は，覚醒下の雄 SD ラットの CsA 誘導高血圧と腎症に寄与することが示された。エンパグリフロジンは CsA を投与したラットの腎臓の交感神経活性化のマーカーのチロシンヒドロキシラーゼ発現の増加を抑制した［P21-03075］。

腎障害におけるエネルギー代謝へのエンパグリフロジンの作用

5/6 腎摘により C57BL/6 マウスに腎障害を誘導した。マウスに 4 週間，エンパグリフロジン又はケトン体前駆体である 1,3－ブタンジオール（1,3-BD）のいずれかを混餌投与した。血中 β－ヒドロキシ酪酸（βOHB）濃度は，1,3-BD 又はエンパグリフロジンのいずれかを投与した 5/6 腎摘マウスでは，非投与マウスと比較して高かった。エンパグリフロジンは，近位尿細管上皮細胞（PTEC）における糸球体障害，尿細管間質線維化及び炎症を阻害し，血漿中シスタチン C の増加を抑制した。同様の腎保護作用は，1,3-BD を投与したマウス群でも認められた［P20-06846］。

多くの動物モデルにおいて，エンパグリフロジンによるケトン体の血漿中濃度のわずかな上昇が認められた［P19-10933，P18-08803，P19-03216，P18-09761，P18-12030］。

ケトン体は，様々な器官におけるエネルギー供給のためのグルコース酸化に対する追加又は代替エネルギー源として考えられている。実際，βOHB といったケトン体の酸化は，グルコース酸化と比較して酸素消費量の少ない効率的なアデノシン三リン酸（ATP）産生経路であると考えられる［P16-06721］。

上述のことから，エンパグリフロジンは様々な作用で腎臓病の病態生理を抑制することができると考えられる。エンパグリフロジンは GFR，アルブミン尿を正常化し，腎機能を正常化し得る。その上，エンパグリフロジンは酸化ストレスの抑制に加えて，腎臓のリモデリングと線維化の過程を抑制し得る。さらに，エンパグリフロジンは酸素消費量の少ない効率的な代替エネルギーを供給し，交感神経活性を低下させる。

エンパグリフロジンは，*in vitro* 並びに *in vivo* でのマウス及びラットモデルを用いた様々な非臨床試験において，腎疾患に対する有意で有益な作用を示した。これらの有益な作用は DM 動物だけでなく非 DM 動物でも一貫して観察された。

Proprietary confidential information © 2022 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3. 薬物動態試験

新たな薬物動態試験のデータはない。

Proprietary confidential information © 2022 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

4. 毒性試験

新たな毒性試験のデータはない。

Proprietary confidential information © 2022 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5. 総括及び結論

CKD の様々な病態生理におけるエンパグリフロジンの作用については，様々な *in vitro* 及び *in vivo* 薬理学的試験で研究されている。細胞アッセイは HPTC を用いて行われ，*in vivo* 試験はマウス及びラットを用いた様々な試験が行われている。これらの試験は臨床試験で確認されたエンパグリフロジンの有益な作用を再現し，腎臓でのエンパグリフロジンの作用機序をより理解するため DM 動物だけでなく非 DM 動物でも行われている点が重要である。

エンパグリフロジンは SGLT2 の強力かつ選択的な阻害剤である。エンパグリフロジンは腎臓の近位尿細管に発現している SGLT2 を阻害することにより，グルコースの再吸収を減少させ，それにより UGE を促進し，その結果，血中グルコースを低下させる。SGLT2 はグルコースとナトリウムを 1:1 の割合で輸送する。ナトリウムの再吸収の増加は緻密斑での Na‐Cl‐K 濃度を低下させ，尿細管ー糸球体フィードバック機構を介して GFR を増加させることにより，糖尿病性糸球体過剰濾過につながる［P13-15161，P16-05352］。SGLT2 阻害はナトリウムの再吸収を低下させることで，遠位尿細管及び緻密斑でのナトリウム濃度を増加させ，ナトリウム利尿をもたらす［P18-04268］。エンパグリフロジンは様々な動物モデルにおいて GFR を正常化した。エンパグリフロジンは *in vivo* DKD モデルにおいて糸球体過剰濾過を抑制し，GFR の低下を伴う CKD の様々なモデルにおいて，アルブミン尿の抑制によって示されるように，様々な動物種における糸球体障害を抑制した。

エンパグリフロジンは，様々な刺激により誘導された腎疾患を有する DM 動物並びに非 DM 動物における炎症を抑制し，糸球体及び尿細管間質の保護作用を示した。これらの作用は，臨床試験で確認された CKD に対するエンパグリフロジンの有益な作用の一つである可能性がある。

エンパグリフロジンは *in vitro* で EMT を抑制し線維化の過程を阻害した。さらに，*in vivo* において，DM の有無にかかわらず，エンパグリフロジンの投与によってマトリックスの増加とコラーゲン沈着を含む腎臓のリモデリングが阻害された。

エンパグリフロジンは *in vitro* で ROS の増加を抑制し，様々な薬理モデルにおいて酸化ストレスの抑制作用を示した。

交感神経系の活性化は，動物モデルにおいて病態生理学的関連が示された。これは DM Akita/+ マウスモデル並びに CsA 誘導腎症モデルにて示され，エンパグリフロジン投与によって両 *in vivo* モデルの交感神経系の活性化が抑制された。

エンパグリフロジンの腎疾患への有益な作用が認められたマウスモデルにおいて，エンパグリフロジンの投与により血中 βOHB が増加していることが示された。また，マウスにケトン体を実験的に投与したときも，同様の有益な作用が観察された。非臨床試験と同様に臨床試験においても，エンパグリフロジン投与による血漿ケトン体の軽度な増加が認められた。ケトン体は，様々な器官におけるエネルギー供給のためのグルコース酸化に対して追加又は代替エネルギー源として考えられている。実際，βOHB といったケトン体の酸化は，グルコース酸化と比較して酸素消費量が少ない効率的な ATP の産生経路であると考えられる［P16-06721］。したがって，ケトン体は器官の追加のエネルギー源と見なすことができる。

Proprietary confidential information © 2022 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

上述のすべてのエンパグリフロジンの作用は腎保護作用に寄与する可能性があり，患者にとって有益な作用であると考えられる。エンパグリフロジンの腎に対する有益な作用，特に CKD に関する正確な分子機構については，現在行われている非臨床試験及び臨床試験において精力的に研究されているところである。

ヒト CKD は，生理的でない GFR 値を特徴とする疾患であり，GFR の低下がみられる。また，初期の DKD では過剰濾過がみられる。加えて，CKD では一般的に腎臓における炎症，線維化，及び酸化ストレスが生じる。エンパグリフロジンは，様々な介入により誘導された CKD の動物モデルにおいて，腎機能を改善し，腎臓の病態生理学的リモデリングを阻害した。加えて，エンパグリフロジンは炎症と酸化ストレスを抑制し，交感神経活性を低下させた。さらに，エンパグリフロジンは，機能障害のある腎に対して，追加又は代替エネルギー源となるケトン体を供給するための代謝改善作用を有する可能性がある。

このように，エンパグリフロジンは，マウス及びラットを用いた多くの非臨床試験において，CKD に対して顕著で有益な作用を示した。これらの有益な作用は，T2DM 動物と同様に非 DM 動物でも一貫して観察された。

上記のそれぞれの機序が臨床試験で観察されたエンパグリフロジンの有益な作用にどの程度寄与するかについては，現在も議論が続いており，非臨床試験及び臨床試験において検討中である。

結論として，エンパグリフロジンの腎に対する有益な作用は，腎臓における SGLT2 阻害に直接関係している可能性がある。その結果，尿細管－糸球体フィードバック機構が活性化され，レニンーアンジオテンシンーアルドステロン系（RAAS）抑制，交感神経活性の低下，ヘマトクリットの上昇が起こる。加えて，エンパグリフロジンの腎エネルギー供給に対する代謝改善作用，局所抗炎症，抗リモデリング及び抗酸化作用は，CKD 患者におけるエンパグリフロジンの有益な作用に寄与している可能性がある。この薬理試験の概要に *in vitro* 及び *in vivo* の多くの試験を記載したが，エンパグリフロジンの腎に対する有益な作用の正確な分子機構については，今後も研究が継続される。これらの薬理試験の結果に基づいて，エンパグリフロジンは CKD 患者に対する有望で革新的治療法となると考えられる。

Proprietary confidential information © 2022 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6. 参考文献

P13-15161 Vallon, V., Gerasimova, M., Rose, M. A., Masuda, T., Satriano, J., Mayoux, E., et al. SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice. American journal of physiology 2014; 306(2); F194–F204. ［CTD4.3-08_P13-15161］

P14-12076 Gembardt, F., Bartaun, C., Jarzebska, N., Mayoux, E., Todorov, V. T., Hohenstein, B., et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates early features of diabetic nephropathy in BTBR ob/ob type 2 diabetic mice with and without hypertension. American journal of physiology 2014; 307(3); F317–F325. ［CTD4.3-14_P14-12076］

P14-15469 Lin B., Koibuchi N., Hasegawa Y., Sueta D., Toyama K., Uekawa K., et al. Glycemic control with empagliflozin, a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. Cardiovasc Diabetol. 2014; 13; 148. ［CTD4.3-22_P14-15469］

P15-09840 Zinman B., Wanner C., Lachin JM., Fitchett D., Bluhmki E., Hantel S., et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. N Engl J Med. 2015; 373(22); 2117-2128. ［CTD4.3-01_P15-09840］

P16-06721 Ferrannini E., Mark M., Mayoux E. CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME Trial: A "Thrifty Substrate" Hypothesis. Diabetes Care 2016; 39(7); 1108-1114. ［CTD4.3-37_P16-06721］

P16-05352 Maltese G., Abou-Saleh A., Gnudi L., Karalliedde J. Preventing diabetic renal disease: the potential reno-protective effects of SGLT2 inhibitors. Br J Diabetes Vasc Dis 2015; 15(3); 114-118. ［CTD4.3-40_P16-05352］

P17-13884 Andreadou I., Efentakis P., Balafas E., Togliatto G., Davos CH., Varela A., et al. Empagliflozin limits myocardial infarction in vivo and cell death in vitro: role of STAT3, mitochondria, and redox aspects. Front Physiol 2017; 8; 1077. ［CTD4.3-21_P17-13884］

P18-04268 Heerspink HJL., Kosiborod M., Inzucchi SE., Cherney DZI. Renoprotective effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors. Kidney International 2018; 94(1); 26-39. ［CTD4.3-13_P18-04268］

P18-08803 Abdurrachim, D., Teo, X. Q., Woo, C. C., Chan, W. X., Lalic, J., Lam, C., et al. Empagliflozin reduces myocardial ketone utilization while preserving glucose utilization in diabetic hypertensive heart disease: A hyperpolarized 13 C magnetic resonance spectroscopy study. Diabetes, obesity & metabolism 2019; 21(2); 357–365. ［CTD4.3-33_P18-08803］

Proprietary confidential information © 2022 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

P18-09761 Abdurrachim D., Manders E., Nicolay K., Mayoux E., Prompers JJ. Single dose of empagliflozin increases in vivo cardiac energy status in diabetic db/db mice. Cardiovasc Res. 2018; 114(14); 1843-1844. ［CTD4.3-35_P18-09761］

P18-10152 Inzucchi SE., Kosiborod M., Fitchett D., Wanner C., Hehnke U., Kaspers S., et al. Improvement in cardiovascular outcomes with empagliflozin is independent of glycemic control. Circulation 2018; 138(17); 1904-1907. ［CTD4.3-38_P18-10152］

P18-10661 Yang, C. C., Chen, Y. T., Wallace, C. G., Chen, K. H., Cheng, B. C., Sung, P. H., et al. Early administration of empagliflozin preserved heart function in cardiorenal syndrome in rat. Biomedicine & pharmacotherapy 2019; 109; 658–670. ［CTD4.3-19_P18-10661］

P18-12030 Oshima, H., Miki, T., Kuno, A., Mizuno, M., Sato, T., Tanno, M., et al. Empagliflozin, an SGLT2 Inhibitor, Reduced the Mortality Rate after Acute Myocardial Infarction with Modification of Cardiac Metabolomes and Antioxidants in Diabetic Rats. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 2019; 368(3); 524–534. ［CTD4.3-36_P18-12030］

P19-01258 Li C., Zhang J., Xue M., Li X., Han F., Liu X., et al. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. Cardiovasc Diabetol. 2019; 18(1); 15. ［CTD4.3-25_P19-01258］

P19-02786 Lee, H. C., Shiou, Y. L., Jhuo, S. J., Chang, C. Y., Liu, P. L., Jhuang, W. J., et al. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin attenuates cardiac fibrosis and improves ventricular hemodynamics in hypertensive heart failure rats. Cardiovascular diabetology 2019; 18(1); 45. ［CTD4.3-30_P19-02786］

P19-03216 Santos-Gallego CG., Requena-Ibanez JA., San Antonio R., Ishikawa K., Watanabe S., Picatoste B., et al. Empagliflozin Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics. J Am Coll Cardiol. 2019; 73(15); 1931-1944. ［CTD4.3-34_P19-03216］

P19-03653 Yurista SR., Silljé HHW., Oberdorf-Maass SU., Schouten EM., Pavez Giani MG., Hillebrands JL., et al. Sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin improves cardiac function in non-diabetic rats with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Eur J Heart Fail 2019; 21(7); 862-873. ［CTD4.3-29_P19-03653］

P19-07273 Kidokoro, K., Cherney, D., Bozovic, A., Nagasu, H., Satoh, M., Kanda, E., et al. Evaluation of Glomerular Hemodynamic Function by Empagliflozin in Diabetic Mice Using In Vivo Imaging. Circulation 2019 ;140(4); 303–315. ［CTD4.3-07_P19-07273］

P19-07532 Xue, M., Li, T., Wang, Y., Chang, Y., Cheng, Y., Lu, Y., et al. Empagliflozin prevents cardiomyopathy via sGC-cGMP-PKG pathway in type 2 diabetes mice. Clinical science 2019; 133(15); 1705–1720. ［CTD4.3-24_P19-07532］

Proprietary confidential information © 2022 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

P19-10736 Thomson, S. C. & V. Vallon. Renal Effects of Sodium-Glucose Co- Transporter Inhibitors. Am J Cardiol. 2019; 124(Suppl 1); S28-S35. ［CTD4.3-15_P19-10736］

P19-10833 Lu, Q., Liu, J., Li, X., Sun, X., Zhang, J., Ren, D., et al. Empagliflozin attenuates ischemia and reperfusion injury through LKB1/AMPK signaling pathway. Molecular and cellular endocrinology 2020; 501; 110642. ［CTD4.3-32_P19-10833］

P19-10933 Oh CM., Cho S., Jang JY., Kim H., Chun S., Choi M., et al. Cardioprotective Potential of an SGLT2 Inhibitor Against Doxorubicin-Induced Heart Failure. Korean Circ J. 2019; 49(12); 1183-1195. ［CTD4.3-27_P19-10933］

P19-11151 Pennig, J., Scherrer, P., Gissler, M. C., Anto-Michel, N., Hoppe, N., Füner, L., et al. Glucose lowering by SGLT2-inhibitor empagliflozin accelerates atherosclerosis regression in hyperglycemic STZ-diabetic mice. Scientific reports 2019; 9(1); 17937. ［CTD4.3-20_P19-11151］

P19-11904 Das, N. A., Carpenter, A. J., Belenchia, A., Aroor, A. R., Noda, M., Siebenlist, U., et al. Empagliflozin reduces high glucose-induced oxidative stress and miR-21-dependent TRAF3IP2 induction and RECK suppression, and inhibits human renal proximal tubular epithelial cell migration and epithelial-to-mesenchymal transition. Cellular signalling 2020; 68; 109506. ［CTD4.3-05_P19-11904］

P20-00333 Castoldi, G., Carletti, R., Ippolito, S., Colzani, M., Barzaghi, F., Stella, A., et al. Renal Anti-Fibrotic Effect of Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibition in Angiotensin II-Dependent Hypertension. American journal of nephrology 2020; 51(2); 119–129. ［CTD4.3-11_P20-00333］

P20-00869 Byrne, N. J., Matsumura, N., Maayah, Z. H., Ferdaoussi, M., Takahara, S., Darwesh, A. M., et al. Empagliflozin Blunts Worsening Cardiac Dysfunction Associated With Reduced NLRP3 (Nucleotide- Binding Domain-Like Receptor Protein 3) Inflammasome Activation in Heart Failure. Circulation. Heart failure 2020; 13(1); e006277. ［CTD4.3-18_P20-00869］

P20-00978 Chowdhury, B., Luu, A. Z., Luu, V. Z., Kabir, M. G., Pan, Y., Teoh, H., et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces mortality and prevents progression in experimental pulmonary hypertension. Biochemical and biophysical research communications 2020; 524(1); 50–56. ［CTD4.3-28_P20-00978］

P20-05733 Maayah, Z. H., Ferdaoussi, M., Takahara, S., Soni, S., & Dyck, J. Empagliflozin suppresses inflammation and protects against acute septic renal injury. Inflammopharmacology 2021; 29; 269-279. ［CTD4.3-10_P20-05733］

Proprietary confidential information © 2022 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

P20-06846 Tomita, I., Kume, S., Sugahara, S., Osawa, N., Yamahara, K., Yasuda-Yamahara, M., et al. SGLT2 Inhibition Mediates Protection from Diabetic Kidney Disease by Promoting Ketone Body-Induced mTORC1 Inhibition. Cell metabolism 2020; 32(3); 404–419. ［CTD4.3-09_P20-06846］

P20-07032 Wanner, C., Inzucchi, S. E., Zinman, B., Koitka-Weber, A., Mattheus, M., George, J. T., et al. Consistent effects of empagliflozin on cardiovascular and kidney outcomes irrespective of diabetic kidney disease categories: Insights from the EMPA-REG OUTCOME trial. Diabetes, obesity & metabolism 2020; 22(12); 2335–2347. ［CTD4.3-02_P20-07032］

P20-07681 Packer, M., Anker, S. D., Butler, J., Filippatos, G., Pocock, S. J., Carson, P., et al. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. The New England journal of medicine 2020; 383(15); 1413–1424. ［CTD4.3-03_P20-07681］

P20-10198 Pirklbauer, M., Bernd, M., Fuchs, L., Staudinger, P., Corazza, U., Leierer, J., et al. Empagliflozin Inhibits Basal and IL-1β-Mediated MCP-1/CCL2 and Endothelin-1 Expression in Human Proximal Tubular Cells. International journal of molecular sciences 2020; 21(21); 8189. ［CTD4.3-06_P20-10198］

P21-03075 Castoldi, G., Carletti, R., Ippolito, S., Colzani, M., Barzaghi, F., Stella, A., et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition prevents renal fibrosis in cyclosporine nephropathy. Acta diabetologica 2021; 58(8); 1059–1070. ［CTD4.3-12_P21-03075］

P21-08234 Anker, S. D., Butler, J., Filippatos, G., Ferreira, J. P., Bocchi, E., Böhm, M., et al. Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. The New England journal of medicine 2021; 385(16); 1451–1461. ［CTD4.3-04_P21-08234］

P22-05313 Giri Ravindran, S., Kakarla, M., Ausaja Gambo, M., Yousri Salama, M., Haidar Ismail, N., Tavalla, P., et al. The Effects of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors (SLGT-2i) on Cardiovascular and Renal Outcomes in Non-diabetic Patients: A Systematic Review. Cureus 2022; 14(5); e25476. ［CTD4.3-39_P22-05313］

R22-2945 Irazabal, M. V., & Torres, V. E. Reactive Oxygen Species and Redox Signaling in Chronic Kidney Disease. Cells 2020; 9(6); 1342. ［CTD4.3-31_R22-2945］

R22-2946 Akchurin, O. M., & Kaskel, F. Update on inflammation in chronic kidney disease. Blood purification 2015; 39(1-3); 84–92. ［CTD4.3-16_R22-2946］

R22-2947 Eddy, A. A., & Neilson, E. G. Chronic kidney disease progression. Journal of the American Society of Nephrology. JASN 2006; 17(11); 2964–2966. ［CTD4.3-23_R22-2947］