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：	2.6.1 緒言
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

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

目　次

目　次 2
1.　緒　言 3

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

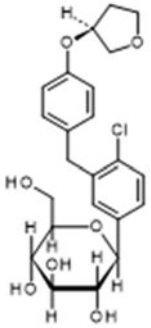
1. 緒 言

エンパグリフロジンは，経口投与可能なヒトナトリウム-グルコース共役輸送担体 2（SGLT2）に対する強力かつ選択的な阻害剤である。

エンパグリフロジンの化学名，構造式，分子式及び分子量は以下のとおりである。

化 学 名 ： (1*S*)-1,5-Anhydro-1-*C*-{4-chloro-3-[(4-{[(3*S*)-oxolan-3-yl]oxy}phenyl)methyl]phenyl}-D-glucitol

化学構造式：



分子式：$C_{23}H_{27}ClO_7$

分子量：450.91

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 を阻害することでグルコースの再吸収を抑制し，尿中へのグルコース排泄を促進し，結果として血糖値を低下させる。

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 型糖尿病患者の血糖コントロールの改善を適応として，2014 年 4 月以降に本邦をはじめ米国，欧州を含む 100 カ国以上で承認を受け，日本では，ジャディアンス®10 mg 錠及び 25 mg 錠が 2014 年 12 月に 2 型糖尿病の効能又は効果で承認され，販売されている。さらに，慢性心不全に関する適応は，左室駆出率が低下した慢性心不全治療薬として，EU（2021 年 6 月承認），米国（2021 年 8 月承認）を含む 80 カ国で，さらに，左室駆出率の保たれた患者に適応可能な慢性心不全治療薬として米国（2022 年 2 月承認），EU（2022 年 3 月承認）を含む 60 カ国以上で承認された。日本では，ジャディアンス®10 mg 錠が 2021 年 11 月に慢性心不全の効能・効果の追加承認を取得し，臨床現場で使用されている。

今回，臨床試験の結果に基づき，慢性腎臓病の治療を目的として，添付文書（案）［CTD 1.8-02 参照］に記載の効能又は効果，用法及び用量にて承認申請する。

非臨床試験として，既公表文献の結果を用いて，*in vitro* におけるヒト近位尿細管細胞を用いた細胞アッセイ，並びに糖尿病，又は正常血糖の腎疾患動物モデルを用いた試験によって，エンパグリフロジンの有効性を検討した［CTD 2.6.2 参照］。エンパグリフロジンの腎臓病に対する作用機序については，現時点で入手可能な知見を基に検討した。

なお，その他の薬理，薬物動態，及び毒性試験成績は，2 型糖尿病に対する治療薬としての承認申請時に提出済みである。

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：	2.6.2 薬理試験の概要文
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

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

目　次

目　次 2
略号一覧表 3
1. まとめ 5
2. 効力を裏付ける試験 7
2.1 背景と設定根拠 7
2.2 SGLT2 阻害薬:作用機序 7
2.3 *In vitro* 薬理試験 8
2.3.1 高グルコース条件下における *in vitro* 薬理試験 8
2.3.2 生理的グルコース条件下における *in vitro* 薬理試験 9
2.4 *In vivo* 薬理試験 10
2.4.1 糖尿病動物の疾患関連モデルを用いた試験 10
2.4.2 糖尿病ではない動物の疾患関連モデルを用いた試験 18
3. 副次的薬理試験 25
4. 安全性薬理試験 26
5. 薬力学的薬物相互作用試験 27
6. 考察及び結論 28
7. 図表 33
8. 参考文献 34

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

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
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
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
EMPA	Empagliflozin	エンパグリフロジン
EMPA-REG OUTCOME	Empagliflozin Cardiovascular Outcome Event Trial in Type 2 Diabetes Mellitus Patients	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
EMPEROR-Preserved	Empagliflozin Outcome Trial in Patients with Chronic Heart Failure with Preserved Ejection Fraction	左室駆出率が保たれた慢性心不全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-Reduced	Empagliflozin Outcome Trial in Patients with Chronic Heart Failure and a Reduced Ejection Fraction	左室駆出率が低下した慢性心不全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
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition	上皮間葉転換
ET-1	endothelin-1	エンドセリン－1
FITC	fluorescein isothiocyanate	フルオレセインイソチオシアナート
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
KUN	kidney urea nitrogen	腎組織中尿素窒素
LPS	Lipopolysaccharide	リポ多糖
LY	Lucifer yellow	ルシファーイエロー
Mac	macrophage differentiation antigen	-
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	単球走化性タンパク質－1
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1	哺乳類ラパマイシン標的タンパク質複合体 1
ND	normal diet	通常食
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	核内因子 κB
NS	no significance	有意性なし
P	probability (significance)	確率（有意性）
RAAS	renin-angiotensin-aldosterone system	レニンーアンジオテンシンーアルドステロン系
PTEC	proximal tubule epithelial cell	近位尿細管上皮細胞
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed	-

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

	and secreted	
RECK	reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs	-
RPTEC/TERT1	renal proximal tubule epithelial cell/TERT-immortalized 1	-
SD	Sprague Dawley	-
SE	standard error	標準誤差
S.E.M.	standard error of the mean	標準誤差
SGLT1	sodium-dependent glucose co-transporter 1	ナトリウムーグルコース共役輸送担体 1
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
T1DM	type 1 diabetes mellitus	1 型糖尿病
T2DM	type 2 diabetes mellitus	2 型糖尿病
TIMP2	tissue inhibitor of metalloproteinases 2	組織メタロプロテアーゼ阻害因子 2
TLR4	toll-like receptor 4	Toll 様受容体 4
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

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

1. まとめ

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）が促進され，その結果，血中グルコースを低下させる。この作用はエンパグリフロジンが 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し，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ことで生じる［P18-04268］。

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，主要評価項目（心血管死，非致死的心筋梗塞又は非致死的脳卒中からなる複合評価項目）のリスクを低下させ，また，心血管死，心不全による入院及びすべての原因による死亡のリスクを減少させた［P15-09840］。本試験において，アルブミン尿と推算糸球体濾過量（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は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させた［P20-07681，P21-08234］。

さらに，心血管系及び腎に対する有益な作用はエンパグリフロジンのグルコース低下作用とはほとんど無関係であり，糖尿病（DM）の有無にかかわらず観察された［P18-10152，P22-05313］。

この薬理試験概要文には，慢性腎臓病（CKD）患者の治療にエンパグリフロジンを使用する根拠を示すために，関連する公表済みの非臨床試験の結果を記載する。

腎疾患におけるエンパグリフロジンの作用を様々な刺激により病態が誘導される様々な薬理学的モデル，すなわちヒト近位尿細管細胞（HPTC）株を用いた *in vitro* 試験，及びマウス及びラットの DM 及び非 DM モデルを用いた *in vivo* 試験で検討した。

エンパグリフロジンは，*in vitro* で HPTC 株において酸化ストレス及び炎症を抑制した。また，*in vivo* において，エンパグリフロジンは DKD のマウスモデルの単一ネフロン糸球体濾過量

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

（SNGFR）と糸球体血行動態を改善した。加えて，エンパグリフロジンにより *in vivo* で炎症，リモデリング及び酸化ストレスが低下した。さらに，エンパグリフロジンは交感神経活性を減弱し，血漿中のケトン体の軽度な増加を誘導することによりエネルギー供給を改善する可能性が示された。T2DM 動物並びに非 DM 動物モデルにおいて，エンパグリフロジンの腎への有益な作用が確認された。

エンパグリフロジンの副次的薬理試験及び安全性薬理試験は，初回申請時に評価し，報告している［CTD 1.13.1-01_ジャディアンス®錠承認時申請資料］。安全性薬理試験において，エンパグリフロジンによる神経，肺，消化器，肝臓及び心血管系への影響は認められず腎機能への影響は予測された薬理学的変化に限定されていた。

以上のように，薬理試験の結果に基づくと，エンパグリフロジンは CKD 患者に対する革新的治療法となる可能性がある。しかし，これらの有益な作用をもたらす正確な分子メカニズムについては，現在も議論が続いており，複数の非臨床及び臨床試験で検討中である。

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

2. 効力を裏付ける試験

2.1 背景と設定根拠

CKD は，死亡率が高く世界的な健康上の大きな負担となっている。多くの場合，はっきりとした初期症状がなく，そのため，病気に気づかないうちに症状が進行していることがある。CKD は世界の人口の 10%以上に影響を与えているとされ，公衆衛生上の課題としてますます認知されてきている［R17-2620］。1980 年から 2017 年までの死亡率に関するデータを調べた Global Burden of Disease の研究によると，腎機能が低下した人の年齢調整死亡率は 100,000 人あたり 16 人と非常に高い。2017 年には CKD に起因した死亡は世界で約 1,200,000 人に及んでおり，2040 年までに CKD による死者が肺癌や乳癌，ヒト免疫不全ウイルス（HIV）／後天性免疫不全症候群（AIDS），早産による死者よりも多くなると予測されている［R19-4218，R19-4241］。CKD は様々な病態生理から発症する。DM は CKD の病態の主要な原因であり，高血圧や糸球体腎炎がこれに続く［R17-2623］。T2DM 患者の約 40%は eGFR 又はアルブミン尿の分類に基づく CKD であり，20%以上が臨床的に明らかな CKD（eGFR が 60 mL/min/1.73 m^2 未満）である［R17-2622，R15-5809，R13-4387］。CKD に伴う高い死亡リスクは，CKD が心不全を含む心血管疾患とともに心血管死や全死亡率のリスクと関連することから示されている［R17-2621，R15-5162］。最も頻度の高い CKD 患者の死因は心血管イベントである。

以上のように，CKD の治療薬の開発が広く必要とされている。

2.2 SGLT2 阻害薬：作用機序

エンパグリフロジンの腎臓の近位尿細管における SGLT2 阻害により，腎臓でのグルコース再吸収が抑制されて尿中へのグルコース排泄が促進され，その結果，血中グルコースが低下する。同時に，ナトリウムの再吸収が阻害され尿中のナトリウム濃度が上昇する。

しかし，エンパグリフロジンの心血管及び腎に対する保護作用は，SGLT2 阻害による UGE 作用とは無関係であるとされており，その保護作用機序は完全には解明されていない［P18-10152，P22-05313］。

SGLT2 阻害薬は，様々な機序を介して糸球体過剰濾過を減少させる。尿細管－糸球体フィードバック機構の回復，体重減少，血漿量及び全身血圧の低下，及び尿細管の酸素需要の減少による腎低酸素症の抑制は，すべて SGLT2 阻害による有益な作用であると考えられる［P20-10198］。

臨床試験におけるエンパグリフロジンの有益な作用は，少なくとも部分的には，レニンーアンジオテンシンーアルドステロン（RAAS）系などの神経体液性経路への効果に起因する可能性がある。また，エンパグリフロジンの効果として，ヘマトクリット値の上昇，血圧及び心臓交感神経活性の低下が認められている。さらに，エンパグリフロジンは DM 動物モデル並びに非 DM 動物モデルにおける腎臓病の症状を改善した（参考文献については以下の項を参照）。

その上，エンパグリフロジンはケトン体，すなわち βーヒドロキシ酪酸（βOHB）の血漿中濃度を上昇させた。ケトン体は，グルコース酸化に比べて酸素消費量が少なく，心臓や腎臓を含む不全器官の代替エネルギー源として働いていることが示唆されている［P16-06721］。また，エンパグリフロジンは生体内で線維化を含むリモデリングを抑制することが示されている。さらに，

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

in vitro 及び *in vivo* で炎症と酸化ストレスを減少させた。これらの作用は，エンパグリフロジンの有益な腎保護作用にも寄与する可能性がある。

しかしながら，CKD におけるエンパグリフロジンの作用の正確な分子メカニズムは，まだ検討中であり，複数の非臨床及び臨床研究で検討していく予定である。

2.3 *In vitro* 薬理試験

CKD は，GFR の低下，腎障害のマーカーの発現増加，又は両方の症状を少なくとも 3 カ月間示す腎機能の低下を特徴とする疾患である。この機能障害のほかに，酸化ストレス，炎症，内皮機能不全並びにリモデリングといった病態生理学的特徴がみられる。*In vitro* で CKD の様々な側面を検討するため，正常腎臓由来の HPTC 株（human kidney 2［HK-2］細胞株，renal proximal tubule epithelial cell/TERT-immortalized 1［RPTEC/TERT1］細胞株）を用いた *in vitro* 試験を実施した。DM は CKD 発症の主要な危険因子の一つであるため，生理学的濃度及び病理学的な高濃度グルコースの条件で試験を実施した。

2.3.1 高グルコース条件下における *in vitro* 薬理試験

In vitro でのヒト近位尿細管細胞における高濃度グルコース誘導酸化ストレスと炎症に対するエンパグリフロジンの作用

高濃度グルコース誘導酸化ストレスと炎症に対するエンパグリフロジンの作用を，*in vitro* において HPTC 株（HK-2）を用いて検討した。血清飢餓培養の HK-2 細胞を 25 mmol/L の D-グルコース（高濃度グルコース条件下）に 15 分間曝露した。エンパグリフロジンは 500 nmol/L の濃度で高濃度グルコース曝露の 15 分前に添加した。スーパーオキシド生成を Cytochrome C アッセイにより定量し，過酸化水素生成は Amplex Red アッセイにより定量した。マンニトールは浸透圧対照として使用した。実験は 6 回行った。

高濃度グルコースに曝露すると，HK-2 細胞のスーパーオキシド生成は対照と比べて有意に亢進した（$p<0.05$）。エンパグリフロジンは，*in vitro* でスーパーオキシド生成の亢進を有意に抑制した（$p<0.05$）（図2.3.1: 1）。エンパグリフロジンは HK-2 細胞の高濃度グルコースで誘導された過酸化水素生成の亢進も同様に有意に抑制した（$p<0.05$）。高濃度グルコースに曝露した HK-2 細胞では，膜結合型の内在性マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）阻害分子及び抗線維化メディエーターである reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs（RECK）の発現が抑制された。この RECK の抑制は，エンパグリフロジンにより阻害された。さらに，エンパグリフロジンは，高濃度グルコースによる TRAF3 interacting protein 2（TRAF3IP2），核内因子 κB（NF-κB），p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK），miR-21，インターロイキン（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／CC－ケモカインリガンド 2（MCP-1／CCL2）を含む炎症誘導性及び線維化促進性メディエーターの発現増加を抑制した。

炎症経路に加えて，高濃度グルコースへの曝露により HK-2 細胞において上皮間葉転換（EMT）が誘導され，上皮マーカーである E-カドヘリンの発現は減少し，線維化マーカーであるフィブ

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

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 の発現は上昇した。エンパグリフロジンは正常な E-カドヘリン発現を回復させ，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 発現を抑制した［CTD4.3-05_P19-11904］。

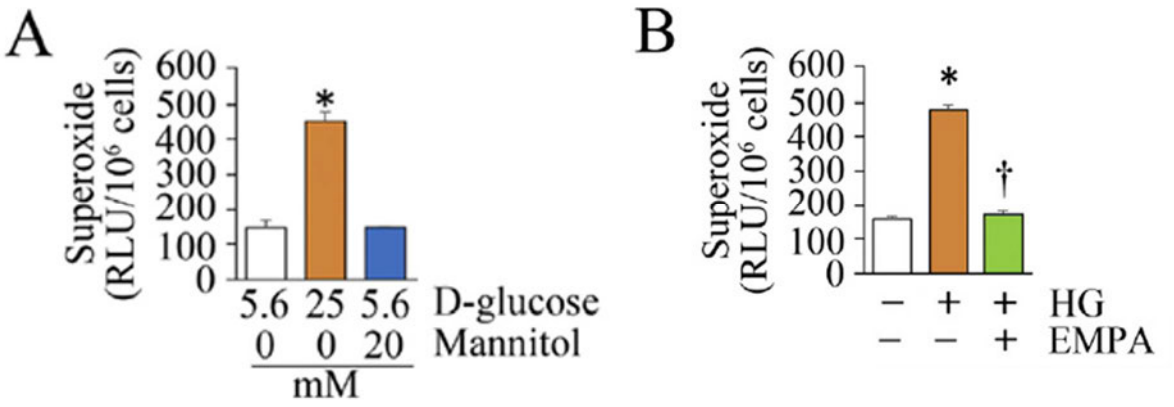


図2.3.1: 1 （A）高濃度グルコース（HG，25 mmol/L）による HK-2 細胞のスーパーオキシド生成。（B）HK-2 細胞の高濃度グルコース誘導スーパーオキシド生成に対するエンパグリフロジンの作用。データは平均値±S.E.M.で示す。n=6。* p<0.05（マンニトール又は 5.6 mmol/L D-グルコースとの比較），†p<0.05（高濃度グルコースとの比較），ANOVA 及び Dunnett 検定［P19-11904 一部改編］。

要約すると，HK-2 細胞の高濃度グルコース曝露により，スーパーオキシド及び過酸化水素生成が誘導され，抗線維化メディエーターである RECK の発現抑制による EMT の誘導，並びに炎症メディエーター放出が起こる。エンパグリフロジンは，*in vitro* で HK-2 細胞におけるこれらの高濃度グルコース誘導病態生理学的作用をすべて抑制した。

結論として，エンパグリフロジンは *in vitro* で高濃度グルコースに曝露した HK-2 細胞において抗酸化，抗リモデリング並びに抗炎症作用を示し，EMT を抑制した。

2.3.2 生理的グルコース条件下における *in vitro* 薬理試験

ヒト近位尿細管細胞の IL-1β 誘導性炎症応答に及ぼすエンパグリフロジンの作用

エンパグリフロジンが IL-1β 誘導 MCP-1／CCL2 及びエンドセリン－1（ET-1）発現に及ぼす影響について，2 種類の HPTC 株（HK-2 及び RPTEC/TERT1）を用いて，通常のグルコース濃度下で検討を行った。炎症性刺激として IL-1β（10 ng/mL）に曝露したときの mRNA やタンパク濃度を指標に，エンパグリフロジンによる遺伝子発現調節を検討した。マイクロアレイハイブリダイゼーションを用いた検討の結果，両細胞系で，IL-1β 添加下で 24 時間培養すると 259 遺伝子の発現が一律に増加したが，500 nmol/L の濃度のエンパグリフロジンを添加することによりこの遺伝子発現増加が抑制された。これらの遺伝子の機能的アノテーションにより，8 つの経路クラスターが同定された。

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

MCP-1／CCL2 及び ET-1 は CKD の初期病因へ関与することから，mRNA やタンパクレベルでの検証の指標に使用した。IL-1β 添加と同時にエンパグリフロジンを添加したとき，両 HPTC 株での IL-1β による MCP-1／CCL2 と ET-1 mRNA 発現を IL-1β 刺激後 1 時間から少なくとも 24 時間まで，エンパグリフロジン非添加での発現量の 1/5 まで阻害した。これらの分子のエンパグリフロジンによる阻害はタンパクレベルでも確認された［CTD4.3-06_P20-10198］。

要約すると，IL-1β による HK-2 又は RPTEC/TERT1 細胞への炎症性刺激により，これら 2 つの HPTC 株における 259 遺伝子の発現増加がマイクロアレイハイブリダイゼーション解析により明らかとなった。クラスター分析により MCP-1／CCL2 及び ET-1 mRNA 発現の増加が示され，さらにタンパクレベルでも確認された。これらの遺伝子発現及びタンパクレベルの発現の増加は，エンパグリフロジンによって抑制された。

結論として，2 つの異なる HPTC 細胞株を使用した *in vitro* 試験において，エンパグリフロジンは，炎症機構の促進を抑制した。

2.4 *In vivo* 薬理試験

2.4.1 糖尿病動物の疾患関連モデルを用いた試験

DM は CKD 発症の主要な危険因子の一つであるため，DM 動物モデルを用いて以下の *in vivo* 試験を実施した。DM は，動物モデルにおいて異なる方法で誘導することができる。遺伝的に DM を示す Akita マウス，肥満，インスリン抵抗性，続いて DKD を生じるレプチンの劣性変異を有する BTBR ob/ob マウス，又はアテローム性動脈硬化症傾向を示すアポリポタンパク E 欠損（ApoE-/-）マウスを用いて試験を行なった。これらのマウスは異なる強度で過剰濾過，タンパク尿又は腎障害のような症状を伴う腎臓の病態生理を示す。

In vivo イメージングを用いた糖尿病マウスの糸球体血行動態機能に対するエンパグリフロジンの作用

糸球体血行動態に対するエンパグリフロジンの作用を，1 型糖尿病（T1DM）のモデルである雄の Ins2+/Akita マウスで検討した。Ins2+/Akita マウスは，インスリンタンパクの不正確な折り畳み，膵臓の β 細胞数の減少及びインスリン分泌の減少をもたらすインスリン遺伝子の自然変異を有する。6~7 週齢の Ins2+/Akita マウス，又は野生型（WT）対照として C57BL/6 マウス（n=5~8）にエンパグリフロジン（20 mg/kg/日）を 4 週間強制経口投与した。インスリン（0.05~0.1 U/body/日）を皮下投与した Ins2+/Akita マウスを血中グルコース濃度の対照として用いた。SNGFR は多光子顕微鏡を用いて測定した。最初に表層糸球体とそれに続く近位尿細管を 100 μm の最小光学断層像内で捉えた。次に，糸球体を自由に透過する蛍光色素「ルシファーイエロー（LY）」を動物の頚動脈に注入し，濾過された LY の近位尿細管の下流への通過を可視した。SNGFR は，近位尿細管起始部の約 100~200 μm 離れた 2 つの関心領域（ROI）内の LY の蛍光強度変化を測定して算出した。

Ins2+/Akita マウスにおける SNGFR は WT 対照群よりも有意に高く（$p<0.05$），DM 動物の糸球体過剰濾過を示した。インスリンを 4 週間皮下投与したマウスでは，溶媒投与 Ins2+/Akita マウ

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

スと比較して血中グルコース濃度が 738 ± 25 mg/dL から 473 ± 47 mg/dL へ有意に低下した（p<0.05）。エンパグリフロジン（20 mg/kg/日）を投与したマウスでは，インスリンと同様に，溶媒投与 Ins2+/Akita マウスに比べて血中グルコース濃度が 738 ± 25 mg/dL から 512 ± 29 mg/dL へ有意に低下した（p<0.05）。

Ins2+/Akita マウスにおいてエンパグリフロジンの投与により，溶媒投与に比べて SNGFR が有意に低下した（p<0.05）。対照的に，インスリン投与は血中グルコースを効果的に低下させたが，SNGFR に対しては有意な効果を示さなかった。クレアチニンクリアランスについても同様の結果が得られた（図2.4.1: 1）。

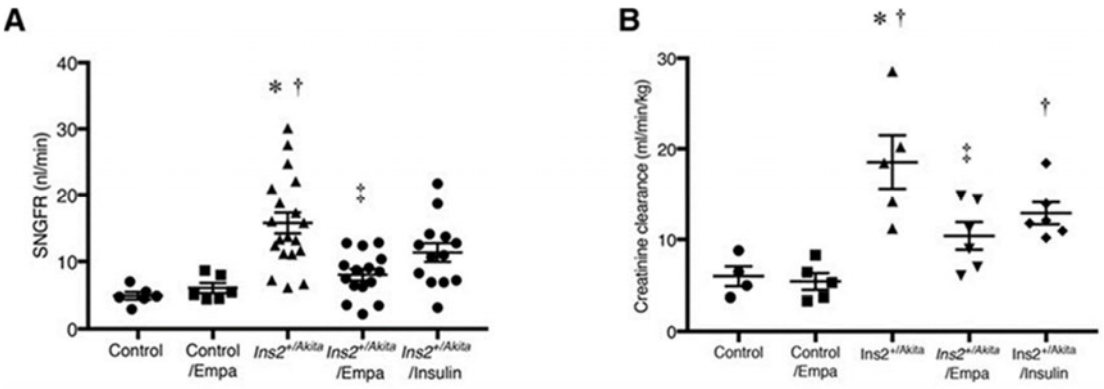


図2.4.1: 1 糖尿病 Ins2+/Akita マウスの（A） 単一ネフロン糸球体濾過量（SNGFR），（B） クレアチニンクリアランスに対するエンパグリフロジンの作用。データは平均値±S.E.M.で示す。n=5~8。*p<0.05（野生型対照［Control］群との比較），†p<0.05（エンパグリフロジンを投与した野生型対照［Control/Empa］群との比較），‡p<0.05（Ins2+/Akita マウスとの比較），ANOVA 及び Tukey 検定［P19-07273 一部改編］

破綻した尿細管－糸球体フィードバック機構による輸入細動脈の拡張は，糸球体過剰濾過と糸球体圧上昇に関与すると推測される。エンパグリフロジンの糸球体血行動態に及ぼす影響を *in vivo* イメージングを用いて測定した。Ins2+/Akita マウスは輸入細動脈拡張（p<0.01）とアルブミンの糸球体透過性増加を示した。エンパグリフロジンは統計的に有意に輸入細動脈拡張とアルブミンの糸球体透過性増加を改善した（p<0.01）。腎機能に対するエンパグリフロジンの作用は，アデノシン A1 受容体拮抗剤により阻害されたが，神経型一酸化窒素合成酵素阻害剤やシクロオキシゲナーゼ-2 阻害剤では阻害されなかった［CTD4.3-07_P19-07273］。このことからエンパグリフロジンが尿細管－糸球体フィードバック機構の回復に関与することが考えられる。

要約すると，Ins2+/Akita マウスは高い血中グルコース濃度を指標とした DM を発症した。WT 対照群と比較して Ins2+/Akita マウスでは SNGFR が増加した。血中グルコース濃度はインスリン投与と同様にエンパグリフロジン投与により低下した。インスリン投与では SNGFR に影響はな

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

かったが，対照的に，エンパグリフロジンは SNGFR を有意に低下させた（$p<0.05$）。さらに，エンパグリフロジンは付随する腎臓の細輸入細動脈の血管拡張を改善した。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。

結論として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 と糸球体血行動態に有益な効果を与えたと考えられる。

糖尿病マウスの糖尿病性腎肥大，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

DKD に対するエンパグリフロジンの作用を雄の Ins2+/Akita DM マウスモデル（$Ins2^{+/C96Y}$；Akita/+，以下 Akita/+と示す）で試験し，$Ins2^{+/+}$同腹仔を WT 対照として用いた（n=10~13）。

4 週齢の雄マウスに，0.03%のエンパグリフロジン又は対照（賦形剤）を含む通常のげっ歯類用の餌を 15 週間与えた。

エンパグリフロジンを与えた WT マウスは尿中グルコース／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示し，この用量において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。

Akita/+マウスは，WT マウスと比較して，血漿中インスリン濃度が 90%減少し，血中グルコース濃度が 5 倍上昇した。エンパグリフロジンはこの高血糖性の Akita/+マウスの血中グルコース濃度を 60%低下させた。

Tail-cuff 法を用いた自動血圧装置より覚醒マウスの血圧を測定した。収縮期血圧は，WT マウスに対して Akita/+マウスで上昇した。エンパグリフロジンは，対照食を与えたマウスと比較して，Akita/+マウスにおけるこの収縮期血圧の上昇を抑制した。心拍数は Akita/+マウスも WT マウスもエンパグリフロジン曝露の有無にかかわらず変化はなかった（図2.4.1: 2）。

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

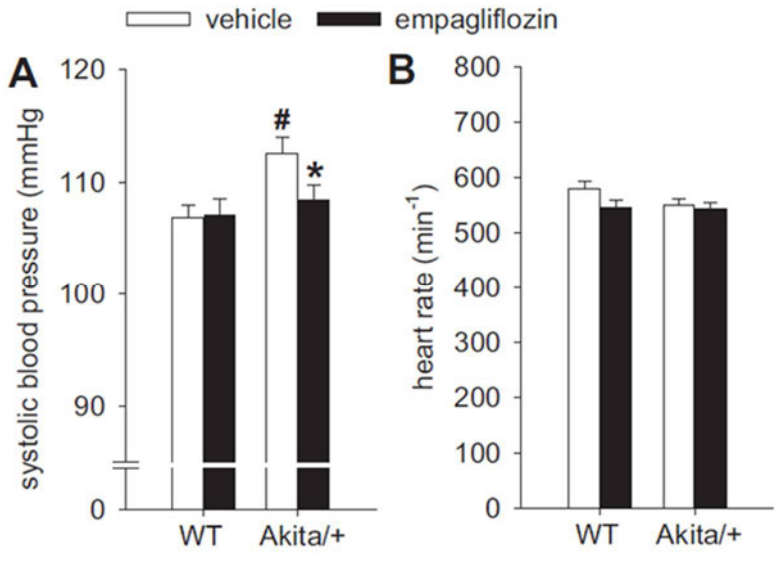


図2.4.1: 2 Akita/+マウスにおけるエンパグリフロジンの（A）収縮期血圧，及び（B）心拍数への作用。データは平均値±SE で示す。各群 n=10~13。*p<0.05（同一遺伝子型における対照食群との比較），#p<0.05（WT マウスとの比較）。ANOVA 及び対応のない Student の t 検定［P13-15161 一部改変］。

糸球体濾過量（GFR）は，GFR マーカーであるフルオレセインイソチオシアナート（FITC）-Sinistrin（Fresenius-Kabi）の，単回静脈内投与後の血漿中動態を用いて測定した。GFR は，WT マウスと比較して Akita/+群で 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 WT マウスの GFR をわずかに低下させ（エンパグリフロジン投与群：250 µL/min，対照食群：306 µL/min，p<0.05），Akita/+マウスの DM による GFR 上昇を完全に抑制した（エンパグリフロジン投与群：255 µL/min，対照食群：397 µL/min，p<0.05）（図2.4.1: 3）。エンパグリフロジンは，血中グルコース濃度の低下に伴って，WT マウスと比較して Akita/+マウスで認められた腎臓重量及び尿中アルブミン／クレアチニン濃度比の増加を抑制し，糸球体の大きさを正常化させた。

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

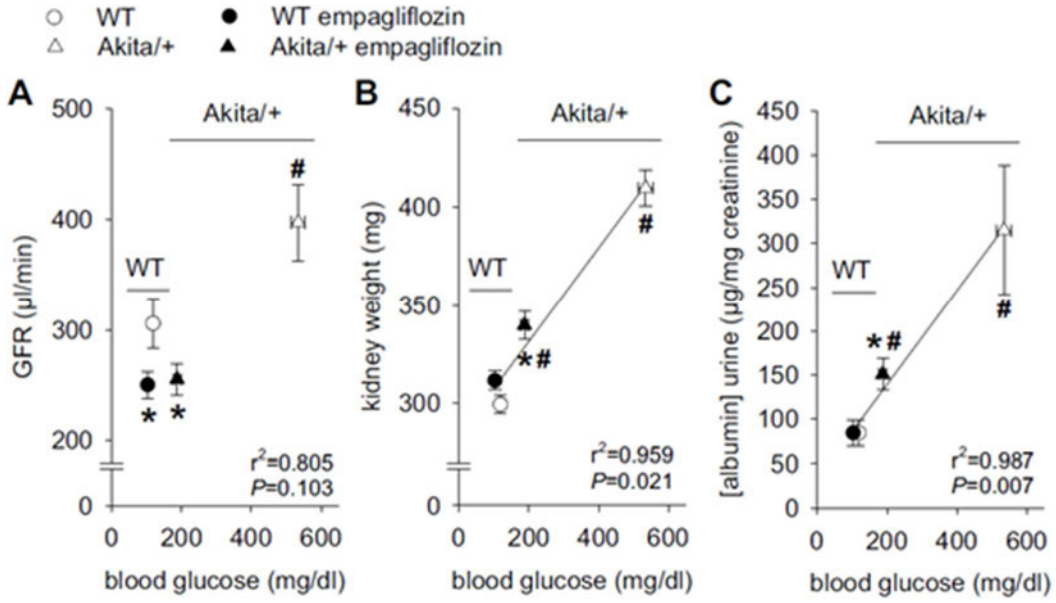


図2.4.1: 3 （A）糸球体濾過量（GFR），（B）腎臓重量，及び（C）アルブミン尿に対するエンパグリフロジンの作用。データは平均値±SE で示す。n=10~13。*p<0.05 （同一遺伝子型における対照食群との比較），#p<0.05（WT マウスとの比較）。ANOVA 及び対応のない Student の t 検定と線形回帰分析。統計学的有意が得られた場合は線形回帰直線を含めた［P13-15161 一部改編］。

NF-κB は，炎症性サイトカインを含むサイトカイン産生を担う転写調節因子である。Akita/+マウスは，WT マウスと比較して腎臓内の NF-κB の mRNA 発現量が増加し，さらに MCP-1／CCL2，CD14，IL-6，及び組織メタロプロテアーゼ阻害因子 2（TIMP2）の mRNA 発現量も増加した。エンパグリフロジンは，Akita/+の腎臓におけるこれらすべての炎症性マーカーの mRNA 発現量を低下又は正常化したが，WT マウスでの発現には大きな影響を及ぼさなかった［CTD4.3-08_P13-15161］。

要約すると，Akita/+マウスは，WT マウスと比較して，血漿中インスリンレベルが顕著に低下し血中グルコース濃度が 5 倍増加した（p<0.05）。さらに GFR，腎臓重量と尿中アルブミン濃度が有意に増加し（p<0.05）DKD の徴候を示した。これらの作用はすべて，エンパグリフロジンによって有意に抑制された（p<0.05）。さらに，NF-κB，CD14，炎症性メディエーターである MCP-1／CCL2， IL-6 及び TIMP2 の mRNA 発現量は，Akita/+マウスの腎臓で増加した。エンパグリフロジンはこれらの組織中 mRNA レベルを低下又は正常化した。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。

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

結論として，エンパグリフロジンは，DM Akita/+マウスにおいて収縮期血圧の上昇を抑制し，糸球体の大きさを正常化させ，さらに糖尿病性腎肥大の分子マーカーの発現，及び炎症を抑制した。

高血圧の有無によるマウスの糖尿病性腎臓病に対するエンパグリフロジンの作用

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。

正常血圧マウスの実験には，8 週齢の雌の BTBR ob/ob マウス，並びに対照として性及び年齢を一致させた WT マウスを用いた。マウス（n=12）に 0.03%のエンパグリフロジン又は同等カロリーの対照（賦形剤）を含む餌を 12 週間与えた。血糖値は，アキュチェックアビバ血糖計（Roche Diagnostics）で試験開始前と開始後 3，6，12 週目に測定した。高血圧マウスを用いた実験は別の条件で行った。高血圧を誘導するために，雄の BTBR ob/ob マウス（8 週齢，n=16）に 1 µg/kg/日のアンジオテンシン II（Ang II）を放出する Alzet 浸透圧ミニポンプを移植することで Ang II を皮下投与した。ミニポンプの移植 3 日後から 6 週間，マウスをエンパグリフロジン投与群と対照食群に等しく分けた。血糖値はエンパグリフロジン又は対照食を与える前と後 3 週目と 6 週目に測定した。マウスを代謝ケージに 24 時間置き，尿分析のために尿を採取した。血漿中クレアチニン濃度は，酵素クレアチニンアッセイ（Crystal Chem）を用いて測定した。ナトリウムーグルコース共役輸送担体 1（SGLT1）及び SGLT2 の発現は，それぞれの抗体を用いた免疫組織化学法，ウエスタンブロット法により検討した。タンパク発現量は β-actin 量により標準化した。

DM の BTBR ob/ob マウスでは，WT マウスと比較して，腎臓の SGLT1 及び SGLT2 タンパク発現量がそれぞれ 65%及び 64%増加した。エンパグリフロジンはこれらのタンパク発現には影響しなかった。また，BTBR ob/ob マウスでは，WT マウスと比較して UGE が増加した。エンパグリフロジン投与開始から 3 週間後，BTBR ob/ob マウスでは尿中グルコース濃度が 3 倍以上増加し，この増加は実験期間全体にわたって持続したことから，エンパグリフロジンの十分な曝露を実証している。UGE の増加により，BTBR ob/ob マウスの血糖は顕著に減少した。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，対照食群と比較して，アルブミン尿が有意に減少した（$p<0.05$）（図2.4.1: 4）。BTBR ob/ob マウスにエンパグリフロジンを 12 週間投与したところ，炎症誘導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 発現量が有意に減少し（$p<0.05$），腎臓の炎症が抑制された。

Alzet ミニポンプにより Ang II を 6 週間投与し，BTBR ob/ob マウスに持続的に重度の高血圧を誘導した。Ang II 投与により，約 150 mmHg の血圧値が誘導された。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（高血圧 BTBR ob/ob マウス： 4814 ± 630 µmol/mg クレアチニン，正常血圧 BTBR ob/ob マウス: 2182 ± 972 µmol/mg クレアチニン，$P < 0.001$）。エンパグリフロジ

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

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 を誘導した。正常血圧マウスで観察されたように，エンパグリフロジンによる UGE の増加は試験全体にわたって持続した。エンパグリフロジンは高血圧 BTBR ob/ob マウスにおいて尿中アルブミン濃度を70%減少させたが（図2.4.1: 4），クレアチニンクリアランス及び糸球体肥大に対する影響は認められなかった［CTD4.3-14_P14-12076］。

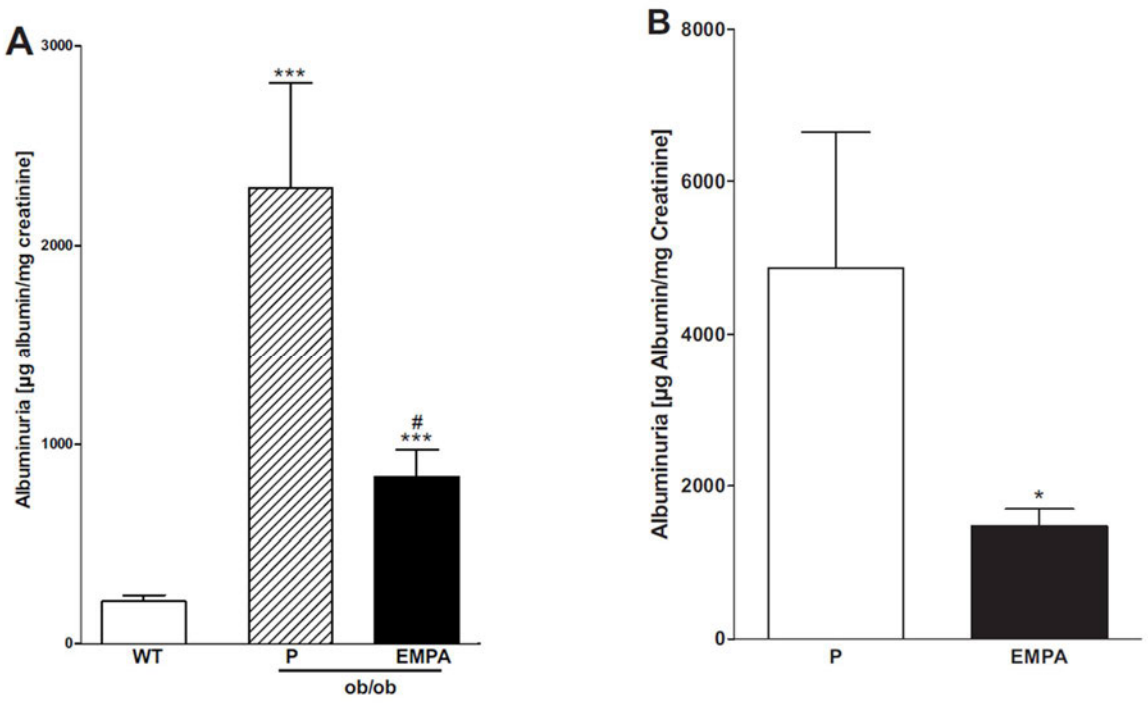


図2.4.1: 4 **アンジオテンシン II 誘導性高血圧を（A）伴わない，又は（B）伴う BTBR ob/ob マウスのアルブミン尿症に対するエンパグリフロジンの作用。データは平均値±SE で示す。A：n>8。***p<0.001（WT マウスとの比較），$^{\#}$p<0.05（対照食を与えた BTBR ob/ob マウスとの比較），B：n>6。*p<0.05（対照食を与えた BTBR ob/ob マウスとの比較），Student の t 検定［P14-12076 一部改編］。**

要約すると，BTBR ob/ob マウスは T2DM と腎疾患を自然発症するモデルであり，浸透圧ミニポンプによる Ang II の投与により高血圧が誘導された。混餌投与したエンパグリフロジンは，正常及び高血圧 BTBR ob/ob マウスにおいて糖尿を誘導し，血中グルコース濃度を低下させた。エンパグリフロジンを 12 週間以上投与することにより腎の過剰濾過と糸球体肥大が減少した。エンパグリフロジンは高血圧の有無にかかわらず， BTBR ob/ob マウスのアルブミン尿を有意に減少させた（p<0.05）。さらに，エンパグリフロジンは，12 週間投与後に炎症性サイトカインである MCP-1／CCL2，RANTES，及び IL-6 の mRNA 発現量を減少させた（p<0.05）。

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

結論として，エンパグリフロジンは，高血圧の有無にかかわらず，BTBR ob/ob マウスにおいて DKD の初期特徴，特にアルブミン尿症を改善した。

マウスの慢性腎臓病発症に対するエンパグリフロジンの作用

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，高脂肪食（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。10 週齢の雄 ApoE-/-マウスとその同腹仔の対照 ApoE+/+マウスに，それぞれ 60%HFD 又は通常食（ND）を合計 24 週間与えた（n = 5~6）。HFD を与えた ApoE-/-マウスは，ND を与えた ApoE+/+マウスと比較して，肥満と高血糖症（それぞれ 183 ± 15 mg/dL 及び 118 ± 12 mg/dL，$p<0.05$）を示した。

雄 ApoE-/-マウスとその同腹仔の対照 ApoE+/+マウス（10 週齢，n=8）に HFD を 16 週間与えた後，エンパグリフロジン（30 mg/kg/日）又は溶媒を 8 週間経口投与した。次にマウスを安楽殺し，アテローム性動脈硬化症，腎血流，腎組織及び腎機能を調べた。HFD を 16 週間与えたことによって，ApoE-/-マウスにおいて高血糖症が誘導された。また，このマウス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が観察された（図 2.4.1: 5）。さらに，ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色による顕微観察評価では，糸球体肥大と線維化を伴うメサンギウム領域の拡大，空胞変性，重度の尿細管間質性炎症及び線維化を伴う近位尿細管上皮細胞（PTEC）における組織損傷が観察されたが，ポドサイト損傷は認められなかった。

このように，HFD を与えた ApoE-/-マウスは，進行した尿細管間質病変と大血管及び微小血管損傷を伴う非タンパク尿性腎機能障害の表現型を示した。HFD を与えた ApoE-/-マウスの腎臓のアデノシン三リン酸（ATP）レベルは ND を与えたマウスよりも低かった。エンパグリフロジンは HFD を与えた ApoE-/-マウスにおいて空腹時に血糖値を有意に低下させ（$p<0.001$），ケトン体濃度を増加させた。さらに，エンパグリフロジン投与により，糸球体傷害の抑制，尿細管細胞の変性とアポトーシスの阻害，尿細管間質の線維化と炎症の抑制，PTEC のミトコンドリア異常抑制及び血漿中シスタチン C 濃度の低下を示した。さらに，エンパグリフロジンは腎臓の ATP 濃度を回復させ（図2.4.1: 5），これは腎機能の改善と関連していた。

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

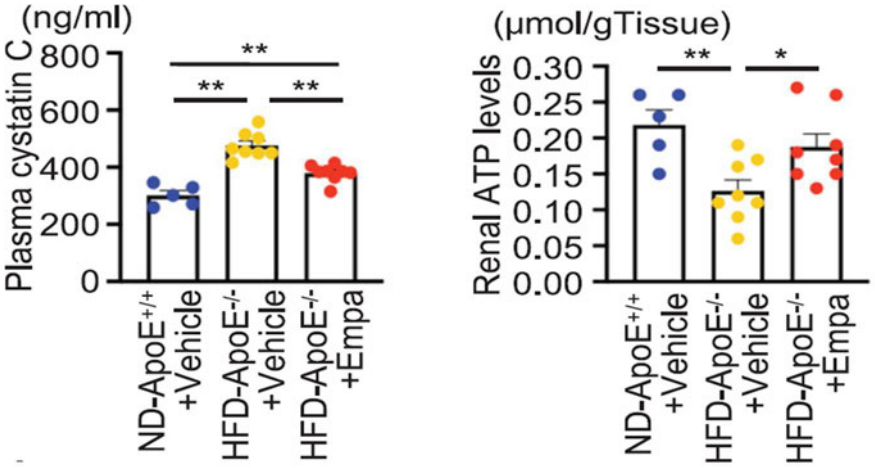


図2.4.1: 5　　高脂肪食を与えた ApoE-/-マウスの腎障害に対するエンパグリフロジンの作用。データは平均値±S.E.M.で示す。*p<0.05，**p<0.01，ANOVA 及び Tukey 検定（多群間比較）又は Student の t 検定（2 群間比較）［P20-06846 一部改編］。

ケトン体前駆体であるケトン 1,3－ブタンジオール（1,3-BD）の投与でも同様の腎保護作用が認められた。ケトン体の供給は，哺乳類ラパマイシン標的タンパク質複合体 1（mTORC1）シグナル伝達を遮断することにより腎障害を改善すると考えられる。エンパグリフロジンを投与した雄の ApoE-/-マウス（10 週齢，n=5~8）では血漿中ケトン体濃度が増加した。ケトン体生成の主要な酵素である 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA シンターゼ 2（HMGCS2）の遺伝子を欠損した雄マウス（10 週齢，n=7~15）では，HFD を与えた ApoE-/-マウスで観察されたエンパグリフロジンの腎保護作用は消失した［CTD4.3-09_P20-06846］。

要約すると，ApoE-/-マウスへ HFD を与えると，血漿中シスタチン C の増加，ATP レベルの減少，線維化と軽度アルブミン尿を伴う糸球体肥大，並びにメサンギウム領域の拡大，尿細管間質病変の進行と大血管及び微小血管損傷を伴う腎不全が誘導された。エンパグリフロジンは，糸球体傷害を抑制し，尿細管細胞の変性を阻害した。さらにエンパグリフロジンは尿細管間質線維化及び炎症を抑制し，PTEC におけるミトコンドリア異常及び血漿中シスタチン C の上昇を抑制した。その上，エンパグリフロジンは，腎機能の改善に関連する腎臓の ATP 濃度を回復させた。

結論として，エンパグリフロジンは PTEC における糸球体傷害，尿細管間質線維化及び炎症を抑制し，血漿中シスタチン C の上昇を抑制した。つまり，エンパグリフロジンは *in vivo* で ApoE-/-マウスにおける軽度のアルブミン尿を伴う DKD の徴候を減弱させた。

2.4.2　　非糖尿病動物の疾患関連モデルを用いた試験

非臨床モデルにおいて，腎疾患を誘導する方法は複数存在する。エンパグリフロジンによる腎障害の抑制は，マウスのリポ多糖（LPS）誘導急性敗血症性腎障害モデルで試験した。さらに，

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

マウスの 5/6 腎摘モデル，ラットの Ang II 依存性高血圧モデル又はラットのシクロスポリン投与モデルを使用した。

マウスの LPS 誘導急性敗血症性腎障害モデルに対するエンパグリフロジンの作用

8 週齢の雄 C57BL/6N マウス（n=10）にエンパグリフロジン（10 mg/kg/日）又は溶媒（1%ジメチルスルホキシド［DMSO］）を 1 日 3 回経口投与した。3 日目に，LPS 10 mg/kg を単回腹腔内投与することにより急性敗血症性腎障害を誘導し，対照群には生理食塩水を単回腹腔内投与した。

血中尿素窒素（BUN）と腎組織中尿素窒素（KUN）を腎機能のマーカーとして測定した。BUN 及び KUN は，健常な生理食塩水投与対照群と比較して LPS 投与マウスで有意に増加し（$p<0.05$）（図2.4.2: 1），腎障害が示された。さらに，LPS 投与マウスは，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の増加を示した。加えて，腎線維化マーカーである I 型コラーゲン及び IV 型コラーゲンは，生理食塩水投与対照マウスと比較して有意に増加していた（$p<0.05$）。LPS 投与前にエンパグリフロジンを投与したマウスでは溶媒投与したマウスと比較して，BUN 及び KUN の増加が抑制されメサンギウム基質及び細胞の増殖が回復し，糸球体及び間質のコラーゲン沈着が減少し，腎線維化マーカーである I 型コラーゲン及び IV 型コラーゲンが減少していた（図2.4.2: 1）。

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

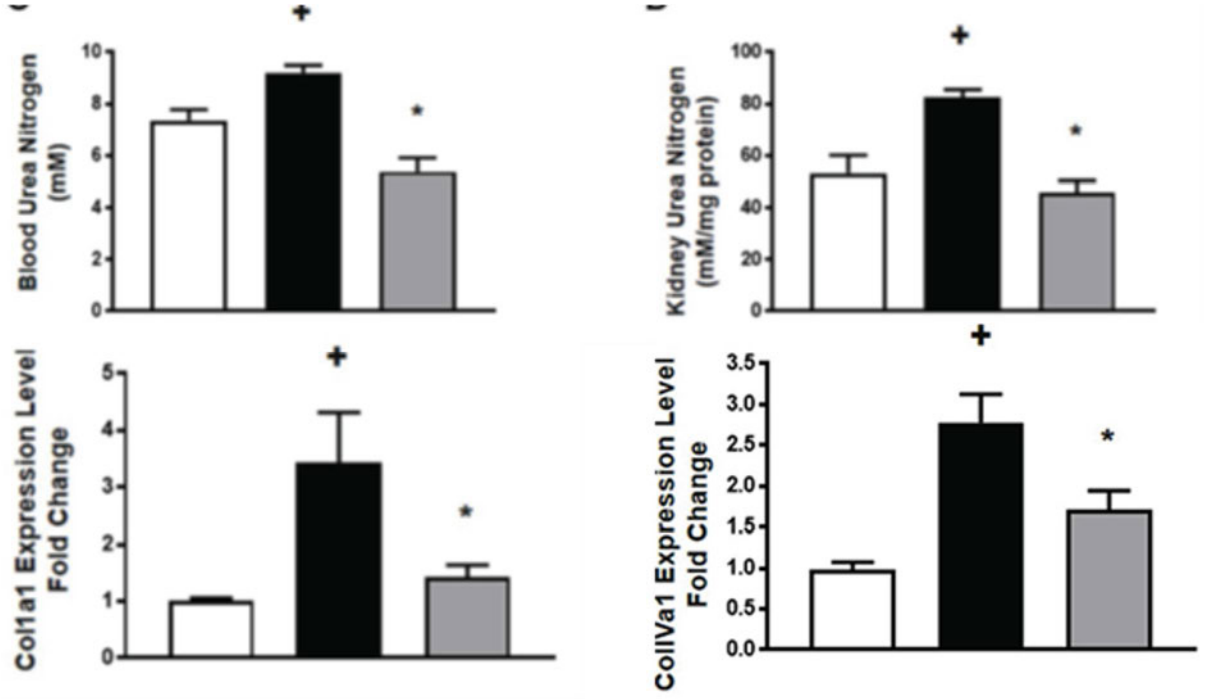


図2.4.2: 1　マウスの LPS 誘導急性敗血症性腎障害モデルにおける血中尿素窒素（BUN），腎組織中尿素窒素（KUN），腎 I 型コラーゲン（コラーゲン 1a1［col1a1］）及び IV 型コラーゲン（コラーゲン IVa1［colIVa1］）に対するエンパグリフロジンの作用。白=生理食塩水投与対照群，黒=溶媒+LPS 群，灰色=エンパグリフロジン+LPS 群を示す。データは平均値±S.E.M.で示す。n=10。+p<0.05（生理食塩水投与対照群との比較），*p<0.05（溶媒+LPS 群との比較），ANOVA 及び Tukey 検定［P20-05733］。

溶媒投与マウスに LPS を投与すると，Toll 様受容体 4（TLR4），ガレクチン-3 及び炎症マーカーである TNF-α， IL-6，IL-18，及びカスパーゼ-1，並びにマクロファージマーカーである F4/80，CD68，及び macrophage differentiation antigen（Mac）3 が発現増加した。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低下させた（p<0.05）。

溶媒投与群で死亡率が増加したのとは対照的に，LPS 投与の前にエンパグリフロジンを投与した群では死亡率がより低かった。

LPS 誘導性炎症に対するエンパグリフロジンの作用を調べるために，別の雄マウス（8 週齢，n = 6）に，生理食塩水又は LPS（10 mg/kg）を単回腹腔内投与し，その 3 時間後にエンパグリフロジン（10 mg/kg）又は溶媒を経口投与した。

LPS 投与後に溶媒を経口投与したマウスでは，IL-5，IL-6，IL-16，IL-17，TNF-α，Leukemia inhibitory factor （LIF）及びインターフェロン γ（INF-γ），並びに γ インターフェロン誘導性モノカイン（MIG），インターフェロン γ 誘導タンパク 10（IP-10），CCL5，CCL17，CCL19 及び

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

CCL20 が増加した。エンパグリフロジンは，LPS 投与マウスにおける IL-1β 及びその他のサイトカインとケモカインを有意に減少させた（p<0.05）［CTD4.3-10_P20-05733］。

要約すると，エンパグリフロジンは腎障害マーカーの増加，メサンギウム基質及びメサンギウム細胞の拡大の増加，糸球体及び間質のコラーゲン沈着を抑制した。さらに，エンパグリフロジン投与群は，溶媒投与群と比較して，炎症マーカーの発現抑制，及び死亡率の低下を示した。

結論として，エンパグリフロジンは LPS 誘導腎障害モデルにおいて腎障害，リモデリング及び炎症を抑制した。死亡率は，溶媒投与対照群と比較してエンパグリフロジン投与群で低かった。

マウスを用いた 5/6 腎摘モデルによる腎障害に対するエンパグリフロジンの作用

8 週齢の雄 C57BL/6 マウスの左腎の 2/3 を結紮し，7 日間回復させた後，右腎を摘出した。さらに 7 日間，マウスを回復させた。対照動物にはそれぞれの偽手術を行った。外科的処置から回復した後，マウス（n=7）にエンパグリフロジン（30 mg/kg/日）を 4 週間経口投与した。1,3-BD 群（n=7）については 30% 1,3-BD を含む ND を与えた。

午後 5 時にマウスに強制的に餌を経口投与し，翌日の午後 5 時までは絶食させた。

5/6 腎摘は血圧上昇，アルブミン尿及び血漿中シスタチン C の増加を伴う重度の腎障害を誘導した。エンパグリフロジン又は 1,3-BD 投与マウスは，血圧，アルブミン尿，及び血漿中シスタチン C レベルの低下を示し，ポドサイト及び尿細管間質病変の両方における組織学的損傷が改善した（図2.4.2: 2）。

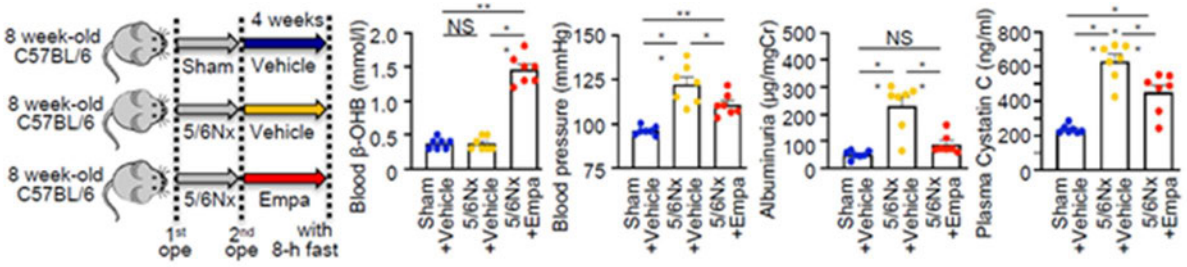


図2.4.2: 2　5/6 腎摘により腎障害を誘導した C57BL/6 マウスの血中 β－ヒドロキシ酪酸濃度，血圧，アルブミン尿及び血漿中シスタチン C 濃度へのエンパグリフロジンの作用。データは平均値±S.E.M.で示す。各群 n=7。*p<0.05，**p<0.01，NS 有意差なし，ANOVA 及び Tukey 検定［P20-06846］。

これらの改善は，ポドサイト及び PTEC における mTORC1 シグナル伝達の阻害と腎臓のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1a（CPT1a）発現の維持を伴った。ケトリシス関連酵素であるスクシニル-CoA-3-オキサロ酸 CoA トランスフェラーゼ（Scot）発現は，5/6 腎摘マウスの腎臓で低く，これはエンパグリフロジン投与により改善しなかった［CTD4.3-09_P20-06846］。

要約すると，5/6 腎摘は血圧上昇，アルブミン尿及び血漿中シスタチン C の増加を伴う重度の腎障害を誘導した。エンパグリフロジンは血圧，アルブミン尿及び血漿中シスタチン C 濃度を低

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

下させ，ポドサイト及び尿細管間質組織における腎障害を改善した。さらに，βOHB の血中濃度は，エンパグリフロジンを投与したマウスで増加した。

結論として，エンパグリフロジンは，非 DM マウスの 5/6 腎摘モデルにおいて，血圧，アルブミン尿及び血漿中シスタチン C 濃度を低下させることにより腎障害を改善した。βOHB 投与でも同様の結果が示された。エンパグリフロジン投与により血中 βOHB の増加がみられており，これらの結果から，血漿中のケトン体濃度上昇はエンパグリフロジンの薬効に寄与している可能性があることが示唆された。

ラットの Ang II 依存性高血圧モデルにおける腎線維化に対するエンパグリフロジンの作用

Ang II 誘導による高血圧を有する雄 Sprague Dawley（SD）ラット（体重 150~175 g）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。Ang II はペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg）の腹腔内投与による麻酔下で皮下移植した浸透圧ミニポンプ（Alzet 2002）を用いて投与した。対照動物には浸透圧ミニポンプを用いて生理食塩水を投与した。「対照 + Empa 群」（n =6）及び「Ang II + Empa 群」（n=10）では，エンパグリフロジンを飲水投与し，1 日量を 10 mg/kg となるようにした。

Ang II を 200 ng/kg/分の用量で 2 週間投与すると，血圧が顕著に上昇した。さらに，対照動物と比較して，腎結合組織における腎単球及びマクロファージの浸潤が誘導された。加えて，Ang II 投与によって I 型コラーゲン及び IV 型コラーゲン発現量が増加し，それぞれ主に尿細管間質と糸球体に局在した。

エンパグリフロジンは，投与開始後数日で対照群と Ang II 投与群の両方で UGE を誘導し，この作用は実験期間を通じて持続した。エンパグリフロジン投与は Ang II により誘導される I 型コラーゲン及び IV 型コラーゲンの発現増加を阻害した（図2.4.2: 3）。さらにエンパグリフロジンは腎結合組織における腎単球及びマクロファージの浸潤を抑制した［CTD4.3-11_P20-00333］。

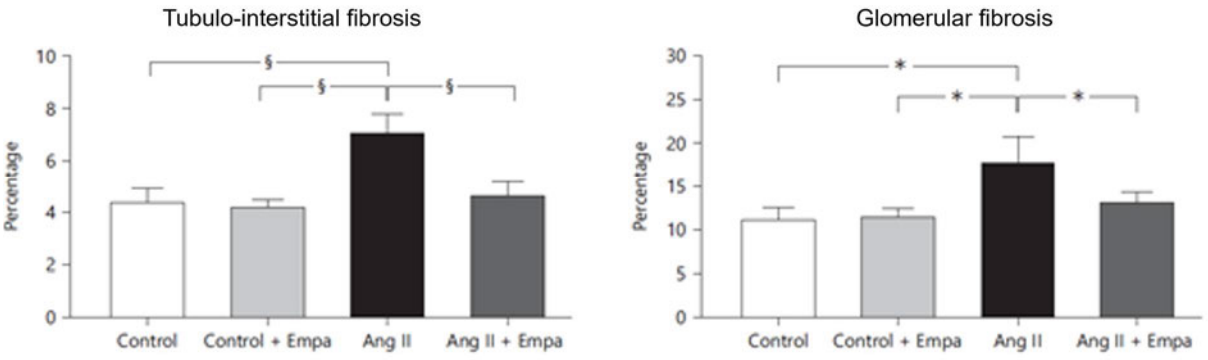


図2.4.2: 3　アンジオテンシン II 誘導尿細管間質線維化及び糸球体線維化に対するエンパグリフロジンの作用。データは平均値±S.E.M.で示す。n=6～10。*p<0.05, §p<0.01，ANOVA 及び Fisher の正確確率検定［P20-00333］。

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

要約すると，2 週間にわたる浸透圧ミニポンプによる Ang II 投与は，雄 SD ラットにおいて尿細管間質並びに糸球体線維化を誘導した。10 mg/kg/日のエンパグリフロジンを飲水投与した群は，対照群と比較して，腎臓の単球及びマクロファージの浸潤及び腎線維化が抑制された。

結論として，エンパグリフロジンは *in vivo* でラットの Ang II 依存性高血圧モデルにおいて抗炎症及び抗線維化作用を示した。

ラットのシクロスポリン誘導腎線維化モデルに対するエンパグリフロジンの作用

覚醒下の雄 SD ラットを用いて，シクロスポリン誘導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。シクロスポリン A（CsA）は臓器移植の治療管理に広く使用されているカルシニューリン阻害剤である。その臨床使用は腎毒性の可能性により制限されているが，腎疾患に関する非臨床研究では腎障害のツールとして使われている。

試験には体重 150~200 g 及び 8~9 週齢の SD ラットを用いた。ラットは飲料水及び低塩食を自由に摂取できるようにした。低塩食はシクロスポリン誘導腎障害を増加させるために用いられた。CsA （Sandimmune，Novartis）を 15 mg/kg/日の用量で 4 週間腹腔内投与し，腎症を誘導した（CsA 投与ラット，n=8）。このラットに 10 mg/kg/日のエンパグリフロジンを飲水投与した（CsA + Empa 投与ラット，n=7）。対照ラットにはエンパグリフロジンを含まない飲料水を与えた（n = 7）。

GFR は，対照ラットと比較して CsA 投与ラットで有意に減少したが（$p<0.05$），CsA + Empa 投与ラットでは減少しなかった。CsA 投与により尿中リン排泄量が増加し，その増加はエンパグリフロジン投与により鈍化した。CsA 投与ラットの腎臓は，近位尿細管の等尺性空胞化，尿細管萎縮，異栄養性微小石灰化，間質への炎症性浸潤及び尿細管間質の線維化を伴う尿細管傷害の中等度の変化を示した。対照群と CsA + Empa 投与群は，いずれも糸球体と尿細管に関して正常な組織学的構造を示した。

シリウスレッド染色切片解析により，CsA 投与ラットにおける糸球体及び尿細管間質線維化の有意な増加が明らかとなった（$p<0.05$）。エンパグリフロジン投与により，CsA 投与群の糸球体及び尿細管間質の線維化の増加が抑制された。

CsA 投与により，主に尿細管間質及び糸球体での I 型及び 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投与は，CsA 投与ラットにおける I 型及び IV 型コラーゲン発現の増加を抑制した。

対照ラットと比較して CsA 投与ラットでは尿細管間質領域への単球及びマクロファージの浸潤が有意に増加した（$p<0.05$）。その上，対照ラットと比較して実質内の交感神経線維のチロシンヒドロキシラーゼ発現が増加した。交感神経系の活性化は，CsA 誘導高血圧と腎症に寄与する。エンパグリフロジン投与は，CsA 投与によって誘導される腎実質における炎症細胞浸潤と腎臓のチロシンヒドロキシラーゼ発現を完全に抑制した［CTD4.3-12_P21-03075］。

要約すると，4 週間のエンパグリフロジン投与は，CsA 投与による雄 SD ラットの血圧上昇を抑制し，腎線維化，炎症性細胞浸潤，及びチロシンヒドロキシラーゼ発現を抑制した。

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

結論として，エンパグリフロジンは，ラットの CsA 腎症における血圧，腎線維化，炎症及び交感神経活性を抑制することにより，腎保護を促進した。

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

3. 副次的薬理試験

新たな副次的薬理試験はない。

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

4. 安全性薬理試験

新たな安全性薬理試験はない。

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

5. 薬力学的薬物相互作用試験

新たな薬力学的薬物相互作用試験はない。

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

6. 考察及び結論

EMPA-REG OUTCOME では，DKD の発現率及び進行は腎疾患のカテゴリーにかかわらずエンパグリフロジンによって低下した。さらに，急性腎障害を含む急性腎不全患者の割合は，エンパグリフロジン群ではプラセボ群よりも低く，エンパグリフロジンにより腎機能が維持された［P20-07032］。EMPEROR-Reduced 及び EMPEROR-Preserved では，HFrEF 及び HFpEF 患者を対象に，それぞれエンパグリフロジンの作用を検討した。これらの臨床試験では，T2DM と非 DM 患者を対象とした。エンパグリフロジンは，DM の有無にかかわらず，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］。さらに，心血管系及び腎に対する有益な作用はエンパグリフロジンのグルコース低下作用とはほとんど無関係であることが示されている［P18-10152，P22-05313］。

SGLT2 阻害薬は，腎臓の近位尿細管にある SGLT2 を阻害することにより，血糖値を低下させ，UGE を増加させる。そのプロセスは，グルコース分子とナトリウムイオンの共輸送（比率 1:1）によるものであり，結果として遠位尿細管と緻密斑でのナトリウム濃度の増加をもたらす［P18-04268］。緻密斑における調節過程は，求心性静脈のアデノシン調節性血管緊張や RAAS 系の調節など，神経ホルモン経路に影響を及ぼす可能性がある［P17-03366］。

DM は病態生理学的に血糖値が上昇することを特徴とする。血中グルコースの増加は，最終的には，PTEC の SGLT2 によるグルコースとナトリウムの再吸収の増加をもたらし，原尿中の高グルコース濃度を引き起こす。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-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］。そのため DKD は進行により，最終的には GFR の低下を伴う腎障害が生じる。

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，これまでに *in vitro* 試験並びに様々な *in vivo* 動物モデルを用いた薬理試験が実施されている。各試験は，異なる動物種を用いて DM の有無にかかわらず実施され，そのなかには腎障害を直接誘導する試験も含まれている。非 DM 動物を用いた試験では，5/6 腎摘，又はシクロスポリン，Ang II 及び LPS の投与，又は肥満高血圧動物を用いて腎障害を誘導した。

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

様々な動物モデルにおいて，エンパグリフロジン投与後に，腎機能の改善又は腎機能の悪化の抑制が示された。

DM Ins2+/Akita マウスでは，WT マウスと比較して SNGFR の増加が観察された。インスリン投与と同様に，エンパグリフロジンは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低下させた。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における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］。

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

別の試験では，DM Akita/+マウスに GFR マーカーとして FITC-Sinistrin を単回静脈内投与した後，GFR を測定した。GFR は，Akita/+マウスにおいて WT マウスと比べて 30%大きく，糖尿病性糸球体過剰濾過が示された。エンパグリフロジンにより Akita/+マウスの過剰濾過は完全に抑制され，GFR は WT マウスのレベルまで低下した。さらに，Akita/+マウスで有意に増加した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［P13-15161］。

ApoE-/-マウスに HFD を 24 週間与えた試験では，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 と並行して最後の 8 週間にエンパグリフロジンを投与すると，血漿中シスタチン C の増加が抑制され，腎機能の低下が阻害された［P20-06846］。

非 DM 動物の腎機能に対するエンパグリフロジンの効果を，マウスとラットの CKD モデルで評価した。C57BL/6 マウスの 5/6 腎摘により誘導した腎障害では，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は血圧，アルブミン尿及び血漿中シスタチン C 濃度を低下させ，ポドサイト及び尿細管間質組織における腎障害を改善した。

低塩食と併用して 4 週間 CsA で処置した SD ラットでは，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飲水投与したとき，GFR の低下が抑制された［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，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傷害を抑制した。

腎障害の炎症に対するエンパグリフロジンの作用

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* において炎症を抑制した。HPTC において，エンパグリフロジンは高濃度グルコースが誘導する炎症性メディエーターである IL-1β，IL-6，TNF-α 及び MCP-1／CCL2 の発現増加を抑制した［P19-11904］。エンパグリフロジンは IL-1β による MCP-1／CCL2 及び ET-1 の発現を mRNA 及びタンパクレベルで抑制した［P20-10198］。

DM Akita/+マウスモデルにおいて，エンパグリフロジンは病態生理学的に増加した炎症メディエーターNF-κB，MCP-1／CCL2，CD14，IL-6 及び 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 マウスに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，RANTES，IL-6 の mRNA 発現量が有意に減少し，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 投与は，TNF-α，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，ガレクチン-3，及び Mac3 といったマクロファ

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

ージ浸潤マーカーを増加させた。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低下させた［P20-05733］。非 DM の雄 SD ラットにおける CsA 誘導腎疾患のモデルにおいて，エンパグリフロジン投与は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 動物における腎臓での炎症を抑制し，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，臨床においてみられる 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。

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

線維性のリモデリングは，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過程に対するエンパグリフロジンの効果を，T2DM 又は非 DM の様々な動物モデルで検討した。

In vitro において，高濃度グルコースへの曝露によって HK-2 細胞における 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，α-SMA 及びビメンチン C の発現は増加した。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，この *in vitro* の条件において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］。

糸球体傷害，尿細管細胞変化及び尿細管間質線維化は，DKD モデルである ApoE-/-マウスへ HFD を与えることにより誘導した。エンパグリフロジンは，尿細管間質線維化と同様に，糸球体傷害と尿細管細胞変化を抑制した［P20-06846］。

非 DM の C57BL/6N マウスに LPS を投与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 型コラーゲンの発現は，健常対照マウスと比較して有意に増加した。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抑制した。さらに，エンパグリフロジン投与群は，溶媒投与群と比較して低い死亡率を示した［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 型コラーゲン発現の増加を抑制した［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た［P21-03075］。

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

線維化の過程に対するエンパグリフロジンの作用は，他の様々の *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 のような線維化の過程を阻害した。さらに，*in vivo* において，エンパグリフロジンの投与によって，マトリックスとコラーゲン沈着を含む腎臓のリモデリングが DM の有無にかかわらず阻害された。

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］。高濃度グルコースにより，*in vitro* で HK-2 細胞によるスーパーオキシド生成と過酸化水素生成が有意に増加した。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阻害し，また抗酸化作用を示した［P19-11904］。

さらに様々な動物モデルを用いた別の試験では，エンパグリフロジンは生体内の酸化ストレスを抑制した。酸化ストレスの減少は，エンパグリフロジンの有益な効果の一つである可能性がある［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

DM Akita マウスモデルにおいて，エンパグリフロジンは，対照食を与えたマウスと比較して，Akita/+マウスにおける収縮期血圧の上昇を抑制した。心拍数は Akita/+マウスも WT マウスもエンパグリフロジン投与の有無にかかわらず変化しなかった［P13-15161］。

交感神経系の活性化は，覚醒下の雄 SD ラットにおける CsA 誘導高血圧及び腎症に寄与することが示された。エンパグリフロジン投与は CsA 投与ラットの腎臓の交感神経活性化のマーカーである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 腎摘により腎障害を誘導した C57BL/6 マウスにエンパグリフロジン又はケトン体前駆体である 1,3-BD のいずれかを混餌で 4 週間，投与した。血中 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，糸球体傷害及び尿細管間質線維化を阻害し，血漿中シスタチン C 濃度の増加を抑制した。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］。

非臨床試験と同様に臨床試験において，エンパグリフロジン投与による，血漿中ケトン体濃度の軽度な増加が認められた。ケトン体は，器官のエネルギー供給のためのグルコース酸化の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］。

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

以上のように，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。

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。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。

内皮機能に対するエンパグリフロジンの作用，機能障害のある腎に対して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及び炎症の抑制，酸化ストレスによるリモデリング及び交感神経活性の低下は，臨床試験で確認された腎疾患の改善に寄与している可能性がある。

しかしながら，上記のそれぞれの機序が臨床研究で認めら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，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効果，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で *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。

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

7. 図表

図は本文中の適切な場所に示した。

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

8. 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］

P16-05352 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］

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］

P17-03366 Perrone-Filardi, P., Avogaro, A., Bonora, E., Colivicchi, F., Fioretto, P., Maggioni, A. P., et al. Mechanisms linking empagliflozin to cardiovascular and renal protection. International journal of cardiology 2017; 241; 450–456. ［CTD4.3-50_P17-03366］

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］

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

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］

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］

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

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］

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］

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

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］

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］

R13-4387 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Blood Pressure Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. Kidney Int Suppl; 2013; 3(1); 1-150. ［CTD4.3-47_R13-4387］

R15-5162 Fox, C. S., Matsushita, K., Woodward, M., Bilo, H. J., Chalmers, J., Heerspink, H. J., et. al. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal

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

disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. Lancet 2012; 380(9854) ; 1662-1673. ［CTD4.3-49_R15-5162］

R15-5809 Bailey, R. A., Wang, Y., Zhu, V., & Rupnow, M. F. Chronic kidney disease in US adults with type 2 diabetes: an updated national estimate of prevalence based on Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) staging. BMC research notes 2014; 7; 415-421. ［CTD4.3-46_R15-5809］

R17-2620 Eckardt, K. U., Coresh, J., Devuyst, O., Johnson, R. J., Köttgen, A., Levey, A. S., et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. Lancet 2013; 382(9887); 158–169. ［CTD4.3-41_R17-2620］

R17-2621 Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. Lancet 2010; 375(9731); 2073–2081. ［CTD4.3-48_R17-2621］

R17-2622 Wu, B., Bell, K., Stanford, A., Kern, D. M., Tunceli, O., Vupputuri, S., et al. Understanding CKD among patients with T2DM: prevalence, temporal trends, and treatment patterns-NHANES 2007-2012. BMJ open diabetes research & care 2016; 4(1); e000154. ［CTD4.3-45_R17-2622］

R17-2623 Jha, V., Garcia-Garcia, G., Iseki, K., Li, Z., Naicker, S., Plattner, B., et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. Lancet 2013; 382(9888); 260–272. ［CTD4.3-44_R17-2623］

R19-4218 Foreman, K. J., Marquez, N., Dolgert, A., Fukutaki, K., Fullman, N., McGaughey, M., et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. Lancet 2018; 392(10159); 2052–2090. ［CTD4.3-42_R19-4218］

R19-4241 GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 2018; 392(10159); 1736–1788. ［CTD4.3-43_R19-4241］

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］

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

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］

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：	2.6.3 薬理試験概要表
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

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

目　次

目　次 2
1. 薬理試験：一覧表 3
2. 効力を裏付ける試験 3
3. 副次的薬理試験 3
4. 安全性薬理試験 3
5. 薬力学的薬物相互作用試験 3

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

1. 薬理試験：一覧表

該当する試験は実施していない。

2. 効力を裏付ける試験

該当なし。

3. 副次的薬理試験

該当なし。

4. 安全性薬理試験

該当なし。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。