

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	新規アルドステロン合成酵素阻害薬の同定および心不全モデルを用いた薬効評価
Title(English)	
著者(和文)	古菌信二
Author(English)	Shinji Furuzono
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10503号, 授与年月日:2017年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田川 陽一,丸山 厚,近藤 科江,秦 猛志,林 宣宏
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10503号, Conferred date:2017/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

新規アルドステロン合成酵素阻害薬の同定および 心不全モデルを用いた薬効評価

古藺信二

東京工業大学生命理工学研究科
生体分子機能工学専攻

主指導教員

田川 陽一 准教授

副指導教員

丸山 厚 教授

目次

第一章：序論	4
1.1 慢性心不全と薬物治療	5
1.2 アルドステロンと臓器障害	7
1.3 ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の問題点	9
1.4 アルドステロン合成酵素	10
1.5 アルドステロン合成阻害剤 FAD-286 の問題点	11
1.6 本研究の目的と意義	12
第二章：CYP11B2 阻害薬のスクリーニング	18
2.1 緒言	19
2.2 方法	20
2.2.1 被験物質	20
2.2.2 発現プラスミドの作製	20
2.2.3 安定発現細胞の作製	21
2.2.4 ヒト CYP11B2 の酵素活性測定法(シンチレーション近接アッセイ)	22
2.2.5 ヒト CYP11B2 の酵素活性測定 (HTRF [®] 法)	23
2.2.7 ヒト CYP19 の酵素活性測定	24
2.2.8 脂溶性評価試験	25
2.2.9 溶解性試験	25
2.2.10 膜透過性試験	25
2.2.11 肝ミクロソームにおける代謝安定性試験	25
2.2.12 マウス血漿タンパク結合率の測定	26
2.2.13 シトクロム P450(CYP)の直接阻害評価	26
2.2 結果	27
2.2.1 アルドステロン生成反応の検討	27
2.2.2 ランダムスクリーニングによる Compound 2 の取得	27
2.2.3 Compound 2 の阻害様式の検討	28
2.2.4 探索的な誘導体展開による Compound 1 の取得	28

2.3 考察	40
第三章：心不全モデルマウスを用いた Compound 1 の薬効評価	41
3.1 緒言	42
3.2 方法	43
3.2.1 動物	43
3.2.2 横行大動脈狭窄(TAC)マウス作製	43
3.2.3 心エコー解析	43
3.2.4 臓器重量の測定	44
3.2.5 左室組織からの全 RNA 抽出	44
3.2.6 全 RNA から cDNA の作製(逆転写反応)	44
3.2.7 TaqMAN® PCR 法による左室組織発現解析	45
3.2.8 血漿中濃度の測定	45
3.2.9 統計解析	45
3.3 結果	47
3.3.1 圧負荷心肥大マウスにおける Compound 1 の延命作用	47
3.3.2 心エコーによる左室収縮機能の評価	47
3.3.3 臓器重量の評価	48
3.3.4 左室の mRNA 発現解析	48
3.3.5 薬物動態学的解析	50
3.3.6 血漿中カリウムイオン濃度の解析	50
3.4 考察	60
第四章：総括および今後の展望	64
4.1 総括	65
4.2 今後の展望	67
参考文献	69
公表論文	78
謝辞	79

第一章

序論

1.1 慢性心不全と薬物治療

高齢化に伴いわが国の慢性心不全患者数は増加している。厚生労働省発表の「人口動態統計の概況」によると、平成27年1年間の死因別死亡総数のうち、心疾患（高血圧性を除く）は19万6113人で、死因別死亡数全体の15.2%を占めており、悪性新生物（がん）に次ぎ2番目に多かった。また、その中で心不全による死亡数は7万1860人を占めていた(1)(Fig. 1-1)。

慢性心不全は『慢性の心筋障害により心臓のポンプ機能が低下し、末梢主要臓器の酸素需要量に見合うだけの血液量を絶対的にまた相対的に拍出できない状態であり、肺、体静脈系または両系にうっ血を来し日常生活に障害を生じた病態』と定義されている(2)。慢性心不全は進行性の予後不良な病態であることから、慢性心不全の治療は症状の緩和・生活の質(QOL)の改善のみならず、生命予後の改善、とりわけ急死の抑制が目的とされる。

近年、慢性心不全は交感神経系やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系に代表される神経体液因子の異常により生じる病態という概念が確立してきている。ゆえに、慢性心不全では第一選択薬としてアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬が用いられる(2)。また、心臓のポンプ機能が低下することにより代償的に心拍数の増加および血管の収縮がもたらされることから、大規模臨床試験においてエビデンスが得られているカルベジロールなどのアドレナリンβ受容体遮断薬(β遮断薬)が基礎的薬剤として用いられている(2)。

心不全の程度や重症度を示す分類としては、自覚症状から判断するNYHA(New York Heart Association)心機能分類が用いられており、Huntらによってさらに治療を加味したステージ分類の概念が追加されている(2)(Fig. 1-2)。また、わが国においても2010年に慢性心不全治療ガイドラインにおいて紹介された。慢性心不全治療薬には様々なものがあるが、前負荷を軽減する薬、後負荷を軽減する薬、β遮断薬、強心薬の4つに大きく分類される(3)(Fig. 1-3)。

慢性心不全治療ガイドラインが発表されたことにより慢性心不全のための薬物治療も確立されてきているが、一般的に心不全の5年生存率は50%で、重症心不全の3年生存率では50%を切っているのが実情である(4)。また、医療ニーズが満たされていないにも関わらず、久しく新規治療薬が見出されていないこともこの分野における大きな課題であった。

しかしながら、アンジオテンシン受容体ネプリライシン阻害薬(LCZ696)の臨床試験結果が2014年に発表され、代表的なACE阻害薬であるエナラプリルとの直接比較試験で死亡率の有意な改善を示した(5)。慢性心不全患者では、代償的機構としてレニン・アンジオテンシン系が活性化され、血管収縮による後負荷や水分貯留による前負荷が増加している(2)(3)。その一方で、ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメジュリンなどの生理活性ペプチドがネプリライシンにより分解され、その血管拡張作用が減弱し、後負荷増加となる(2)(5)。このような代償機転の持続を抑制するメカニズムにより、レニン・アンジオテンシン系阻害に加えてネプリライシン阻害が心不全の予後改善につながると考えられている(5)。LCZ696は今後、既存の慢性心不全治療薬ガイドラインにパラダイムシフトをもたらす可能性があるが、それでも将来的に医療ニーズが満たされないことが予想される。

心不全患者数の増加は臨床上の問題のみならず、社会における医療費の増加という医療経済の観点から大きな問題として考えるべきであり、今後もさらなる生命予後の改善をもたらす心不全治療薬の開発が期待されている。

1.2 アルドステロンと臓器障害

レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系は恒常性を保つ内分泌機構の一つで、血圧と体液量調節に重要な役割を担っている(3)(6)。腎臓の傍系球体細胞から分泌されたレニンが肝臓で生合成されたアンジオテンシノーゲンに作用して、N 末端から 10 番目のロイシンと 11 番目のバリンの間で加水分解を起こし、アンジオテンシン I を産生する(3)(6)。アンジオテンシン I は ACE により C 側から二つのペプチドが切り離され、アンジオテンシン II が生成される(3)(6)。アンジオテンシン II は末梢血管平滑筋を直接収縮させ、強い昇圧作用を有することから高血圧の病態に重要な役割を担うことが確認され、ACE 阻害薬およびアンジオテンシン II 受容体の遮断薬(ARB)は優れた降圧作用を示す治療薬として開発された(3)。さらに、これらの薬剤には心不全患者で心臓の臓器保護作用を示すことが臨床試験により知られている(7)(8)。一方で、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の最終産物であるアルドステロンは、1953 年に Simpson らによって単離され(9)、レニン・アンジオテンシン刺激により副腎皮質から分泌され、腎臓遠位尿細管のミネラルコルチコイド受容体に作用してナトリウムイオン再吸収とカリウムイオンの排泄を促す。1957 年に入り、米国 G.D.サール社においてアルドステロン受容体拮抗薬であるスピロラクトンが開発され、カリウム保持性利尿薬として臨床応用された(10)。

しかしながら、1999 年に RALES (the Randomized Aldactone Evaluation Study) (11) の結果が発表されるとアルドステロンは単なる電解質ホルモンとしてではなく心血管リスクホルモンとして広く認識されるようになった。RALES 試験は左室駆出率 35%以下で、ACE 阻害薬、ループ利尿薬、および必要に応じてジゴキシンを投与中の標準治療を受けている NYHA 分類ⅢからⅣの重症心不全患者 1663 例を対象にスピロラクトン群とプラセボ群に分類し、主要エンドポイントを患者の総死亡率として 3 年間観察する試験であったが、中間解析の結果、スピロラクトン投与群における有用性が明らかになり、経過観察期間が平均 24 ヶ月に達した時点で本試験は予定よりも早く中止となった(11)。スピロラクトン投与群ではプラセボ群に比べて、心不全死、突然死のいずれも優位に低下させ、総死亡率を 30%低下させた(11)(Fig. 1-4)。

一方で、スピロラクトンにはミネラルコルチコイド受容体に対する選択性が十分ではないという問題点があり、プロゲステロン受容体やアンドロゲン受容体に対しても親和性を有

するため、長期投与により内分泌系の副作用が報告されていた(10)(12)(13)(14)。そこで、ミネラルコルチコイド受容体に対する選択性を高めたエプレレノンがチバ・ガイギー社(現ノバルティス社)により開発された(12)(13)(14)。2003年に急性心筋梗塞後の左室機能不全患者を対象にEPHESUS(Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study)が、2011年に慢性心不全患者を対象にしたEMPHASIS-HF(Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure)が報告され、いずれもミネラルコルチコイド受容体拮抗薬であるエプレレノンによる好成績が発表された(15)(16)。以上から、心不全治療におけるミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の地位は確固たるものとなった。

1.3 ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の問題点

ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬は上述するように優れた薬理作用を示すことで注目され、RALES 試験以降に処方数が増加した。アルドステロンはナトリウムイオンを身体に保持すると同時に、カリウムイオンを体外に排泄する働きを持つホルモンであるため、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬には血清カリウムイオンが上昇するという副作用がある。高カリウム血症は致死的な不整脈を引き起こす重篤な副作用であり、特に腎機能が低下した患者には使用が制限されるという問題点がある。ゆえに、投与前に患者の腎機能を確認するとともに、投与中の患者の血中カリウムイオン濃度には、常に注意を払う必要がある。

1.4 アルドステロン合成酵素

アルドステロンは副腎皮質に存在する酵素により、コレステロールを前駆体として合成される(Fig. 1-5)(17)。細胞質内に取り込まれたコレステロールは、StAR(ステロイド産生急性調節タンパク質: Steroidogenic acute regulatory protein)の作用によりミトコンドリア内膜に運ばれ、コレステロール側鎖切断酵素であるシトクローム P450(CYP)11Aによりプレグネロンが合成される。その後、3 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素(3 β -HSD2)、21-水酸化酵素(CYP21A)の働きにより 11-デオキシコルチコステロンが合成される。そして、アルドステロン合成酵素である CYP11B2 の作用を受けアルドステロンが生合成される。この過程は三段階を経て進行し、まず 11-デオキシコルチコステロンが 11 β -ヒドロキシル化反応によりコルチコステロンになり、次にコルチコステロンの 18 位炭素が 18-ヒドロキシル化反応により水酸化されて 18-ヒドロキシコルチコステロンとなる。続いて 18 位が酸化(脱水素化)されて、アルドステロンとなる(18)。この反応にはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ酸(NADPH)、酸素一分子、ミトコンドリアの電子伝達系が必要である。この電子伝達系には活性中心に[Fe₂-S₂]クラスターを持つ水溶性の電子伝達タンパク質フェレドキシンとフェレドキシン還元酵素が関与する(19)。

また、アルドステロン合成酵素には齧歯類と非齧歯類における種差が大きいことが報告されており、ヒトとマウスにおけるアミノ酸相同性は 68%と低い(20)。ヒトにおいて有効な CYP11B2 阻害薬を創製する際に、齧歯類で薬効および安全性を評価することは必須であり、できるだけヒトと齧歯類で種差が少ない化合物を得ることは重要であると考えられる。

1.5 アルドステロン合成阻害剤 FAD-286 の問題点

代表的なアルドステロン合成酵素阻害剤として FAD-286 が報告されている。FAD-286 はアロマターゼ阻害薬である CGS016949A (fadrozole) のラセミ体のうち (*R*)-enantiomer のみを分離した化合物である(21)。高血圧自然発症ラットを用いた研究で FAD-286 は用量依存的に尿中および血中のアルドステロン濃度を低下させた(22)。また、心筋梗塞により心不全を誘発したモデルラットを用いた評価で、FAD-286 はスピロラクトンと同様に左室の血行動態、リモデリングおよび機能を改善した(23)。

その後、高血圧自然発症ラットを用いた検証で fadrozole の (*R*)-enantiomer と (*S*)-enantiomer のいずれにも血中アルドステロン低下作用があることが報告された(24)。しかしながら、興味深いことに (*R*)-enantiomer には左室の抗線維化抑制作用が認められたにも関わらず、(*S*)-enantiomer には検出されなかった(24)。ゆえに、FAD-286 の作用がアルドステロン合成阻害によるものか疑問視されており、CYP11B2 へ選択性の高い化合物の取得が望まれている。

1.6 本研究の目的と意義

本研究の目的は、ヒトと齧歯類の種差が少ない CYP11B2 選択的阻害剤を取得し、過剰なアルドステロン産生を直接阻害することにより心不全の予後改善効果が得られるかを検証し、臨床への応用の可能性を探索することである。

ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬を用いた臨床試験の結果から、アルドステロンシグナルの遮断には心不全の予後改善効果があることが複数の臨床試験から示されている(11)(15)(16)。

また、アルドステロン合成酵素に対する阻害剤としてはすでに FAD-286 などの報告がなされているが、これらの化合物は選択性および種差の観点で動物モデルにおいて評価するのに適した化合物であるとは言いがたい。

本研究では CYP11B2 選択的阻害剤である Compound 1 を用いて、マウス圧負荷心不全モデルにおける薬効の評価を行うことで、臨床応用への可能性を検証した。本研究は CYP11B2 阻害剤の基礎研究および心不全におけるアルドステロンの寄与解明に重要な役割を果たすと考えられる。

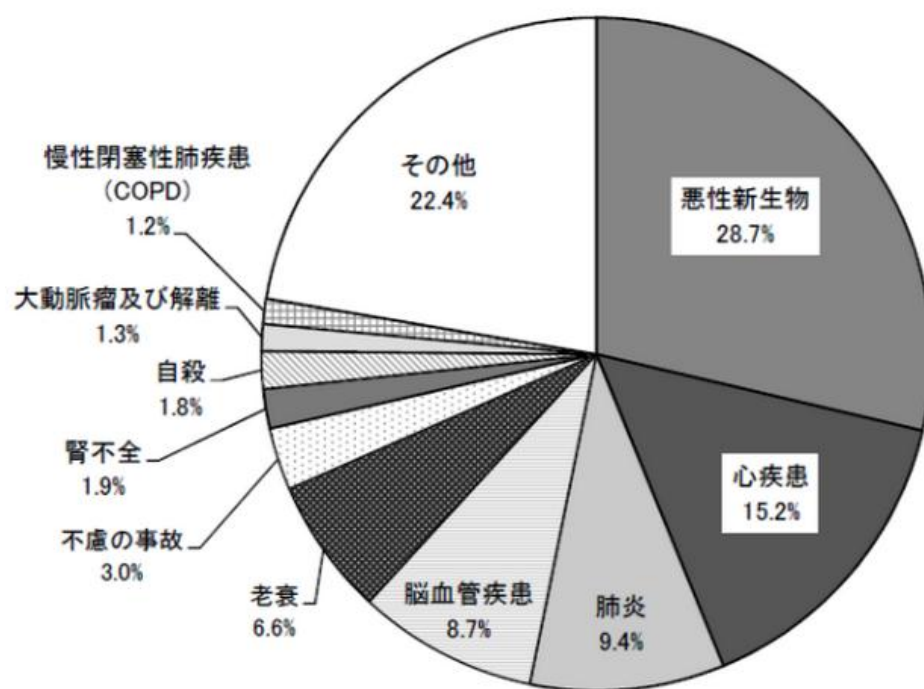


Fig. 1-1 主な死因別死亡数の割合(2015 年)

参考文献(1)より抜粋

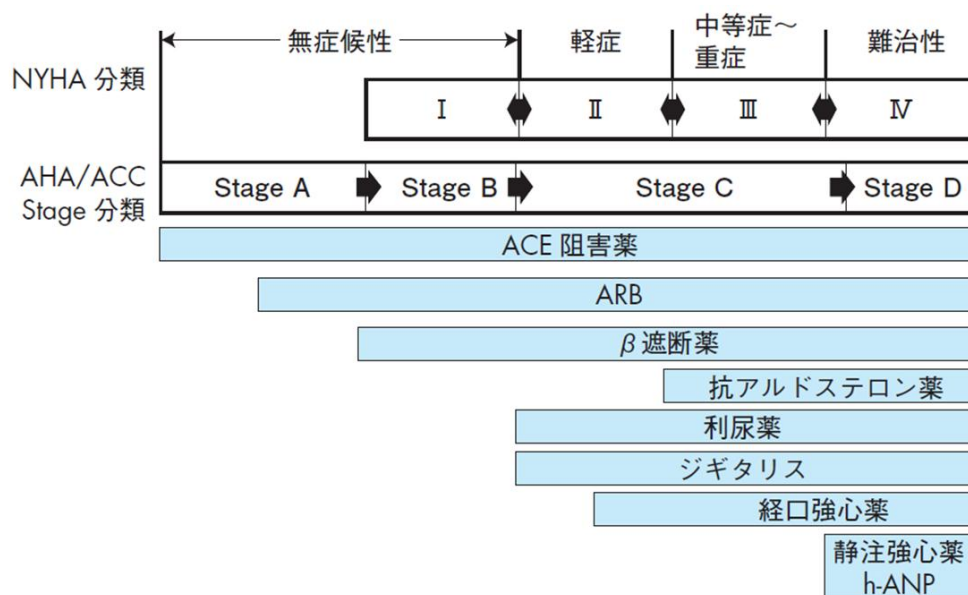


Fig. 1-2 心不全の重症度からみた薬物治療指針

参考文献(1)より抜粋

心不全の重症度分類

1) NYHA (New York Heart Association) 分類

I 度: 心疾患はあるが身体活動に制限はない。

日常的な身体活動では著しい疲労、動悸、呼吸困難あるいは狭心痛を生じない。

II 度: 軽度の身体活動の制限がある。安静時には無症状。

日常的な身体活動で疲労、動悸、呼吸困難あるいは狭心痛を生じる。

III 度: 高度な身体活動の制限がある。安静時には無症状。

日常的な身体活動以下の労作で疲労、動悸、呼吸困難あるいは狭心痛を生じる。

IV 度: 心疾患のためいかなる身体活動も制限される。

心不全症状や狭心痛が安静時にも存在する。わずかな労作でこれらの症状は増悪する。

2) AHA/ACC (American Heart Association / American College of Cardiology) ステージ分類

ステージ A: 危険因子を有するが、心機能障害がない

ステージ B: 無症状の左室収縮機能不全

ステージ C: 症候性心不全

ステージ D: 治療抵抗性心不全

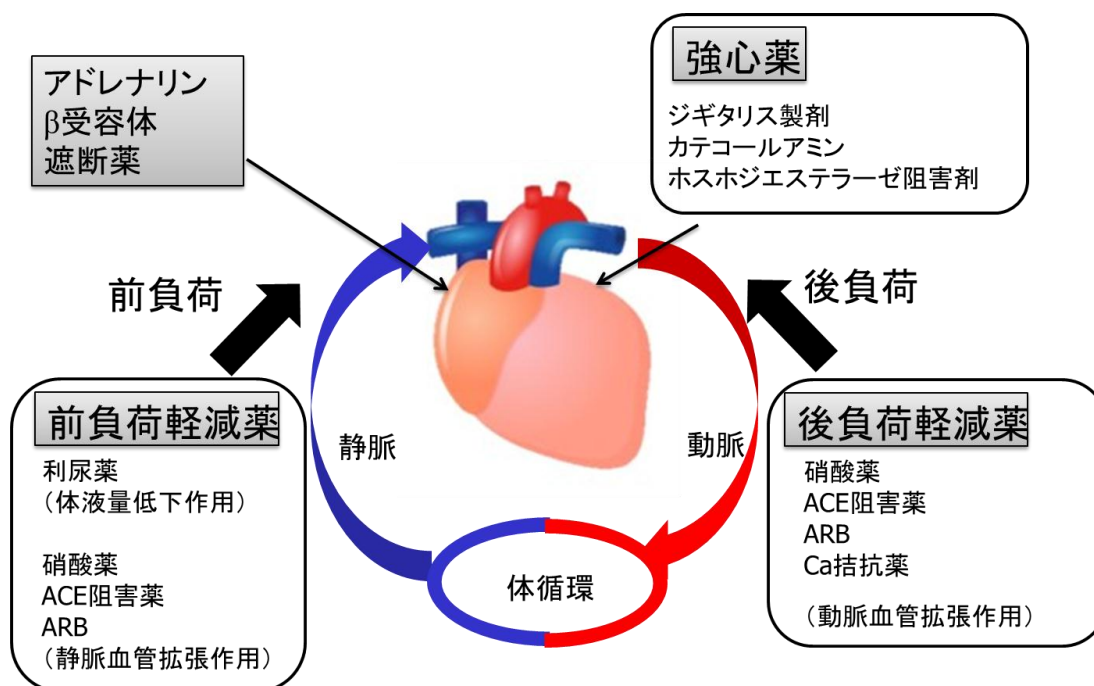


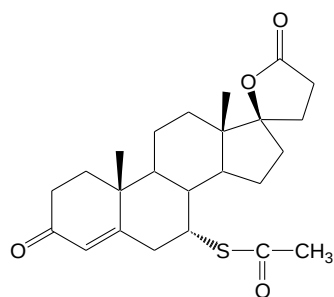
Fig. 1-3 主な慢性心不全治療薬の作用点

参考文献(1)をもとに改編引用

慢性心不全治療薬はメカニズム別に大きく4つに分類される。

- ① 強心薬: 不整脈を伴う慢性心不全等に使用し、心臓の働きを強めて運動能力を向上させる
- ② アドレナリンβ受容体遮断薬(β遮断薬): 自律神経の興奮を遮断する働きにより心筋の興奮を抑制する
- ③ 前負荷軽減薬:
利尿薬: 体液量を低下させて浮腫を改善する
硝酸薬・アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬・アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬(ARB): 静脈血管を拡張させて前負荷を軽減させる
- ④ 後負荷軽減薬:
硝酸薬・ACE阻害薬・ARB・Ca拮抗薬: 動脈血管を拡張させて後負荷を軽減させる

Spironolactone



RALES

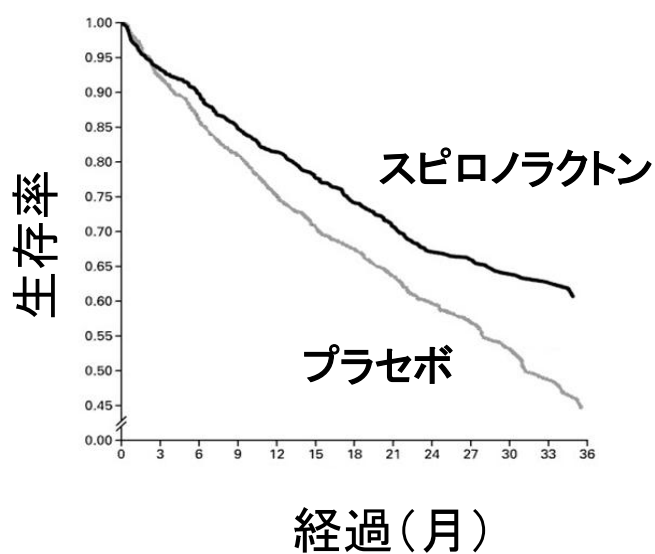


Fig. 1-4 スピロラクトンの構造と RALES

(左) スピロラクトンの構造式 (右) RALES による Kaplan-Meier Analysis の結果を参考文献(11)より改変引用 重症心不全患者に対して標準的な薬物治療にスピロラクトンを上乗せし、3 年生存率を 30%改善した。

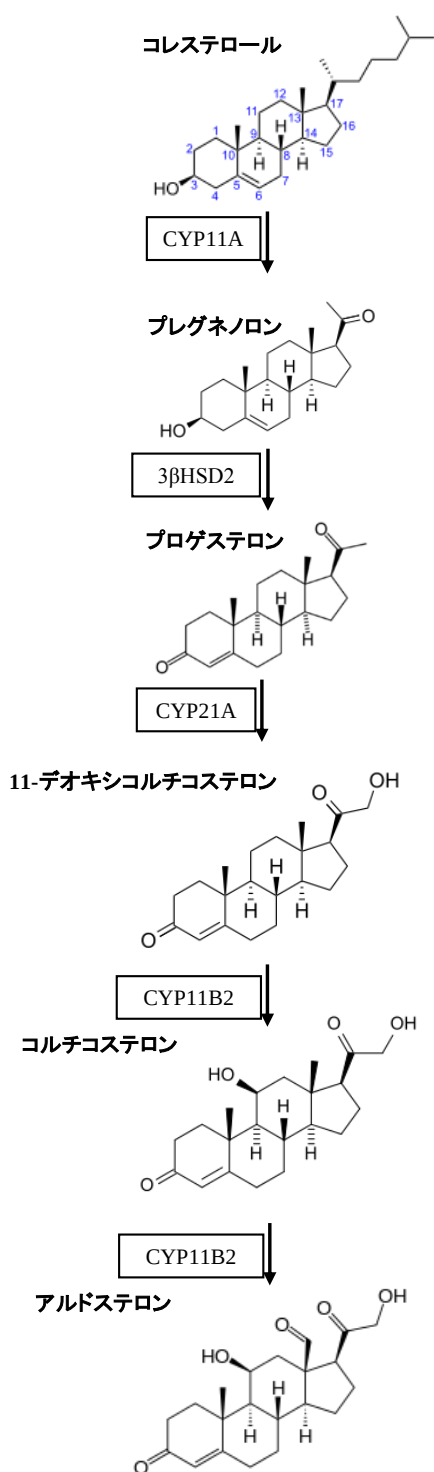


Fig. 1-5 アルドステロン生合成経路

参考文献(17)より改変引用

第二章

CYP11B2 阻害薬のスクリーニング

2.1 緒言

これまでに報告されている CYP11B2 阻害剤は他の CYP への選択性が低いことと、ヒトに比べて齧歯類(ラットおよびマウス)に対する阻害活性が小さいという種差を有することが問題であり(25)(26)(27)(28)(29)(30)(31)、すでに報告されている阻害剤からの合成展開により上記の課題を克服することは困難であると推測された。そこで、新規化合物を取得すべくランダムスクリーニングを実施し、リード化合物 Compound 2 を取得した。また、得られたリード化合物を基に探索的誘導体展開を実施し、活性が向上した Compound 1 を取得した。これら化合物の酵素阻害活性、選択性、物性について述べる。

2.2 方法

2.2.1 被験物質

本研究において使用した被験物質は全て第一三共株式会社 創薬化学研究所において合成されたものを用いた。

2.2.2 発現プラスミドの作製

ヒト副腎皮質由来培養細胞 NCI-H295R (CRL-2128, ATCC, Rockville)から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo)を用いて 全 RNA を抽出した。それを鋳型として SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Tokyo) を用いて常法に従い逆転写反応を実施した後、ヒト CYP11B2 (GenBank NM_000498) (以下、hCYP11B2)の cDNA を得るために制限酵素認識配列を付加した特異的プライマー (Table 2-1)を用いて PCR を行った。pcDNA3.1(+) vector (Life Technologies, Tokyo)および PCR 産物を制限酵素処理 (EcoRI, XhoI)した後、Quick Ligation Kit (New England Biolabs, Tokyo)でライゲーションを行った。動物細胞用タンパク質発現ベクターとして、CMV プロモーターによる高発現が可能で、ネオマイシン耐性遺伝子を有する pcDNA3.1(+)を採用した。

マウス副腎から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo)を用いて 全 RNA を抽出した。それを鋳型として SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Tokyo)を用いて逆転写反応を実施した後、マウス CYP11B2 (GenBank NM_009991)(以下、mCYP11B2)の cDNA を得るために制限酵素認識配列を付加した特異的プライマー (Table 2-1)を用いて PCR を行った。PCR 産物および pcDNA4/myc-His vector (Life Technologies, Tokyo) を制限酵素処理 (KpnI, EcoRV)した後、Quick Ligation Kit (New England Biolabs, Tokyo)でライゲーションを行った。動物細胞用タンパク質発現ベクターとして、CMV プロモーターによる高発現が可能で、ゼオシン耐性遺伝子を有する pcDNA4/myc-His を採用した。

ヒト Ferredoxin1 (GenBank NM_00419) (以下、hFDX) の cDNA は human adrenal gland Marathon-Ready cDNA library (Takara Bio, Shiga)を鋳型とし、制限酵素認識配列を付加した特異的プライマー (Table 2-1)を用いて PCR を行い取得した。PCR 産物およ

び pIRES-puro vector (Takara Bio, Shiga)を制限酵素処理 (NotI, EcoRI)した後、Quick Ligation Kit (New England Biolabs, Tokyo)でライゲーションを行った。動物細胞用タンパク質発現ベクターとして、CMV プロモーターによる高発現が可能で、ピューロマイシン耐性遺伝子を有する pIRES-puro vector を採用した。ヒト Ferredoxin Reductase (GenBank NM_024417)(以下、hFDXR)の cDNA は human adrenal gland Marathon-Ready cDNA library (Takara Bio, Shiga)を鋳型とし、制限酵素認識配列を付加した特異的プライマー (Table 2-1)を用いて PCR を行い取得した。PCR 産物および pcDNA3.1/Hygro(+) vector (Life Technologies, Tokyo)を制限酵素処理 (EcoRI, XhoI)した後、Quick Ligation Kit (New England Biolabs, Tokyo)でライゲーションを行った。動物細胞用タンパク質発現ベクターとして、CMV プロモーターによる高発現が可能で、ハイグロマイシン耐性遺伝子を有する pcDNA3.1/Hygro(+)を採用した。

これらの遺伝子組換え実験は、第一三共株式会社の「遺伝子組換え実験に関する細則」に則り、遺伝子組換え実験安全委員会で承認を得、第一三共株式会社で実施された。

2.2.3 安定発現細胞の作製

293A 細胞 (Life Technologies, Tokyo)および HEK293 細胞 (CRL-1573, ATCC, Rockville)は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (以下、DMEM) (Life Technologies, Tokyo)に 10%ウシ胎仔血清 (Cat# CC 3008-502, Lot# 29080306, EIDIA, Tokyo)と抗生物質を加えた培地を用い、37℃、5% CO₂ 条件下で培養した。

Lipofectamine2000 (Life Technologies, Tokyo) を用いて pcDNA3.1(+) –hCYP11B2 vector を 293A 細胞へ導入し、G418 (Life Technologies, Tokyo)含有培地で安定発現細胞を選択し、hCYP11B2 安定発現 293A 細胞(以下、hCYP11B2-293A)を取得した。さらに、hCYP11B2-293A 細胞へ同様に pIRES-puro-hFDX および pcDNA3.1/Hygro(+)-hFDXR を導入し、Puromycin(Sigma-Aldrich, Tokyo)および Hygromycin B (Life Technologies, Tokyo)含有培地で共発現細胞を選択し、酵素活性の最も大きなクローン(以下、hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A)を選抜した。

また、pcDNA4/myc-His-mCYP11B2 vector を HEK293 細胞へ同様に導入し、Zeocin (Life Technologies, Tokyo) 含有培地で安定発現細胞を選択し、酵素活性の最も大きなクローン(以下、mCYP11B2-HEK293)を選抜した。

2.2.4 ヒト CYP11B2 の酵素活性測定法(シンチレーション近接アッセイ)

ヒト CYP11B2 に対する酵素阻害活性を有する薬剤のランダムスクリーニングを実施するために、ヒト CYP11B2、ヒト FDX および hFDXR を安定発現させた hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A 細胞による酵素反応測定系を採用した。酵素反応により産生されたアルドステロンの測定にはアルドステロン特異的抗体によるシンチレーション近接アッセイ(Scintillation Proximity Assay : SPA)を採用した。SPA は放射性標識化合物と共に用いることで、迅速かつ高感度に多様な生物学的プロセスを解析可能な技術であり、洗浄・分離ステップを経ることがなく、オートメーション化が可能なため、ハイスループットスクリーニングに特に適している。今回の評価で採用した抗体の特異性が本来の基質である 11-デオキシコルチコステロンよりも中間体であるコルチコステロンに対して選択的であり、CYP11B2 による酵素反応は 11-デオキシコルチコステロンおよびコルチコステロンのいずれも基質となりうることから、スクリーニングでは検出感度を上げるためにコルチコステロンを基質として用いた。

ポリ-D-リジンコートされた 384well plate (#781940, Greiner, Tokyo)へ hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A 細胞を 15000cells/20 μ L/well で播種し、37°C、5%CO₂ 条件下で一晩培養した。翌日、PBS により希釈した被験物質を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間プレインキュベーションを行った。DMEM で希釈したコルチコステロン(終濃度:10 μ M)を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 4 時間インキュベーションを行い、培養上清を回収した。

続いて、抗アルドステロン抗体 (Biogenesis, Poole)、SPA ビーズ(#RPN141, GE Healthcare, Tokyo)および 0.1% ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich, Tokyo)を添加した PBS をあらかじめ OptiPlate (PerkinElmer, Waltham)へ分注し、培養上清を添加した。さらに、終濃度 4 nM の [³H]-アルドステロンを添加した。プレートを攪拌後、シールをして室温

で一晩インキュベーションし、翌日マイクロプレートシンチレーションカウンターTOP COUNT (PerkinElmer, Waltham)により放射活性を測定した。

これらの放射線実験は、第一三共株式会社の放射線安全委員会で実験計画書の承認を得、「放射線障害予防規程」および「放射線障害予防規程細則」に則り、第一三共株式会社が実施された。

2.2.5 ヒト CYP11B2 の酵素活性測定 (HTRF[®]法)

ポリ-L-リジンコートされた 96well plate (#MS-0096L, SUMILON, Osaka)へ hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 条件下で一晩培養した。翌日、DMEM により希釈した被験物質を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間プレインキュベーションを行った。DMEM で希釈した 11-デオキシコルチコステロン（終濃度:1 μM）を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベーションを行い、培養上清を回収した。培養上清に含まれるアルドステロンの生成量はアルドステロン HTRF[®]キット (Cisbio, Bedford)を用いて RUBYstar (BMG LABTECH)にて測定した。HTRF[®] (Homogeneous Time Resolved Fluorescence)技術は、時間分解蛍光 (time resolved fluorescence : TRF)と、蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescence resonance energy transfer : FRET)とを組み合わせたもので、2 種類の蛍光標識分子間のエネルギー転移に基づいている。

また、内在性酵素に対する酵素阻害を調べるために、過剰発現細胞の代わりに NCI-H295R 細胞を用いて阻害活性を評価した。NCI-H295R 細胞は DMEM/F-12 (Life Technologies, Tokyo)に 2% ウシ胎仔血清、1% ITS+Premix (BD Biosciences, San Jose)、抗生物質を加えた培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。ポリ-L-リジンコートされた 96well plate (#MS-0096L, SUMILON, Osaka)へ NCI-H295R 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 条件下で一晩培養した。翌日、1 mM dibutyl cAMP (Sigma-Aldrich, Tokyo)で細胞を処理し、一晩培養した。その翌日、2% ウシ胎仔血清、1% ITS+Premix 、抗生物質を加えた DMEM/F-12 により希釈した被験物質を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間プレインキュベーションを行った。DMEM/F-12 で希釈した 11-デオキシコルチコステロン（終濃度:1 μM）を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベーションを行い、培養上清を回収した。培養上清に含まれるアルドステロンの生成量はアルドステロン

HTRF[®]キット(Cisbio, Bedford)を用いて RUBYstar (BMG LABTECH)にて測定した。50 %阻害濃度 (IC₅₀)は GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego)を用いてシグモイド曲線を作成し、Nonlinear Regression 解析 (variable slope)を用いて算出した。

2.2.6 マウス CYP11B2 の酵素活性測定

ポリ-L-リジンコートされた 96well plate (#MS-0096L, SUMILON, Osaka)へ mCYP11B2-HEK293 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 条件下で一晩培養した。翌日、DMEM により希釈した被験物質を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間プレインキュベーションを行った。DMEM で希釈した 11-デオキシコルチコステロン (終濃度:2 μM)を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 2 時間インキュベーションを行い、培養上清を回収した。培養上清に含まれるアルドステロンの生成量はアルドステロン HTRF[®]キット (Cisbio, Bedford)を用いて RUBYstar (BMG LABTECH)にて測定した。50 %阻害濃度 (IC₅₀)は GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego)を用いてシグモイド曲線を作成し、Nonlinear Regression 解析 (variable slope)を用いて算出した。

2.2.7 ヒト CYP19 の酵素活性測定

NCI-H295R 細胞は DMEM/F-12 (Life Technologies, Tokyo)に 2% ウシ胎児血清、1% ITS+Premix (BD Biosciences, San Jose)、抗生物質を加えた培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。ポリ-L-リジンコートされた 96well plate (#MS-0096L, SUMILON, Osaka)へ NCI-H295R 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 条件下で一晩培養した。翌日、1 mM dibutyryl cAMP (Sigma-Aldrich, Tokyo)で細胞を処理し、一晩培養した。その翌日、2% ウシ胎児血清、1% ITS+Premix 、抗生物質を加えた DMEM/F-12 により希釈した被験物質を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間プレインキュベーションを行った。同培地で希釈した 100 nM testosterone (終濃度)を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 40 分インキュベーションを行い、培養上清を回収した。培養上清に含まれるエストラジオールの生成量はエストラジオール HTRF[®]キット(Cisbio, Bedford)を用いて RUBYstar (BMG LABTECH)にて測定した。

2.2.8 脂溶性評価試験

ジメチルスルホキシドで調製した 10 mM の被験物質溶液を凍結乾燥後、PBS(-)緩衝液飽和 n-オクタノールを 5 mL 添加後攪拌し、10 分間超音波処置後、吸引濾過し、濾液を 2 mL 採取した。そこに n-オクタノール飽和 PBS(-)緩衝液を 2 mL 添加し、振盪後、遠心分離し、上層(油層)、下層(水層)を採取し、LC-MS/MS により濃度を測定した。以下の式より分配係数(Log D)を算出した。

$$\text{Log D} = \log [(\text{油層ピーク面積値}) / (\text{水層ピーク面積値})]$$

2.2.9 溶解性試験

ジメチルスルホキシドで調製した 10 mM の被験物質溶液(50 μ L)に 250 μ L の日本薬局方記載の溶出試験第 1 液 (JP1, pH 1.2)、第 2 液 (JP2, pH 6.8)を添加し、攪拌し、4 時間以上放置後、吸引濾過し、濾液を LC-MS/MS により濃度を測定し、溶解度(μ g/mL)を算出した。

2.2.10 膜透過性試験

ジメチルスルホキシドで調製した 10 mM の被験物質溶液を用い、1998 年に Kansy ら (Roche)により報告された Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA)法により膜透過性 (permeability coefficient (P_{eff} , 10^{-6} cm/sec))を算出した(32)。

2.2.11 肝ミクロソームにおける代謝安定性試験

プールドヒト肝ミクロソーム、プールドラット肝ミクロソーム (Sprague Dawley, male)およびプールドカニクイザル肝ミクロソーム (male)は Xenotech 社 (Kansas)のものをを用いた。反応液の最終濃度は、評価化合物濃度 (1 μ M)、リン酸ナトリウムバッファー濃度 (100 mM)、プールドヒト肝ミクロソーム濃度 (0.5 mg protein/mL)、NADPH 産生システム (1 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate、10 mM D-glucose 6-phosphate、1 unit/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase、3.3 mM MgCl_2)で行った。反応は 37°C、30 分で行い、アセトニトリル添加で反応を停止させ、LC-MS/MS にて

分析した。また、反応前にアセトニトリルを添加したものをコントロールとして準備し、結果はコントロール(反応ゼロ分)のものに対する相対面積比を求め、残存率(%)として表示した。

2.2.12 マウス血漿タンパク結合率の測定

ジメチルスルホキシドで調製した 10 mM の被験物質溶液をマウス(BALB/c)血漿に最終濃度 5 μ M となるように添加し、平衡透析法により血漿タンパク結合率を算出した。濃度測定は LC-MS/MS を用いた。

上記の実験は第一三共株式会社の「動物実験に関する細則」に則り、第一三共実験動物委員会に承認された実験計画書に基づいて、第一三共株式会社にて実施された。

2.2.13 シトクロム P450(CYP)の直接阻害評価

ジメチルスルホキシドで調製した 10 mM の被験物質溶液を用い、終濃度が 10 μ M になるようにプールドヒト肝ミクロソームに添加し、phenacetin dealkylation (CYP1A2)、tolbutamide hydroxylation (CYP2C9)、dextromethorphan O-demethylation (CYP2D6)、および、midazolam 1'-hydroxylation (CYP3A4)に対する阻害能を評価した。各 CYP 分子種に対する阻害能は、酵素活性阻害率(% inhibition of enzyme activity)として表示した。

2.2 結果

2.2.1 アルドステロン生成反応の検討

hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A 細胞の培養メディウム中に基質である 11-デオキシコルチコステロンを添加してインキュベーションを行うことで、アルドステロンが生成することを確認した。各基質濃度[S]において反応速度 v を算出し、[S] に対し v をプロットした (Michaelis-Menten プロット) (Fig. 2-1)。また、 $1/[S]$ に対して $1/v$ をプロットした Lineweaver-Burk プロットを用いて、 K_m および V_{max} を算出した (Fig. 2-1)。得られた K_m は $1.162 \mu\text{M}$ 、 V_{max} は $109.9 \mu\text{M}\cdot\text{hr}^{-1}$ であった。

2.2.2 ランダムスクリーニングによる Compound 2 の取得

hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A 細胞を用いた酵素反応測定系により、第一三共のライブラリー化合物からアルドステロン合成酵素阻害剤のスクリーニングを実施した。アルドステロン濃度の測定は SPA により実施した (Fig. 2-2)。ヒット化合物の阻害率は、基質非存在下における溶媒コントロールの放射活性 (cpm) = A、基質存在下における溶媒コントロールの放射活性 (cpm) = B、基質存在下における被験物質の放射活性 = x とした時に、カウント上昇率 (Count increase) = $(x-B)/(A-B)\times 100$ (%) で算出した。カウント上昇率が 75% 以上の化合物を有効とし、同条件下で再現性試験を実施した。結果の一例を Fig. 2-3 に示した。

また、ランダムスクリーニングに用いた SPA では、使用する抗アルドステロン抗体の特異性の観点から基質にはコルチコステロンを使用した。しかし、生体内における CYP11B2 の本来の基質は 11-デオキシコルチコステロンであるため、SPA におけるヒット化合物は基質に 11-デオキシコルチコステロンを用いて酵素反応測定を行い、同様の結果が得られるかを調べた。また、その際の培養上清中アルドステロン産生量の測定にはアルドステロン HTRF[®] キットを用いた。アルドステロン HTRF[®] キットに使用されている抗体は基質に対する交叉性が低く、HTRF[®] 法では問題とならなかった。

CYP はその多くが薬物代謝およびステロイドホルモン合成に関連しており、CYP11B2 阻害剤のヒット化合物の中には CYP に対して選択性の低い阻害剤は優先順位を下げる必

要があると判断した。そこで、CYP11B2 との相同性が比較的低い（18.2%）ものの、CYP11B2 と同様にステロイド合成に関連する CYP であり、性ホルモン合成変換反応に関連する CYP19 (アロマターゼ) に対する選択性を評価し、Novartis 特許化合物 FAD-286 に対して特異性の大きな化合物の優先順位を上げた。さらに、薬物代謝酵素の中で代表的な分子種である CYP3A4 に対する選択性試験を実施し、特異性の低い阻害剤はヒット化合物から除外した。以上の検討より、得られた複数のヒット化合物に対して優先順位付けを行った。それらのヒットに対して、マウス CYP11B2 に対する酵素阻害活性を評価し、種差の少ない化合物を選抜し、ヒットとして Compound 2 (N-carbamimidoyl-4-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]pyridine-3-sulfoamide) を選抜した。Compound 2 のヒト CYP11B2 に対する酵素阻害は $IC_{50} = 32 \text{ nM}$ 、マウス CYP11B2 に対する酵素阻害は $IC_{50} = 5.2 \text{ }\mu\text{M}$ 、ヒト CYP19 に対する酵素阻害活性は $1 \text{ }\mu\text{M}$ において 17.0% であった。また、比較対照として用いた Novartis 特許化合物 FAD-286 のヒト CYP19 に対する酵素阻害活性は $1 \text{ }\mu\text{M}$ において 87.8% であった。

続いて、内在性酵素に対する酵素阻害活性を調べるために、過剰発現細胞の代わりに NCI-H295R 細胞を用いて同様に酵素阻害活性を評価した Compound 2 は内在性酵素に対しても同様に阻害活性を示すことを担保した (Fig. 2-4)。

2.2.3 Compound 2 の阻害様式の検討

取得したリード化合物の阻害様式を予測するために、hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A 細胞を用いた酵素反応速度解析を行った。あらかじめ細胞へ阻害剤を処理し、各基質濃度 $[S]$ において反応速度 v を算出し、 $[S]$ に対し v をプロットした (Michaelis-Menten プロット) (Fig. 2-5)。また、 $1/[S]$ に対して $1/v$ をプロットした Lineweaver-Burk プロットを用いて、 K_i を算出した (Fig. 2-5)。得られた K_i は 9 nM で、阻害様式は拮抗阻害 (competitive inhibition) であった。

2.2.4 探索的な誘導体展開による Compound 1 の取得

リード化合物 Compound 2 の構造類似化合物を評価し、合成展開の余地があることを確認した (Fig. 2-6)。続いて、探索的に誘導体展開を実施し、心不全モデルマウスで薬効評

価するために十分なポテンシャルを備えた化合物である Compound 1 を取得した。構造式を Fig. 2-7 に示した。Compound 1 のヒト CYP11B2 に対する酵素阻害は $IC_{50} = 3$ nM、マウス CYP11B2 に対する酵素阻害は $IC_{50} = 96$ nM であった (Fig. 2-8)。また、ヒト CYP19 に対する酵素阻害活性は 1 μ M において 16.3% であった。Compound 1 の物性 (脂溶性、溶解性、膜透過性)、代謝安定性、血漿タンパク結合率、CYP 直接阻害の結果を Table 2-1 に示した。Compound 1 の脂溶性は logD が 3.1 とやや高めではあるが、溶解性、PAMPA による膜透過性は良好であった。また、ヒト、ラット、カニクイザルに対する代謝安定性がそれぞれ 91.0%、60.0%、51.0% と良好であった。マウス血漿に対するタンパク結合率に関しても 81.5% と良好であった。CYP の直接阻害に関しては、代表的な 4 分子種 (CYP1A1、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4) に対していずれも 10% 以下と特に問題となる値ではなく、薬物代謝に関連する CYP への特異性も担保されていた。

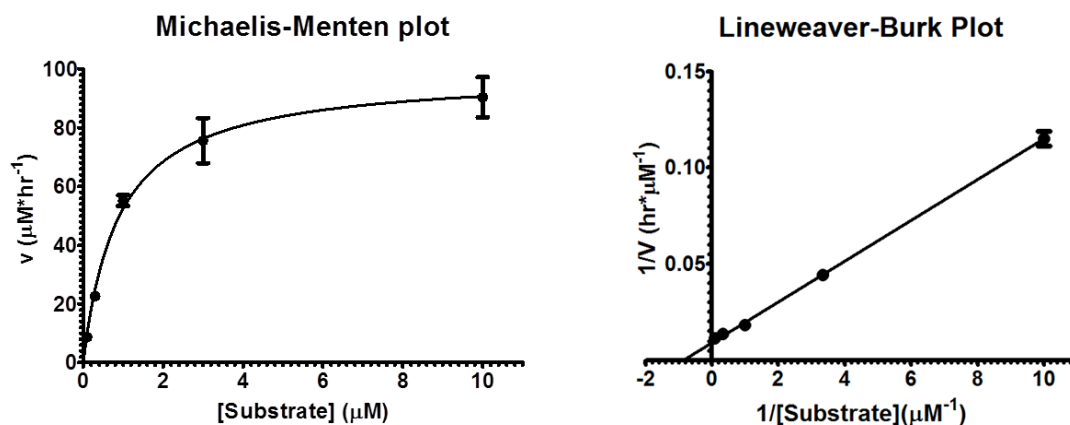


Fig. 2-1 アルドステロン生成反応

(左) hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A 細胞を用いた酵素反応測定により、各基質濃度 [S] における反応速度 v を算出し、[S] に対し v をプロットした (Michaelis-Menten プロット)。(右) $1/[S]$ に対して $1/v$ をプロットした Lineweaver-Burk プロットを用いて、 K_m および V_{max} を算出した。得られた K_m は $1.162 \mu\text{M}$ 、 V_{max} は $109.9 \mu\text{M} \cdot \text{hr}^{-1}$ であった。

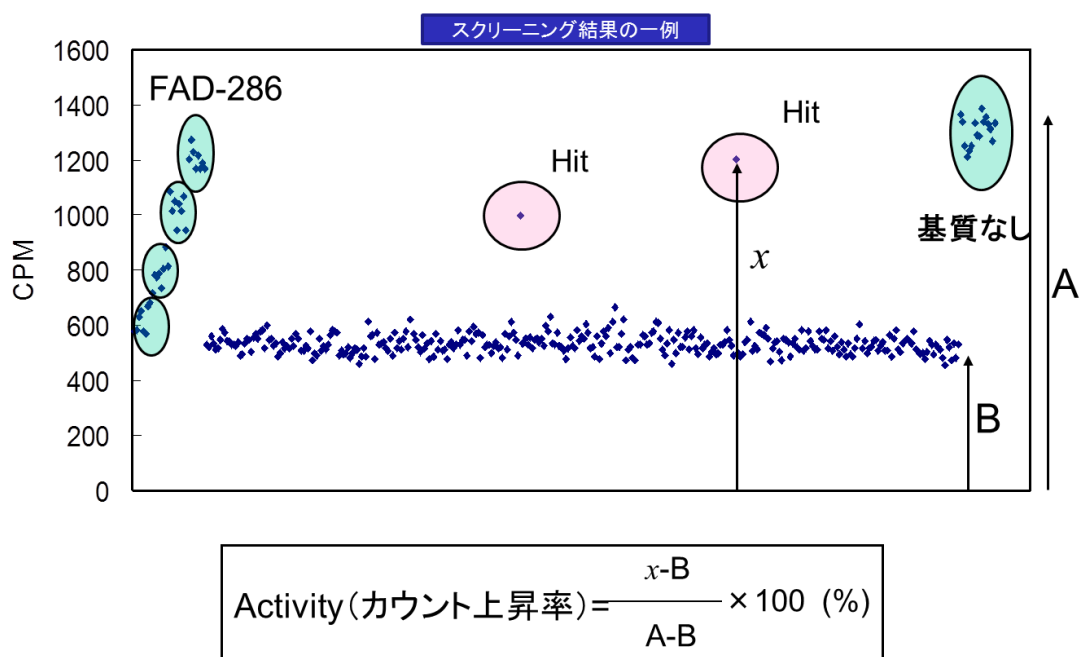


Fig. 2-3 ランダムスクリーニング結果の一例

384well plateを用いて実施したランダムスクリーニングの結果の一例。横軸には384化合物の各データを、縦軸には放射活性 (CPM)を示した。陽性対照にはFAD-286を用いており、濃度依存的な阻害による放射活性の上昇が観察された。ヒット化合物の阻害率は、基質非存在下における溶媒コントロールの放射活性 (cpm) = A、基質存在下における溶媒コントロールの放射活性 (cpm) = B、基質存在下における被験物質の放射活性 = xとした時に、Activity (カウント上昇率) = $(x-B)/(A-B) \times 100 (\%)$ で算出した。カウント上昇率が75%以上の化合物を有効とし、ヒットの一例を図内に示した。

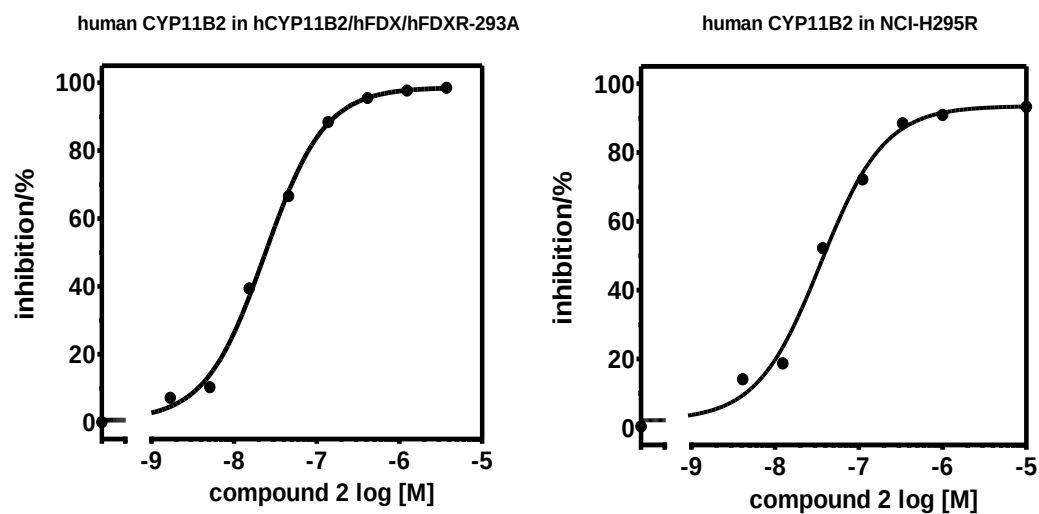


Fig. 2-4 過剰発現系および内在性酵素に対する Compound 2 の酵素阻害活性

(左) ヒト CYP11B2, ヒト FDR およびヒト FDXR 過剰発現 293A 細胞を用いて Compound 2 による阻害作用を測定し、 $IC_{50} = 32 \text{ nM}$ を得た。(右) 内在性酵素を発現する NCI-H295R 細胞を用いて同様の測定を実施し、 $IC_{50} = 40 \text{ nM}$ を得た。

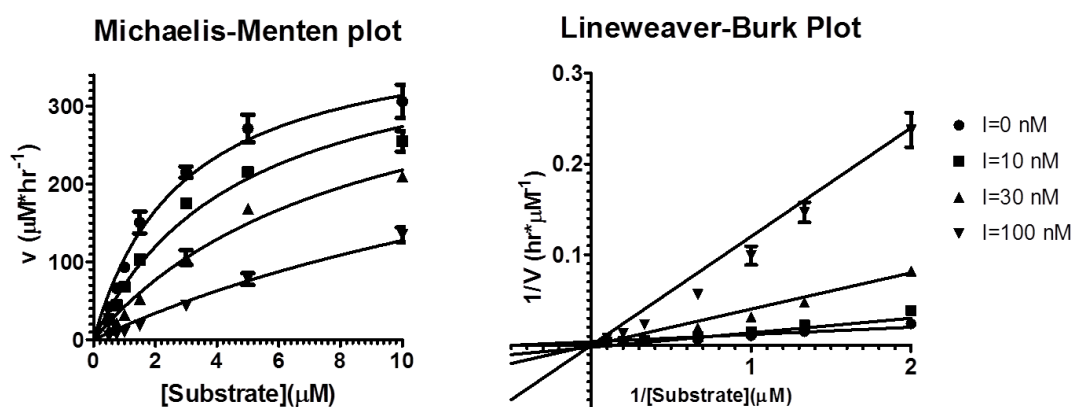
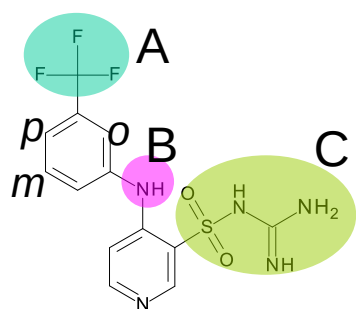


Fig. 2-5 Compound 2 の阻害様式解析

hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A 細胞を用いて、予め 0、10、30、100nM の阻害剤 (Compound 2)を前処理した後、各 0.5、0.75、1、1.5、3、5、10 μM の基質 (11-デオキシコルチコステロン)を添加してインキュベーションを行った後、アルドステロン産生量から反応速度 v を算出した。(左) Michaelis-Menten plot (右) Lineweaver-Burk plotを示した。算出された K_i は 9 nM であり、阻害様式は拮抗阻害 (competitive inhibition) であった。



Compound 2

N-carbamimidoyl-4-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]pyridine-3-sulfoamide

Compound	A	B	C	<i>h</i> CYP11B2 IC ₅₀ (μM)
Compound 2	<i>m</i> CF ₃	-NH-	SO ₂ NH-CNH-NH ₂	0.032
Compound 2-1	<i>m</i> CF ₃	-S-	NH ₂	0.047
Compound 2-2	<i>m</i> Cl	-S-	SO ₂ NH ₂	0.058
Compound 2-3	<i>p</i> Cl	-S-	SO ₂ NH ₂	0.069
Compound 2-4	<i>m</i> CF ₃ , <i>p</i> Cl	-NH-	SO ₂ NH ₂	0.072
Compound 2-5	<i>m</i> Br	-NH-	SO ₂ NH ₂	0.081
Compound 2-6	<i>m</i> Cl, <i>p</i> Cl	-NH-	SO ₂ NH ₂	0.127
Compound 2-7	<i>p</i> Cl	-NH-	SO ₂ NH ₂	0.314
Compound 2-8	<i>p</i> CH ₃	-S-	SO ₂ NH ₂	0.405
Compound 2-9	<i>m</i> F ₃	-NH-	SO ₂ OH	0.791
Compound 2-10	<i>o</i> CH ₃	-NH-	SO ₂ NH ₂	2.491
Compound 2-11	<i>o</i> Cl, <i>o'</i> Cl	-S-	SO ₂ NH ₂	2.921

Fig. 2-6 構造類似化合物の活性評価

Compound 2 の構造式と、部分構造を変換した Compound 2-1 から Compound 2-11 の各化合物におけるヒト CYP11B2 酵素阻害活性の IC₅₀ を示した。

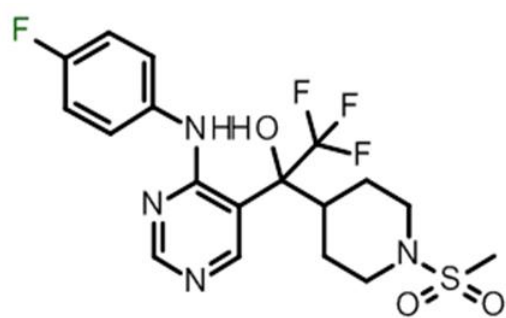


Fig. 2-7 Compound 1 の構造式

2,2,2-trifluoro-1-{4-[(4-fluorophenyl)amino]pyrimidin-5-yl}-1-[1-(methylsulfonyl)piperidin-4-yl]ethanol

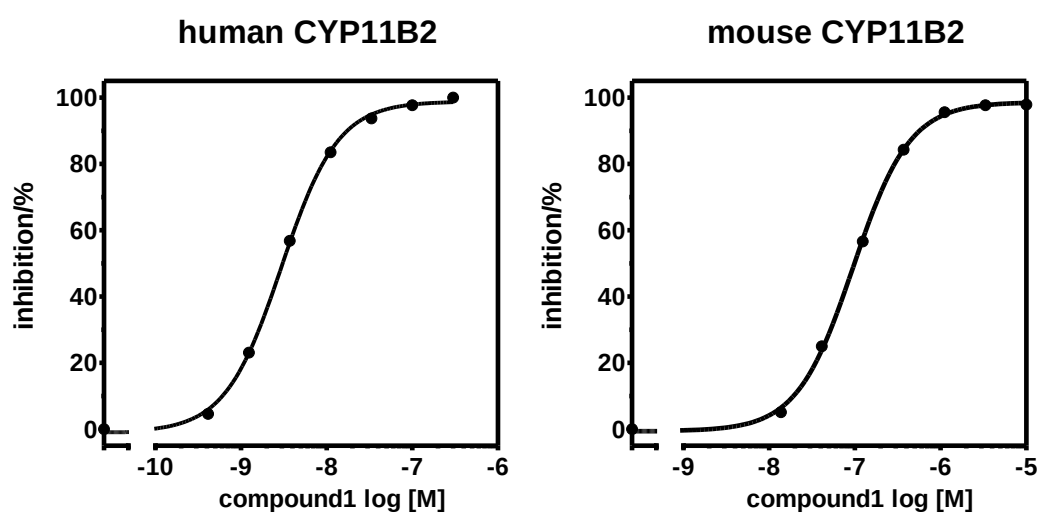


Fig. 2-8 Compound 1 のヒトおよびマウス CYP11B2 に対する酵素阻害活性

(左) hCYP11B2/hFDX/hFDXR-293A 細胞を用いて Compound 1 の酵素阻害活性を測定し、 $IC_{50} = 3 \text{ nM}$ を得た。(右) mCYP11B2-HEK293 細胞を用いて Compound 1 の酵素阻害活性を測定し、 $IC_{50} = 96 \text{ nM}$ を得た。

Table 2-1 遺伝子のクローニングで用いたプライマーの配列

遺伝子	プライマー配列 (5'-3') (上段 : forward, 下段 : reverse)
ヒト CYP11B2	(EcoRI: gaattc) ATGGCACTCAGGGCAAA
	(XhoI: ctcgag) CTAGTTAATCGCTCTGAAAGTGA
ヒト FDX	(NotI: gcggccgc) ATGGCTGCCGCTGG
	(EcoRI: gaattc) TCAGGAGGTCTTGCCCACA
ヒト FDXR	(EcoRI: gaattc) ATGGCTTCGCGCTGCT
	(XhoI: ctcgag) TCAGTGGCCCAGGAGGCG
マウス CYP11B2	(KpnI: ggtacc) ATGGCTCTCAGGGTGA
	(EcoRV: gatatc) CTAGCTGACAGGCCGGAAG

**Table 2-2 Compound 1 の物性・代謝安定性・血漿タンパク結合率・CYP
阻害活性**

Parameters			Values
Lipophilicity	LogD _{7.4}		3.1
Solubility	(μg/mL)	JP1	860
	(μg/mL)	JP2	260
Permeability	(10 ⁻⁶ cm/sec)	pH 5.0	>50.0
	(10 ⁻⁶ cm/sec)	pH 7.4	45.1
Metabolic stability	(%)	Human	91
		Rat	60
		Monkey	51
Protein binding	(%)	Mouse	81.5
CYP inhibition	(% inhibition of enzyme activity)	CYP1A2	<0
		CYP2C9	3.4
		CYP2D6	5.8
		CYP3A4	4.1

2.3 考察

アルドステロンの酵素活性測定系として、安定発現細胞の培地中に基質を添加し、培養上清中に酵素反応により生成されたアルドステロンが遊離する現象を利用した。これは、基質である 11-デオキシコルチコステロンと生成物のアルドステロンがいずれもステロイドであり、その細胞膜透過性が優れているために可能となる測定系であり、一般的に行われている手法である。ヒト CYP11B2 安定発現 Chinese hamster ovary cell line (V79)を用いて同様に培地へ基質である 11-デオキシコルチコステロンを添加して、培養上清のアルドステロン濃度を測定することで Lineweaver-Burk plot により K_m を算出した文献が報告されており、 $1.73 \mu\text{M}$ であった(33)。また、HEK293 細胞へヒト CYP11B2 を一過性に強制発現させた細胞を用いて上記と同様に酵素反応速度解析を実施している報告があり、11-デオキシコルチコステロンに対する K_m は $1.163 \mu\text{M}$ であった(34)。本研究ではヒト CYP11B2 および電子伝達系共役因子である FDX と FDXR を安定発現させた HEK293A 細胞を用いて酵素活性測定系を構築しており、算出された K_m は $1.162 \mu\text{M}$ と上述した報告に近い値が得られた。

近年になりアルドステロンが心血管リスクホルモンであると認識され、アルドステロン合成酵素である CYP11B2 に対する阻害剤は Roche(25)(26)、Merk (27)、Boehringer Ingelheim (28)(29)、Novartis (30)(31)など各社から報告されている。しかしながら、いずれもヒトあるいはサルに対する酵素阻害活性を強くした化合物が多く、齧歯類との種差を克服することに主眼が置かれていない。そこで、本研究ではオリジナルの骨格を有する化合物を取得するためにランダムスクリーニングを実施して、CYP11B2 に対して特異性が高く、さらにヒトおよび齧歯類との種差ができる限り少ない pyrimidin 誘導体化合物の Compound 1 を取得した。

Compound 1 はステロイド合成に関連するヒト CYP19 および薬物代謝に関連するヒト CYP 4 分子種に比べてヒト CYP11B2 に対して選択性が高く、さらにマウス CYP11B2 に対する活性も二桁 nM と高活性を示した。また、溶解性や膜透過性などの物性面からも良好な結果を示し、高次動物評価へ進める価値のある化合物と判断した。

第三章

心不全モデルマウスを用いた
Compound 1 の薬効評価

3.1 緒言

疾患モデル動物を用いた薬剤の有効性検証は創薬研究において必須であり、ヒトで有効性を検証する臨床試験へ進めるためには齧歯類（主にマウスまたはラット）および非齧歯類（主にサル）における安全性評価は避けられない。すなわち、ヒトの標的分子に対して特異性が高いことは当然であるが、齧歯類の標的分子に対してもある程度の活性を保持していないと薬効および副作用を検証することは困難となる。アルドステロン合成酵素はマウスとヒトで相同性が低い酵素であったが、特異性が高く、両者の種差が少ない化合物 Compound 1 を取得した。本章では、横行大動脈狭窄 (TAC : Transverse aortic constriction) による左室圧負荷心不全モデルマウス (TAC マウス) を用いて、Compound 1 の生存率に対する影響を検証する。

3.2 方法

3.2.1 動物

雄性マウス(7週齢)は日本 SLC 社(Yokohama)から購入した。動物は温度 $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\%\pm 5\%$ 、12 時間の消灯サイクルで、自由飲水、自由摂取(FR-2, Funabashi Farms, Chiba)条件下で飼育を行った。全ての実験は第一三共株式会社の「動物実験に関する細則」に則り、第一三共実験動物委員会に承認された実験計画書に基づいて、第一三共株式会社にて実施された。

3.2.2 横行大動脈狭窄(TAC)マウス作製

8 週齢のマウスをイソフルラン吸入麻酔下でマウス用ベンチレーターにて人工呼吸を施し、正中開胸した。横行大動脈を剥離した後、先端を鈍くした 27G 針とともに横行大動脈をポリプロピレン糸(7-0)で結紮し、27G 針のみを抜き取ることで横行大動脈を狭窄して、心臓に対する圧負荷を誘導した。狭窄により右頸動脈が大きく脈打つことを目視で確認した後、閉胸した。偽手術群(Sham 群)として、マウスには開胸および横行大動脈の剥離を行った後、閉胸した。TAC マウス作製には高度に熟練した技術を必要とするため、共同研究者である第一三共株式会社 細胞治療ラボラトリー 永山 貴弘博士に手術をしていただいた。手術 1 週間後に、心エコーパラメータと体重で群分けを行い、被験物質の投与を開始した。被験物質は FR-2(Funabashi Farms, Chiba)へ混餌投与した。溶媒投与偽手術群($n=5$)、溶媒投与横行大動脈狭窄群($n=26$)、0.006% Compound 1 投与横行大動脈狭窄群($n=16$)、0.02% Compound 1 投与横行大動脈狭窄群($n=16$)、0.06% Compound 1 投与横行大動脈狭窄群($n=16$)で試験を行った。

3.2.3 心エコー解析

手術 1 週あるいは 4 週後、15MHz のリニアプローブを用いて経胸的心エコーにより無麻酔下での心機能を測定した。左室拡張末期径(LVDd[mm])と左室収縮末期径(LVDs[mm])を測定し、左室駆出率(ejection fraction: EF)の評価は左室拡張末期容積(Left Ventricular End-Diastolic Volume: LVEDV)と左室収縮末期容積(Left Ventricular

End-Systolic Volume:LVESV)を用いて、 $(LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100(\%)$ で計算した。

3.2.4 臓器重量の測定

試験中に TAC マウスの死亡が観察された場合、あるいは試験終了時には心臓と肺を摘出し、心臓は左心室のみに分けた後、肺はそのままの状態湿重量 (mg) を測定した。これら臓器重量より、左室重量/体重比 (LV/BW) および肺重量/体重比 (Lung/BW) を算出した (単位: mg/g)。また、左室は mRNA 発現解析を行うため、液体窒素にて急速凍結させた後、-80℃で保存し、3.2.5 の操作で使用した。

3.2.5 左室組織からの全 RNA 抽出

POLYTRON ホモジナイザーを用いて左室組織を TRIzol (Life Technologies, Tokyo) 中でホモジライズした後、室温で 5 分間放置した。クロロホルムを加えた後、激しく懸濁し、室温で 3 分間放置した。冷却遠心機により遠心分離 (12,000×g, 20℃, 10min) した後、その上層を別のチューブに移し、イソプロパノールを加え、穏やかに混和した後、室温で 10 分間放置した。冷却遠心機により遠心分離 (12,000×g, 20℃, 10min) した後、上層を捨て、RNase free water で溶解し、全 RNA を調製した。各サンプルの全 RNA 濃度が 0.5 µg/µL となるように RNase free water で希釈した。

3.2.6 全 RNA から cDNA の作製 (逆転写反応)

解析に必要な cDNA を得るために、3.2.5 で得られた全 RNA を鋳型として、SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Tokyo) を用いて逆転写反応を実施した。具体的には、1 µL の Oligo dT primer、1 µL の 10 mM の dNTP mix、サンプル 10 µL を混和した後、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System, Applied Biosystems) を用いて、65℃で 5 分間処理し、速やかに氷冷した。続いて、氷上で 4 µL の 5×First-Strand Buffer、2 µL の 0.1 M DTT、1 µL の RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor の混和液を加え、42℃で 2 分間処理した後、1 µL の逆転写酵素 (SuperScript II Reverse Transcriptase) を加えた。42℃で 50 分間逆転写反応を行った後、70℃で 15 分間処理す

ることにより反応を停止させ、cDNA を作製した。得られた cDNA は次の解析を行うまで -20℃以下で保存した。

3.2.7 TaqMAN® PCR 法による左室組織発現解析

3.2.6 で得られた逆転写反応液に 80 µL のイオン交換水を加え、全量を 100 µL とした。この希釈液から 3 µL を分取し、これに 27 µL のイオン交換水を加えて全量を 30 µL とし、cDNA テンプレートとして以降の反応に供した。リアルタイム PCR は TaqMan® プローブ法により、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) を用いて実施した。具体的には、384well プレート (Applied Biosystems, Foster City) に 1well あたり、10 µL の TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City)、1 µL の 20× TaqMan® Gene Expression Assay Probe (Applied Biosystems, Foster City)、7 µL のイオン交換水および 2 µL の cDNA を混合した。PCR 反応は、50℃で 2 分間、95℃で 10 分間処理した後、95℃で 15 秒間と 60℃で 1 分間の処理を 40 サイクルで実施し、算出された Ct 値から比較 Ct 法により発現量を測定した。この際、各遺伝子の発現量は TAC マウスの発現解析において内在性コントロールとして汎用されている GAPDH(35)(36)を用い、補正を実施した。全ての偽手術群の左室組織より得られた発現量を GAPDH の発現量で除し、平均値を 1.0 として、各個体の相対発現量を算出した。

3.2.8 血漿中濃度の測定

血漿中アルドステロン濃度の測定は、DPC アルドステロン キット (Mitsubishi Chemical Medience, Tokyo) を用いて、常法に従い測定した。血漿中の Compound 1 の濃度は LC-MS/MS を用いて測定した。血漿中カリウムイオン濃度の測定は自動分析装置 (型式: JCA-BM6070、日本電子株式会社) を用いて測定した。

3.2.9 統計解析

統計学的解析には SAS System Release 9.2 (SAS Institute Japan) を用いた。結果は平均値±標準誤差 (SEM) で表記した。

溶媒投与偽手術群と溶媒投与横行大動脈狭窄群の比較には t 検定を行い、P 値が

0.05 未満の場合に有意とした。

対照群(溶媒投与横行大動脈狭窄群)と Compound 1 投与横行大動脈狭窄群の比較では、一元配置分散分析を行った後、Dunnet 検定を行い、 P 値が 0.05 未満の場合に有意とした。

生存率(%)は、カプラン・マイヤー法を用いて解析した。生存率の検定にはログランク検定を行った。その際、多重性調整には Bonferroni 法を用いた。 P 値が 0.05 未満の場合に有意とした。

3.3 結果

3.3.1 圧負荷心肥大マウスにおける Compound 1 の延命作用

マウスにおける横行大動脈狭窄 (TAC: Transverse aortic constriction) は左心室に対して圧負荷を誘導し、心肥大を生じさせる。本試験では、近年非常によく用いられている TAC モデルマウスを用いて CYP11B2 阻害薬である Compound 1 による延命効果の有無を調べるために、Compound 1 を長期投与した際の生存率に及ぼす影響を検討した。

Kaplan-Meier 生存曲線を用いて各群における生存率を示した (Fig. 3-1)。本試験において、各群で体重増加に差は認められなかった (Fig. 3-2)。また、各群における投与開始から 5 日間の摂餌量を調べたが差は認められなかった (Control: 3.2g/日/個体, 0.006%: 2.8g/日/個体, 0.02%: 3.0g/日/個体, 0.06%: 3.3g/日/個体)。偽手術群 (n=5) では試験中死亡例はなかった。対照群 (n=26) では、溶媒投与 6 日目には最初の死亡例が観察された。以降、時間経過とともに死亡例の発生が継続し、試験終了までに 12 例が死亡し、終了時の生存率は 53.8% であった。最高用量の 0.06% Compound 1 投与横行大動脈狭窄群 (n=16) では投与 18 日目に 1 例死亡したに過ぎなかった。終了時の生存率は 93.8% であり、0.06% Compound 1 投与群では統計学的に有意な延命効果を示した ($P < 0.05$)。しかしながら、低用量群 (0.006% および 0.02% compound 1) では試験終了時にいずれの群においても 11 匹が生存し、生存率は 68.8% であった。低用量群においてはいずれも有意な延命作用を示さなかった。

3.3.2 心エコーによる左室収縮機能の評価

溶媒または被験物質を 4 週間投与した後 (試験終了時) における生存マウスを用いて、心エコーにより左室収縮機能の評価した。溶媒のみを投与した偽手術群 (n=5) に対して、投与横行大動脈狭窄群 (n=14) では、左室拡張末期径 (LVDd) および左室収縮末期径 (LVDs) がいずれも有意に増加していた (Fig. 3-3)。また、左室駆出率 (Ejection Fraction: EF) は偽手術群に対して、投与横行大動脈狭窄群で有意に低下していた (Fig. 3-4)。以上から試験終了時に横行大動脈狭窄マウスでは左室収縮力の低下が認められた。

左室収縮力低下が観察された横行大動脈狭窄マウスに対し、0.06% Compound 1 を 4

週間混餌投与した群では、LVDd および LVDs がいずれも有意に低下していた ($P < 0.05$)。しかしながら、低用量および中用量群 (0.006% および 0.02% compound 1) では有意差が認められなかった。さらに、EF に関してはいずれの投与量群でも有意差がみとめられなかった。

3.3.3 臓器重量の評価

試験中に死亡した場合は死亡時、試験終了時までの生存例に関しては試験終了時における生存マウスを用いて、左室重量/体重比 (LV/BW) および肺重量/体重比 (Lung/BW) を測定し、結果を Fig. 3-5 に示した。LV/BW は横行大動脈狭窄により有意に増大しており (偽手術群 (n=5): 3.1 ± 0.1 mg/g, 横行大動脈狭窄群 (n=26): 6.5 ± 0.1 mg/g, $P < 0.05$)、左室肥大が確認された。また、Lung/BW (肺うっ血の程度を反映する) も横行大動脈狭窄により有意に増大しており (偽手術群 (n=5): 5.2 ± 0.2 mg/g, 横行大動脈狭窄群 (n=26): 18.6 ± 1.4 mg/g, $P < 0.05$)、左室肥大とともに心不全症状として肺うっ血が確認された。

心不全症状が観察された横行大動脈狭窄マウスに対し、各用量の Compound 1 を 4 週間混餌投与した群ではいずれも LV/BW に対して有意差が認められなかった (0.006% (n=16): 6.5 ± 0.3 mg/g, 0.02% (n=16): 6.4 ± 0.3 mg/g, 0.06% (n=16): 6.2 ± 0.3 mg/g, 各々 $P > 0.05$)。Lung/BW に対しても低用量および中用量群では有意差が認められなかった (0.006% (n=16): 15.9 ± 1.6 mg/g, 0.02% (n=16): 16.5 ± 2.03 mg/g, 各々 $P > 0.05$)。しかしながら、最高用量の 0.06% Compound 1 投与群 (n=16) では有意に低下が観察された (12.7 ± 1.3 mg/g, $P < 0.05$)。

3.3.4 左室の mRNA 発現解析

心肥大と繊維形成の関連標的遺伝子の mRNA に関して TaqMAN[®] PCR 法を用いて発現量を解析した。結果を Fig. 3-6 に示した。脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は心臓で合成され分泌されるホルモンであり、利尿作用、血管拡張作用、交感神経抑制、肥大の抑制などの作用を介して心筋を保護する作用を有する。心不全患者の重症度や予後との関係が報告され(37) (38)、左室収縮機能低下患者のスクリーニングとして有用であることが

示された(39)。BNP は心不全の生化学的マーカーとして広く臨床現場で用いられており、『慢性心不全治療ガイドライン』の心不全の診断の項にも記載されている。左室の *Bnp* mRNA 量は偽手術群に比べ投与横行大動脈狭窄群で上昇した (偽手術群 (n=4): 1.0 ± 0.1 , 横行大動脈狭窄群 (n=7): 4.2 ± 0.3 , $P < 0.05$)。0.06%あるいは 0.6%の Compound 1 を 4 週間混餌投与した横行大動脈狭窄群では溶媒投与横行大動脈狭窄群に対して、いずれも *Bnp* mRNA を低下させた (0.006% (n=4): 2.6 ± 0.4 , 0.06% (n=4): 2.3 ± 0.3 , 各々 $P < 0.05$)。しかしながら、中用量の Compound 1 投与群では有意差が認められなかった (0.02% (n=4): 3.3 ± 0.2 , $P > 0.05$)。

カルシウム依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンは、NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) を脱リン酸化し、それに伴い核内に移行することで心肥大関連遺伝子の転写を促進する(40)。NFAT の標的遺伝子に *Rcan-1* (*Regulator of calcineurin 1*) があり、カルシニューリンシグナルが活性化されるとRCAN-1が発現上昇し、RCAN-1はカルシニューリンと結合することでその活性を抑制するという負のフィードバックループを形成している(41)。TACによる圧負荷心肥大によってRCAN-1の発現が増加することが報告されており、病的な心肥大によるリモデリングを反映していると考えられている(42)。左心室の *Rcan-1* は偽手術群に比べ投与横行大動脈狭窄群で上昇した (偽手術群 (n=4): 1.0 ± 0.1 , 横行大動脈狭窄群 (n=7): 3.5 ± 0.5 , $P < 0.05$)。0.06%あるいは 0.6%の Compound 1 を 4 週間混餌投与した横行大動脈狭窄群では溶媒投与横行大動脈狭窄群に対して、いずれも *Rcan-1* mRNA を低下させた (0.006% (n=4): 1.9 ± 0.2 , 0.06% (n=4): 1.6 ± 0.2 , 各々 $P < 0.05$)。しかしながら、中用量の Compound 1 投与群では有意差が認められなかった (0.02% (n=4): 2.3 ± 0.3 , $P > 0.05$)。

次に、心臓の線維化に対する作用を調べるために、TAC による圧負荷心肥大で発現増加が報告されており、線維化した細胞で発現が増加するI型コラーゲン *Col1a2* の発現量を解析した(43)。*Col1a2* は偽手術群に比べ投与横行大動脈狭窄群で上昇した (偽手術群 (n=4): 1.0 ± 0.1 , 横行大動脈狭窄群 (n=7): 2.1 ± 0.2 , $P < 0.05$)。各用量の Compound 1 を 4 週間混餌投与した群ではいずれも有意差が認められなかった (0.006% (n=4): 1.7 ± 0.3 , 0.02% (n=4): 1.9 ± 0.1 , 0.06% (n=4): 1.7 ± 0.1 , 各々 $P > 0.05$)。

3.3.5 薬物動態学的解析

Compound 1 を投与することにより得られた薬理作用と曝露の関連性を精査するために、4 週間混餌投与したマウスの血漿中アルドステロン濃度と血漿中薬物濃度を測定した。

溶媒投与群に対して 0.06% Compound 1 投与群では有意に血漿アルドステロン濃度の低下が観察された (溶媒投与群 (n=7): 578.5±222.8 pg/mL, 0.06%投与群 (n=10): 88.3±14.5 pg/mL, $P < 0.05$)。低用量および中用量投与群ではアルドステロン低下に有意差が認められなかった (0.006% (n=7): 292.1±42.5 pg/mL, 0.02% (n=7): 340.0±93.2 pg/mL, 各々 $P > 0.05$) (Fig. 3-7)。また、Compound 1 の血漿中濃度は用量依存的に増加していた (0.006% (n=11): 0.05±0.01 μ M, 0.02% (n=11): 0.14±0.03 μ M, 0.06% (n=15): 0.65±0.13 μ M) (Fig. 3-8)。

3.3.6 血漿中カリウムイオン濃度の解析

ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬では、アルドステロン作用を抑制することにより、高カリウム血症を引き起こすことが報告されている。Compound 1 の投与により、血漿中アルドステロン濃度の低下が観察されたため、血漿中カリウムイオン濃度に対する影響を評価した。本試験で用いたモデルにおいては、いずれの用量の Compound 1 投与群においても血漿中カリウムイオン濃度は有意差を示さなかった (溶媒投与群 (n=14): 6.5±1.0 mEq/L, 0.006%投与群(n=11): 5.8±0.5 mEq/L, 0.02%投与群(n=11): 6.2±1.0 mEq/L, 0.06%投与群(n=15): 5.6±0.4 mEq/L, 各々 $P > 0.05$) (Fig. 3-9)。

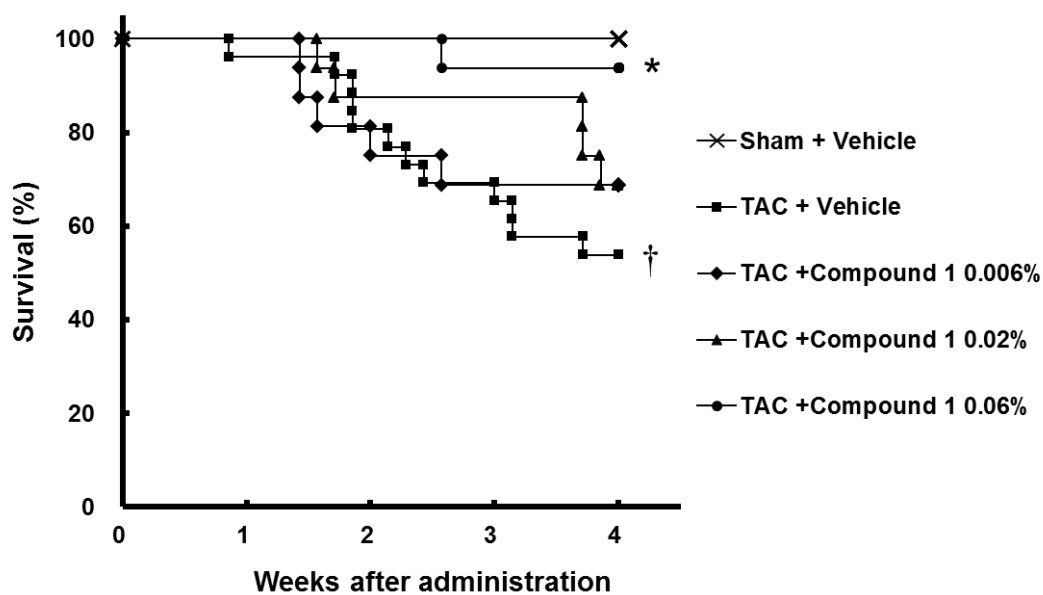


Fig. 3-1 圧負荷心不全マウスにおける Compound 1 の延命作用

横行大動脈狭窄 (TAC: Transverse aortic constriction) により圧負荷を誘導したマウス (9 週齢) に対して、混餌投与により溶媒または Compound 1 を 4 週間投与した。 Kaplan-Meier 曲線を用いて、溶媒投与偽手術群 (Sham+Vehicle, n=5)、溶媒投与横行大動脈狭窄手術群 (TAC+Vehicle, n=26)、Compound 1 投与横行大動脈狭窄手術群 (TAC+Compound 1, 0.006%, 0.02%, 0.06%, 各群 n=16) における生存率を示した。

$^{\dagger}P < 0.05$ vs. Sham+Vehicle, $^*P < 0.05$ vs. TAC+Vehicle

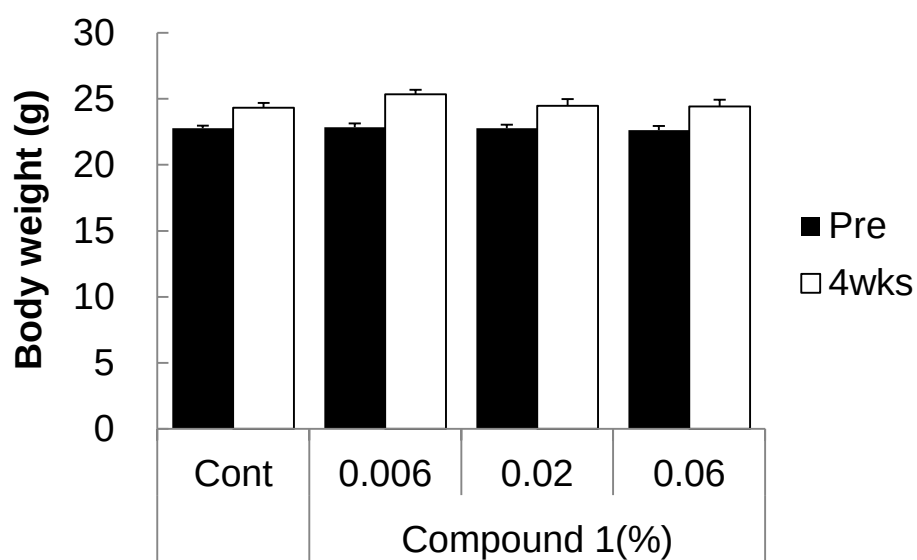


Fig. 3-2 圧負荷心不全マウスにおける体重変化

横行大動脈狭窄 (TAC: Transverse aortic constriction) により圧負荷を誘導したマウス (9 週齢) に対して、混餌投与により溶媒または Compound 1 を 4 週間投与した。各投与量群における投与前の平均体重(Pre)と投与 4 週間後の平均体重(4wks)を示した。

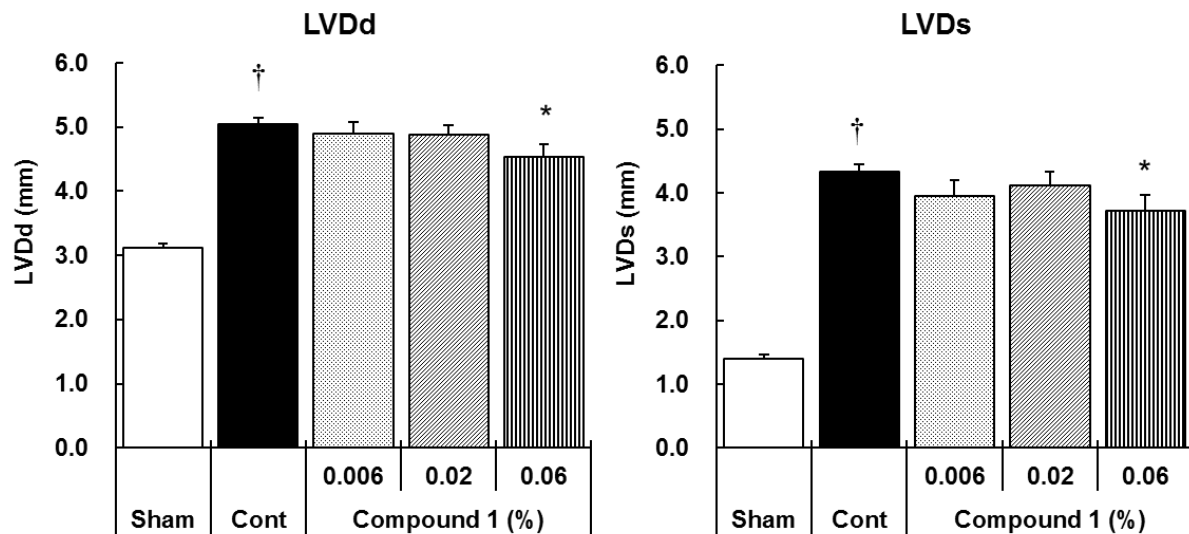


Fig. 3-3 心エコーによる左室収縮機能の評価

横行大動脈狭窄 (TAC: Transverse aortic constriction) により圧負荷を誘導したマウス (9 週齢) に対して、混餌投与により溶媒あるいは Compound 1 を 4 週間投与した後、溶媒投与偽手術群 (Sham, n=5)、溶媒投与横行大動脈狭窄手術群 (Cont, n=14)、Compound 1 投与横行大動脈狭窄手術群 (Compound 1, 0.006%, 0.02%, 0.06%, 各群 n=11, 11, 15) に関して、心エコーにより左室拡張末期径 (LVDd[mm])、左室収縮末期径 (LVDs[mm]) を測定した。データは平均値±標準誤差で示した。

[†] $P < 0.05$ vs. Sham+Vehicle, * $P < 0.05$ vs. TAC+Vehicle

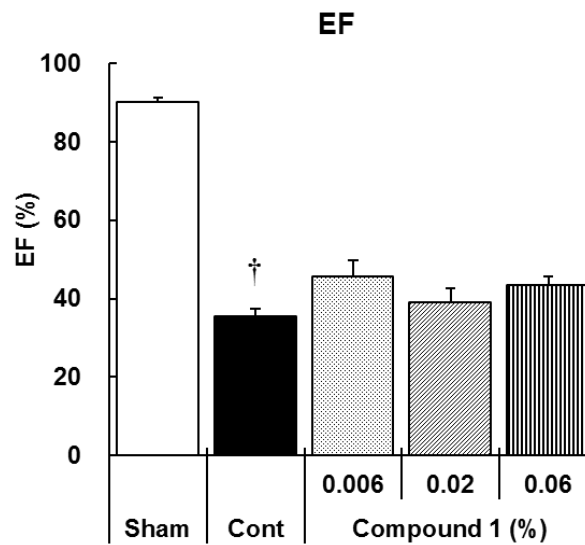


Fig. 3-4 心エコーによる左室駆出率の評価

横行大動脈狭窄 (TAC: Transverse aortic constriction) により圧負荷を誘導したマウス (9 週齢) に対して、混餌投与により溶媒あるいは Compound 1 を 4 週間投与した後、溶媒投与偽手術群 (Sham, n=5)、溶媒投与横行大動脈狭窄手術群 (Cont, n=14)、Compound 1 投与横行大動脈狭窄手術群 (Compound 1, 0.006%, 0.02%, 0.06%, 各群 n=11, 11, 15) に関して、心エコーにより左室駆出率 (ejection fraction: EF) を算出した。EF は左室拡張末期容積 left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) と左室収縮末期容積 left ventricular end-systolic volume (LVESV) を用いて、 $(LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100(\%)$ で計算した。データは平均値±標準誤差で示した。

[†] $P < 0.05$ vs. Sham+Vehicle

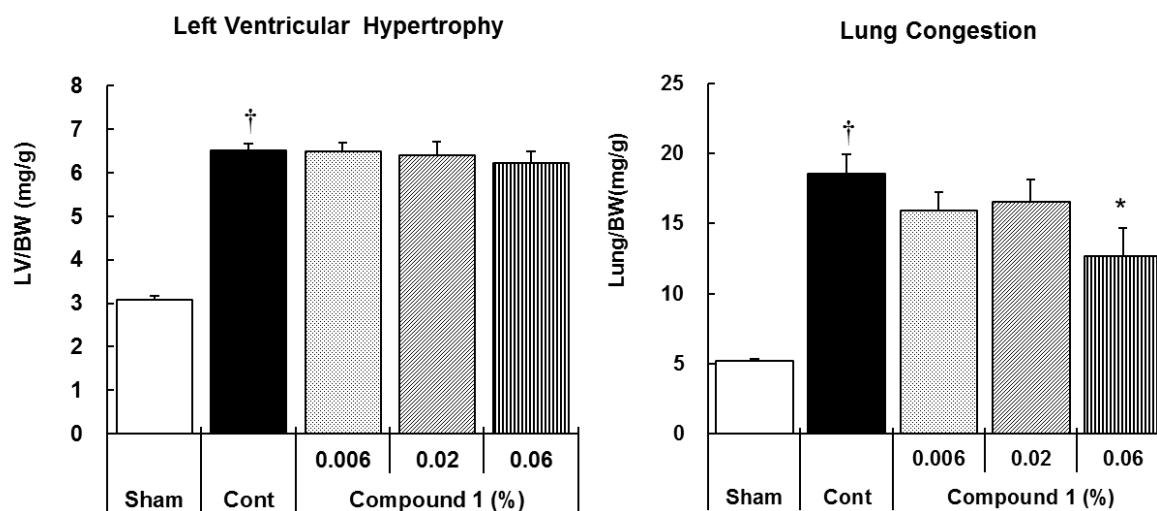


Fig. 3-5 臓器重量の評価

横行大動脈狭窄 (TAC: Transverse aortic constriction) により圧負荷を誘導したマウス (9 週齢) に対して、混餌投与により溶媒あるいは Compound 1 を 4 週間投与した後、溶媒投与偽手術群 (Sham, n=5)、溶媒投与横行大動脈狭窄手術群 (Cont, n=26)、Compound 1 投与横行大動脈狭窄手術群 (Compound 1, 0.006%, 0.02%, 0.06%, 各群 n=16) に関して左室重量/体重比 (LV/BW) および肺重量/体重比 (Lung/BW) を測定した。試験期間中に死亡した場合は死亡時に測定し、データは平均値±標準誤差で示した。

[†] $P < 0.05$ vs. Sham+Vehicle, ^{*} $P < 0.05$ vs. TAC+Vehicle

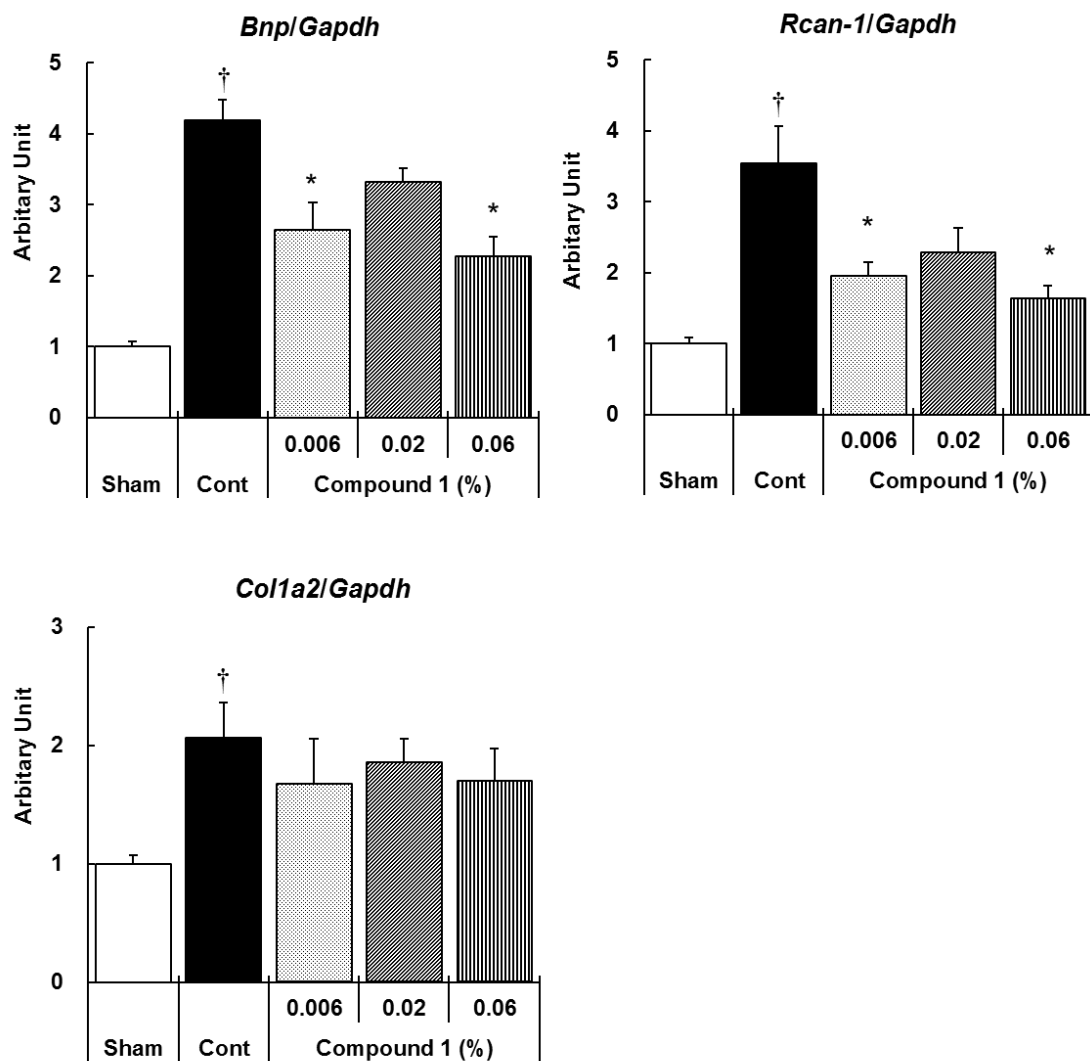


Fig. 3-6 左室の mRNA 発現解析

横行大動脈狭窄 (TAC: Transverse aortic constriction) により圧負荷を誘導したマウス (9 週齢) に対して、混餌投与により溶媒あるいは Compound 1 を 4 週間投与した後、溶媒投与偽手術群 (Sham, n=4)、溶媒投与横行大動脈狭窄手術群 (Cont, n=7)、Compound 1 投与横行大動脈狭窄手術群 (Compound 1, 0.006%, 0.02%, 0.06%, 各群 n=4) に関して、各遺伝子の *GAPDH* に対する mRNA 発現量を解析した。データは平均値±標準誤差で示した。

[†]P < 0.05 vs. Sham+Vehicle, *P < 0.05 vs. TAC+Vehicle

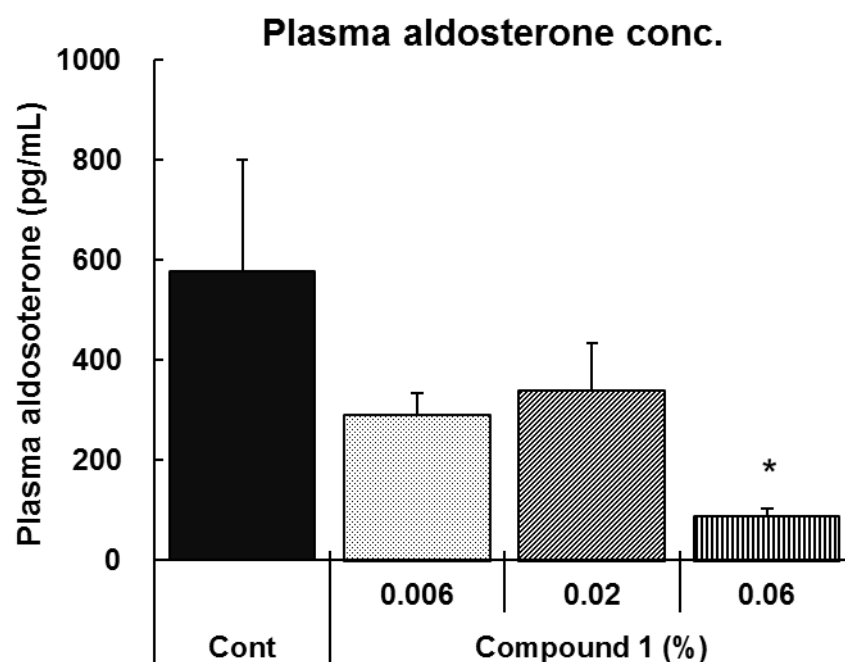


Fig. 3-7 血漿中アルドステロン濃度の測定

横行大動脈狭窄 (TAC: Transverse aortic constriction) により圧負荷を誘導したマウス (9 週齢) に対して、混餌投与により溶媒あるいは Compound 1 を 4 週間投与した後、溶媒投与横行大動脈狭窄手術群 (Cont, n=7)、Compound 1 投与横行大動脈狭窄手術群 (Compound 1, 0.006%, 0.02%, 0.06%, 各群 n=7, 7, 10) に関して血漿中アルドステロン濃度を測定した。データは平均値±標準誤差で示した。

* $P < 0.05$ vs. TAC+Vehicle

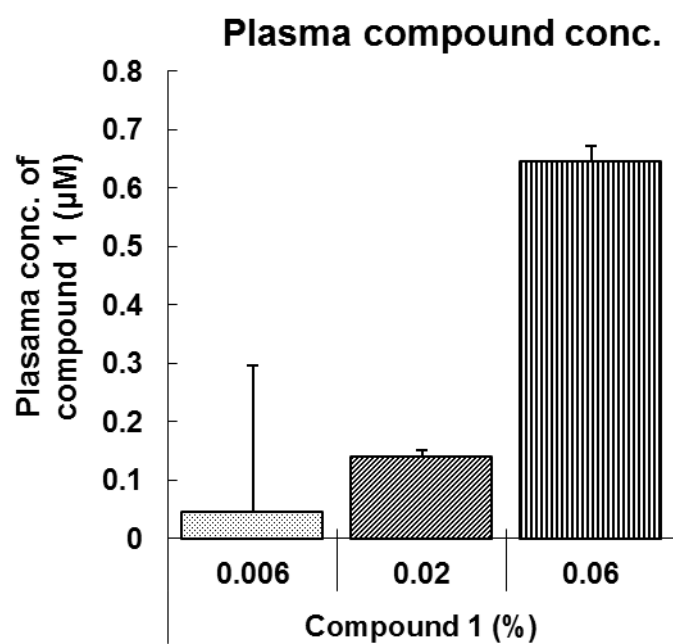


Fig. 3-8 血漿中薬物濃度の測定

横行大動脈狭窄により圧負荷を誘導したマウス (9 週齢) に対して、Compound 1 を 4 週間混餌投与した後、Compound 1 投与横行大動脈狭窄手術群 (Compound 1, 0.006%, 0.02%, 0.06%, 各群 n=11, 11, 15) に関して、LC-MS/MS により血漿中薬物濃度を測定した。データは平均値±標準誤差で示した。

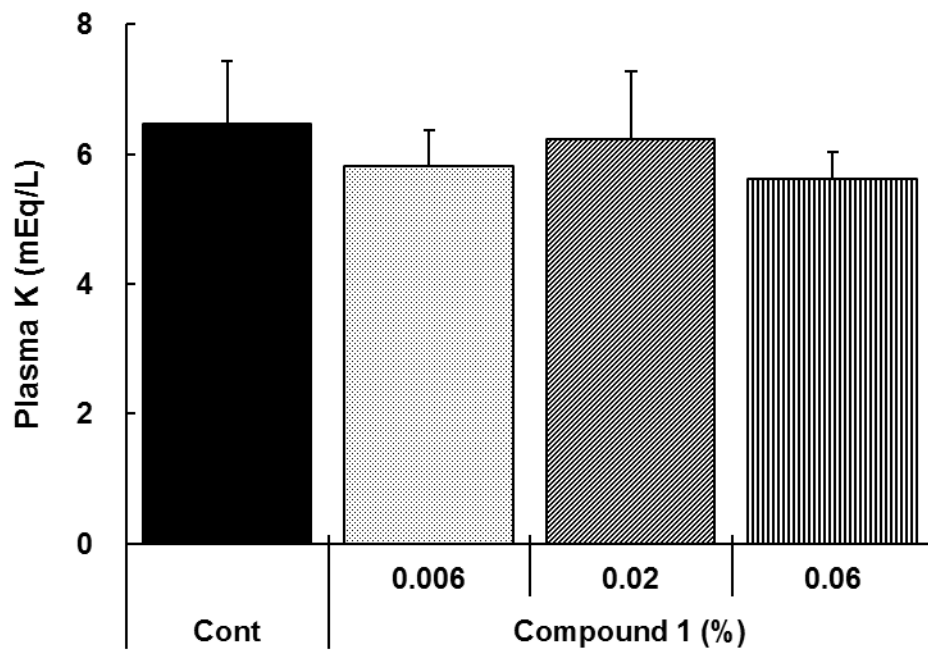


Fig. 3-9 血漿中カリウムイオン濃度の測定

横行大動脈狭窄により圧負荷を誘導したマウス (9 週齢) に対して、Compound 1 を 4 週間混餌投与した後、溶媒投与横行大動脈狭窄手術群 (Cont, n=14)、Compound 1 投与横行大動脈狭窄手術群 (Compound 1, 0.006%, 0.02%, 0.06%, 各群 n=11, 11, 15) に関して血漿中カリウムイオン濃度を測定した。データは平均値±標準誤差で示した($P > 0.05$ vs. Cont)。

3.4 考察

本章においては、マウス CYP11B2 に対して十分な阻害活性・選択性・良好な物性を示したアルドステロン合成酵素阻害薬である Compound 1 が、圧負荷心不全マウスにおいて肺うっ血改善作用を示し、延命作用をもたらすことが示された。

今回、横行大動脈狭窄による左室圧負荷モデルを選定した理由は、大動脈弁狭窄症や高血圧症などに起因するヒトの病態に類似した重症の左室不全を誘発するモデルとして近年汎用されているためである(44)。この圧負荷心不全マウスにおいて、0.06%のCompound 1を4週間混餌投与することで、横行大動脈狭窄による生存率を延命させた。このとき、十分な曝露がかかっていることを調べるために血漿中薬物濃度を測定すると、0.06%の投与量において $0.12 \pm 0.02 \mu\text{M}$ (フリー体換算)であった。Compound 1のマウスCYP11B2に対する IC_{50} は96 nMであったため、血漿中のフリー体薬物濃度が*in vitro*の IC_{50} を上回ること、血漿中アルドステロン濃度を有意に低下させられ、それにより延命効果をもたらした可能性が示唆された。0.006%、0.02%、そして0.06%の3用量で投与を行い、血漿中薬物濃度に関しては用量依存的な増加が認められたが、血漿中アルドステロン低下作用に関しては0.006%と0.02%において用量依存性が観察されなかった。これは最低用量の0.006%における曝露の個体間におけるばらつきが大きかったことに起因している可能性があげられ、心エコーにおける左室収縮機能の評価、左室駆出率、肺重量/体重比、左室のmRNA発現解析においていずれも0.006%と0.02%で用量依存性が見られなかったことにも合致していると考えられる。0.06% Compound 1の投与による延命作用のメカニズムを解析するために、① 心機能、② 心肥大、③ 線維化に対する作用を評価した。

① 心機能に関しては、心エコーによる解析から、0.06% Compound 1の投与により左室拡張末期径 (LVDd)および左室収縮末期径 (LVDs)が有意に低下していたが、心室機能の指標とされる左室駆出率(EF)に関しては有意差が認められず、明確な改善作用が確認できなかった。

② 心肥大に関しては、左室肥大の指標となる左室重量/体重比(LV/BW)を測定したが、Compound 1投与による有意差は認められなかった。しかしながら、肺重量/体重比(Lung/BW)に関しては0.06% Compound 1投与により有意に低下していた。また、心肥大

に関連する転写因子 NFAT の標的遺伝子の一つである *Rcan-1* の発現量を解析したが、Compound 1 投与による有意差は認められなかった。

③ 線維化に関しては、線維化した細胞で発現が増加するI型コラーゲン *Col1a2* の発現量を解析した。しかしながら、Compound 1 の投与による *Col1a2* の発現量に有意差は認められなかった。

以上より、0.06% Compound 1 の投与により確認された延命効果のメカニズムに関しては、① 心機能、② 心肥大 ③ 線維化のいずれの影響も関与していないと考えられた。しかしながら、4 週間の 0.06% Compound 1 投与後の試験終了時において、肺うっ血の指標とされる Lung/BW の有意な低下が認められた。先行研究によると、慢性左室不全は肺うっ血を引き起こし、肺重量を増加させ、肺組織線維化とリモデリングをもたらすことが報告されている(45)。Lung/BW は心不全の症状の一つである肺うっ血の指標とされており、肺うっ血は左室から血液を送り出す機能が低下することで左心室に本来戻るはずの血液が肺に溜まることにより引き起こされる。重症心不全患者では、左心不全により肺うっ血を引き起こし、咳、痰、呼吸困難などの症状が現れ、肺胞の中に水分がしみ出すと肺水腫に至り、生命の危険があるため、入院が必要となる。それゆえ、Compound 1 を投与したことによる肺うっ血の改善作用が延命作用に寄与している可能性が高いと考えられる。1981 年に Krozowski らがラットの肺組織に³H]-アルドステロンの結合が検出されたことから、肺におけるミネラルコルチコイド受容体の存在を報告している(46)。しかしながら近年、アルドステロンが心不全における肺のリモデリングに関与していない報告(47)などもあり、肺うっ血改善が肺に対する直接的な作用である可能性に関しては低いと考えられる。Compound 1 を投与したことによる肺うっ血改善のメカニズムを精査するためには免疫学的ならびに病理組織学的解析方法による心臓および肺の詳細な解析が必要である。

さらに、CYP11B2 阻害薬を投与したことによるアルドステロンの前駆体である 11-デオキシコルチコステロンが蓄積する可能性についても考察する。Novartis 社特許化合物 FAD-286 を Zucker diabetic fatty ラットへ投与することにより、アルドステロン濃度の低下とともに 11-デオキシコルチコステロン濃度が 3 倍以上有意に増加したと報告されている(48)。11-デオキシコルチコステロンにはアルドステロンに比べて 1/10-1/30 程度のミネラルコルチコイド作用があると報告されている(49)(50)。ゆえに、Compound 1 を投与したこと

により過剰に蓄積した 11-デオキシコルチコステロンがミネラルコルチコイド受容体に作用したために、有意に血漿中アルドステロン濃度を低下させたにも関わらず、ミネラルコルチコイド受容体活性化を十分に抑制できていなかった可能性がある。

また、アルドステロンのシグナルを遮断する薬理学的手段として、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬とアルドステロン合成酵素阻害薬の違いに関して考察する。アルドステロンは心臓の線維化作用があることが動物モデルとヒトにおいて示されている。スピロノラクトンは、心筋梗塞モデルラットを用いた研究ならびに圧負荷心不全モデルマウスを用いた研究により線維化抑制作用があることが報告されている(51)(52)。一方で、CYP11B2 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、心臓のアルドステロン濃度が上昇しているが、心肥大や心線維化は観察されなかったことが報告されている(53)。これらの先行研究から、圧負荷心不全マウスにおいて、ミネラルコルチコイド受容体の活性化は心肥大と心線維化を引き起こすが、ミネラルコルチコイド受容体はアルドステロンに依存せず活性化している可能性が考えられる。Mihailidou らによると、ミネラルコルチコイド受容体はグルココルチコイドによって占有されており、それらによって活性化される可能性があることも報告されている(54)。さらに、アルドステロンの作用として、ミネラルコルチコイド受容体を介さない非ゲノム作用に関する報告もなされている(55)。ゆえに、Compound 1 の投与による血漿中のアルドステロン濃度の低下は、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の有する作用メカニズムとは異なる薬理作用をもたらす可能性が示される。

最後に、Compound 1 の投与による血漿中アルドステロン濃度の低下に伴う血漿中カリウムイオン濃度変化に関して考察する。ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬では、アルドステロン作用を抑制することにより、高カリウム血症を引き起こし、それにより重篤な不整脈の副作用を引き起こすことが報告されている(56)。今回用いた圧負荷心不全モデルマウスにおいては、血漿中アルドステロン濃度を十分に低下させたが、高カリウム血症は観察されなかった。今回の結果は、ミネラルコルチコイド受容体欠損マウスが重度の高カリウム血症となる報告と(57)(58)、CYP11B2 欠損マウスでは中程度の高カリウム血症である報告(59)に合致すると考えられる。腎機能が低下している慢性腎不全の患者では、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の投与による高カリウム血症リスクがよりいっそう高くなることから、投与が制限されている。ゆえに、今回の評価で高カリウム血症リスクが観察されなかった

ことは臨床上のメリットとなりうる可能性がある。しかしながら、Compound 1 の高カリウム血症リスクを精査するためには、腎機能が低下した動物モデルでミネラルコルチコイド受容体拮抗薬と直接比較するより詳細な検討が必要となる。

第四章

総括および今後の展望

4.1 総括

本研究では、ヒトとマウスの種差が少なく、選択性および物性面で優れた新規アルドステロン合成酵素阻害薬を取得し、圧負荷心不全モデルマウスを用いて、延命作用があることを見出した。

創薬研究プロセスにおいて、薬剤の有効性検証はヒトで有効性・副作用を検証する臨床試験へ進める前に、齧歯類および非齧歯類(主にサル)における薬理・安全性評価は避けられないものとなっている。すなわち、ヒトの標的分子に対して特異性が高いことは当然であるが、齧歯類の標的分子に対してもある程度の活性を保持していないと薬効および副作用を検証することは困難となる。これまで報告されているアルドステロン合成酵素阻害薬の多くはヒトにおける酵素阻害活性を上昇させることを主眼において創製されてきており、マウスのアルドステロン合成酵素に対する阻害活性が弱いため、齧歯類のモデル動物を用いた検証には適していなかった。そこで、ヒトおよびマウスに対して酵素阻害活性を有する化合物を取得するためにランダムスクリーニングを実施した。

第二章では、ランダムスクリーニングを実施して得られたヒット化合物 Compound 2 のプロファイリングと、それを元に探索的誘導体展開を実施して得られた Compound 1 の活性・物性などの基本的性質について述べた。Compound 1 のヒト CYP11B2 に対する IC₅₀ は 3 nM、マウス CYP11B2 に対する IC₅₀ は 96 nM と高活性を示す化合物で、Compound 1 はマウスに投与することで十分な曝露がかかり、血漿中アルドステロン濃度を低下させることが期待される化合物と考えられた。

第三章では、Compound 1 が心不全モデルマウスにおいて延命作用があるかを検証した。心不全動物モデルとして、ヒトの病態に類似した重症の左室不全を誘発することから近年汎用されている、横行大動脈狭窄左室圧負荷マウスを選定した。この圧負荷心不全マウスにおいて、0.06%の Compound 1 を4週間混餌投与することで、横行大動脈狭窄による生存率を延命させた。この時の血漿中薬物濃度を調べると、マウス CYP11B2 に対する IC₅₀ を超えた曝露がかかっており、それに伴い血漿中アルドステロン濃度が有意に低下していた。以上から、第二章で報告した Compound 1 は十分に期待した酵素阻害作用を *in vivo* において発揮したことが示唆された。

以上の結果より、Compound 1 は *in vivo* においてアルドステロン合成酵素を阻害することで過剰なアルドステロン産生を抑制し、アルドステロンが引き起こす様々な病態に対して、その役割を解明するための有益な薬剤となることが期待できる。

4.2 今後の展望

Compound 1 の投与はマウス血漿中のアルドステロン濃度を低下させ、それに伴い、横行大動脈狭窄左室圧負荷に対して延命作用を示した。その作用メカニズムに関して検証すると、肺うっ血の改善作用が最も延命効果に寄与している可能性が大きいことが示された。しかしながら、これまでの研究により、圧負荷心不全モデルに対してミネラルコルチコイド受容体拮抗薬を投与した場合、線維化作用・心機能の改善が報告されており、今回のアルドステロン合成酵素阻害薬である Compound 1 の投与時に観察された結果とは合致しない。

圧負荷心不全マウスにおいて、ミネラルコルチコイド受容体の活性化は心肥大と心線維化を引き起こすが、ミネラルコルチコイド受容体はアルドステロンに依存せず、グルココルチコイドによって活性化されている可能性が報告されている。さらに、アルドステロンの作用として、ミネラルコルチコイド受容体を介さない非ゲノム作用に関する報告もなされている。ゆえに、Compound 1 の投与による血漿中のアルドステロン濃度の低下は、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬とは異なる新たな薬理作用をもたらす可能性が十分に考えられる(Fig. 4-1)。

現時点で、上記に示した、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬とアルドステロン合成酵素阻害薬によるアルドステロンシグナル遮断による薬理作用との違いは未だ明確となっておらず、その違いに関する詳細の解明が大いに期待される。今回用いたアルドステロン合成酵素阻害薬 Compound 1 は、*in vivo* において十分に血漿中アルドステロン濃度を低下させる作用を示し、*in vitro* における評価結果からも特異性は十分に担保されていると考えられた。しかしながら、1 種類の化合物のみで結論を出すことは望ましいとは言えないため、さらに構造の異なる複数のアルドステロン合成酵素阻害剤を用いて同様の結果が得られるかを検証していくことが重要となる。

アルドステロン合成酵素阻害薬はミネラルコルチコイド受容体拮抗薬とは異なる新規作用メカニズムにより延命作用をもたらす新規慢性心不全治療薬になる可能性があると考えられ、今後のさらなる研究により慢性心不全患者の予後改善薬となることが期待される。

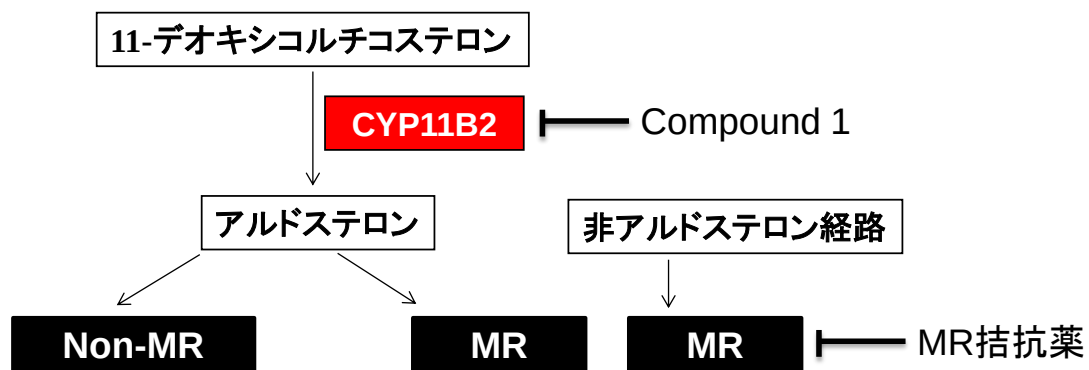


Fig. 4-1 CYP11B2 阻害薬とミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗薬の違いに関する考察

CYP11B2 阻害薬である Compound 1 はアルドステロン濃度を低下させることにより、アルドステロンにより MR を介さず直接活性化される Non-MR 経路とアルドステロンにより活性化される MR 経路をいずれも遮断することが可能と考えられる。それに対して、MR 拮抗薬では Non-MR 経路を抑制することができないが、アルドステロンにより活性化される MR 経路とアルドステロンに依存しない活性化経路（非アルドステロン経路）をいずれも抑制することが可能と考えられる。

参考文献

- (1) 平成 27 年人口動態統計月報年計(概数)の概況 厚生労働省
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai15/dl/kekka.pdf>
- (2) 循環器病の診断と治療に関するガイドライン:慢性心不全治療ガイドライン(2010 年改訂版)
<http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2010matsuzakih.pdf>
- (3) NEW 薬理学 改訂 5 版 田中 千賀子/加藤 隆一(編集) 南江堂
- (4) メルクマニュアル 第 18 版 日本語版 Mark H. Beers (著), 福島 雅典 (監修, 監修)
- (5) McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR; PARADIGM-HF Investigators and Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. N Engl J Med. 2014;371(11):993-1004. doi: 10.1056/NEJMoa1409077.
- (6) 生理学テキスト 大地 陸男(著)
- (7) The Consensus Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). N Engl J Med. 1987;316(23):1429-35, doi: 10.1056/NEJM198706043162301
- (8) Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Yusuf S, Pocock S; CHARM Investigators and Committees.. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. Lancet. 2003;362(9386):759-66. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14282-1
- (9) Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Reichstein T. Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism. Experientia. 1953;9(9):333-5.
- (10) アルダクトン A インタビューフォーム
http://www.info.pmda.go.jp/go/interview/2/671450_2133001C1097_2_1F

- (11) Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999; 341(10):709-17. doi: 10.1056/NEJM199909023411001
- (12) Delyani JA Mineralocorticoid receptor antagonists: the evolution of utility and pharmacology. *Kidney Int*. 2000;57(4):1408-11. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00983.x
- (13) Struthers A, Krum H, Williams GH. A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clin Cardiol*. 2008;31(4):153-8. doi: 10.1002/clc.20324.
- (14) de Gasparo M, Joss U, Ramjoué HP, Whitebread SE, Haenni H, Schenkel L, Kraehenbuehl C, Biollaz M, Grob J, Schmidlin J, et al. Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;240(2):650-6.
- (15) Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M; Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348(14):1309-21. doi: 10.1056/NEJMoa030207
- (16) Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B; EMPHASIS-HF Study Group. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011;364(1):11-21. doi: 10.1056/NEJMoa1009492
- (17) Müller-Vieira U, Angotti M, Hartmann RW. The adrenocortical tumor cell line NCI-H295R as an in vitro screening system for the evaluation of CYP11B2 (aldosterone synthase) and CYP11B1 (steroid-11beta-hydroxylase) inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;96(3-4):259-70. doi: 10.1016/j.jsbmb.2005.04.032

- (18) Bassett MH, Zhang Y, Clyne C, White PC, Rainey WE. Differential regulation of aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase transcription by steroidogenic factor-1. *J Mol Endocrinol*. 2002;28(2):125-35. doi: 10.1677/jme.0.0280125
- (19) Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology*. 2005;146(6):2544-50. doi: 10.1210/en.2005-0096
- (20) Cerny MA. Progress towards clinically useful aldosterone synthase inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(12):1385-401. doi: 10.2174/1568026611313120003
- (21) Lamberts SW, Bruining HA, Marzouk H, Zuiderwijk J, Uitterlinden P, Blijd JJ, Hackeng WH, De Jong FH. The new aromatase inhibitor CGS-16949A suppresses aldosterone and cortisol production by human adrenal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;69(4):896-901. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-69-4-896>
- (22) Ménard J, Gonzalez MF, Guyene TT, Bissery A. Investigation of aldosterone-synthase inhibition in rats. *J Hypertens*. 2006;24(6):1147-55. doi: 10.1097/01.hjh.0000226205.65442.f2
- (23) Mulder P, Mellin V, Favre J, Vercauteren M, Remy-Jouet I, Monteil C, Richard V, Renet S, Henry JP, Jeng AY, Webb RL, Thuillez C. Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone. *Eur Heart J*. 2008;29(17):2171-9. doi: 10.1093/eurheartj/ehn277.
- (24) Minnaard-Huiban M, Emmen JM, Roumen L, Beugels IP, Cohuet GM, van Essen H, Ruijters E, Pieterse K, Hilbers PA, Ottenheijm HC, Plate R, de Gooyer ME, Smits JF, Hermans JJ. Fadrozole reverses cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive heart failure rats: discordant enantioselectivity versus reduction of plasma aldosterone. *Endocrinology*. 2008;149(1):28-31. doi: 10.1210/en.2007-0584

- (25) Martin RE, Lehmann J, Alzieu T, Lenz M, Carnero Corrales MA, Aebi JD, Märki HP, Kuhn B, Amrein K, Mayweg AV, Britton R. Synthesis of annulated pyridines as inhibitors of aldosterone synthase (CYP11B2). *Org Biomol Chem.* 2016;14(25):5922-7. doi: 10.1039/c6ob00848h.
- (26) Martin RE, Aebi JD, Hornsperger B, Krebs HJ, Kuhn B, Kuglstatter A, Alker AM, Märki HP, Müller S, Burger D, Ottaviani G, Riboulet W, Verry P, Tan X, Amrein K, Mayweg AV. Discovery of 4-Aryl-5,6,7,8-tetrahydroisoquinolines as Potent, Selective, and Orally Active Aldosterone Synthase (CYP11B2) Inhibitors: In Vivo Evaluation in Rodents and Cynomolgus Monkeys. *J Med Chem.* 2015;58(20):8054-65. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00851.
- (27) Hoyt SB, Petrilli W, London C, Liang GB, Tata J, Hu Q, Yin L, van Sok A, Cai TQ, Stribling S, Pai LY, Ma X, Metzger J, Verras A, McMasters D, Chen Q, Tung E, Tang W, Salituro G, Buist N, Clemas J, Zhou G, Gibson J, Maxwell CA, Lassman M, McLaughlin T, Castro-Perez J, Szeto D, Forrest G, Hajdu R, Rosenbach M, Xiong Y. Discovery of Triazole CYP11B2 Inhibitors with in Vivo Activity in Rhesus Monkeys. *ACS Med Chem Lett.* 2015;6(8):861-5. doi: 10.1021/acsmedchemlett.5b00048.
- (28) Weldon SM, Cerny MA, Gueneva-Boucheva K, Cogan D, Guo X, Moss N, Parmentier JH, Richman JR, Reinhart GA, Brown NF. Selectivity of BI 689648, a Novel, Highly Selective Aldosterone Synthase Inhibitor: Comparison with FAD286 and LCI699 in Nonhuman Primates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;359(1):142-50. doi: 10.1124/jpet.116.236463.
- (29) Cerny MA, Csengery A, Schmenk J, Frederick K. Development of CYP11B1 and CYP11B2 assays utilizing homogenates of adrenal glands: Utility of monkey as a surrogate for human. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;154:197-205. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.08.004.
- (30) Papillon JP, Adams CM, Hu QY, Lou C, Singh AK, Zhang C, Carvalho J, Rajan S, Amaral A, Beil ME, Fu F, Gangl E, Hu CW, Jeng AY, LaSala D, Liang G,

- Logman M, Maniara WM, Rigel DF, Smith SA, Ksander GM. Structure-Activity Relationships, Pharmacokinetics, and in Vivo Activity of CYP11B2 and CYP11B1 Inhibitors. *J Med Chem.* 2015;58(11):4749-70. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00407.
- (31) Meredith EL, Ksander G, Monovich LG, Papillon JP, Liu Q, Miranda K, Morris P, Rao C, Burgis R, Capparelli M, Hu QY, Singh A, Rigel DF, Jeng AY, Beil M, Fu F, Hu CW, LaSala D. Discovery and in Vivo Evaluation of Potent Dual CYP11B2 (Aldosterone Synthase) and CYP11B1 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2013;4(12):1203-7. doi: 10.1021/ml400324c.
- (32) Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem.* 1998;41(7):1007-10.
- (33) Fisher A. Human aldosterone synthase and 11 β -hydroxylase: studies on the relationship of structure and function and their clinical implications 1999 Glasgow Theses Service <http://theses.gla.ac.uk/839/1/1999fisherphd.pdf>
- (34) Vecchiola A, Lagos CF, Fuentes CA, Allende F, Campino C, Valdivia C, Tapia-Castillo A, Ogishima T, Mukai K, Owen G, Solari S, Carvajal CA, Fardella CE. Different effects of progesterone and estradiol on chimeric and wild type aldosterone synthase in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11:76. doi: 10.1186/1477-7827-11-76.
- (35) Spruill LS, Baicu CF, Zile MR, McDermott PJ. Selective translation of mRNAs in the left ventricular myocardium of the mouse in response to acute pressure overload. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44(1):69-75. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.10.011
- (36) Hsu S, Nagayama T, Koitabashi N, Zhang M, Zhou L, Bedja D, Gabrielson KL, Molkentin JD, Kass DA, Takimoto E. Phosphodiesterase 5 inhibition blocks pressure overload-induced cardiac hypertrophy independent of the calcineurin pathway. *Cardiovasc Res.* 2009;81(2):301-9. doi: 10.1093/cvr/cvn324.

- (37) Tsutomoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, Ohnishi M, Sugimoto Y, Kinoshita M. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 1997;96(2):509-16 doi: 10.1161/01.CIR.96.2.509
- (38) Maeda K, Tsutomoto T, Wada A, Hisanaga T, Kinoshita M. Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *Am Heart J*. 1998;135:825-32. doi: 10.1016/S0002-8703(98)70041-9
- (39) McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, Morton JJ, Ford I, Morrison CE, Tunstall-Pedoe H, McMurray JJ, Dargie HJ. Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *Lancet*. 1998;351:9-13. doi: 10.1016/S0140-6736(97)03034-1
- (40) Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93(2):215-28. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81573-1
- (41) Vega RB, Bassel-Duby R, Olson EN. Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(39):36981-4. doi: 10.1074/jbc.R300023200
- (42) Wang Y, De Keulenaer GW, Weinberg EO, Muangman S, Gualberto A, Landschulz KT, Turi TG, Thompson JF, Lee RT. Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down Syndrome Critical Region-1 in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(2):H533-9. doi: 10.1152/ajpheart.00002.2002
- (43) Liu W, Zi M, Tsui H, Chowdhury SK, Zeef L, Meng QJ, Travis M, Prehar S, Berry A, Hanley NA, Neyses L, Xiao RP, Oceandy D, Ke Y, Solaro RJ, Cartwright EJ, Lei M, Wang X. A novel immunomodulator, FTY-720 reverses existing

- cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by targeting NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling and periostin. *Circ Heart Fail.* 2013;6(4):833-44. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000123
- (44) Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(18):8277-81. doi: 10.1073/pnas.88.18.8277
- (45) Chen Y, Guo H, Xu D, Xu X, Wang H, Hu X, Lu Z, Kwak D, Xu Y, Gunther R, Huo Y, Weir EK. Left ventricular failure produces profound lung remodeling and pulmonary hypertension in mice: heart failure causes severe lung disease. *Hypertension.* 2012;59(6):1170-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186072
- (46) Krozowski Z, Funder JW. Mineralocorticoid receptors in the rat lung. *Endocrinology.* 1981 ;109(6):1811-3. doi: 10.1210/endo-109-6-1811
- (47) Chabot A, Jiang BH, Shi Y, Tardif JC, Dupuis J. Role of aldosterone on lung structural remodelling and right ventricular function in congestive heart failure. *BMC Cardiovasc Disord.* 2011;11:72. doi: 10.1186/1471-2261-11-72. doi: 10.1186/1471-2261-11-72
- (48) Hofmann A, Brunssen C, Peitzsch M, Martin M, Mittag J, Jannasch A, Engelmann F, Brown NF, Weldon SM, Huber J, Streicher R, Deussen A, Eisenhofer G, Bornstein SR, Morawietz H. Aldosterone Synthase Inhibition Improves Glucose Tolerance in Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rats. *Endocrinology.* 2016 ;157(10):3844-3855. doi: 10.1210/en.2016-1358
- (49) Arterbery AS, Fergus DJ, Fogarty EA, Mayberry J, Deitcher DL, Kraus WL, Bass AH. Evolution of ligand specificity in vertebrate corticosteroid receptors. *BMC Evol Biol.* 2011;11:14. doi: 10.1186/1471-2148-11-14.
- (50) William F. Ganong *Ganong's Review of Medical Physiology* 23rd Edition

- (51) Katada J, Meguro T, Saito H, Ohashi A, Anzai T, Ogawa S, Yoshikawa T. Persistent cardiac aldosterone synthesis in angiotensin II type 1A receptor-knockout mice after myocardial infarction. *Circulation*. 2005;111(17):2157-64. doi: 10.1161/01.CIR.0000163562.82134.8E
- (52) Qu J, Volpicelli FM, Garcia LI, Sandeep N, Zhang J, Márquez-Rosado L, Lampe PD, Fishman GI. Gap junction remodeling and spironolactone-dependent reverse remodeling in the hypertrophied heart. *Circ Res*. 2009;104(3):365-71. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184044
- (53) Garnier A, Bendall JK, Fuchs S, Escoubet B, Rochais F, Hoerter J, Nehme J, Ambroisine ML, De Angelis N, Morineau G, d'Estienne P, Fischmeister R, Heymes C, Pinet F, Delcayre C. Cardiac specific increase in aldosterone production induces coronary dysfunction in aldosterone synthase-transgenic mice. *Circulation*. 2004;110(13):1819-25. doi: 10.1161/01.CIR.0000142858.44680.27
- (54) Mihailidou AS, Loan Le TY, Mardini M, Funder JW. Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction. *Hypertension*. 2009;54(6):1306-12. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.136242
- (55) Dooley R, Harvey BJ, Thomas W. Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;350(2):223-34. doi: 10.1016/j.mce.2011.07.019
- (56) Chapagain A, Ashman N. Hyperkalaemia in the age of aldosterone antagonism. *QJM*. 2012;105(11):1049-57. doi: 10.1093/qjmed/hcs106
- (57) Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, Schütz G. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(16):9424-9. doi: 10.1073/pnas.95.16.9424

- (58) Bleich M, Warth R, Schmidt-Hieber M, Schulz-Baldes A, Hasselblatt P, Fisch D, Berger S, Kunzelmann K, Kriz W, Schütz G, Greger R. Rescue of the mineralocorticoid receptor knock-out mouse. *Pflugers Arch.* 1999;438(3):245-54. doi: 10.1007/s004240050906
- (59) Makhanova N, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA, Kim HS, Smithies O. Disturbed homeostasis in sodium-restricted mice heterozygous and homozygous for aldosterone synthase gene disruption. *Hypertension.* 2006;48(6):1151-9. doi: 10.1161/01.HYP.0000249902.09036.e7

公表論文

Furuzono S, Meguro M, Miyauchi S, Inoue S, Homma T, Yamada K, Tagawa Y, Nara F, Nagayama T. A novel aldosterone synthase inhibitor ameliorates mortality in pressure-overload mice with heart failure. *Eur J Pharmacol.* 2016;795:58-65. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.11.049.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なご指導、ご助言を賜りました東京工業大学大学院生命理工学研究科生体分子機能工学専攻 准教授 田川 陽一先生に心より御礼申し上げます。本研究を行う機会を与えて頂きました、第一三共株式会社研究統括部執行役員 大槻昌彦博士、第一三共株式会社 臓器保護ラボラトリー長 高橋正明博士に深く感謝致します。

本研究全般および本論文作成にあたり、多大なるご指導とご鞭撻を賜り、さらには心不全モデルマウスを作製するにあたり、高度な技術を必要とする横行大動脈狭窄技術で多大なるご支援をいただきました第一三共株式会社 細胞治療ラボラトリー永山 貴弘博士に心より感謝申し上げます。また、本研究全般および本論文作成にあたり、多大なるご指導とご鞭撻を賜りました同バイオ・癌免疫ラボラトリー 奈良 太博士に心より感謝申し上げます。

共同研究者として多大なるご助力を賜りました、第一三共株式会社臓器保護ラボラトリー一本間 剛博士、同希少疾患・LCM ラボラトリー山田 啓介博士に心より御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、化学合成の労を取って頂きました、第一三共株式会社 バイオ・癌免疫ラボラトリー 目黒 正規博士、同分析評価研究所 宮内 智氏、薬物動態評価の労を取っていただきました同薬物動態研究所 井上 晋一博士を始めとする多くの共同研究者の方々からの有益なご助言と多大なご協力を賜り完成に至ったものであり、ここに心より御礼申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり多くの励ましを頂いた第一三共株式会社臓器保護ラボラトリー 田中 純博士に感謝致します。