

ウロテンシン II/GPR14 シグナルの  
心血管障害における生理学的意義の解明と  
新規 GPR14 拮抗薬 DS37001789 の薬効薬理に関する研究

西 美奈

2022 年

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とする。

基礎となる論文

1. Nishi M, Yonesu K, Tagawa H, Kato M, Marumoto S, Nagayama T. A Novel and Highly Potent Urotensin II Receptor Antagonist Inhibits Urotensin II-Induced Pressure Response in Mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2019;73:15-21.
2. Nishi M, Tagawa H, Ueno M, Marumoto S, Nagayama T. The urotensin II receptor antagonist DS37001789 ameliorates mortality in pressure-overload mice with heart failure. *Heliyon.* 2020;6:e03352.

## 略語一覧（アルファベット順）

略語	英語	日本語
ACE	angiotensin converting enzyme	アンジオテンシン変換酵素
ADME	absorption, distribution, metabolism, excretion	吸収、分布、代謝、排泄
ANP	atrial natriuretic peptides	心房性ナトリウム利尿ペプチド
ARB	angiotensin II receptor blocker	アンジオテンシン II 受容体拮抗薬
ARNI	angiotensin receptor-neprilysin inhibition	アンジオテンシン受容体/ネプリリシン阻害薬
AUC	area under the curve	曲線下面積
BNP	brain natriuretic peptide	脳性ナトリウム利尿ペプチド
bpm	beats per minute	1 分あたりの心拍数
COL1A2	collagen type I alpha 2 chain	コラーゲン $\alpha$ -2 (I) 鎖
Ct	threshold cycle	Ct 値
CPM	count per minute	カウント毎分
CYP1A2		シトクロム P450 1A2
CYP2C9		シトクロム P450 2C9
CYP2D6		シトクロム P450 2D6
CYP3A4		シトクロム P450 3A4
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
DTT	dithiothreitol	ジチオトレイトール
EF	ejection fraction	駆出率
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
GPCR	G protein-coupled receptor	G タンパク質共役型受容体
HFmrEF	heart failure with mid-range ejection fraction	左室駆出率が軽度低下した心不全
HFpEF	heart failure with preserved ejection fraction	左室駆出率が保たれた心不全

略語	英語	日本語
HFpEF	heart failure with preserved	左室駆出率が改善した心不全
improved	ejection fraction, improved	
HFrEF	heart failure with reduced ejection	左室駆出率が低下した心不全
	fraction	
Lung/BW	lung weight/ body weight	肺重量/体重比
LV	left ventricular	左心室
LV/BW	left ventricular weight/ body weight	左心室重量/体重比
LVDd	left ventricular end-diastolic diameter	左室拡張末期径
LVDs	left ventricular end-systolic diameter	左室収縮末期径
LVEDV	left ventricular end-diastolic volume	左室拡張末期容積
LVEF	left ventricular ejection fraction	左室駆出率
LVESV	left ventricular end-systolic volume	左室収縮末期容積
LVP	left ventricular pressure	左室収縮期圧
MBP	mean blood pressure	平均血圧
MRA	mineral corticoid receptor antagonist	ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬
NFAT	nuclear factor of activated T-cells	活性型 T リンパ核ファクター
PAMPA	parallel artificial membrane	人工膜透析性試験
	permeability assay	
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PLN	phospholamban	ホスホランバン
PVDF	poly vinylidene di fluoride	フッ化ビニリデン樹脂
RCAN-1	regulator of calcineurin 1	カルシニューリン 1
SEM	standard error of the mean	標準誤差
SERCA2a	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum	心筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase
	$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2a	
SGLT	sodium/glucose cotransporter	ナトリウム-グルコース 共輸送体
TAC	transverse aortic constriction	横行大動脈狭窄
U-II	urotensin II	ウロテンシン II

## 目次

### 第1章 序論

1.1 心不全の疫学と病態 .....	1
1.2 心不全の治療と現状 .....	3
1.3 Urotensin IIとGPR14 .....	5
1.4 Urotensin II/GPR14 シグナルと生理作用 .....	6
1.5 GPR14 拮抗薬の開発状況と問題点.....	8
1.6 本研究の目的と意義 .....	10

### 第2章 *In vitro* プロファイル .....

2.1 目的 .....	11
2.2 GPR14 結合試験.....	11
2.2.1 方法.....	11
2.2.1.1 被験物質 .....	11
2.2.1.2 細胞の維持・継代 .....	11
2.2.1.3 リガンド結合試験 .....	12
2.2.2 結果.....	12
2.3 ADME 評価.....	13
2.3.1 方法.....	13
2.3.1.1 脂溶性評価試験 .....	13
2.3.1.2 溶解性試験 .....	14
2.3.1.3 膜透過性試験 .....	14
2.3.1.4 肝ミクロソームにおける代謝安定性試験 .....	14
2.3.1.5 マウス血漿タンパク結合率の測定 .....	14
2.3.1.6 シトクロム P450 (CYP) の直接阻害評価 .....	15
2.3.2 結果.....	15
2.4 考察 .....	16

### 第3章 ラットおよびサルの摘出血管でのヒト U-II 誘発収縮に対する抑制効果

3.1 目的 .....	17
3.2 方法 .....	17

3.2.1	試薬.....	17
3.2.2	動物.....	17
3.2.3	ラットおよびサル摘出動脈標本の作製.....	18
3.2.4	摘出動脈標本の張力変化の測定.....	18
3.3	結果 .....	19
3.4	考察 .....	20
第4章	マウスでのヒト U-II が誘発する昇圧反応に対する抑制効果 .....	22
4.1	目的 .....	22
4.2	方法 .....	22
4.2.1	試薬.....	22
4.2.2	動物.....	22
4.2.3	DS37001789 の正常血圧および心収縮に対する評価.....	22
4.2.4	U-II 昇圧反応試験.....	23
4.2.5	単回投与時の DS37001789 の血漿中濃度測定.....	23
4.2.6	統計解析.....	23
4.3	結果 .....	24
4.4	考察 .....	27
第5章	TAC マウスでの心肥大および心機能障害に対する改善作用 .....	29
5.1	目的 .....	29
5.2	方法 .....	30
5.2.1	試薬.....	30
5.2.2	動物.....	30
5.2.3	TAC マウスの作製.....	31
5.2.4	心エコー解析.....	32
5.2.5	血行力学検査.....	32
5.2.6	臓器重量の測定.....	32
5.2.7	PCR 法による左心室組織 mRNA 発現解析.....	32
5.2.8	ウェスタンブロット法による GPR14 タンパク質発現解析.....	33
5.2.9	ラット単離心筋細胞試験での GPR14 タンパク質発現解析.....	34

5.2.10	DS37001789 の血漿中濃度測定.....	35
5.2.11	統計解析.....	35
5.3	結果.....	36
5.3.1	TAC マウスでの DS37001789 の生存率改善作用.....	36
5.3.2	左心室収縮機能評価.....	37
5.3.3	臓器重量の評価.....	40
5.3.4	左心室の mRNA 発現解析.....	41
5.3.5	左心室の GPR14 発現解析.....	44
5.3.6	血漿中薬物濃度解析.....	46
5.4	考察.....	47
第 6 章	TAC マウスの心機能に対する GPR14 欠損の影響.....	51
6.1	目的.....	51
6.2	方法.....	51
6.2.1	動物.....	51
6.2.2	U-II 昇圧反応試験.....	51
6.2.3	TAC マウスの作製.....	52
6.2.4	心エコー解析.....	52
6.2.5	臓器重量の測定.....	52
6.2.6	統計解析.....	52
6.3	結果.....	52
6.3.1	GPR14 欠損マウスでの U-II 昇圧試験.....	52
6.3.2	TAC マウスの生存率に対する GPR14 欠損の影響.....	54
6.3.3	TAC マウスの心機能に対する GPR14 欠損の影響.....	55
6.3.4	臓器重量の評価.....	56
6.4	考察.....	57
第 7 章	結論.....	58
	参考文献.....	60
	謝辞.....	67

## 第1章 序論

### 1.1 心不全の疫学と病態

心疾患は、悪性新生物に次いで、わが国の死因第2位である（図1、令和2年（2020）人口動態統計月報年系（概数）の概況）。高齢者の割合の増加とともに、心疾患は健康長寿社会の実現の阻害要因となるため、効果的な新規治療戦略が望まれている。心疾患には心筋梗塞や狭心症などの虚血性心疾患、不整脈、心不全等があり、なかでも、心不全での死者数は年間8万人である。日本で実施された心不全患者の予測に関する疫学研究では、心不全患者は2030年に約130万人に達すると推測されている（Okura *et al.*, 2008）。心不全の生命予後は極めて悪く、進行がんとほとんど変わらず、5年生存率が50%と言われている（Shiba *et al.*, 2008）。

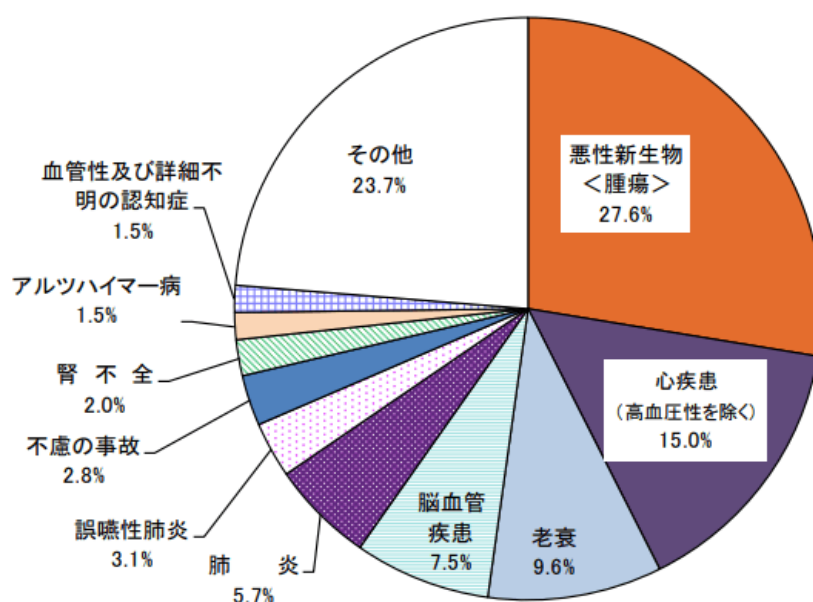


図1. 主な死因の構成割合  
厚生労働省ホームページ「令和2年（2020）人口動態統計月報年系（概数）の概況」から引用

日本循環器学会が作成している「急性・慢性心不全診療ガイドライン（2017年改訂版）」によれば、「心不全」とは、「なんらかの心臓機能障害、すなわち、心臓に器質的および/あるいは機能的異常が生じてポンプ機能の代償機転が破綻し



た結果、呼吸困難・倦怠感や浮腫が出現し、それに伴い運動耐容能が低下する臨床症候群」と定義される。心不全は、その病状によってステージ A から D まで段階的に分類される。ステージ A は、器質性心疾患（心臓の弁、血管あるいは筋肉に異常がある病気）のないリスクステージ、ステージ B は、器質性心疾患のあるリスクステージ、ステージ C は、心不全ステージおよびステージ D は、治療抵抗性心不全ステージである（図 2）（急性・慢性心不全診療ガイドライン（2017 年改訂版）、2018）。

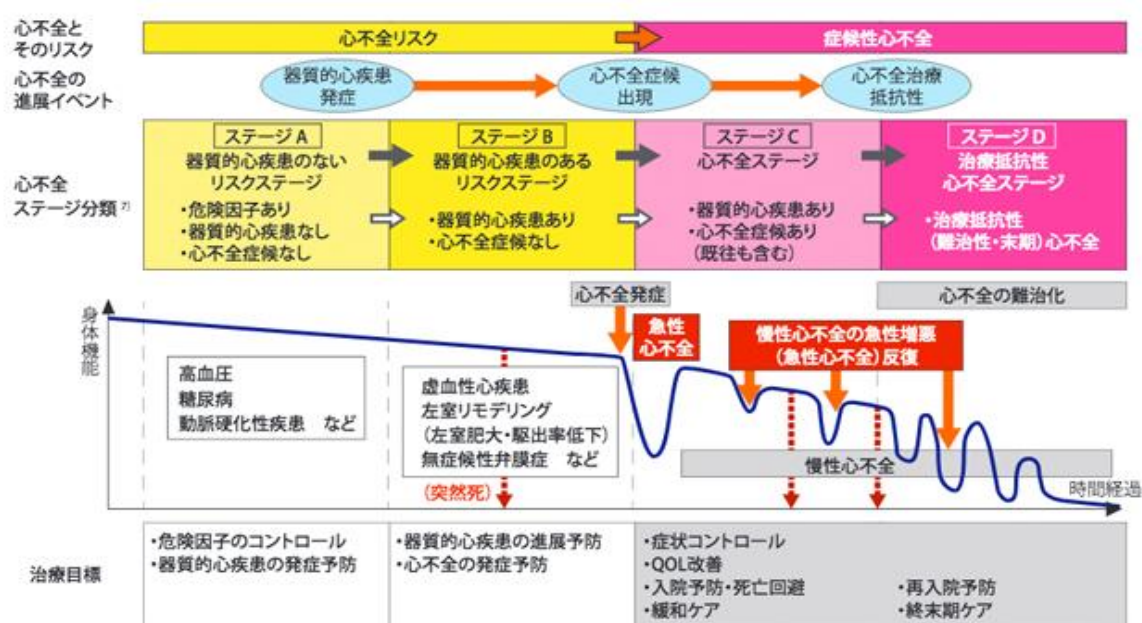


図 2. 心不全とそのリスクの進展ステージ

急性・慢性心不全診療ガイドライン（2017 年改訂版）から引用

心不全は、心臓が代謝要求に十分な量の血液を組織に共有できなくなり、心臓変化に関連して肺または全身静脈圧が上昇する結果、臓器うっ血をきたす。この状態は、収縮機能、拡張機能あるいは一般的に両機能に異常を来した結果として発生する。また、心不全は、急性心不全と慢性心不全に分類される。急性心不全は、心臓ポンプ機能低下を代償する時間的余裕がない状態で起こり、心不全症状が数時間から数日の経過で急速に出現する状態を指す。急性心不全は、多くが慢性心不全の急性増悪である。慢性心不全は、長期の経過で心臓のポンプ機能が徐々に低下し、これを補うための代償機構が働き、心臓が肥大し、心拍数が増加する状態を指す。心不全の急性増悪を繰り返すことにより進行する。そのため、急性増悪を防ぐことが、生存率の改善とともに心不全の重要な治療目標となる。

慢性心不全は、心室の肥大や拡大、収縮不全（心筋が薄く心室が拡張し、血液を送り出す力が弱い状態）、拡張不全（心筋が厚く心室が狭くなり、心臓が固くて膨らみにくい）などが進行することが知られており、これは心室リモデリングと呼ばれている。この過程では、ミクロからマクロまで変性が認められ、心筋細胞の肥大、変性、脱落や間質の線維化を伴う。その背景には交感神経系、レニン・アンジオテンシン系、炎症性サイトカインなどの液性因子が関与している（図 3、甲斐, 2012）。

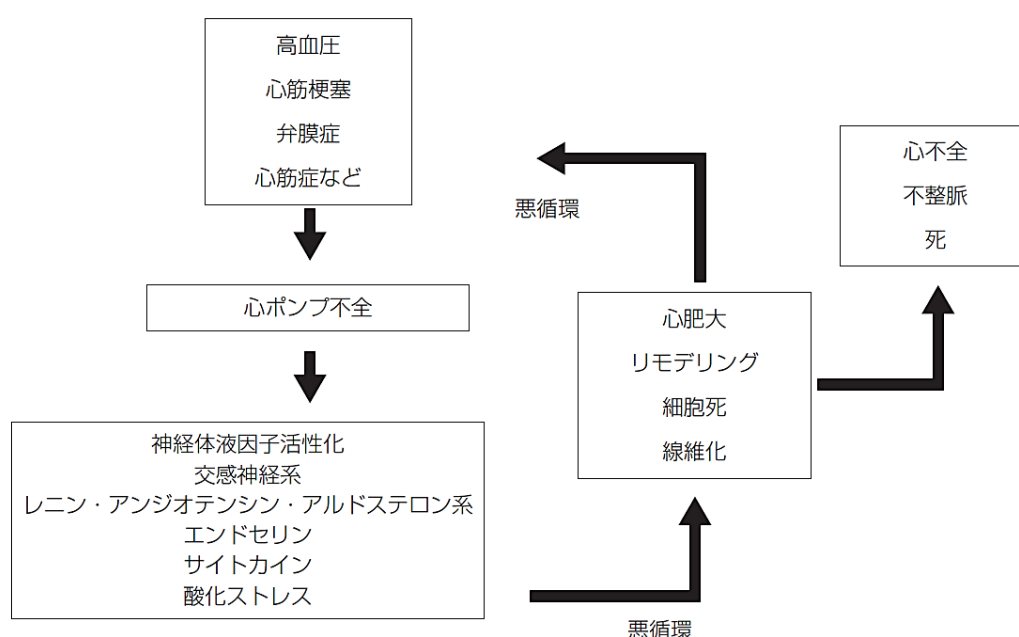


図 3. 慢性心不全の病態

## 1.2 心不全の治療と現状

急性・慢性心不全診療ガイドライン（2017 年改訂版）で推奨されている薬剤には、症状を緩和する薬剤として、利尿薬、硝酸薬または強心薬、余命を延長する薬剤として、アンジオテンシン変換酵素（angiotensin converting enzyme; ACE）阻害薬、β遮断薬、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬（mineral corticoid receptor antagonist; MRA）またはアンジオテンシン II 受容体拮抗薬（angiotensin II receptor blocker; ARB）がある。慢性心不全におけるこれらの薬剤使用のエビデンスは左室収縮率（left ventricular ejection fraction; LVEF）に基づき構築されている（表 1）

(Ponikowski *et al.*, 2016; Yancy *et al.*, 2013 改編)。

表 1. LVEF による心不全の分類

定義	LVEF	説明
LVEF の低下した心不全 (heart failure with reduced ejection fraction; HFrEF)	40%未満	収縮不全が主体
LVEF の保たれた心不全 (heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF)	50%以上	拡張不全が主体
LVEF が軽度低下した心不全 (heart failure with mid-range ejection fraction; HFmrEF)	40%以上 50%未満	境界型心不全
LVEF が改善した心不全 (heart failure with preserved ejection fraction, improved; HFpEF improved)	40%以上	LVEF が改善した心不全

LVEF の低下した心不全 (heart failure with reduced ejection fraction; HFrEF) では、病態の主軸である神経内分泌系亢進の抑制を目的として交感神経系に対する $\beta$ 遮断薬、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系に対する ACE 阻害薬、ARB、MRA が使用され、うっ血解除を目的として利尿薬が用いられている。これらの薬剤に加えて、昨年、sodium/glucose cotransporter (SGLT) 2 阻害薬およびアンジオテンシン受容体/ネプリライシン阻害薬 (angiotensin receptor-neprilysin inhibition; ARNI) が HFrEF の治療アルゴリズムに加わった (図 4) (2021 年 JCS/JHFS ガイドラインフォーカスアップデート版急性・慢性心不全診療)。しかし、これらの治療薬の作用機序は、後負荷 (心臓が収縮した直後に心臓にかかる負荷) および前負荷 (心臓が収縮する直前に心臓にかかる負荷) の軽減であり、いくつかの薬剤を併用したとしても予後の改善には限界がある。一方で、LVEF の保たれた心不全 (heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF) では、予後を改善する薬物治療はまだ確立しておらず、うっ血に対する利尿薬と、高血圧や糖尿病、心房細動の併存症の治療が中心である。HFpEF は、高齢の女性に多

く見られ、今後高齢化が進むにつれて患者数も増えていくことから、HFpEF に対する有効な薬剤の開発は喫緊の課題である。このように慢性心不全の治療薬の治療満足度は未充足であり、治療薬の選択肢を増やすため、更には、標準治療への上乗せで有効性を高めるため、作用機序の異なる薬剤の開発は極めて重要

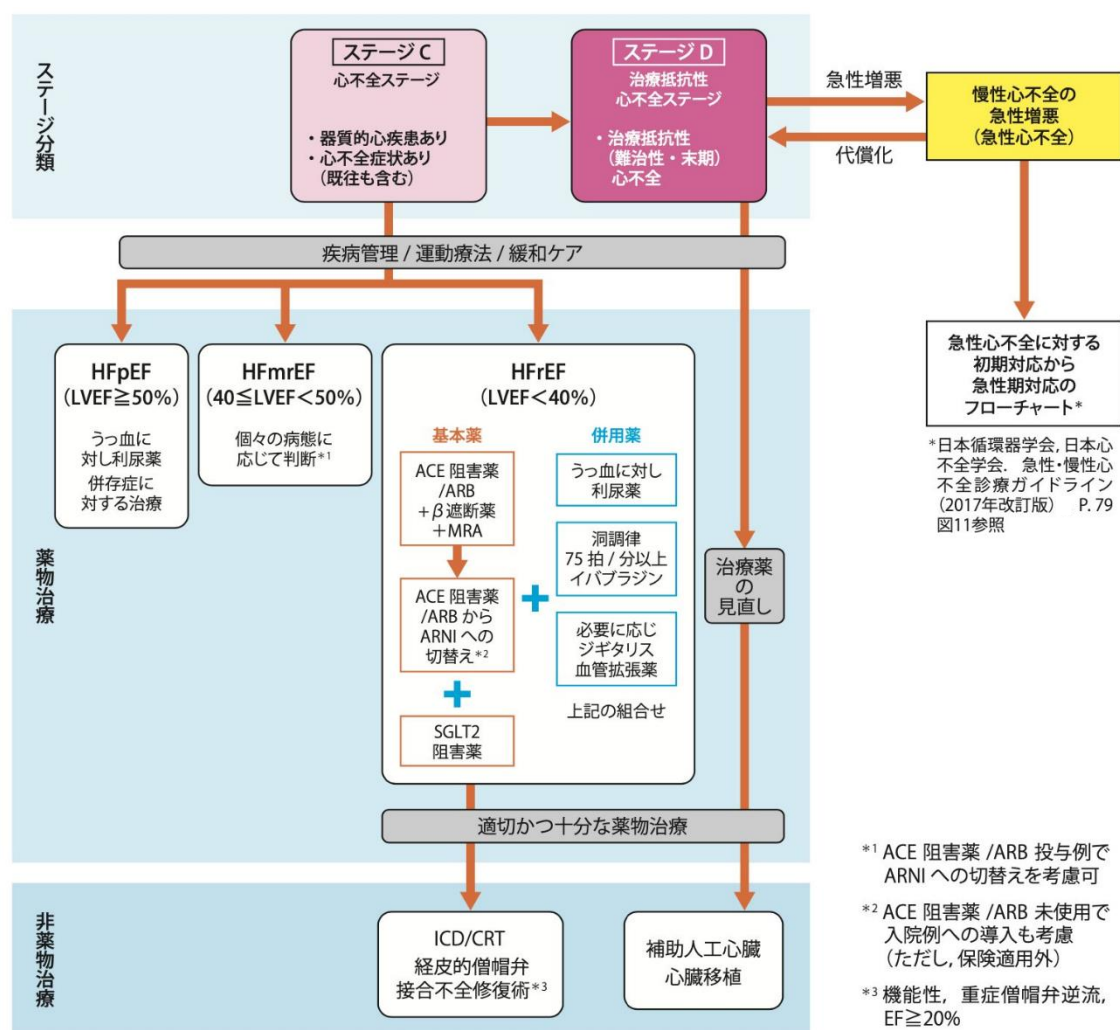


図 4. 心不全治療アルゴリズム

である。

### 1.3 Urotensin II と GPR14

Urotensin II（U-II）は、1969年代に魚類の神経分泌ホルモンとして発見された環状ペプチド分子である。その後、1998年にヒト prepro-U-II の存在が報告され（Coulouarn *et al.*, 1998）、翌1999年にはU-IIが当時オーファンGタンパク質共役

型受容体（G protein-coupled receptor; GPCR）であったGPR14のリガンドとして同定された（Ames *et al.*, 1999）。ヒトU-IIのcDNAは688 bpからなり、塩基配列中には3ヶ所の構造的に切断されやすい多塩基性切断部位が存在する。ヒトU-IIにはprepro-U-II<sub>A</sub>（139残基）とprepro-U-II<sub>B</sub>（124残基）の2つの異なる前駆体ホルモンが存在するが、最終的には同じ11個のアミノ酸からなるU-IIが作られる。種によりアミノ酸数は異なり、ヒトとサルは11残基、ラットは14残基からなるが、受容体に作用する環状部分は共通である（図5、Douglas *et al.*, 2005）。生理作用としては、強い血管収縮作用があり、その作用はエンドセリンよりも10-20倍強い。しかし、単離血管における収縮反応が動物種差と血管床ごとで極めて多様であり、血管収縮に加えて内皮依存性の血管弛緩作用を示すことも特徴である（Bottrill *et al.*, 2000; Douglas *et al.*, 2000）。この点は、すべての血管で収縮作用を示すエンドセリンやアンジオテンシンIIとは異なる。

U-IIの受容体であるGPR14は、クラスAのロドプシン様受容体に分類されるGPCRである。ヒトGPR14は389残基からなり、サルと97%、ラットと75%、マウスと76%相同性を有する。U-II以外にU-II関連ペプチド（配列はACFWKYCV）もGPR14の内因性のリガンドとして知られている。GPR14は、中枢神経系では大脳、小脳、脳幹部、下垂体に高発現しており、末梢組織では種々の組織に発現するが、特に左心室、副腎、精巣における発現が高い。



図 5. U-II の構造

#### 1.4 Urotensin II/GPR14 シグナルと生理作用

U-II/GPR14 シグナルは、中枢神経系では神経伝達物質として行動の調節などに関連し、一方、末梢組織では循環調節ホルモンとして血管収縮、心筋収縮、心肥大および線維化作用を有する（Cheung *et al.*, 2004）。末梢組織でのU-II発現は副腎に、GPR14は心臓に高発現することから、U-IIは副腎から分泌された後、

古典的なエンドクリン機構にて心臓に作用すると考えられ、U-II の病態生理的役割で最も注目されているのが心不全である。事実、心不全患者の血中 U-II 濃度が有意に増加しており、拡張型心筋症、虚血性心疾患のいずれによる心不全でも、心臓組織中の U-II、GPR14 発現ならびに U-II 結合親和性が増加していることも報告されている (Douglas *et al.*, 2002)。心不全以外にも未透析、透析中の腎不全 (Totsune *et al.*, 2001)、腎機能が正常な糖尿病 (Totsune *et al.*, 2003)、動脈硬化 (Suguro *et al.*, 2008)、喘息 (Maclean *et al.*, 2000) 患者等で U-II ならびに GPR14 の発現が血中や各組織で上昇していることも示されている。このように病態で亢進した U-II/GPR14 シグナル (図 6、吉本 他, 2004) の抑制は、心血管疾患の重要な治療標的となる可能性があるため、GPR14 拮抗薬について多くの研究開発が推進されている。

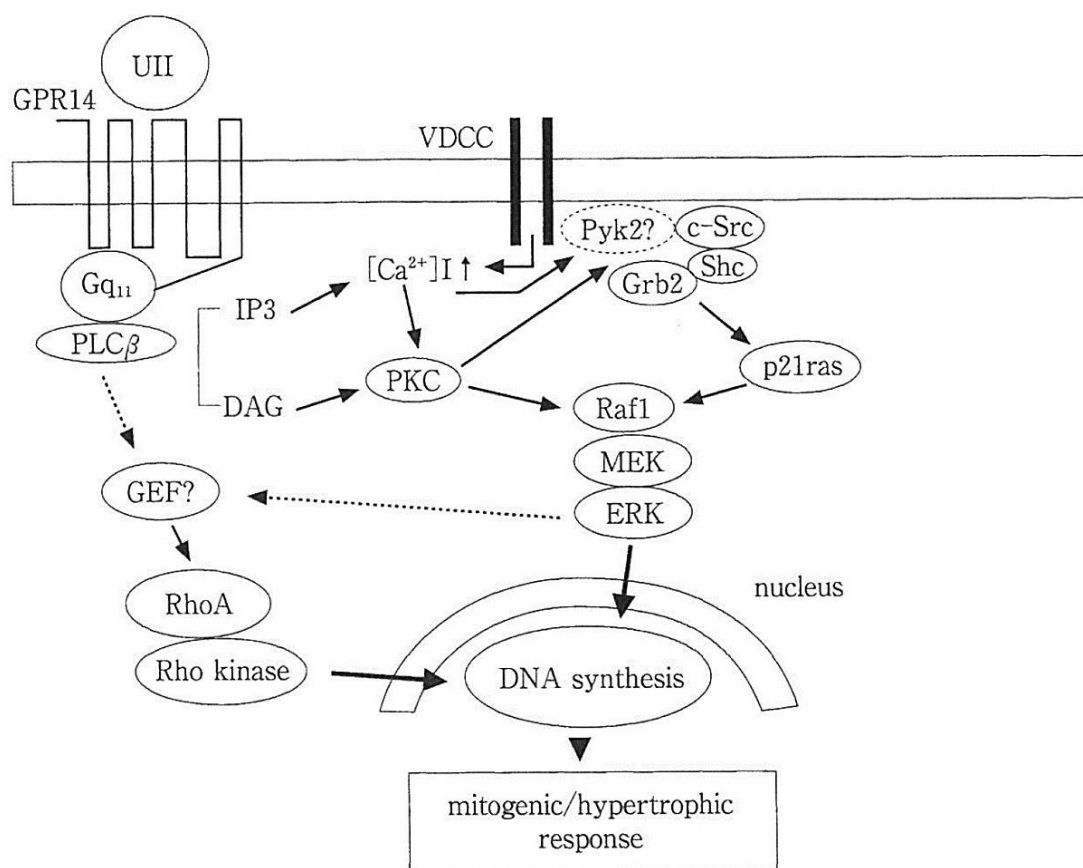


図 6. U-II と GPR14 シグナル



## 1.5 GPR14 拮抗薬の開発状況と問題点

前臨床研究では、幾つかの非ペプチド性 GPR14 拮抗薬が様々な動物モデルで薬効を示している（表 2、Nassour *et al.*, 2019 を基に改編）。GPR14 拮抗薬が様々な疾患の治療薬となる可能性を示す研究があるにも関わらず、GPR14 拮抗薬の初期の臨床試験ではヒトでの有効性は限定的であった。これまでに臨床試験が実施された化合物を表 3 に示す。非ペプチド性の GPR14 拮抗薬 3 化合物について、臨床試験が実施された。ACT-058362 は臨床試験が最初に実施された GPR14 拮抗薬であるが、第二相臨床試験では II 型糖尿病患者の血糖値に影響を与えず（Sidharta *et al.*, 2009）、また、II 型糖尿病腎症の高血圧患者でのアルブミン尿、血圧、糸球体ろ過量および腎血流量に変化を与えなかった（Vogt *et al.*, 2010）。GSK1440115 は健常者と喘息患者で安全性と忍容性が高かったが、喘息患者の気管支拡張を示さず、メタコリンによる気管支痙攣に対する抑制作用も認められなかった（Portnoy *et al.*, 2013）。SAR101099 も糖尿病性腎症に対する第一相臨床試験で治療効果を示すことができなかった。このように臨床試験で成功した GPR14 拮抗薬はなく、U-II/GPR14 シグナルの病因への関与や、このシグナル阻害に基づく臨床効果は未だ不明である。そのため、より強力な新規 GPR14 拮抗薬を創製するとともに、このシグナルの病因への関与を解明することが本領域の喫緊の課題となっている。

表 2. 前臨床段階の GPR14 拮抗薬

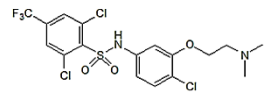
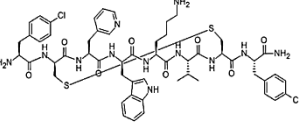
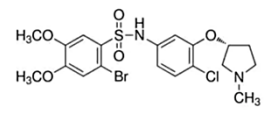
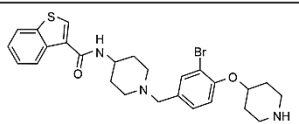
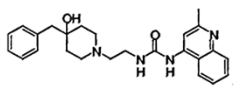
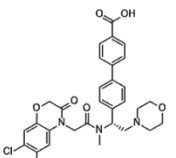
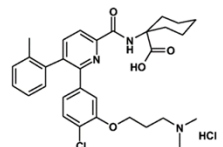
化合物	構造	動物種	モデル	作用
SB-611812		ラット	再狭窄	内膜/中膜面積比の減少
		ラット	うっ血性心不全	心リモデリング抑制
SB-710411		ラット	肝硬変	線維化低下
		ラット	心筋梗塞	梗塞サイズの減少
SB-657510		ラット	神経障害性疼痛	慢性収縮損傷に伴う熱的痛覚過敏および機械的アロディア軽減
		マウス	メタボリックシンドローム	心機能、グルコース濃度、高脂血症、血圧の改善
		マウス	動脈硬化症	糖尿病に伴う動脈硬化抑制、耐糖能異常改善
KR-36676	構造不明	マウス	血管機能障害	頸動脈の内膜肥厚抑制
		マウス	心肥大	心肥大および線維化抑制
		ラット	肺高血圧症	右心室収縮期血圧低下、心肥大および線維化抑制
KR-36996		ラット	慢性心不全	左心室重量低下、心肥大および線維化抑制

表 3. 臨床試験が実施された GPR14 拮抗薬

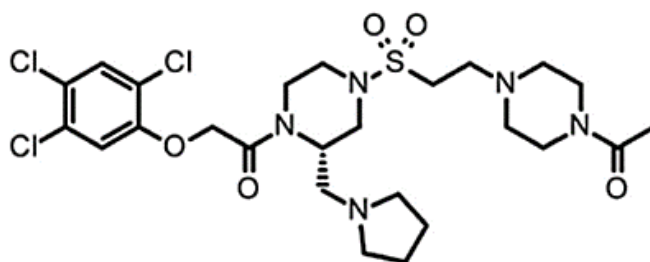
	ACT-058362	GSK1440115	SAR101099
構造			
開発企業	Actelion	GlaxoSmithKline	Sanofi
対象疾患	糖尿病性腎症 Ⅱ型糖尿病	喘息	糖尿病性腎症
開発フェーズ	Ph2: 2012年開始	Ph1: 2010年開始	Ph1: 2012年開始
結果	第Ⅱ相試験 中止	第Ⅰ相試験 保留中	第Ⅰ相試験 中止



## 1.6 本研究の目的と意義

第一三共株式会社では、新規 GPR14 拮抗薬の獲得を目的とし、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を指標としたハイスループットスクリーニングを実施した。そして、ピペラジン骨格のリード化合物を見出し、そのリード化合物から約 300 化合物を誘導体展開した。これらの化合物に対し、*in vitro* スクリーニングとして GPR14 結合試験を、*ex vivo* 試験としてラット摘出血管でのヒト U-II 誘発収縮抑制試験を、*in vivo* 試験としてヒト U-II 誘発マウス昇圧抑制試験ならびにマウス心不全抑制試験を実施した。最終的に、GPR14 に対して特異的かつ強力な新規 GPR14 拮抗薬である DS37001789 を見出した (図 7)。

本研究では、U-II/GPR14 シグナルの病態への関与を明らかにするために、DS37001789 を用いて U-II/GPR14 シグナルの血管収縮作用の解析と心不全の発症・進展を解析した。血管収縮作用の解析では、正常ラットあるいはサルの摘出血管でのヒト U-II の血管収縮作用と、麻酔下正常マウスでのヒト U-II の昇圧に対する作用に対して、DS37001789 と臨床試験が最初に実施された ACT-058362 を比較検討した。心不全の発症・進展解析では、ヒトの心不全病態を模倣した横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) 圧負荷心不全モデルマウス (TAC マウス) に DS37001789 を投与し、生存率および心機能改善効果を検討した。更に、U-II/GPR14 シグナルの心不全への関与を検証するために、GPR14 欠損マウスで TAC を行い、同様に生存率と心機能に対する作用を検討した。



1-{4-[2-(4-acetylpiperazin-1-yl) ethanesulfonyl]-2-[(pyrrolidin-1-yl) methyl] piperazin-1-yl-2-(2,4,5-trichlorophenoxy) ethan-1-one

図 7. DS37001789 の構造

## 第2章 *In vitro* プロファイル

### 2.1 目的

これまでにいくつかの非ペプチド性の GPR14 拮抗薬が開発されているが、それらには、(1) GPR14 受容体に対する弱い拮抗活性 (Behm *et al.*, 2002)、(2) 特定の種の GPR14 受容体に対するフルアゴニスト活性 (Camarda *et al.*, 2002)、(3) 受容体選択性の欠如 (Herold *et al.*, 2003)、という欠点が報告されている。そのため、これらを克服したより強力で選択性の高い GPR14 拮抗薬の開発が急務となっている。そこで、強力な新規 GPR14 拮抗薬を得るべく、ハイスループットスクリーニングからリード化合物を取得し、その化合物を基に探索的誘導体展開を実施し、最終的に DS37001789 を取得するに至った。本章では、DS37001789 の GPR14 結合試験による U-II 結合阻害活性、ADME プロファイルを評価し、*in vivo* 薬効評価を実施するために十分な資質を兼ね備えた化合物であるかを検証した。なお、GPR14 結合試験で、臨床試験が最初に実施された GPR14 拮抗薬である ACT-058362 と U-II 結合阻害活性を比較検討した。

### 2.2 GPR14 結合試験

#### 2.2.1 方法

##### 2.2.1.1 被験物質

DS37001789 および ACT-058362 は第一三共株式会社で合成された。

##### 2.2.1.2 細胞の維持・継代

ヒト GPR14 安定発現 CHO 細胞 (Epics Therapeutics S.A., Gosselies, Belgium) は維持培地 (10% FBS (Equitech-Bio Inc., Kerrville, TX, USA), 100 units/mL penicillin G sodium, 100 µg/mL streptomycin sulfate (Invitrogen Inc., Carlsbad, MA, USA) および 400 µg/mL G418 (Invitrogen Inc.) を含む F-12 培地 (Invitrogen Inc.)) にて維持した。継代培養時には 0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen Inc.) で剥離後、同培地で適宜希釈して播種した。

### 2.2.1.3 リガンド結合試験

[<sup>125</sup>I] U- II 凍結乾燥品ボトル (74 TBq/mmol, 2000 Ci/mmol, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) に蒸留水を加えて溶解し、使用時まで-20℃に保管した。無標識ヒト U-II (株式会社ペプチド研究所、大阪) は蒸留水で溶解し、使用時まで-20℃に保管した。また、アッセイバッファー (15 mM HEPES, pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 0.5% BSA) および洗浄液 (15 mM HEPES, pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M NaCl, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 0.5% BSA) を調製し、使用時まで 4℃に保管した。アッセイ前日に、ヒト GPR14 安定発現 CHO 細胞を 96 ウェル平底プレートに 40,000 細胞/ウェルで播種して一晩培養した。96 ウェル丸底プレートに分注しておいた化合物にアッセイバッファーを加えて希釈し、段階希釈系列を調製した。細胞を播種したプレートを F-12 培地で 3 回洗浄し、アッセイバッファーを添加し、更に、化合物を含む溶液を添加した。プレートを穏やかに振盪混和し、室温で 10 分間静置した。アッセイバッファーで 25 倍に希釈した [<sup>125</sup>I] U-II 溶液を添加後 (終濃度 0.2 nM)、プレートを穏やかに振盪混和し、室温で 90 分間静置した。洗浄液で細胞を 5 回洗浄した後、0.1% Triton X-100 を含む 1 N NaOH 溶液を添加し、細胞を溶解した。放射線の計数率 (count per minute; cpm) をγカウンター (COBRA II, Packard BioScience Co., Meriden, CT, USA) で測定した後、以下の計算式に基づいて阻害率 (%) を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 \times \{1 - (A - B) / (C - B)\}$$

A : 化合物を加えたウェルの放射活性

B : 無標識ヒト U-II を加えたコントロールウェルの放射活性の平均値

C : 無標識ヒト U-II を加えなかったコントロールウェルの放射活性の平均値

### 2.2.2 結果

ヒト GPR14 へのヒト U-II の結合は DS37001789 によって用量依存的に完全に阻害された (図 8)。DS37001789 の IC<sub>50</sub> 値は 0.9 nM と強力な U-II 結合阻害活性を示したのに対し、ACT-058362 の IC<sub>50</sub> 値は 120 nM であった。これらの結果から、DS37001789 は、ACT-058362 の約 130 倍の U-II 結合阻害活性を持つ低分子 GPR14 拮抗薬であることが示された。

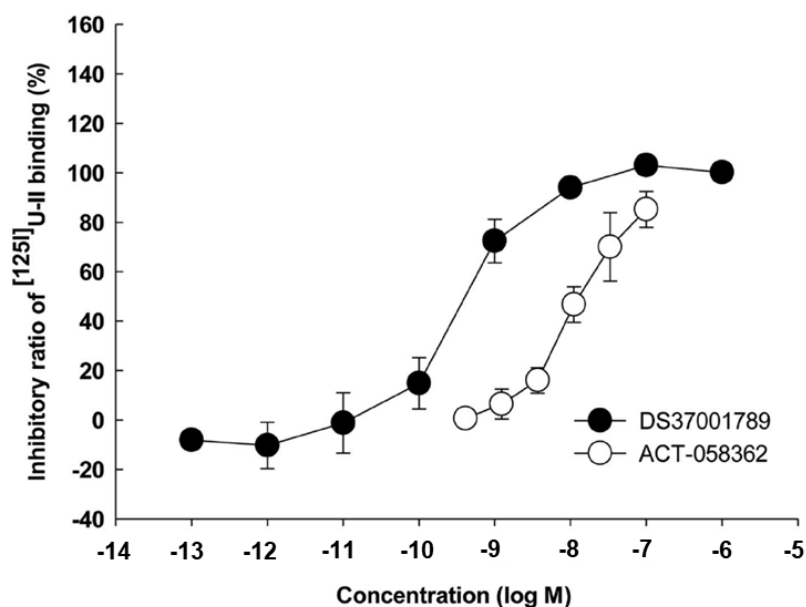


図 8. ヒト GPR14 への $[^{125}\text{I}]$  U-II 結合に対する DS37001789 の阻害効果

GPR14 安定発現 CHO 細胞を用いて、予め DS37001789 および ACT-058362 を前処理し、 $[^{125}\text{I}]$  U-II を添加および洗浄後、 $\gamma$ カウンターで放射線の計数率を測定した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n=3$ ) で示す。

## 2.3 ADME 評価

### 2.3.1 方法

#### 2.3.1.1 脂溶性評価試験

ジメチルスルホキシドで 10 mM に調整した DS37001789 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 分間超音波処理後、吸引濾過し、濾液を 2 mL 採取した。そこに n-オクタノール 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、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置（積水メディカル株式会社、東京）により濃度を測定した。以下の式より、中性付近で測定したオクタノール/水分配係数 (Log D) を算出した。

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

#### 2.3.1.2 溶解性試験

ジメチルスルホキシドで調整した 10 mM の DS37001789 (50  $\mu$ L) に 250  $\mu$ L の日本薬局法記載の溶出試験第 1 液 (JP1, pH 1.2)、第 2 液 (JP2, pH 6.8) を添加し、4 時間以上静置後、吸引濾過し、濾液を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (積水メディカル株式会社) で濃度を測定し、溶解度 ( $\mu$ g/mL) を算出した。

#### 2.3.1.3 膜透過性試験

ジメチルスルホキシドで調整した 10 mM の DS37001789 溶液を用い、Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) 法により膜透過性 (permeability coefficient (Peff,  $10^{-6}$  cm/sec) を算出した (Kansy *et al.*, 1998)。

#### 2.3.1.4 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 Sprague-Dawley ラット肝ミクロソームおよびプールドカニクイザル肝ミクロソームは、SEKISUI XenoTech (Kansas City, KS, USA) から購入した。反応液の最終濃度は、1  $\mu$ M の化合物、100 mM のリン酸ナトリウムバッファー、0.5 mg protein/mL のプールド肝ミクロソーム、NADPH 産生システム (1 mM  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 10 mM D-glucose-6-phosphate, 1 unit/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 3.3 mM  $MgCl_2$ ) となるように調整した。37°C で 30 分間反応後、アセトニトリル添加で反応を停止させ、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (積水メディカル株式会社) で分析した。また、反応前にアセトニトリルを添加した試料をコントロールとし、結果は反応直後のコントロールに対する相対面積比を求め、残存率 (%) として表示した。

#### 2.3.1.5 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整した 10 mM の DS37001789 溶液を BALB/c マウス血漿で終濃度 5  $\mu$ M になるように希釈し、平衡透析法により血漿タンパク結合率を算出した。濃度測定は液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (積水メディカル株式会社) にて分析した。

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、第一三共株式会社で実施された。

#### 2.3.1.6 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整した 10 mM の DS37001789 溶液を用い、終濃度が 10  $\mu$ 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 CYP 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 (%) として表示した。

#### 2.3.2 結果

DS37001789 の物性（脂溶性、溶解性、膜透過性）、代謝安定性、タンパク結合率、CYP 直接阻害の結果を表 4 に示す。溶解性、PAMPA による膜透過性は良好であった。問題点としては、ヒトおよびマウスに対する代謝安定性がそれぞれ 44% および 13% と低い点、血漿に対するタンパク結合率が高い点であった。CYP の直接作用に関しては、代表的な 4 分子種 (CYP1A1, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) の中で、CTP3A4 には 54% とやや高めであった。

表 4. DS37001789ADME プロファイル

	DS37001789
分子量	697.92
Log D	1.8
膜透過性 (pH 5.0, pH 7.4)	Middle (0.7, 28.0)
溶解性 (mg/mL; JP1/JP2)	>100 / >100
タンパク結合率 (%; human/mouse)	99.4 / 90.2
代謝安定性 (% remaining; human/mouse)	44 / 13
CYP誘導 (% inhibition; 1A2, 2C9, 2D6, 3A4)	2.0, 0.0, 8.0, 54.0
CYP阻害 (3A4, in MeCN)	49.8%

## 2.4 考察

GPR14 結合阻害試験では、DS37001789 と ACT-058362 はいずれもヒト GPR14 への U-II 結合を完全に阻害したが、DS37001789 は ACT-058362 よりも約 130 倍高い U-II 結合阻害活性を示した。DS37001789 は、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た。

ACT-058362 は、GPR14 拮抗薬の中で最初に臨床試験は実施された化合物であり、その臨床効果が期待されていたが、第二相試験で糖尿病性腎症ならびに II 型糖尿病で有効性を示すには至らなかった。その大きな理由として、阻害活性の不足が指摘されている。一方、本研究で新規に取得された DS37001789 は ACT-058362 よりも強い U-II 結合阻害活性を有し、更に、溶解性や膜透過性などの物性面からも高次評価系へ進める価値のある化合物と判断した。

## 第3章 ラットおよびサルの摘出血管でのヒト U-II 誘発収縮に対する抑制効果

### 3.1 目的

U-II と GPR14 は、心血管組織に局在し、強い血管収縮作用と血管内皮依存性の血管拡張作用を示すことが報告されている (Ames *et al.*, 1998; Bottrill *et al.*, 2000)。ヒト U-II のラット大動脈やサル冠状動脈における血管収縮作用は、エンドセリン-1 に比べて 10-20 倍高く、これまでに発見されている血管収縮物質の中で最も高いと言われている (Ames *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 2000)。血管内皮細胞が脱落した慢性心不全や本態性高血圧の病態では、U-II は血管内皮細胞非依存的な血管収縮を引き起こすと考えられている。更に、ヒト U-II に対する血管収縮反応は種間や血管床で差があることも報告されているため (Douglas *et al.*, 2000)、試験条件の設定には注意を要する。本章では、U-II/GPR14 シグナルの血管収縮作用を検討するため、ラットおよびサルから大動脈を採材し、血管内皮細胞を除去した後、ヒト U-II の血管収縮反応の種間差を検証、ならびに DS37001780 と ACT-058362 のヒト U-II 誘発収縮抑制作用を比較検討した。

### 3.2 方法

#### 3.2.1 試薬

DS37001789、ACT-058362 およびヒト U-II は、2.2.1.1 と同様のものを使用した。アセチルコリンは第一三共株式会社から購入した。

#### 3.2.2 動物

雄の Sprague-Dawley ラット (8 週齢または 9 週齢) は、日本エスエルシー株式会社 (静岡) から購入した。雌のカニクイザル (2~6 歳) は、ハムリー株式会社 (茨城) から購入した。動物の飼育環境は室温を  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\% \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクルで、自由飲水、餌は、ラットでは自由摂取 (FR-2 固形餌、株式会社フナバシファーム、千葉)、カニクイサルでは午前中に 1 回/日 (PS-A、オリエンタル酵母工業株式会社、東京) の条件下で飼育した。すべ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。



### 3.2.3 ラットおよびサル摘出動脈標本の作製

ラットおよびサルは、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, i.p.) で、麻酔し、腹部大動脈から失血させて安楽殺した。胸部下行大動脈を迅速に摘出し、Kreb's 溶液 (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 22.2 mM D-glucose) 中に浸漬させた。血管周囲組織を注意深く除去した後、大動脈を約 5 mm に輪切りし、湿らせた綿棒で優しくこすることで、内皮を機械的に除去した。

### 3.2.4 摘出動脈標本の張力変化の測定

摘出動脈標本は、2 つのステンレス製フックの間に取り付け、混合ガス (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) で通気した 37°C の Kreb's 溶液 20 mL を満たしたオルガンバス内に懸垂した (図 9)。大動脈の等尺性張力は、PowerLab システム (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) を用いて記録した。大動脈標本は 2 g の安静時張力で 1 時間平衡させた。平衡中、Kreb's 溶液は 20 分毎に交換した。各実験前に大動脈標本が再現性のある収縮反応を示すまで 60 mM KCl で刺激した。内皮細胞の有無は、アセチルコリン 100 nM を添加して、弛緩反応を惹起することで確認した。大動脈標本を被験化合物 (10 μM) で 30 分間の前処理をし、その後、累積濃度のヒト U-II (0.01-100 nM) をオルガンバスの中に添加した。各濃度のヒト U-II に対する収縮反応がプラトーに達してから次の濃度に上げ、1 標本あたり 1 つの濃度反応曲線を作成した。

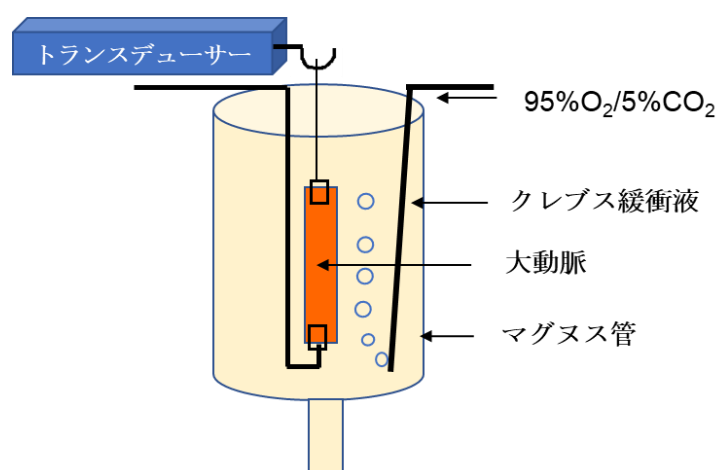


図9. 摘出動脈標本の張力変化の測定

### 3.3 結果

まず、ラットおよびサル摘出大動脈におけるヒト U-II の収縮作用を検討した。ヒト U-II は、ラットおよびサルの大動脈を用量依存的に収縮させ、その  $EC_{50}$  値はそれぞれ 1.35 nM および 0.31 nM であった (図 10、11)。次に、ヒト U-II 誘発血管収縮に対する DS3700178 および ATC-058362 の抑制作用を検討するため、ラットおよびサルから摘出した大動脈を DS3700178 または ATC-058362 で前処理し、ヒト U-II 添加後の収縮反応を評価した。DS37001789 (10  $\mu$ M) はヒト U-II による大動脈収縮に拮抗し、ラットおよびサルで用量反応曲線を右にシフトさせた ( $EC_{50}$  値はそれぞれ 324.9 nM および 43.2 nM)。しかし、最大収縮は変わらなかった。ACT-058362 (10  $\mu$ M) はサルでのみヒト U-II 誘発収縮に拮抗し、 $EC_{50}$  値は 2.26 nM であり、ラットでは明確な抑制作用を示さなかった ( $EC_{50}$  値は 2.24 nM)。これらの結果から、DS37001789 は ATC-058362 とは異なり、ラットおよびサルの両種で強力な GPR14 拮抗薬として機能する可能性が示された。

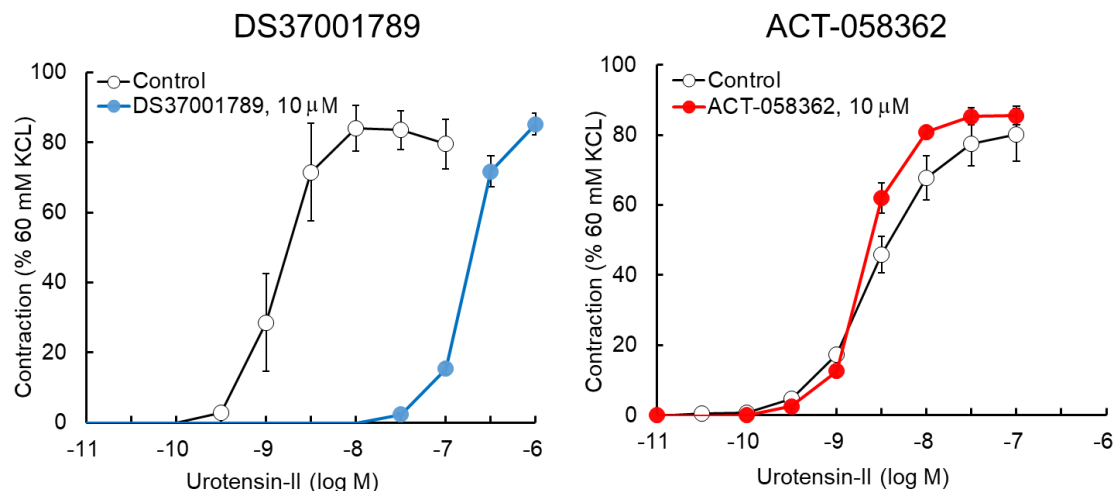


図10. ラット摘出大動脈でのU-II誘発収縮に対する抑制作用

ラットから摘出した下行胸部大動脈輪にDS37001789またはACT-058362を10  $\mu$ Mで30分間前処理した後、累積濃度のヒトU-IIで刺激した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n = 3) で示す。

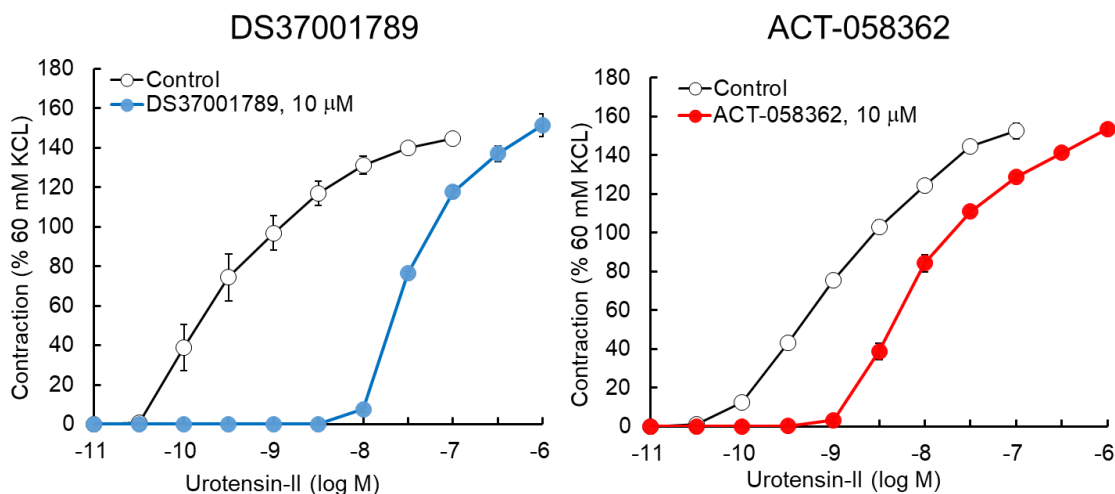


図11. サル摘出大動脈でのU-II誘発収縮に対する抑制作用

サルから摘出した下行胸部大動脈輪にDS37001789またはACT-058362を10 μMで30分間前処理した後、累積濃度のヒトU-IIで刺激した。データは平均値 ± 標準誤差 (n = 3) で示す。

### 3.4 考察

ヒト U-II は、ラットおよびサル摘出大動脈を濃度依存的に収縮させた。その作用はサル摘出大動脈に対する収縮作用の方がやや強く、既報通りであった (Douglas *et al.*, 2000)。ACT-058362 はサル摘出大動脈のみでヒト U-II 誘発収縮を抑制するのに対し、DS37001789 は、両種でヒト U-II が誘発する大動脈収縮を抑制したことから、強力な GPR14 拮抗薬であると同時に、ラットおよびサルの両種で同様の活性を有することが示された。

ACT-058362 は、ラットでは明確な効果は認められなかった。ACT-058362 は、1 μM からラット大動脈収縮の最大応答を抑制することが報告されているが (Clozel *et al.*, 2004)、本研究では 10 μM でも最大応答に変化は見られなかった。ACT-058362 は、齧歯類での作用は弱く、高濃度域での作用は非特異的作用との報告もあるため (Behm *et al.*, 2008)、本研究の結果は妥当であると判断した。一方、DS37001789 の抑制作用は、ラットとサルで同等であったが、ACT-058362 はサル摘出大動脈でのみヒト U-II 誘発収縮を阻害したことから、DS37001789 の種差は少ないと考えられた。

GPR14 拮抗薬の多くは、齧歯類のモデルで有効性を示しているが、サルなどの非齧歯類に対しての有効性は不明である。U-II/GPR14 シグナルの病態生理的

役割を明らかにするための有用なツールとして、種を超えて高活性を示す GPR14 拮抗薬が望まれている。そのため、DS37001789 は、さらなる動物実験で U-II/GPR14 シグナルの生理学的役割を明らかにするための有用な薬剤であるとも考えられる。

## 第4章 マウスでのヒト U-II が誘発する昇圧反応に対する抑制効果

### 4.1 目的

第3章では、ヒト U-II は濃度依存的にラットおよびサルの摘出血管を収縮させ、DS37001789 は兩種でヒト U-II が誘発する大動脈収縮を抑制する化合物であることを明らかにした。本章では、このヒト U-II 誘発血管収縮抑制作用が *in vivo* でも認められるかを検証するため、正常マウスを用いて、ヒト U-II の血圧に対する影響を検証するとともに、ヒト U-II 誘発血管収縮抑制作用について DS37001780 と ACT-058362 を比較検討した。

### 4.2 方法

#### 4.2.1 試薬

DS37001789、ACT-058362 およびヒト U-II は、2.2.1.1 と同様のものを使用した。DS37001789、ACT-058362 の溶媒は 0.5% メチルセルロース（富士フィルム和光純薬株式会社、大阪）を使用し、DS37001789 の静脈内投与溶媒ならびにヒト U-II の溶媒は注射用水（大塚蒸留水、株式会社大塚製薬工場、徳島）を使用した。投与容量は 10 mL/kg とした。

#### 4.2.2 動物

雄性 C57BL/6N マウス（8 週齢または 9 週齢）は、日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入した。動物の飼育環境は室温を  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\% \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクルで、自由飲水、自由摂取（FR-2 固形餌、株式会社フナバシファーム、千葉）の条件下で飼育した。すべ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。

#### 4.2.3 DS37001789 の正常血圧および心収縮に対する評価

マウスをイソフルラン吸入麻酔下で剣状突起軟骨部を側方から切開し、左心室尖端を露出させた。圧-容積カテーテル（型式 SPR-719, サイズ 1.4F, Millar, Houston, TX, USA）を針穿刺により挿入し、心臓長軸に沿って進めた。カテーテルが適切に配置されていることは、心尖部の電極と圧-容積ループの形態を直

接視認することにより確認した。圧容積シグナルは、PowerLab システム (ADInstruments) を用いて記録した。血行動態パラメーターが安定した後、ベースラインを 2 分間記録し、その後、DS37001789 (5 mg/kg) を頸静脈から投与した。投与 5 分後の左室収縮期圧 (left ventricular pressure; LVP) と駆出率 (ejection fraction; EF) を測定した。

#### 4.2.4 U-II 昇圧反応試験

マウスをイソフルラン吸入麻酔下で頸動脈を露出させ、カテーテル (型式 SPR-847, Millar) を頸動脈に外科的に挿入し、PowerLab システム (ADInstruments) の生理学的圧力変換器を介して平均血圧 (mean blood pressure; MBP) と心拍数を連続的に測定した。血行動態パラメーターが安定した後、ベースライン MBP を 2 分間記録し、その後、ヒト U-II (5 µg/kg) を頸静脈から投与した。化合物はヒト U-II 投与 60 分前に経口投与した。ヒト U-II 投与で生じた昇圧反応を 5 分間記録し、平均化された基準値からの MBP の変化を計算し、AUC (0-300 秒) を算出した。

#### 4.2.5 単回投与時の DS37001789 の血漿中濃度測定

DS37001789 (30 および 100 mg/kg) を 0.5%メチルセルロースに懸濁し、C57BL/6N マウス (8 週齢) に経口投与した。投与 1 および 3 時間後に頸静脈から血液を採取した。血漿中の薬物濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (積水メディカル株式会社) で測定した。

#### 4.2.6 統計解析

統計学的解析には、SAS System Release 9.2 (SAS Institute Japan, 東京) を用いた。結果は平均値±標準誤差 (SEM) あるいは平均値+標準誤差で表記した。DS37001789 の静脈投与前および投与後の比較では、Paired *t* 検定を行い、*p* 値が 0.05 未満の場合に有意とした。対照群と化合物投与群の比較では、一元配置分析を行った後、Dunnett 検定を行い、*p* 値が 0.05 未満の場合に有意とした。

### 4.3 結果

ヒト U-II 昇圧反応試験を実施前に、DS37001789 の正常血圧と心収縮への作用を検討した。投与前ならびに DS37001789 を静脈内投与して 5 分後の LVP (大動脈圧と LVP は同等) と EF を図 12 に示す。DS37001789 投与後の LVP と EF は、投与前と差が認められず、DS37001789 は正常血圧と心収縮には影響を与えなかった。

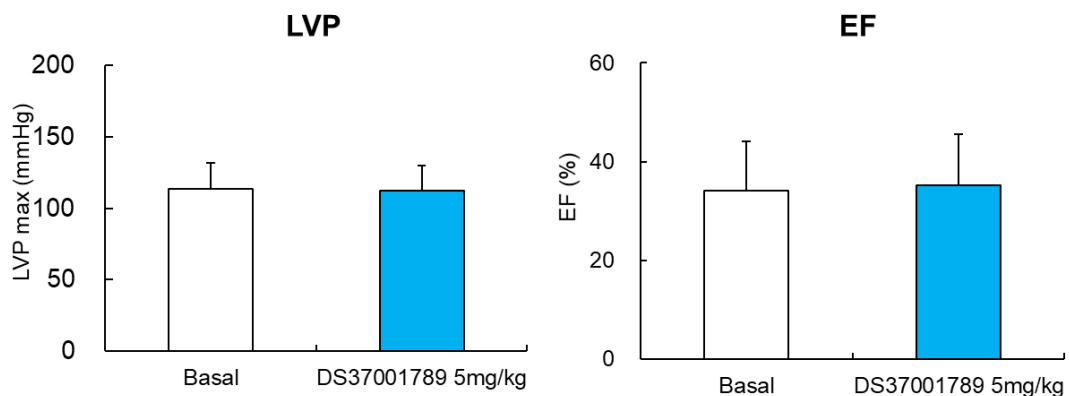


図12. DS37001789の正常血圧と心収縮力に対する作用

正常マウスに DS37001789 を 5 mg/kg 静脈内投与し、投与前と投与 5 分後の左室収縮期圧 (left ventricular pressure; LVP) と駆出率 (ejection fraction; EF) を左心室圧容積解析により測定した。データは平均値+標準誤差 (n = 5) で示す。

次に、ヒト U-II が昇圧作用を示すか否かを検討した。基準値からの MBP の変化と AUC (0-300 秒) の計算値を図 13 に示す。ヒト U-II の急速静注 (5  $\mu$ g/kg) で、MBP は急上昇し、評価中の投与後 5 分間は高い MBP が維持された。

更に、ヒト U-II 誘発昇圧反応に対する DS37001789 および ACT-058362 の抑制効果を評価するため、DS37001789 をマウスに経口投与後にヒト U-II を急速静注し、MBP を測定した。対照群の AUC (0-300 秒) は  $3864 \pm 207$  mmHg $\cdot$ sec であった。DS37001789 投与は U-II による MBP 上昇を用量依存的に抑制し、100 mg/kg で完全に抑制した。DS37001789 投与群の AUC (0-300 秒) は、30 および 100 mg/kg の濃度で溶媒投与群と比較して有意な減少を示した (10, 30, 100 mg/kg のそれぞれで  $2797 \pm 753$ ,  $2019 \pm 310$ ,  $-491 \pm 833$  mmHg $\cdot$ sec)。一方、ACT-058362

は MBP 上昇を抑制したが、AUC (0-300 秒) (100 および 300 mg/kg のそれぞれで  $2315 \pm 282$  および  $3086 \pm 261$  mmHg・sec) には明確な用量依存性は認められず、300 mg/kg でも抑制効果は部分的であった。



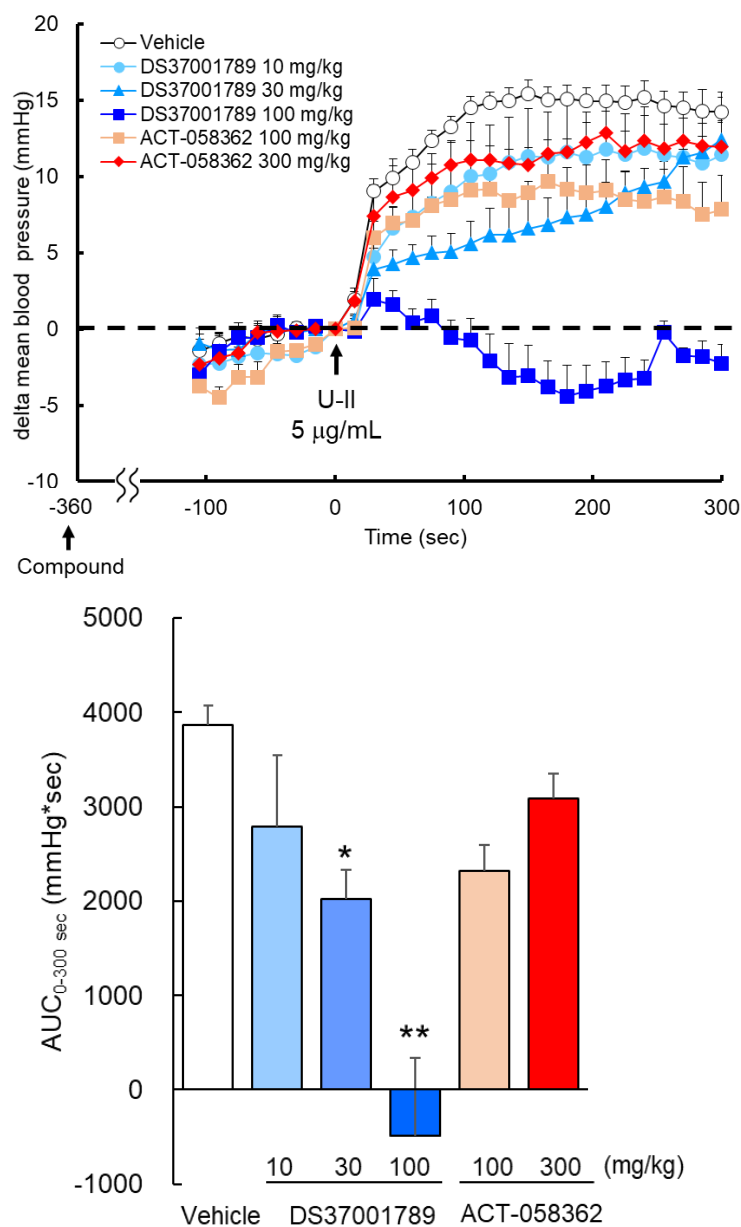


図13. マウスでのヒトU-II誘導昇圧反応に対する抑制作用

平均血圧は頸動脈に挿入したカテーテルで連続的に測定した。血行動態パラメーターが安定した後、ヒトU-IIを投与した。DS37001789およびACT-058362はヒトU-IIを投与する1時間前に投与した。平均基準値からの平均血圧の変化をAUC (0-300 sec) として計算した。データは平均値+標準誤差で示す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Vehicle, Dunnett's test,  $n = 4$ )。

DS37001789 を投与することで得られた薬理作用と曝露の関連性を検討するため、マウスに DS37001789 を 30 mg/kg および 100 mg/kg を経口投与し、投与 1 時間および 3 時間後の血漿中 DS37001789 濃度を測定した。DS37001789 の投与 1 時間後の血漿中濃度は 30 mg/kg で 141.7 ng/mL、100 mg/kg で 1509.4 ng/mL であった (図 14)。

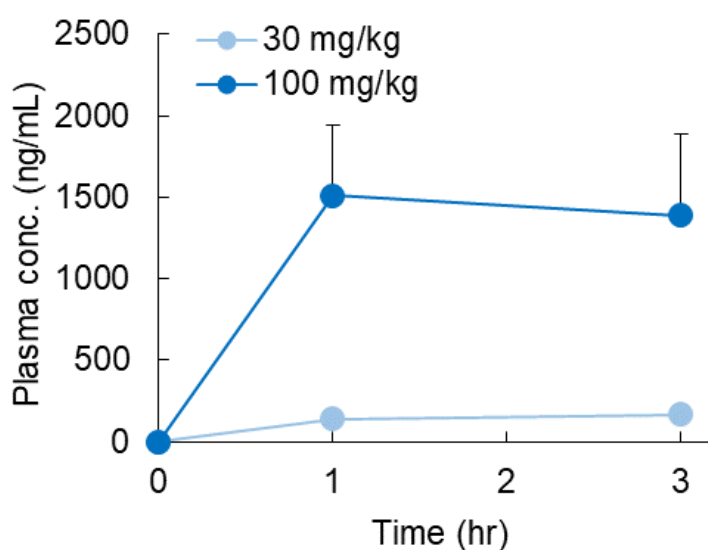


図14. マウスでのDS37001789の血漿中濃度

DS37001789の血漿中濃度は、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法で、30 mg/kgおよび100 mg/kgのDS37001789を投与1時間および3時間後に測定した。データは平均値+標準誤差で示す (n = 3)。

#### 4.4 考察

DS37001789 は、マウスでヒト U-II による血圧上昇を用量依存的に抑制し、100 mg/kg の濃度で完全に抑制した。一方、ACT-058632 は、明確な用量依存性を示さなかった。DS37001789 の昇圧抑制効果は ACT-058362 より優れていることが明らかとなった。

DS37001789 は、U-II 非存在下では静脈内投与で血圧と心収縮には影響を与えなかった。このことは、DS37001789 の昇圧抑制作用は、U-II を投与して生じる昇圧のみ、つまりは U-II 濃度が高い状態でのみ抑制することを示唆する。一方、ACT-058632 はラット摘出大動脈に対してヒト U-II 誘発血管収縮作用を示さな

かったことは、マウスでの U-II 誘発昇圧抑制効果が弱い結果と一致する。

DS37001789 の薬理作用と血漿中濃度との関連性を検討した。マウスでの DS37001789 の遊離型は 9.8%であり、この値と *in vitro* 活性から計算すると、IC<sub>50</sub> 濃度はおよそ 0.56 ng/mL と推定される。マウス U-II 昇圧モデルでの DS37001789 の血中濃度から、30 および 100 mg/kg の DS37001789 曝露量は、それぞれ推定 IC<sub>50</sub> 濃度の 25 倍および 264 倍であった。従って、*in vitro* データに基づく推定曝露量と実際の曝露量には比較的大きな差があるものの、*in vivo* モデルで DS37001789 の薬物動態と薬力学の関係性は示されたと判断した。

一方、ACT-058632 の血漿中化合物濃度は測定していないが、ACT-058632 の曝露は以下の理由から不十分であると考えられた。ACT-058632 の有効性には齧歯類と非齧歯類で大きな種差があること、ACT-058632 は 96%の高い蛋白結合率であること、薬効を示すには DS37001780 より高濃度の曝露が必要であること等が挙げられる。さらに、100 mg/kg および 300 mg/kg の高用量でも用量反応性が認められなかったことから、ACT-058632 の経口投与で十分な血漿中化合物濃度を得ることは極めて困難であると推察される。

以上より、DS37001789 は、様々な動物種での U-II/GPR14 シグナルが引き起こす病態に対して、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。また、臨床試験に進んだ化合物に対する優位性も考慮して、DS37001789 を更なる高次動物での評価に値する化合物であると判断した。

## 第5章 TAC マウスでの心肥大および心機能障害に対する改善作用

### 5.1 目的

U-II と GPR14 は心血管組織に局在し、U-II は強い血管収縮作用と内皮依存性の血管拡張作用を示すとともに (Ames *et al.*, 1998; Bottrill *et al.*, 2000)、心収縮性、心筋細胞肥大、線維化、炎症にも関与する (Cheung *et al.*, 2004)。また、心不全患者や圧負荷誘発心不全モデルで、U-II および GPR14 の発現増加が報告されている (Bousette *et al.*, 2006; Gruson *et al.*, 2006; Lapp *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2002; Rucell *et al.*, 2003)。これらの知見は、U-II/GPR14 が心不全で重要な役割を果たすことを示唆している。そのため、非ペプチド性 U-II 受容体拮抗薬の創薬研究が進められたが、SB-657510 は圧負荷による心肥大や心機能障害モデルでの薬効が弱かった (Kompa *et al.*, 2010)。KR-36996 は圧負荷誘発心肥大モデルで抗肥大効果と心機能障害の予防効果を示したが (Oh *et al.*, 2015)、心不全モデルでの生存率への影響は報告されていない。従って、心不全の予後改善に対する U-II 拮抗薬の効果については、未だコンセンサスが得られていない。そこで、本章では、心不全での U-II/GPR14 シグナル抑制の効果を明らかにするために、横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) マウスでの心機能と生存率に対する DS37001789 の効果を検討した。

TAC マウスでは、左心室に対して圧負荷をかけて、心肥大を生じさせる (図 15) (西田, 2016; Takimoto *et al.*, 2005)。今回 TAC マウスを選定した理由は、大動脈弁狭窄症や高血圧などに起因するヒトの病態に類似した重症の左心室不全を誘発するモデルとして、心不全治療薬の研究に汎用されるとともに (Rockman *et al.*, 1991)、臨床で使われる薬剤が薬効を示すためである。TAC マウスのフェノタイプとしては、大動脈における拍出量の減少から、左心室が高圧になり、その高圧が原因で TAC 処置 1 週間後から心肥大が認められ、4 週間後には重度な心肥大や線維化および肺水腫が認められる (図 15)。本研究ではこのヒト心不全のフェノタイプに近い TAC マウスを用いて、DS37001789 の心機能と生存率に対する薬効を検証した。

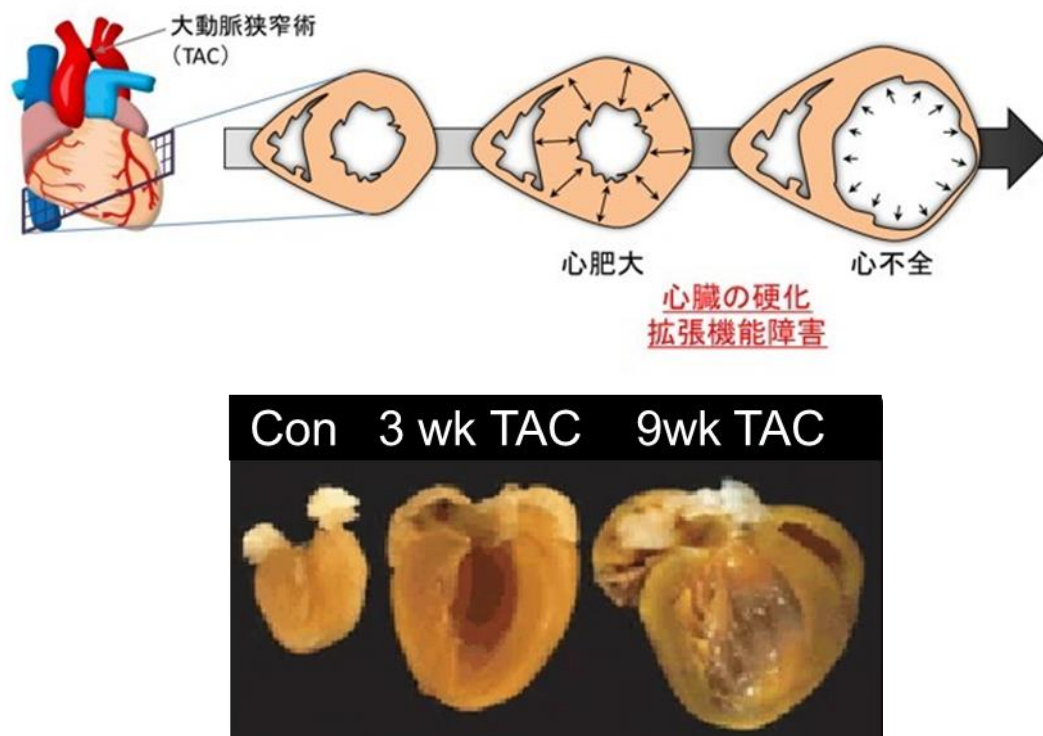


図15. 横行大動脈狭窄（transverse aortic constriction; TAC）圧負荷と心不全

## 5.2 方法

### 5.2.1 試薬

DS37001789 は、2.2.1.1 と同様のものを使用した。

### 5.2.2 動物

雄性 C57BL/6N マウス（7 週齢）と雄性 Sprague-Dawley ラット（8 週齢）を日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入した。動物の飼育環境は室温を  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\% \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクルで、自由飲水、自由摂取（FR-2 固形餌、株式会社フナバシファーム、千葉）の条件下で飼育した。すべ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。

### 5.2.3 TAC マウスの作製

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、心臓に圧負荷をかけた (図 16) (Luo *et al.*, 2015 改編)。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) では、マウスに開胸および横行大動脈を剥離した後、閉胸した。TAC 処置 1 週間後に、心エコーパラメーターと体重で群分けを行い、DS37001789 の投与を開始した。DS37001789 は FR-2 粉末飼料 (株式会社フナバシファーム、千葉) に 0.06%あるいは 0.2%になるように混ぜ合わせ、4 週間ならびに 12 週間給餌した。

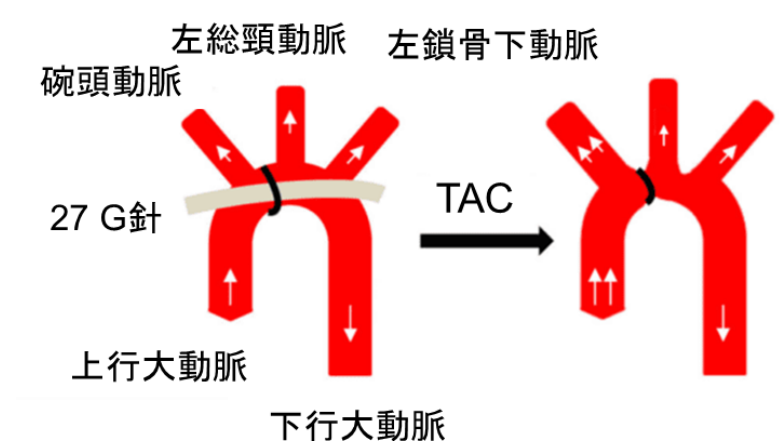


図16. 横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) モデルの作製

#### 5.2.4 心エコー解析

手術 1 週あるいは 4 週間後、超音波高解像度イメージングシステム（型式 Vevo2100, FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Canada）を用いて経胸的心エコーで無麻酔下での心機能を測定した。左室拡張末期径（left ventricular end-diastolic diameter; LVDd）と左室収縮末期径（left ventricular end-systolic diameter; LVDs）を測定し、左室駆出率（ejection fraction; 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、 $(LVEDV-LVESV) / LVEDV \times 100$ （%）で算出した。

#### 5.2.5 血行力学検査

TAC マウスをイソフルラン吸入麻酔下で剣状突起軟骨部を側方から切開し、左心室先端を露出させた。圧-容積カテーテル（型式 SPR-719, サイズ 1.4F, Millar）を針穿刺で挿入し、心臓長軸に沿って進めた。カテーテルが適切に留置されたことは、心尖部の電極と圧-容積ループの形態を直接視認することで確認した。圧容積シグナルは、PowerLab システム（ADInstruments）を用いて記録した。

#### 5.2.6 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は死亡時、それ以外は試験終了時に心臓と肺を摘出し、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。これらの臓器重量から、左心室重量/体重比 (left ventricular weight/body weight; LV/BW) および肺重量/体重比 (lung weight/body weight; Lung/BW) を算出した。また、左心室は mRNA 発現解析を行うため、液体窒素にて急速に凍結させた後、-80℃で保存し、5.2.7 の操作で使用した。

#### 5.2.7 PCR 法による左心室組織 mRNA 発現解析

ホモジナイザーで左心室組織を RNA 抽出試薬 (TRIzol, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 中で細断後、室温で 5 分間静置した。クロロホルムを加えた後、激しく懸濁し、室温で 3 分間静置した。冷却遠心機で遠心分離 (12,000 × g, 20℃, 10 分間) 後、その上層を別チューブに移し、イソプロパノールを加え、穏やかに混和した後、上層を捨て、RNase free water で溶解し、全 RNA を抽出した。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。これらを鋳型として、逆転写反応 (SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific Inc.) を行った。具体的には、oligo dT primer、10 mM dNTP mix、RNA を混和後、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) で、65℃で 5 分間処理し、速やかに氷冷した。続いて、氷上で First-Strand Buffer、0.1 M DTT、RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor の混和液を加え、42℃で 2 分間処理した後、逆転写酵素を加えた。42℃で 50 分間逆転写反応を行った後、70℃で 15 分間処理することで反応を停止させ、cDNA を作製した。リアルタイム PCR は TaqMan プローブ法で測定した (ABI PRISM 7700, Applied Biosystems)。384 ウェルプレート (Applied Biosystems) に TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)、TaqMan® Gene Expression Assay Probe (Applied Biosystems)、イオン交換水および cDNA を混和した。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 サイクルで実施して算出された Ct 値から、比較 Ct 法で発現量を比較した。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 を用い、補正を実施したすべて Sham 群から得られた発現量を GAPDH の発現量で除し、平均値を 1.0 として、各個体の相対量を算出した。

・測定した遺伝子

Atrial natriuretic peptides (*Anp*)

Brain natriuretic peptide (*Bnp*)

Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 2a (*Serca2a*)

Phospholamban (*Pln*)

Regulator of calcineurin 1 (*Rcan1*)

Collagen type I alpha 2 chain (*Col1a2*)

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)

## 5.2.8 ウェスタンブロット法による GPR14 タンパク質の発現解析

GPR14 と GAPDH のタンパク質量を新鮮凍結左心室組織とラット単離心筋細胞で評価した。ホモジナイザーで 1 mM のフッ化フェニルメチルスルホニル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む溶解緩衝液 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 中で細断した。冷却遠心機で遠心分離 (12,000×g, 4℃, 10 分



間) した後、その上層を別のチューブに移し、ビスンコニン酸法 (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.) でタンパク質濃度を定量した。ドデシル硫酸リチウム緩衝液 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を添加し、加熱処理後 (95℃で 5 分間)、氷上で冷却し、タンパク質ゲル (NuPAGE® 4%-12% Bis-Tris Gel, Thermo Fisher Scientific Inc.) に 20 µL をロードし、電気泳動した。タンパク質を PVDF メンブレンに転写し、5%スキムミルクでブロッキング (室温、1 時間) 後、一次抗体である抗 GPR14 抗体 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) あるいは抗 GAPDH 抗体 (1:10,000; Cell Signaling Technology) とともにインキュベーション (4℃、一晩) した。メンブレンを洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体 (ヤギ抗マウス IgG1 抗体; Santa Cruz Biotechnology) でインキュベーション (室温、1 時間) した。メンブレンを洗浄後、ウェスタンブロット用化学発光試薬 (ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) で検出した。バンド強度は、Image J ソフトウェア (NIH, Bethesda, MD, USA) で定量化し、GAPDH の発現量で除して各発現量を補正した。

#### 5.2.9 ラット単離心筋細胞試験での GPR14 タンパク質発現解析

Sprague-Dawleyラット (9週齢) の心臓から心筋細胞を単離した。ラットから心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流システムのカニューレ上に心臓を置いた。心臓をCa<sup>2+</sup>遊離灌流緩衝液 (241 mM NaCl、29.4 mM KCl、1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、2.4 mM MgSO<sub>4</sub>、20 mM HEPES、9.2 mM NaHCO<sub>3</sub>、5.6 mM D-glucose、9.9 mM 2,3-butanedione monoxime、29.9 mM taurine) で10分間灌流し、次に1 mg/mL II型コラゲナーゼ (Worthington Industries, Columbus, OH, USA) を含む洗浄バッファーに切り替え、5分間灌流した。心臓は10% FBS (Thermo Fisher Scientific) を含む灌流緩衝液に入れ、ミンチした。単離した心筋細胞をタイロード溶液 (1 mM CaCl<sub>2</sub>、140 mM NaCl、5 mM KCl、10 mM HEPES、1 mM MgCl<sub>2</sub>、5.6 mM D-glucose) 中で洗浄し、600 nMのDS37001789とインキュベーションした。その後、5分間から240分間まで経時的にサンプリングして、これをウェスタンブロットに供した。

#### 5.2.10 DS37001789 の血漿中濃度測定

投与 4 週間後の解剖時に下大静脈から採血し、血漿中の薬物濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置（積水メディカル株式会社）で測定した。

#### 5.2.11 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）あるいは平均値+標準誤差で表記した。偽手術（Sham）群と TAC 処置通常餌給餌（TAC + Vehicle）群の比較には Student's *t* 検定を行い、*p* 値が 0.05 未満の場合に有意とした。TAC 処置通常給餌（TAC + Vehicle）群と TAC 処置 DS37001789 含有餌給餌（TAC + DS37001789）群の比較では、一元配置分析を行った後、Dunnett 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、 Kaplan・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、*p* 値が 0.05 未満の場合に有意とした。

## 5.3 結果

### 5.3.1 TAC マウスでの DS37001789 の生存率改善作用

DS37001789 による生存率改善作用を調べるため、DS37001789 を長期投与した際の TAC マウスの生存率を検討した。

Kaplan・マイヤー曲線を用いて、各群での生存率を示す（図 17）。Sham 群では、試験中に死亡例はなかった。TAC 処置 Vehicle 群では、投与 12 日後には最初の死亡例が観察された。以降、時間の経過とともに死亡例の発生が認められ、試験終了時の生存率は 29.7%であった。TAC 処置 0.06% DS37001789 含有餌給餌群では、試験終了時の生存率は 23.4%であった。一方、TAC 処置 0.2% DS37001789 含有餌給餌群では、試験終了時の生存率は 52.5%であり、TAC 処置 Vehicle 群に対し、統計学的に有意な生存率改善作用を示した ( $p < 0.05$ )。

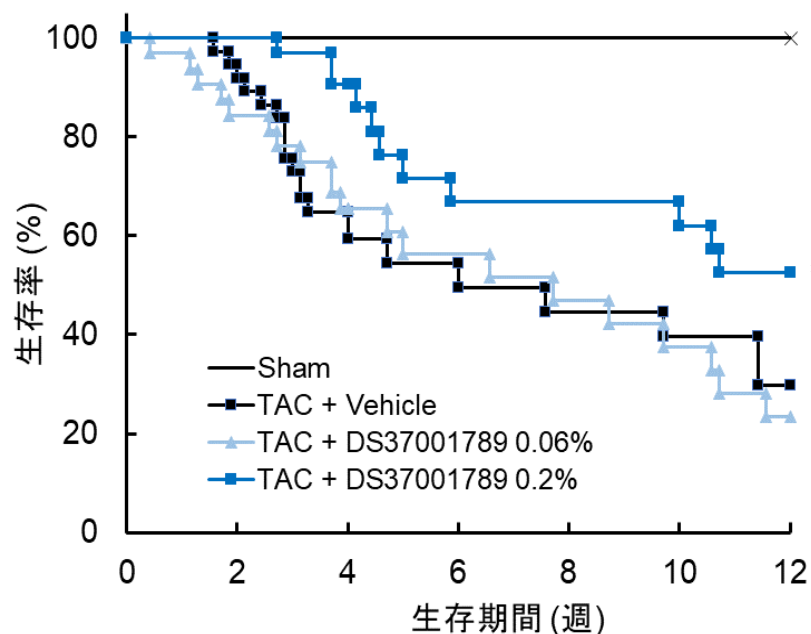


図17. 圧負荷心不全マウスでのDS37001789の生存率改善作用

横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) で圧負荷をかけたマウスにDS37001789を12週間混餌投与した。偽手術群 (Sham,  $n = 5$ )、TAC処置通常餌給餌群 (TAC + Vehicle,  $n = 37$ )、TAC処置DS37001789含有餌給餌群 (TAC + DS37001789, 0.06%, 0.2%, 各群 $n = 32$ ) での生存率を Kaplan・マイヤー曲線で示す (\* $p < 0.05$  vs TAC + Vehicle, Bonferroni correction)。

### 5.3.2 左心室収縮機能評価

DS37001789 が心機能に影響を及ぼすか否かを明らかにするため、DS37001789 投与 4 週間後に左心室圧容積解析および心エコー評価を行った。左心室圧容積解析で、LVP と心拍数 (heart rate; HR) は、TAC 処置 Vehicle 群と TAC 処置 DS37001789 含有餌給餌群で差は認められなかった (図 18)。Sham 群と比較して、TAC 処置 Vehicle 群では、LVEDV (Sham 群:  $31.2 \pm 5.4 \mu\text{L}$ , TAC 処置 Vehicle 群:  $73.5 \pm 11.5 \mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ )、LVESV (Sham 群:  $17.9 \pm 4.8 \mu\text{L}$ , TAC 処置 Vehicle 群:  $62.8 \pm 12.4 \mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ ) の有意な増加および EF (Sham 群:  $52.0 \pm 7.5\%$ , TAC 処置 Vehicle 群:  $21.6 \pm 2.7\%$ ,  $p < 0.05$ ) の有意な低下が認められた。この左心室収縮機能増悪を 0.2% DS37001789 含有餌給餌は、LVEDV ( $36.2 \pm 4.4 \mu\text{L}$ ,  $P < 0.05$ )、LVESV ( $22.4 \pm 4.5 \mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ ) および EF ( $45.9 \pm 6.2\%$ ,  $p < 0.05$ ) と有意に改善した。

心エコー評価では、DS37001789 は心機能 (EF) と心内腔拡大 (LVDd, LVDs) を改善する傾向があったが、TAC 処置 DS37001789 含有餌給餌群と TAC 処置 Vehicle 群の間に有意差は認められなかった (図 19)。

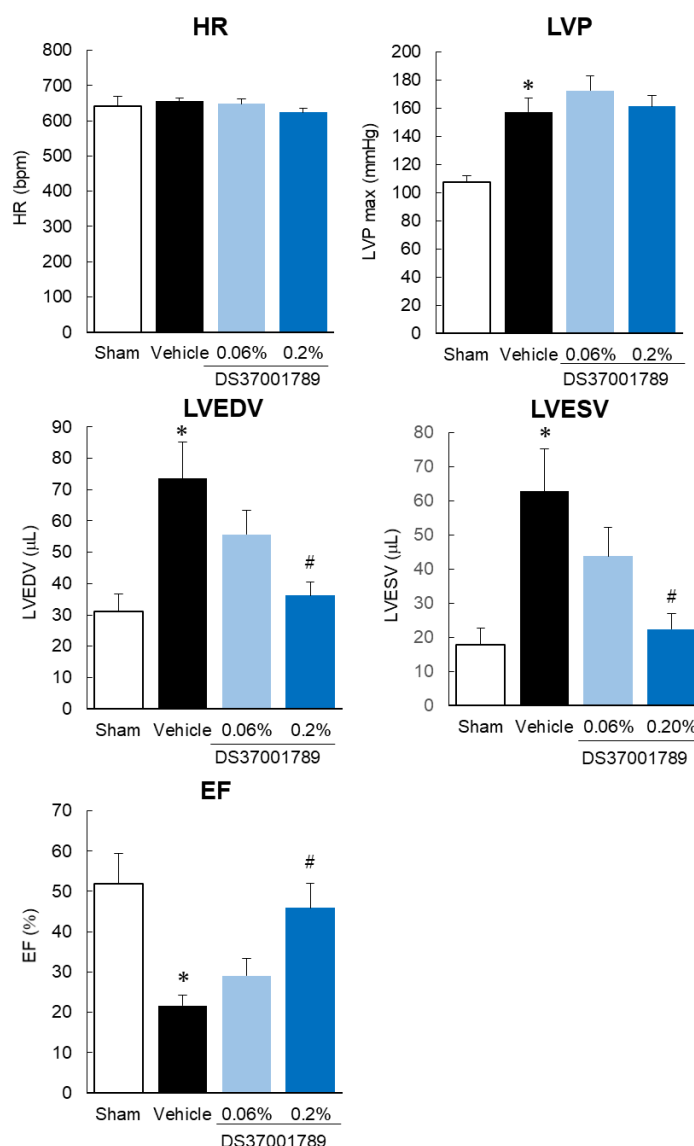


図18. 左心室圧容積解析によるDS37001789の左心室収縮機能評価

横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) で圧負荷をかけたマウスにDS37001789を4週間混餌投与した。偽手術群 (Sham,  $n = 4$ )、TAC処置通常餌給餌群 (TAC + Vehicle,  $n = 4$ )、TAC処置DS37001789含有餌給餌群 (TAC + DS37001789, 0.06%, 0.2%, 各群 $n = 4$ ) に関して、左心室圧容積解析により心拍数 (heart rate; HR)、左室収縮期内圧 (left ventricular pressure; LVP)、左室拡張末期容積 (left ventricular end-diastolic volume; LVEDV)、左室収縮末期容積 (left ventricular end-systolic volume; LVESV) および駆出率 (ejection fraction; EF) を測定した。データは平均値 + 標準誤差で示す (\* $p < 0.05$  vs Sham, Student's  $t$ -test. # $p < 0.05$  vs TAC + Vehicle, Dunnett's test)。

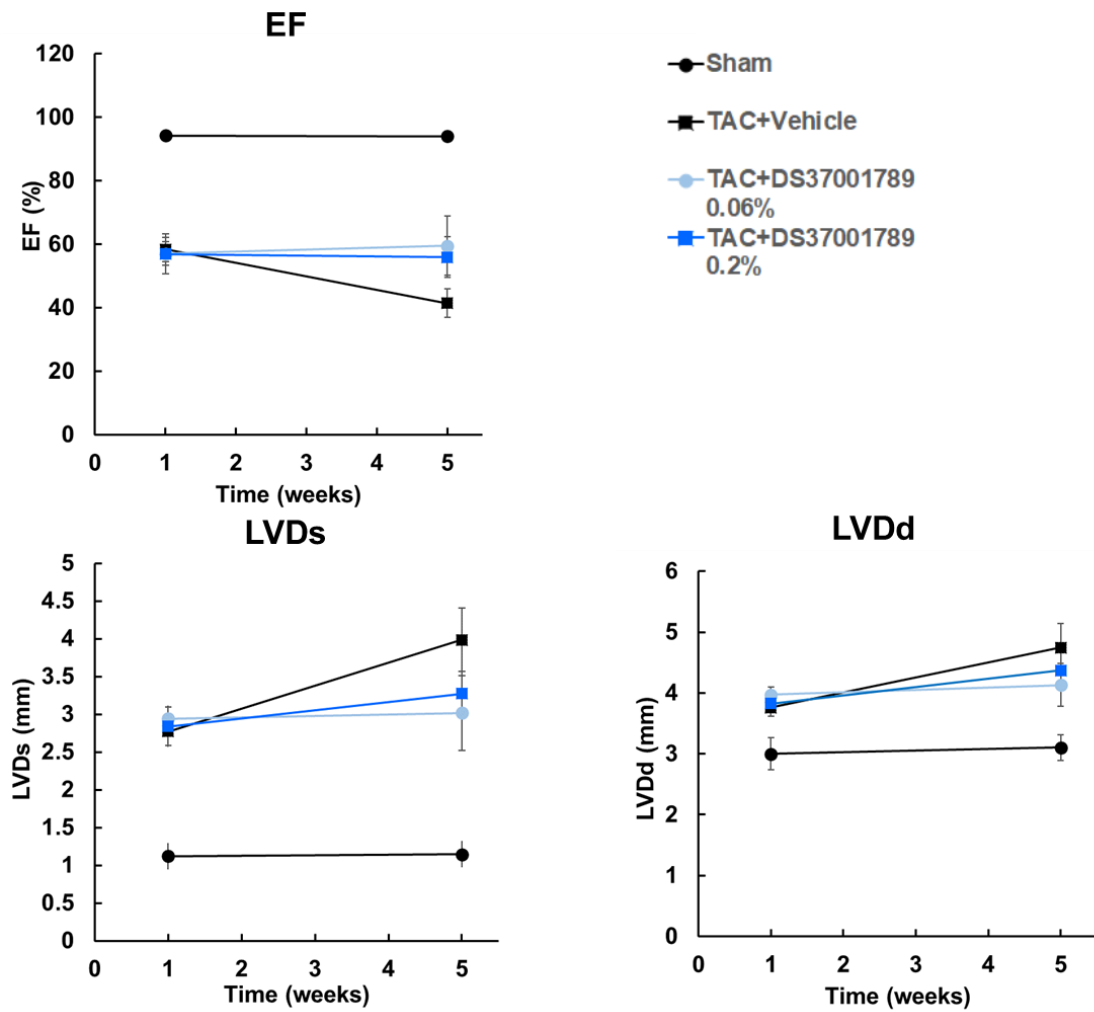


図19. 心エコーによるDS37001789の左心室収縮機能評価

横行大動脈狭窄（transverse aortic constriction; TAC）で圧負荷をかけたマウスにDS37001789を4週間混餌投与した。偽手術群（Sham,  $n = 3$ ）、TAC処置通常餌給餌群（TAC + Vehicle,  $n = 11$ ）、TAC処置DS37001789含有餌給餌群（TAC + DS37001789, 0.06% ( $n = 7$ ), 0.2% ( $n = 10$ )) に関して、心エコーで駆出率（ejection fraction; EF）、左室収縮末期径（left ventricular end-systolic diameter; LVDs）、左室拡張末期径（left ventricular end-diastolic diameter; LVDd）、を測定した。データは平均値±標準誤差で示す。

### 5.3.3 臓器重量の評価

DS37001789が組織重量に影響を及ぼすか否かを検討した。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投与4週間後の試験終了時のマウスを用いて、LV/BWおよびLung/BWを測定し、その結果を図20に示した。LV/BWはTAC処置により有意に増大しており（Sham群:  $3.2 \pm 0.1$  mg/g, TAC処置Vehicle群:  $6.0 \pm 0.3$  mg/g,  $p < 0.05$ ）、左心室肥大が確認された。また、Lung/BW（肺うっ血の程度を反映）もTAC処置により有意に増大しており（Sham群:  $5.7 \pm 0.3$  mg/g, TAC処置Vehicle群:  $15.1 \pm 2.3$  mg/g,  $p < 0.05$ ）、左心室肥大とともに心不全症状として肺うっ血が認められた。一方、DS37001789含有餌は、この増悪したLV/BW（0.06%群:  $5.7 \pm 0.5$  mg/g, 0.2%群:  $5.4 \pm 0.4$  mg/g）およびLung/BW（0.06%群:  $13.5 \pm 3.1$  mg/g, 0.2%群:  $10.7 \pm 2.0$  mg/g）を改善させる傾向を示した。

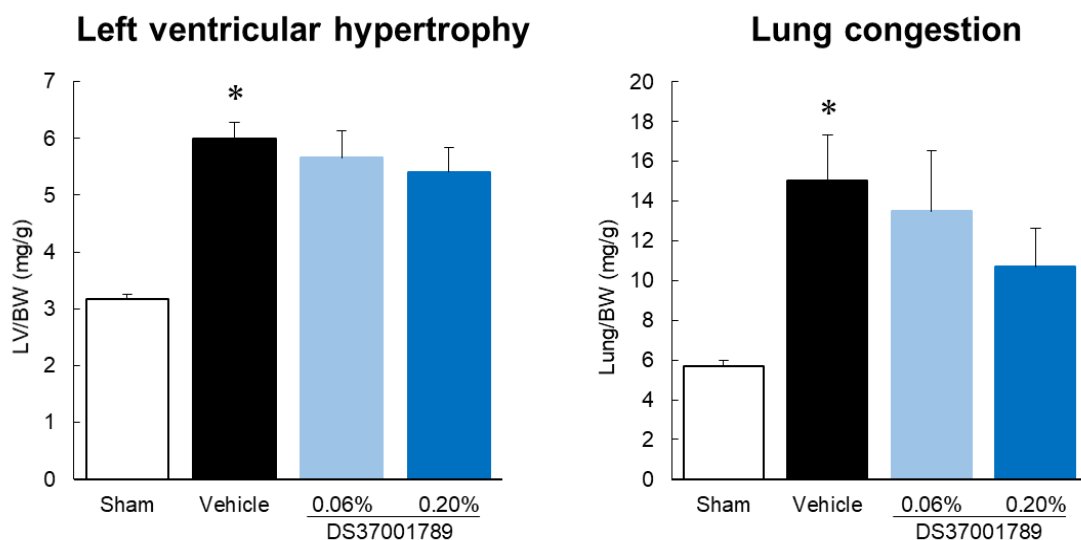


図20. 臓器重量の評価

横行大動脈狭窄（transverse aortic constriction; TAC）で圧負荷をかけたマウスにDS37001789を4週間混餌投与した。偽手術群（Sham,  $n = 8$ ）、TAC処置通常餌給餌群（TAC + Vehicle,  $n = 15$ ）、TAC処置DS37001789含有餌給餌群（TAC + DS37001789, 0.06%, 0.2%, 各群 $n = 10$ ）に関して、左心室重量/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＋標準誤差で示す（\* $p < 0.05$  vs Sham, Student's  $t$ -test）。

### 5.3.4 左心室の mRNA 発現解析

心肥大、心機能ならびに線維形成の関連標的遺伝子の mRNA に関して、PCR 法で発現量を解析し、その結果を図 21 に示す。心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) と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、いずれも利尿作用、血管拡張作用、交感神経抑制、肥大抑制などを介して心筋を保護する作用を有する。これらは、心不全患者の重症度や予後との関係が報告され (Maeda *et al.*, 1998; Tsutamoto *et al.*, 1997)、左心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報告されている。BNP は心不全の生化学的マーカーとして広く臨床現場でも用いられており、「慢性心不全治療ガイドライン」の心不全の診断の項でも記載されている。左心室の *Anp* mRNA および *Bnp* mRNA は、Sham 群に比べ TAC 処置 Vehicle 群で有意に上昇した (*Anp* mRNA:  $26.3 \pm 3.8$  倍, *Bnp* mRNA:  $5.9 \pm 0.8$  倍,  $p < 0.05$ )。一方で、TAC 処置 0.2% DS37001789 含有餌給餌群では、TAC 処置 Vehicle 群に比べ *Anp* mRNA では有意な改善は認められなかったが ( $11.9 \pm 4.5$  倍)、*Bnp* mRNA では有意な改善が認められた ( $1.7 \pm 0.4$  倍,  $p < 0.05$ )。

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、核内移行した NFAT が心肥大関連遺伝子の転写を促進する (Molkentin *et al.*, 1998)。NFAT の標的遺伝子に *Rcan1* (regulator of calcineurin 1) があり、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を形成している (Vega *et al.*, 2003)。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 (Wang *et al.*, 2002)。左心室の *Rcan1* mRNA は、Sham 群に比べ TAC 処置 Vehicle 群で上昇し ( $2.6 \pm 0.7$  倍)、TAC 処置 0.2% DS37001789 含有餌給餌群で TAC 処置 Vehicle 群に比べ有意な低下が認められた ( $0.7 \pm 0.2$  倍,  $p < 0.05$ )。

心筋の収縮・弛緩の制御は、心筋小胞体の SERCA2a (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2a) による  $\text{Ca}^{2+}$  輸送と膜蛋白質 PLN (phospholamban) による調節が重要な役割を担っている。PLN は SERCA2a に結合することで SERCA2a 活性を低下させる (Fleischer *et al.*, 1998)。また、SERCA2a の発現や活性が心不全患者や心不全モデルで低下することが報告されている (Kranias *et al.*, 2012; Marks, 2013; Szymanska *et al.*, 2020)。左心室の *Serca2a* mRNA は、Sham 群に比べ



TAC 処置 Vehicle 群で有意に低下したが ( $0.41 \pm 0.03$  倍,  $p < 0.05$ )、TAC 処置 0.2% DS37001789 含有餌給餌群で変化は認められなかった ( $0.48 \pm 0.04$  倍)。 *Pln* mRNA の発現も Sham 群に比べ TAC 処置 Vehicle 群で有意に低下したが ( $0.64 \pm 0.04$  倍,  $p < 0.05$ )、TAC 処置 0.2% DS37001789 含有餌給餌群で変化は認められなかった ( $0.7 \pm 0.1$  倍)。

次に、心臓の線維化に対する作用を調べるため、TAC による圧負荷心肥大で発現が報告されており、線維化した細胞で発現が増加する I 型コラーゲン *Colla2* の発現量を解析した (Liu *et al.*, 2013)。 *Colla2* mRNA は、Sham 群に比べ TAC 処置 Vehicle 群で有意に増加したが ( $2.3 \pm 0.1$  倍,  $p < 0.05$ )、TAC 処置 0.2% DS37001789 含有餌給餌群で有意な低下は認められなかった ( $1.6 \pm 0.3$  倍)。

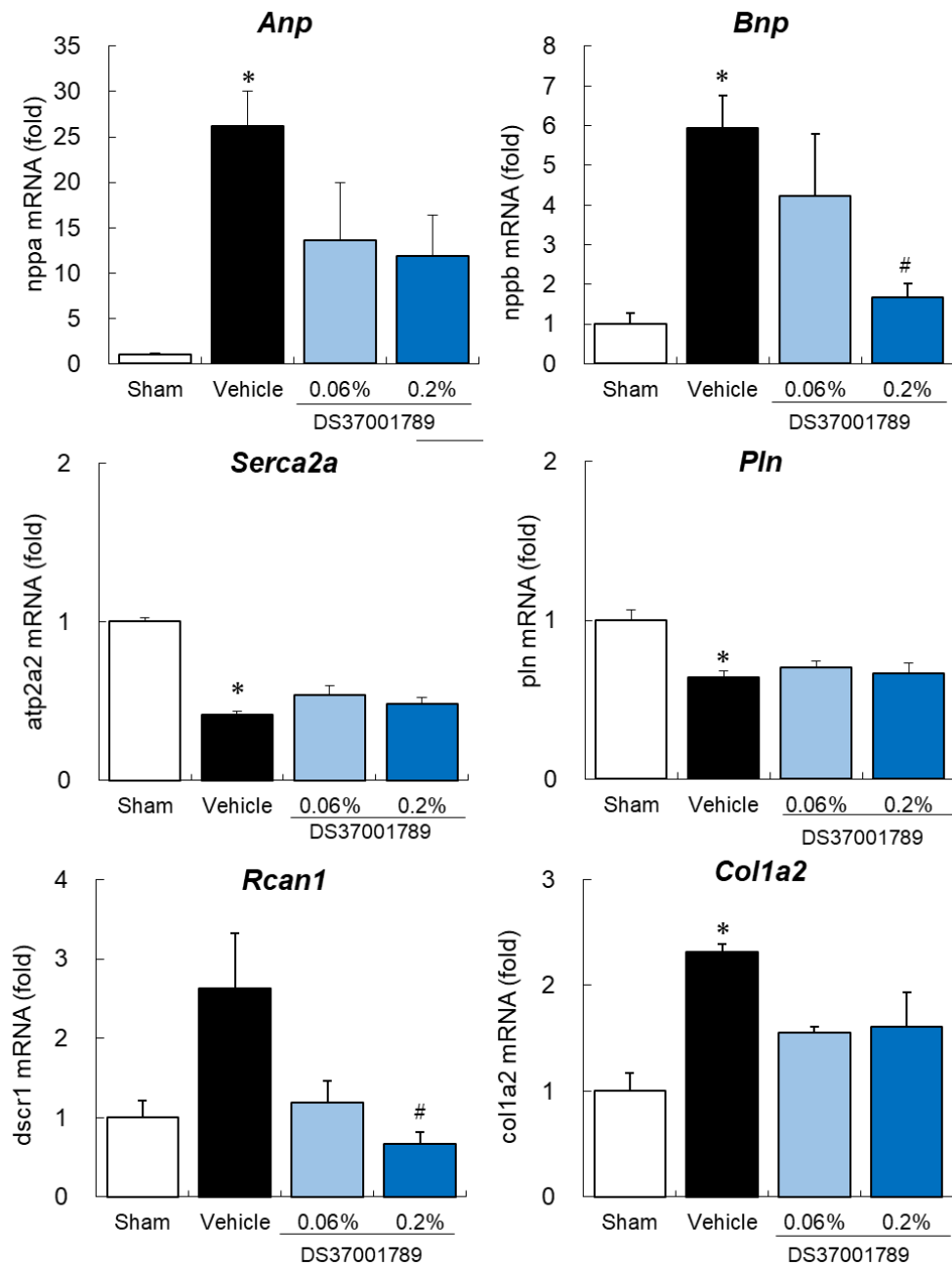


図21. 左心室のmRNA発現解析

横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) で圧負荷をかけたマウスにDS37001789を4週間混餌投与した。偽手術群 (Sham,  $n = 3$ )、TAC処置通常餌給餌群 (TAC + Vehicle,  $n = 4$ )、TAC処置DS37001789含有餌給餌群 (TAC + DS37001789, 0.06%, 0.2%, 各群 $n = 3$ ) に関して、各遺伝子の*Gapdh* mRNAに対する発現量を解析した。データは平均値+標準誤差で示す (\* $p < 0.05$  vs Sham, Student's *t*-test, # $p < 0.05$  vs TAC + Vehicle, Dunnett's test)。

### 5.3.5 左心室の GPR14 発現解析

心不全患者や圧負荷誘発心不全モデルで GPR14 の発現が増加していることが報告されている (Douglas *et al.*, 2002; Bousette *et al.*, 2006)。TAC マウスで GPR14 発現が上昇している否か、更には、DS37001789 の 4 週間投与が TAC マウスでの GPR14 発現に影響を及ぼすか否かを明らかにするために、左心室の GPR14 タンパク質発現をウェスタンブロット法で測定した (図 22)。GPR14 発現は、Sham 群と比較して TAC 処置 Vehicle 群で 1.6 倍増加したが、その差は有意ではなかった。しかし、TAC 処置 0.2% DS37001789 含有餌給餌群で有意に増加した ( $p < 0.05$ )。DS37001789 が心臓の GPR14 発現増加に直接寄与するかを明らかにするため、正常ラットから単離した心筋細胞を用いて、DS37801789 を直接添加した際の GPR14 発現量をウェスタンブロット法で測定した。DS37001789 (600 nM) は、添加 5 分後では GPR14 の発現を低下させ、その後、時間依存的に増加させ、その増加は 240 分後に顕著となった (図 23)。

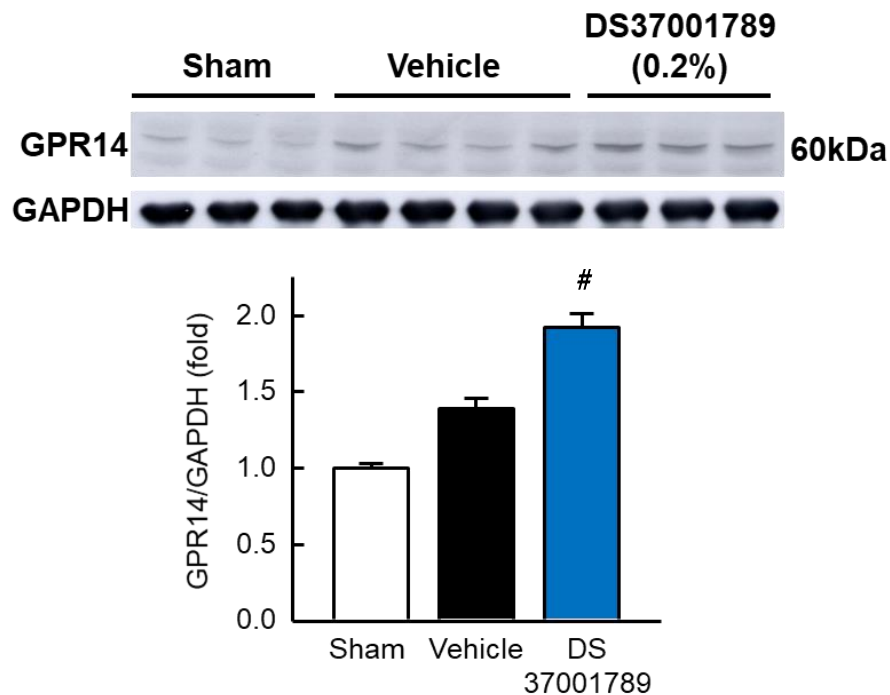


図22. 左心室のGPR14発現解析

横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) で圧負荷をかけたマウスにDS37001789を4週間混餌投与した。偽手術群 (Sham, n = 3)、TAC処置通常餌給餌群 (TAC + Vehicle, n = 4)、TAC処置DS37001789含有餌給餌群 (TAC + DS37001789, 0.2%, 各群n = 3) に関して、GPR14のGAPDHに対するタンパク発現量を解析した。データは平均値 + 標準誤差で示す (# $p < 0.05$  vs TAC + Vehicle, Dunnett's test)。

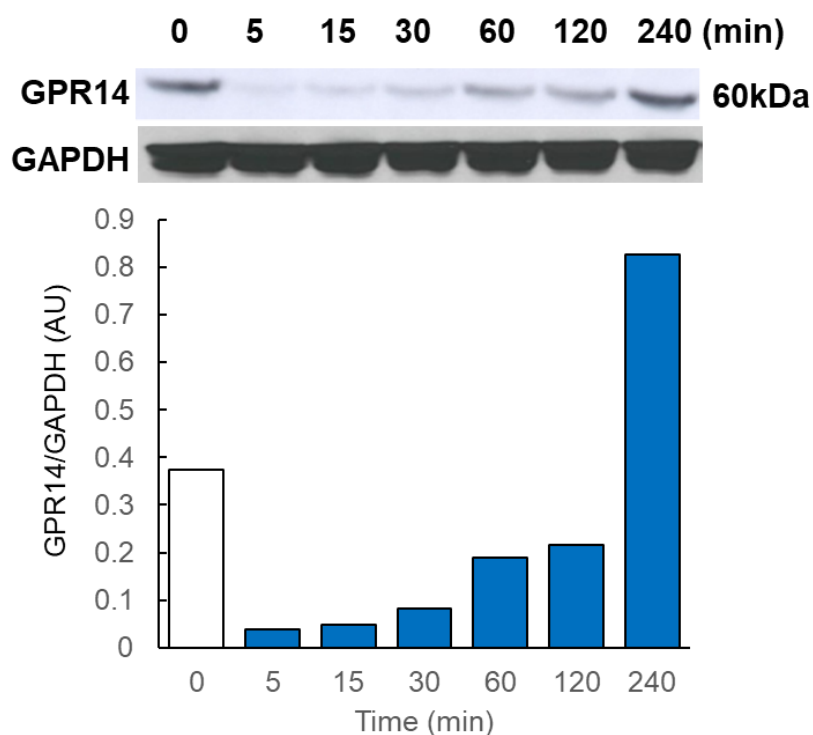


図23. ラット単離心筋細胞を用いたGPR14発現解析

正常ラットから心筋細胞を単離し、単離直後にDS378001789 (600 nM)を添加し、添加240分後までのGPR14のGAPDHに対するタンパク発現量を経時的に解析した (0 minはDS37001789の添加なし)。

### 5.3.6 血漿中薬物濃度解析

DS37001789を投与することで認められた薬理作用と血中濃度との関連性を検討するために、DS37001789の血漿中濃度を投与4週間後に測定した。DS37001789濃度は0.06%および0.2% DS37001789含有餌給餌群で、それぞれ17.0 ng/mLおよび237.0 ng/mLであった (図24)。

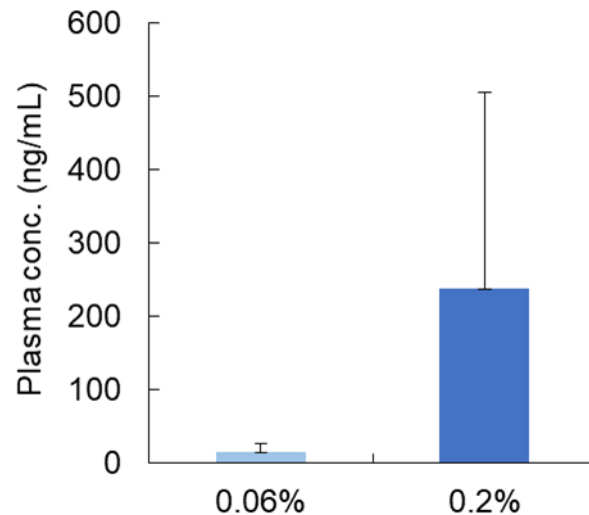


図24. 血漿中薬物濃度の測定

横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) で圧負荷をかけたマウスにDS37001789を4週間混餌投与した。投与4週間後、TAC処置DS37001789含有餌給餌群 (TAC + DS37001789, 0.06% (n = 6) , 0.2% (n = 10) ) から採血し、血漿中のDS37001789の濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置により測定した。データは平均値+標準誤差で示す。

#### 5.4 考察

DS37001789 が圧負荷心不全マウスの心肥大の抑制と心機能改善作用を示し、生存率改善作用を有することが示された。

0.2% DS37001789 を通常飼料を用いて 12 週間混餌経口投与すると、生存率が有意に改善することが示された。その作用機序解析のひとつとして、DS37001789 の心機能に対する効果ならびに心肥大と線維症に対する効果を検討した。圧容積解析では対照群と比較して、DS37001789 (0.2%、4 週間投与) は LVP を変化させることなく LVEDV、LVESV、EF を有意に改善した。実臨床では EF の改善のために HR あるいは LVP を上昇させる強心薬が使用されるが、これらの薬剤は一時的に生活の質は改善するものの、予後を悪化することが明らかとなっている (EPOCH Study Group, 2002)。そのため、DS37001789 の HR ならびに LVP

上昇を伴わない EF 改善作用は大きな意義がある。さらに、DS37001789 は *Bnp* や *Rcan1* mRNA の心肥大マーカーのレベルを有意に減少させたが、TAC 処置で悪化した LV/BW を有意に改善しなかった。Lung/BW は心不全の症状のひとつである肺うっ血の指標とされているが、Lung/BW も有意に改善しなかった。また、DS37001789 は本研究では、圧負荷に対する抗線維化効果を示さなかった。そのため、生存率改善におけるその主な作用機序は心機能の改善に基づくと考えられた。U-II/GPR14 シグナルは線維化作用を有すること (Cheung *et al.*, 2004)、更には、心不全モデルに対して GPR14 拮抗薬を投与した場合、抗線維化作用を示すこと (Oh *et al.*, 2015) が報告されており、今回の DS37001789 の投与時に観察された結果とは合致しない。本研究で抗線維化作用として評価したのは *Colla2* mRNA のみであり、心臓切片を用いた病理組織学解析は実施していない。DS37001789 の抗線維化作用は弱い可能性はあるが、病理組織学解析を含めた詳細な検討は今後の課題である。

次に、この DS37001789 の心機能改善作用が GPR14 抑制に起因するかを検証した。0.2% DS37001789 を投与した TAC 群の GPR14 の発現は、対照群と比較して増加する傾向があった。DS37001789 がこの GPR14 発現上昇に直接寄与するかどうかを検討するため、心筋単離細胞に対する影響を評価した。DS37001789 処理で心筋細胞の GPR14 の発現は、DS37001789 未処理心筋細胞と比較して上昇する傾向があった。この結果は、TAC マウスでの GPR14 上昇が DS37001789 の直接作用によって引き起こされることを示唆する。しかし、添加直後に GPR14 の発現低下が認められていることは、DS37001789 による GPR14 の内在化や分解の可能性も考えられるため、膜表面上の発現解析などの詳細な検証が必要である。β遮断薬は、長期間使用後の中止により離脱症状群を生じ、急激な血圧上昇、心拍数の増加、心筋梗塞や突然死等を起こすことがある。このβ遮断薬の離脱症候群は、長期投与による受容体の発現増加による感受性の亢進に起因する。β遮断薬は、心筋細胞の収縮力を抑制して血圧を抑制させるため、投薬中断で、心筋収縮増加と血圧上昇を伴う。一方、本研究では、DS37001789 の長期投与で GPR14 の発現上昇が認められているが、離脱症状は起こさないと考えている。その理由として、第 4 章の結果から、DS37001789 で全身血圧の低下と心筋細胞の収縮力には影響しないことが挙げられる。また、DS37001789 が心不全に有効である作用機序には心筋肥大の抑制が関与している点も挙げられる。しかし、実

際に長期投与後の休薬実験を実施して、離脱症状が生じないことを精査する必要がある。

本章では、薬理作用と血漿中化合物濃度との関連性を検討した。*In vitro* U-II 結合阻害活性 ( $IC_{50}$  値は 0.9 nM) およびマウス血漿中 DS37001789 フリー体濃度から薬理作用を示す推定血漿化合物濃度を算出した。マウスでの DS37001789 の血漿蛋白結合率は 90.2%であったことから、推定血漿  $IC_{50}$  値は 0.56 ng/mL と算出された。TAC マウスモデルに 0.06%および 0.2%の用量で 4 週間投与した DS37001789 曝露量は、フリー体濃度でそれぞれ 1.67 ng/mL および 23.2 ng/mL であり、推定血漿中  $IC_{50}$  値の 3 倍および 42 倍高い濃度であった。第 4 章では、30 mg/kg の用量で経口投与した DS37001789 がマウスの U-II 誘発昇圧反応を有意に抑制することを示した。その際の DS37001789 の血漿中濃度は推定  $IC_{50}$  値の 25 倍であったことから、0.2% DS37001789 投与時の薬物濃度は、マウスでの U-II 誘発昇圧反応を抑制するのに十分高かった。これらの結果は、0.2% DS37001789 が生理学的 U-II/GPR14 反応を抑制するのに十分な血漿濃度を維持し、心機能の改善を介して、圧負荷マウスの生存率を有意に改善することを示唆する。

最後に、リバーズリモデリングに対する DS37001789 の作用について考察する。心室リモデリングは、血行動態負荷に反応してそれを維持するために心臓の構造や形状を変化させることが関与し、心筋梗塞後あるいは慢性高血圧・容量負荷後に認められる (Mill *et al.*, 1994)。その進行を止めたり逆転させたりすることを「リバーズリモデリング」と呼ぶことが多いが、リバーズリモデリングの概念は、左心室容積の低下と機能の改善と定義され (Kass *et al.*, 1995)、レニン・アンジオテンシン・アルドステロンシグナルの阻害薬、 $\beta$  遮断薬、および心臓再同期または心室補助装置の使用などのデバイス関連療法によって立証された (Hoshikawa *et al.*, 2011; Sabbah *et al.*, 1994; Waring *et al.*, 2016; Willenheimer *et al.*, 1997)。すなわち、リバーズリモデリングは心不全患者の予後を改善できると結論付けられる。そのため、リバーズリモデリングへ到達させることは心不全治療の重要な目標のひとつとなる。本研究では、DS37001789 は圧負荷により生じる LVEDV、LVESV および EF の障害を有意に改善した。従って、リバーズリモデリングを介して、生存率を改善させたと推測される。リバーズリモデリングの機序については、細胞あるいは組織レベルでさまざまな検討が行われているが、未だ不明な



点が多い。この機序が解明されれば、U-II/GPR14 シグナル抑制とリバースリモデリングの関係性も明らかになると思われる。

以上、DS37001789 は、ヒト心不全のフェノタイプを示す TAC マウスでの心肥大の抑制と心機能改善作用を介して、生存率改善作用をもたらすことが示された。

## 第6章 TAC マウスの心機能に対する GPR14 欠損の影響

### 6.1 目的

第5章で GPR14 拮抗薬である DS37001789 が TAC マウスでの心機能障害の改善を介して生存率を改善することを実証した。U-II/GPR14 シグナルが心不全で重要な役割を担うという試験成績を更に精査するために、本章では、内因性 GPR14 欠損 TAC マウスの表現型を解析した。GPR14 欠損マウスの背景として、これまでに体重、心重量、血圧、心機能は野生型と差がないことが報告されているが (Behm *et al.*, 2003)、TAC 後の内因性 GPR14 の心肥大と心機能障害への関与は報告されていない。そのため、GPR14 欠損マウスを用いて、心機能および生存率改善に対する影響を検討した。

### 6.2 方法

#### 6.2.1 動物

雄性 GPR14 欠損マウス (5 週齢) は日本チャールスリバー株式会社 (神奈川) から購入した。動物の飼育環境は室温を  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\% \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクルで、自由飲水、自由摂取 (FR-2 固形餌、株式会社フナバシファーム、千葉) の条件下で飼育した。すべ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。

#### 6.2.2 U-II 昇圧反応試験

4.2.4 と同様の手法にて検討した。すなわち、マウスをイソフルラン吸入麻酔下で頸動脈を露出させ、カテーテルを頸動脈に外科的に挿入し、PowerLab システム (ADInstruments) の生理学的圧力変換器を介して平均血圧と心拍数を連続的に測定した。血行動態パラメーターが安定した後、ベースライン MBP を 2 分間記録し、その後、ヒト U-II ( $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) を頸静脈から投与した。ヒト U-II 投与で生じた昇圧反応を 5 分間記録し、平均化されたベースライン値からの MBP の変化を計算し、AUC (0-300 秒) を算出した。

### 6.2.3 TAC マウスの作製

野生型ならびに GPR14 欠損マウスは 8 週齢で 5.2.3 と同様の方法で野生型ならびに GPR14 欠損マウスに TAC 処置を実施した。Sham 群として、開胸および横行大動脈の剥離を行った。

### 6.2.4 心エコー解析

TAC 処置 1 週間および 5 週間後に 5.2.4 と同様の方法で超音波高解像度イメージングシステム（型式 Vevo2100, FUJIFILM VisualSonics）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。

### 6.2.5 臓器重量の測定

5.2.6 同様に、試験中に TAC マウスの死亡が観察された場合は死亡時、それ以外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。これらの臓器重量から、LV/BW および Lung/BW を算出した。

### 6.2.6 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±標準誤差あるいは平均値+標準誤差で表記した。TAC 処置群野生型と TAC 処置 GPR14 欠損群の比較には Student's *t* 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、*p* 値が 0.05 未満の場合に有意とした。

## 6.3 結果

### 6.3.1 GPR14 欠損マウスでの U-II 昇圧試験

GPR14 欠損によりヒト U-II による昇圧反応が起こらないことを確認するために、野生型と GPR14 欠損マウスにヒト U-II を投与し、MBP を計測した。GPR14 欠損マウスは野生型のようなヒト U-II 昇圧反応は認められなかった (図 25)。なお、ヒト U-II 投与前の野生型と GPR14 欠損マウスの MBP (野生型: 87 mmHg, GPR14 欠損マウス: 77 mmHg,  $p > 0.05$ ) と HR (野生型: 324 bpm, GPR14 欠損マウス: 312 bpm,  $p > 0.05$ ) は有意差を認めなかった。

ス: 349 bpm,  $p > 0.05$ ) に差はなかった。

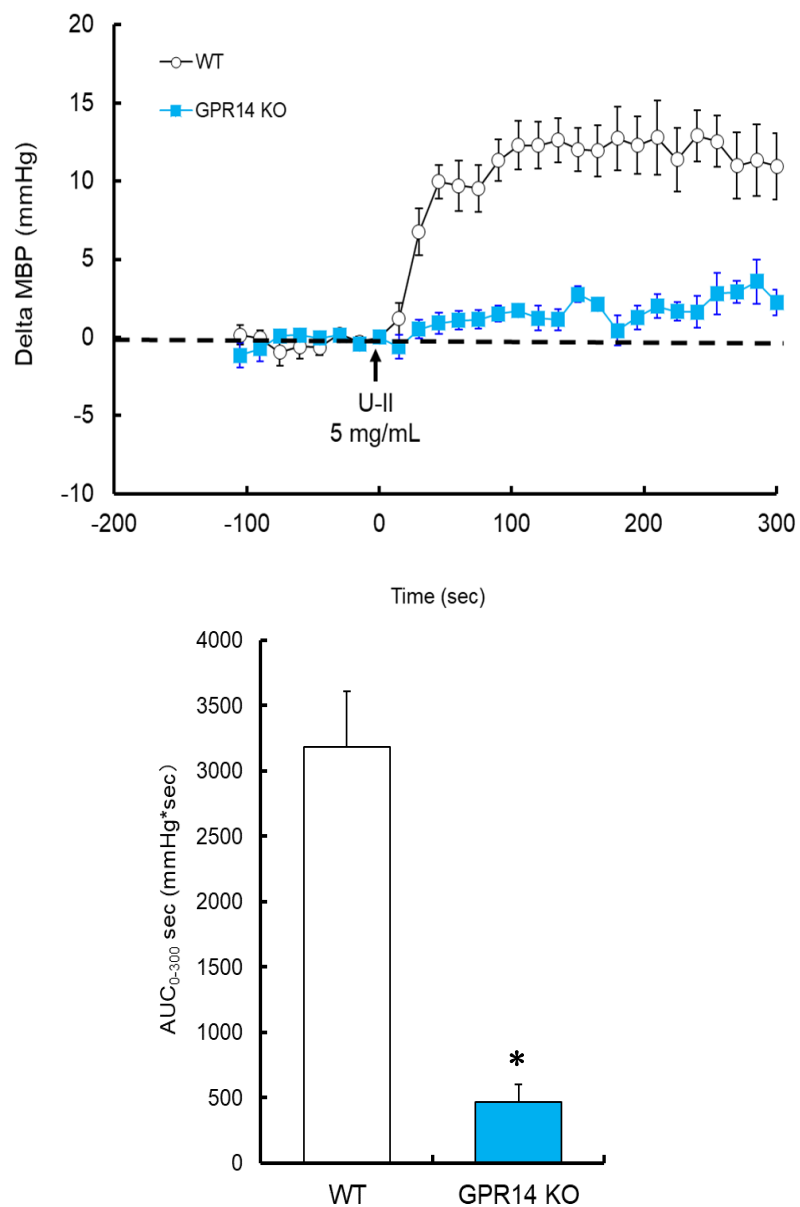


図25. GPR14欠損マウスでのヒトU-II誘導昇圧反応

平均血圧は頸動脈に挿入したカテーテルで連続的に測定した。結構動態パラメーター安定後、ヒトU-IIを投与した。平均ベースライン値からの平均血圧の変化をAUC (0-300 sec) として計算した。MBP推移のデータは平均値±標準誤差、AUCのデータは平均値+標準誤差で示す (n = 7, \* $p < 0.05$  vs WT, Student's  $t$ -test)。

### 6.3.2 TAC マウスの生存率に対する GPR14 欠損の影響

TAC マウスの生存率に対して GPR14 が影響するか否かを調べるために、野生型と GPR14 欠損マウスを用いて TAC 処置をし、TAC 処置 5 週間における生存率を比較検討した。

Kaplan・マイヤー曲線で各群の生存率を示す (図 26)。野生型と GPR14 欠損マウス両群の Sham 処置群では、試験中に死亡例はなかった。試験終了時の生存率は TAC 処置野生型群では、52.3%であった。一方で、TAC 処置 GPR14 欠損群では、75.0%であり、TAC 処置野生型群に対し、統計学的に有意な生存率改善作用を示した ( $p < 0.05$ )。

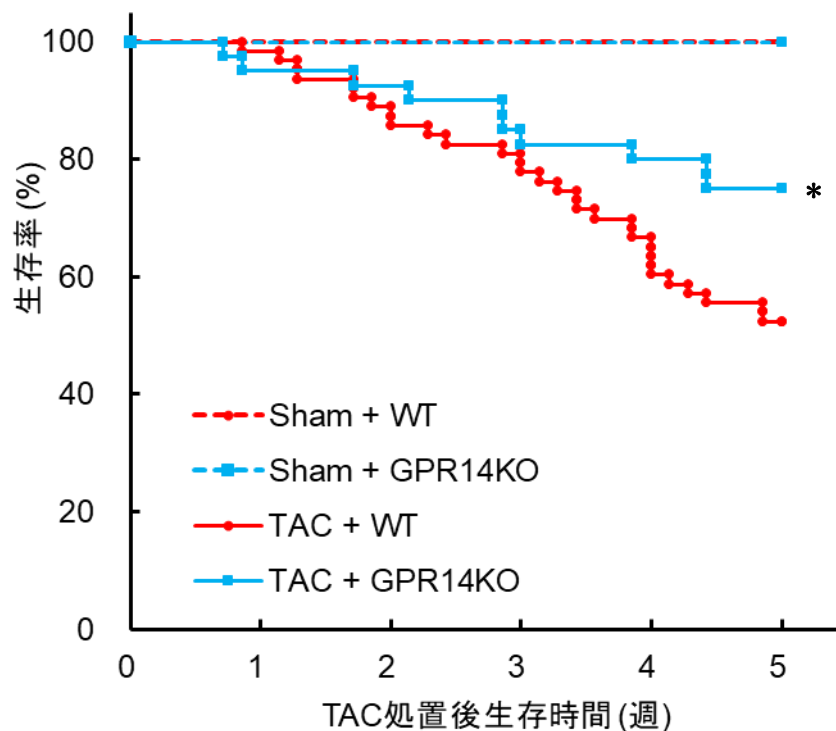


図26. 圧負荷心不全マウスでの生存率に対するGPR14欠損の影響

横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) で圧負荷をかけた野生型およびGPR14欠損マウスの生存率を Kaplan・マイヤー曲線で示す。偽手術野生型群 (Sham + WT,  $n = 14$ )、偽手術GPR14欠損群 (Sham + GPR14 KO,  $n = 13$ ) TAC処置野生型群 (TAC + WT,  $n = 63$ )、TAC処置GPR14欠損群 (TAC + GPR14 KO,  $n = 40$ ) (\* $p < 0.05$  vs TAC + WT, Bonferroni correction)。

### 6.3.3 TAC マウスの心機能に対する GPR14 欠損の影響

生存率が改善した機序を解明するために心エコー検査を TAC 処置 1 週間後と 4 週間後に実施した。TAC 処置 GPR14 欠損群では TAC 処置 1 週間後から EF、LVD ならびに LVDs の有意な低下が認められ、その効果は TAC 処置 4 週間後も持続していた (図 27、 $p < 0.05$ )。

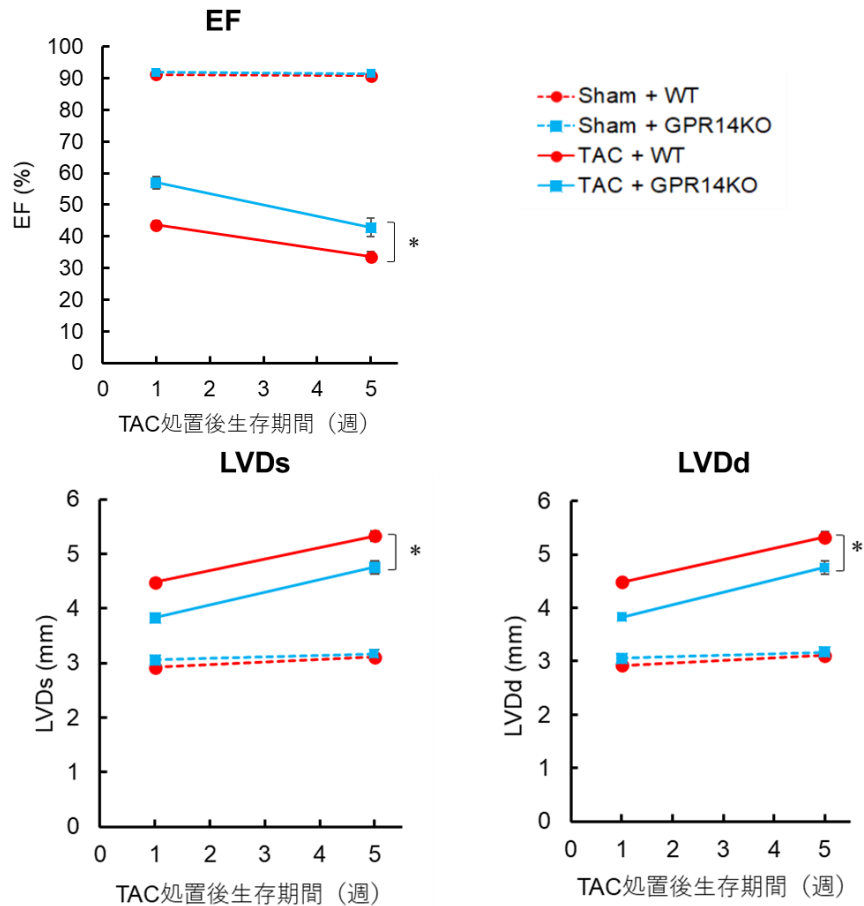


図27. 心エコーによる左心室収縮機能評価

横行大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) で圧負荷をかけた野生型およびGPR14欠損マウスの駆出率 (ejection fraction; EF)、左室収縮末期径 (left ventricular end-systolic diameter; LVDs)、左室拡張末期径 (left ventricular end-diastolic diameter; LVDd) を心エコーで測定した。偽手術野生型群 (Sham + WT,  $n = 10$ )、偽手術GPR14欠損群 (Sham + GPR14 KO,  $n = 8$ ) TAC処置野生型群 (TAC + WT,  $n = 35$ )、TAC処置GPR14欠損群 (TAC + GPR14 KO,  $n = 30$ )。データは平均値±標準誤差で示す (\* $p < 0.05$  vs TAC + WT, Student's  $t$ -test)。

### 6.3.4 臓器重量の評価

試験中に死亡した場合は死亡時、それ以外は試験終了時のマウスを用いて、LV/BW および Lung/BW を測定し、その結果を図 28 に示した。LV/BW ならびに Lung/BW で GPR14 欠損により野生型と差は認められなかった。LV/BW は TAC 処置で野生型および GPR14 欠損群でも有意に増大しており、左心室肥大が認められた。また、Lung/BW（肺うっ血の程度を反映）も TAC 処置で有意に増大しており、左心室肥大とともに心不全症状として肺うっ血が認められた。一方、LV/BW および Lung/BW とともに、野生型と GPR14 欠損マウスでの差はなかった。

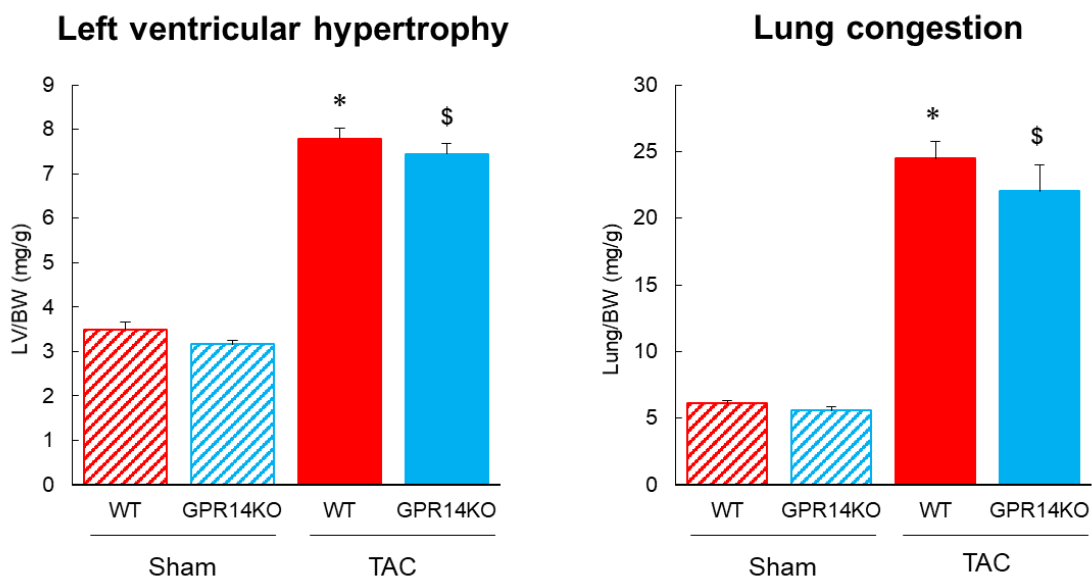


図28. 臓器重量の評価

横行大動脈狭窄（transverse aortic constriction; TAC）で圧負荷をかけた野生型およびGPR14欠損マウスの左心室重量/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た。偽手術野生型群（Sham + WT, n = 4）、偽手術GPR14欠損群（Sham + GPR14 KO, n = 4）TAC処置野生型群（TAC + WT, n = 12）、TAC処置GPR14欠損群（TAC + GPR14 KO, n = 9）。データは平均値 + 標準誤差で示す（\* $p < 0.05$  vs Sham + WT, \$ $p < 0.05$  vs Sham + GPR14 KO, Student's *t*-test）。

## 6.4 考察

本章では、GPR14欠損マウスを用いて、解析を進めた。定常状態のMBPおよびHRに対しては、GPR14欠損の影響はなく、この結果は既報どおりであった (Behm *et al.*, 2003)。また、ヒトU-IIによる血圧上昇作用はGPR14欠損で抑制され、この傾向はDS37001789を野生型マウスに投与した際の結果と類似していた。圧負荷誘発心不全のGPR14欠損マウスでは、生存率は心内腔拡大と心機能の改善を介して有意に改善された。これらの知見は、U-II/GPR14シグナルが心不全発症に寄与し、内因性GPR14抑制が心不全治療戦略として有効であることを示唆する。本研究は、GPR14欠損マウスを用いて、心不全におけるU-II/GPR14シグナル抑制の効果を示した最初の研究となる。

心機能検査の結果では、第5章で示されたDS37001789と内因性GPR14欠損マウスでの結果にいくつかの違いが見られた。その違いは、DS37001789では心機能改善作用が強力であったのに対し、内因性GPR14欠損マウスではDS37001789の作用に比べて弱かったことである。これらの違いは、薬剤と遺伝子というGPR14抑制機序の差に起因すると考えられるが、DS37001789がGPR14以外の受容体を介している可能性も否定できない。それゆえ、各種受容体結合試験等を実施し、受容体選択性を更に評価する必要もある。更に、発達段階でのGPR14欠損の影響を考慮するため、薬剤誘導性GPR14欠損マウスを作製する方法も興味深い。

DS37001789ならびにGPR14欠損マウスを用いたU-II/GPR14シグナル抑制は明確な抗心肥大効果を示さなかったが、心機能が著明に改善し、それに伴い、生存率も上昇した。心不全病態でのU-II/GPR14シグナル抑制から心機能の改善に至る分子機序は依然として不明な部分が多く、この分野の研究の発展が望まれる。また、第1章でも言及したように、U-II/GPR14シグナルの亢進は、心不全以外にも腎不全、糖尿病、動脈硬化等の循環器系疾患に関与している。従って、これらの疾患の負のスパイラルを誘発する可能性に関しても考慮すべきである。ACT-058362の臨床試験は、糖尿病性腎症およびII型糖尿病患者を対象としておこなわれた。現在、GPR14欠損マウスおよびDS37001789というツールを得た状況にある。上述のモデルでの検討で、最大薬効等を見極め、最も適した適応疾患の見極めも併せて実施したい。



## 第7章 結論

本研究では、GPR14 に対する新規低分子阻害薬の創薬研究を行い、強力な GPR14 拮抗作用を有する DS37001789 を取得した。そして、「DS37001789 を用いて U-II/GPR14 シグナルの病態への関与を明らかにする」、「DS37001789 の薬理学的特性を明らかにする」という2点を目的として、鋭意検討を重ね、以下に示す知見を得た。

- (1) DS37001789 は *ex vivo* および *in vivo* で大きな種差はなく、強力な U-II 拮抗作用を有する。
- (2) DS37001789 は圧負荷誘発心不全マウスで、心機能障害の改善を介して生存率を改善する。
- (3) 圧負荷誘発心不全の GPR14 欠損マウスでは、心内腔拡大と心機能障害抑制を介して生存率を改善する。

これらの知見は、U-II/GPR14 シグナル抑制が心不全の心機能を改善することを強く示唆する。GPR14 拮抗薬は、既存薬の作用機序とは異なり、血圧や心収縮に影響せず、心肥大を抑制する治療戦略でもある。心不全の発症要因は心筋梗塞、高血圧、弁膜症、心筋症等である。これらの疾病での心不全発症時には心肥大を経るという共通点がある。心肥大は心不全の危険因子であり、心肥大の抑制が結果的に心不全の予防治療につながる。また、心不全患者の血圧は低下傾向にある。さらなる血圧低下は心収縮の低下を引き起こすため、血圧低下を伴わない治療薬の価値は高い。更に、GPR14 拮抗薬は、既存薬とは異なる作用機序であり、併用薬としての相乗効果も大いに期待できる。

創薬プロセスでは、ヒトで有効性・副作用を検証する臨床試験に進める前に、齧歯類およびサルなどの非齧歯類での薬理・安全性評価は必須である。すなわち、ヒトの標的分子に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。それゆえ、ACT-058362 が臨床試験で有効性が認められなかった理由として、拮抗作用不足の他に、齧歯類では薬物動態と薬力学の関係が検証できず、ヒトへの外挿性の精度を欠いた可能性が考えられる。一方、DS37001789 は大きな種差もなく U-II/GPR14 シグナル関連の病態生理を改善するのに十分な薬理プ

ロファイルを有することが示され、このことはトランスレーショナルリサーチの観点からも意義がある。DS37001789 の臨床試験の実現に向けては、安全性や忍容性などの超えなければならない幾つかの大きなハードルがあり、今後、更なる研究が必要である。加えて、これまでの GPR14 拮抗薬が臨床試験で限定的な薬効しか示していない理由を精査し、臨床試験の成功率を向上させるための戦略を立てる必要がある。そのひとつとして U-II/GPR14 シグナルが亢進している患者の層別化などが考えられる。この点については、GPR14 拮抗薬の研究が進み、臨床および疫学的知見が蓄積されることを期待している。

以上、本研究から、U-II/GPR14 シグナルは、病的心肥大を伴う心不全を治療するための魅力的な創薬標的であり、GPR14 拮抗薬 DS37001789 は、高血圧および大動脈弁狭窄などの圧過負荷状態の患者に対する新規心不全治療薬となる可能性が提起された。

## 参考文献

Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, *et al.*, Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature*. 1999;401:282-286.

Behm DJ, Herold CL, Ohlstein EH, *et al.*, Pharmacological characterization of SB-710411 (Cpa-c[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Cpa-amide), a novel peptidic urotensin-II receptor antagonist. *Br J Pharmacol*. 2002;137:449-458.

Behm DJ, McAtee JJ, Dodson JW, *et al.*, Palosuran inhibits binding to primate UT receptors in cell membranes but demonstrates differential activity in intact cells and vascular tissues. *Br J Pharmacol*. 2008;155:374-86.

Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, *et al.*, Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol*. 2000;130:1865-1870.

Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, *et al.*, Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol*. 2000;130:1865-1870.

Bousette N, Hu F, Ohlstein EH, *et al.*, Urotensin-II blockade with SB-611812 attenuates cardiac dysfunction in a rat model of coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:285-295.

Camarda V, Rizzi A, Calò G, *et al.*, Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2002;365:141-149.

Cheung BM, Leung R, Man YB, *et al.*, Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J hypertens*. 2004; 22:1341-1344.

Clozel M, Binkert C, Birker- RM, *et al.*, Pharmacology of the urotensin-II receptor

antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311:204-212.

Coulouarn Y, Lihrmann I, Jegou S, *et al.*, Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:15803-15808.

Douglas SA. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'?. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:159-167.

Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, *et al.*, Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet*. 2002;359:1990-1997.

Douglas SA, Dhanak D, Douglas G, *et al.*, Johns From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:76-85.

Douglas SA, Sulpizio AC, Piercy V, *et al.*, Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol*. 2000;131:1262-1274.

EPOCH Study Group. Effects of pimobendan on adverse cardiac events and physical activities in patients with mild to moderate chronic heart failure: the effects of pimobendan on chronic heart failure study (EPOCH study). *Circ J*. 2002;66:149–157.

Fleischer S, Inui M. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu Rev Biophys Chem*. 1989;18:333-64.

Gruson D, Rousseau MF, Ahn SA, *et al.*, Circulating urotensin II levels in moderate

to severe congestive heart failure: its relations with myocardial function and well established neurohormonal markers. *Peptides*. 2006;27:1527-1531.

Herold CL, Behm DJ, Buckley PT, *et al.*, The neuromedin B receptor antagonist, BIM-23127, is a potent antagonist at human and rat urotensin-II receptors. *Br J Pharmacol*. 2003;139:203-207.

Hoshikawa E, Matsumura Y, Kubo T, *et al.*, Effect of left ventricular reverse remodeling on long-term prognosis after therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers and  $\beta$  blockers in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2011;107:1065-1070.

Jong P, Yusuf S, Rousseau MF, *et al.*, Effect of enalapril on 12-year survival and life expectancy in patients with left ventricular systolic dysfunction: a follow-up study. *Lancet*. 2003;361:1843-1848.

Kansy M, Senner F, Gubernator K, *et al.*, Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J Med Chem*. 1998;41:1007-1010.

Kass DA, Baughman KL, Pak PH, *et al.*, Reverse remodeling from cardiomyoplasty in human heart failure. External constraint versus active assist. *Circulation*. 1995;91:2314-2318.

Kompa AR, Wang BH, Phrommintikul A, *et al.*, Chronic urotensin II receptor antagonist treatment does not alter hypertrophy or fibrosis in a rat model of pressure-overload hypertrophy. *Peptides*. 2010;31:1523-1530.

Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res*. 2012;110:1646-1660.

Lapp H, Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, *et al.*, Elevated plasma human urotensin-II-like immunoreactivity in ischemic cardiomyopathy. *Int J cardiol*. 2004; 94:93-97.

Liu W, Zi M, Tsui H, *et al.*, A novel immunomodulator, FTY-720 reverses existing cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by targetin NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling and periostin. *Circ Heart Fail.* 2013;6:833-844.

Luo T, Chen B, Wang X. 4-PBA prevents pressure overload-induced myocardial hypertrophy and interstitial fibrosis by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Chem Biol Interact.* 2015;242:99-106.

MacLean, MR, Alexander D, Stirrat A, *et al.*, Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol.* 2000;130:201-204.

Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, *et al.*, 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;135:825-832.

Marks AR. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest.* 2013;123:46-52.

McDonagh TA, Robb SD, Murdoch DR, *et al.*, Biochemical detection of left-ventricular systolic dysfunction. *Lancet.* 1998;351:9-13.

Mill JG, Gomes AP, Carrara AB, *et al.*, Influence of chronic captopril therapy on the mechanical performance of the infarcted rat heart. *Pharmacol Res.* 1994;29:77-88.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, *et al.*, A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998;93:215-228.

Nassour H, Iddir M, Chatenet D. Towards Targeting the Urotensinergic System: Overview and Challenges. *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40:725-734.

Oh KS, Lee JH, Y KY, *et al.*, The orally active urotensin receptor antagonist,

KR36676, attenuates cellular and cardiac hypertrophy. *Br J Pharmacol.* 2015;172:2618-2633.

Okura Y, Ramadan MM, Ohno Y, *et al.*, Impending epidemic: future projection of heart failure in Japan to the year 2055. *Circ J.* 2008;72:489-491.

Packer M, Bristow MR, Cohn JN, *et al.*, The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Eng J Med.* 1996;334:1349-1355.

Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, *et al.*, Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet.* 2000;355:1582-1587.

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, *et al.*, 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2016;18:891-975.

Portnoy A, Kumar S, Behm DJ, *et al.*, Effects of Urotensin II Receptor Antagonist, GSK1440115, in Asthma. *Front Pharmacol.* 2013;4:54.

Richards AM, Nicholls MG, Lainchbury JG, *et al.*, Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet.* 2002;360:545-546.

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, *et al.*, 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;88:8277-8281.

Russell FD, Meyers D, Galbraith AJ, *et al.*, Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ*

physiol. 2003;285:1576-1581.

Sabbah HN, Shimoyama H. Effects of long-term monotherapy with enalapril, metoprolol, and digoxin on the progression of left ventricular dysfunction and dilation in dogs with reduced ejection fraction. *Circulation*. 1994;89:2852-2859.

Shiba N, Shimokawa H. Chronic heart failure in Japan: implications of the CHART studies. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4:103-113

Sidharta PN, Rave K, Heinemann L, *et al.*, Effect of the urotensin-II receptor antagonist palosuran on secretion of and sensitivity to insulin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;68:502-510.

Suguro T, Watanabe T, Kodate S, *et al.*, Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2008;115:327-334.

Szymanska G, Strömer H, Kim DH, *et al.*, Dynamic changes in sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Pflugers Arch*. 2000;439:339-348.

Takimoto E, Champion HC, Ki M, *et al.*, Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2005;11:214-222.

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 Eng J Med*. 1987;316:1429-1435.

The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Eng J Med*. 1992;327:685-691.

The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left



ventricular ejection fractions and congestive heart failure. N Eng J Med. 1991;325:293-302.

Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, *et al.*, Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. Clin Sci (Lond). 2003;104:1-5.

Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, *et al.*, Role of urotensin II in patients on dialysis. Lancet. 2001;358:810-811.

Tsutamoto T, Wada K, Maeda T, Hisanaga, *et al.*, 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;96:509-516.

Vega RB, Bassel-Duby R, Olson EN. Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. J Biol Chem. 2003;278:36981-36984.

Vogt L, Chiurciu C, Chadha-Boreham H, *et al.*, Effect of the urotensin receptor antagonist palosuran in hypersensitive patients with type 2 diabetic nephropathy. Hypertension. 2010;55:1206-1209.

Wang Y, De Keulenaer GW, Weinberg EO, *et al.*, Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down Syndrome Critical Region-1 in cardiac myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;283:533-539.

Waring AA, Litwin SE. Redefining Reverse Remodeling: Can Echocardiography Refine Our Ability to Assess Response to Heart Failure Treatments?. J Am Coll Cardiol. 2016;68:1277-1280.

急性・慢性心不全診療ガイドライン（2017年改訂版）．急性・慢性心不全診療ガイドライン（2017年改訂版）作成班．

令和2年（2020）人口動態統計月報年系（概数）の概況．厚生労働省．

<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai20/index.html>.

2021 年 JCS/JHFS ガイドラインフォーカスアップデート版急性・慢性心不全  
診療. 急性・慢性心不全診療ガイドライン（2017 年改訂版）作成班.

甲斐久史. 慢性心不全の病態生理. 日内会誌 2012; 101:322-328.

西田基宏. 圧負荷により心臓が硬くなるメカニズムを解明（生理学研究所、  
プレスリリース、2016 年 12 月 19 日）

吉本貴宣、平田結喜緒. 細胞増殖作用. 日本臨床 2004; 62S9: 711-714.

## 謝辞

本論文を発表する機会を与えていただき、その作成に際してご指導、ご鞭撻を賜り、主査を引き受けてくださいました、北里大学薬学部 分子薬理学教室 中原 努 教授、副査を引き受けてくださいました北里大学薬学部 薬理学教室 田辺 光男 教授、生薬学教室 小林 義典 教授、臨床薬学研究・教育センター臨床薬学 尾鳥 勝也 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

学位論文の作成に先立ち、研究の機会を与えてくださいました第一三共株式会社 スペシャルティ第二研究所 奥山 亮 所長に厚く御礼申し上げます。

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第一三共株式会社 オンコロジー・メディカルサイエンス部 中神 康裕 博士に心より感謝申し上げます。

論文投稿に際し、ご指導、ご鞭撻いただきました第一三共株式会社 事業開発部 永山 貴弘 博士、プロジェクトマネジメント部 本間 剛 博士、スペシャルティ第一研究所 西澤 友宏 博士、加藤 幹雄 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、第一三共ヨーロッパ GmbH 田川 秀樹 氏、第一三共株式会社 スペシャルティ第一研究所 上野 真澄 氏、IT ソリューション部 米須 清明 博士、第一三共 RD ノバーレ株式会社 合成化学研究部 丸本 真志 博士に心よりお礼申し上げます。また、データの取得にご協力を賜りました、多くの第一三共株式会社の関係者の皆様にこの場をお借りし感謝申し上げます。

本論文作成にあたり多くの励ましを頂いた第一三共株式会社 スペシャルティ第二研究所 小林 英毅 博士、スペシャルティ第一研究所 土門 友紀 博士に感謝いたします。

最後に、本研究の遂行並びに本論文作成を終始励まし支えてくれた、家族に心より感謝します。