

博士論文

新規ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬

CS-3150の薬理作用の研究

新井 清志

目次

序論	1
第1章 新規 MR 拮抗薬 CS-3150 の基本薬理プロファイルの検証	6
第1節 CS-3150 の in vitro MR 及び MR 以外のステロイドホルモン受容体に対する作用	6
[目的]	6
[方法]	7
[結果]	12
第2節 CS-3150 の in vivo MR に対する作用とその持続性	22
[目的]	22
[方法]	23
[結果]	26
[考察]	32
第2章 Dahl 食塩感受性高血圧ラットの病態進展に対する CS-3150 の作用	34
[目的]	34
[方法]	35
[結果]	39
[考察]	50
第3章 DOCA/食塩負荷高血圧ラットに対する CS-3150 の薬理作用	55
第1節 DOCA/食塩負荷高血圧ラットの病態進展に対する抑制作用	55
[目的]	55
[方法]	56
[結果]	61
第2節 DOCA/食塩負荷高血圧ラットの病態に対する治療効果	69

[目的].....	69
[方法].....	70
[結果].....	73
[考察]	82
総括.....	87
参考文献.....	89
謝辞.....	100

序論

高血圧は、心血管疾患や慢性腎臓病、脳血管障害などの要因となる重要なリスク因子であり、全世界で 10 億人以上が罹患しているとされ、生活習慣病の 1 つとして現在も増加の一途を辿っている [1]。日本においても、高血圧症患者は約 4300 万人いるとされ、人口の高齢化に伴い、今後さらに増加することが予想されている [2]。これまでに、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB)、カルシウム拮抗薬、利尿薬、 β 遮断薬といった有効性・忍容性に優れた数多くの降圧薬が開発され、単剤あるいは併用療法の確立により、その薬剤貢献度・治療満足度共に一定の水準が保たれてきている [3]。また、これら 5 種類の主要降圧薬はいずれも心血管病抑制効果を有することが明らかとなっており [4]、特に ACE 阻害薬や ARB は心不全や慢性腎臓病を合併した高血圧症の第一選択薬とされ、優れた心・腎保護作用を併せ持つ降圧薬として高血圧症治療の中核を担っている。しかし一方で、これら降圧薬による治療を駆使しても、血圧が良好にコントロールできている患者の割合は全体の半数程度にとどまっているのが現状である [5]。特に、異なるクラスの降圧薬 3 剤を適切な用量用いても血圧が目標コントロール値に達していない治療抵抗性高血圧患者が全体の 10-20% 存在するとされ、その患者数はこの 20 年で約 60% も増加しており、今後も増加が見込まれている [6, 7]。またこれらの患者では、血圧が目標コントロール値に適切に管理されている高血圧症患者に比べて、心血管イベントや慢性腎不全のリスクが高いことが報告されている [8]。このように、降圧治療の最終目標が心血管疾患や腎疾患の発症予防・進展抑制であるという観点からも、優れた降圧作用はもちろんのこと、より強力な臓器保護作用を発揮する新しい薬剤の開発が望まれている。

アルドステロンは、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の最下流に位置する、副腎で産生・分泌されるステロイドホルモンである。これまで、主に腎尿細管上皮のミネラルコルチコイド受容体 (Mineralocorticoid receptor; MR) に作用して Na^+ 再吸収及び K^+ 排泄を引き起こし、生体内の電解質バランス・体液量調節を介して血圧上昇を引き起

こす古典的な作用が知られていた [9]。しかし近年、腎臓の非上皮系組織 (メサンギウム細胞 [10] やポドサイト [11]) や心臓 [12]、血管 [13] などにも MR が発現し、この MR の活性化が炎症 [14] や線維化 [15]、酸化ストレス [16] を直接惹起することで、心血管及び腎疾患の病態形成に重要な役割を担っていることが明らかとなり、アルドステロン /MR シグナルが心血管リスク因子の 1 つとして考えられるようになった (Figure. 1)。実際、アルドステロンの過剰産生を特徴とする原発性アルドステロン症患者では、年齢及び性別の一致した通常の本態性高血圧症の患者と比べ、心血管イベントの発症率が高いことが報告されている [17, 18]。さらに、後述する既存 MR 拮抗薬 (スピロノラクトン及びエプレレノン) を用いた大規模臨床試験や多数の臨床研究により、MR 活性化を抑制することが、高血圧症 [19, 20] のみならず、心不全 [21, 22, 23] や腎疾患 [24, 25, 26] の治療に有効であることが明らかとなっている。例えば高血圧症においては、前述した治療抵抗性高血圧症の重要なサブタイプの 1 つとして、近年「MR 関連高血圧症」が提唱されている [27]。これは、「血中アルドステロン濃度に関係なく、血圧コントロール及び臓器障害の治療に MR 拮抗薬が有効な高血圧症」のことを指し、アルドステロン依存的/非依存的な MR の病的な活性化が病態に関与していると考えられていて、治療抵抗性高血圧患者への MR 拮抗薬の処方が治療ガイドラインにおいても推奨されている [28]。また、心不全特に収縮性心不全においては、RALES [21] や EPHEBUS [22]、EMPHASIS-HF [23] といった大規模臨床試験の結果から、標準治療への MR 拮抗薬の追加投与により予後が大幅に改善されることが証明されており、最近では拡張性心不全に対しても有効性を示唆する知見 [29] が得られている。さらに腎疾患においては、ACE 阻害薬や ARB が処方されている糖尿病患者や慢性腎不全患者に少量の MR 拮抗薬を上乗せすることで、血圧には影響を与えずに、腎障害のバイオマーカーであるアルブミン尿/タンパク尿が著明に減少することが複数の臨床研究 [24, 25, 26] によって明らかになっており、MR 拮抗薬の腎保護薬としての優れた特性にも注目が集まっている。

しかし、このように MR 阻害の有用性が明確となっている一方で、既存 MR 拮抗薬は、高頻度で特有の副作用の発現や薬効強度、使用に際しての制限など複数の問題点を抱え

ている。MR 拮抗薬として最初に開発されたスピロラクトンは、ステロイド骨格を有し、その MR への選択性の低さから他ステロイドホルモン受容体 (アンドロゲンやプロゲステロン) に作用して、男性では女性化乳房、女性では生理不順といった性ホルモン関連の副作用が頻発することが問題となっている [30, 31]。続いて開発されたエプレレノンもステロイド骨格を有しており、スピロラクトンの MR 選択性の問題点は改善されたものの、MR 拮抗活性の弱さや PK プロファイル (血中半減期が短い) に起因して、スピロラクトンよりも薬効が弱いことが報告されている [32, 33]。また、両者に共通の副作用として、メカニズムベースで生じる高カリウム血症 (MR が阻害されることで尿中へのカリウム排泄が抑制されるために生じる) が挙げられる [34]。エプレレノンは、微量アルブミン尿を呈する糖尿病患者や中等度以上の腎機能低下患者を対象とした米国での開発治験において、この高カリウム血症が高頻度に認められたことから、これらの患者に対して投与禁忌となっている [35]。このように既存 MR 拮抗薬は、有効性・安全性の両面で改善の余地が残された薬剤といえる。

こうした現状を踏まえ、我々は、既存 MR 拮抗薬よりも有効性に優れ且つ安全性の懸念の少ない新しい MR 拮抗薬を開発することができれば、治療抵抗性高血圧や心・腎疾患の新たな治療選択肢の 1 つとして、より幅広い患者層のアンメットニーズに応えることができるのではないかと考えた。そして、以下①～③の仮説に基づいて化合物の探索研究に着手し、その後 Exelixis 社との共同研究により、新規化合物 XL550 の獲得に成功した [36]。XL-550 は非ステロイド骨格のピロール誘導体で、弊社の合成化学担当者の尽力によってラセミ体であることが判明し、光学分割によって最終的に CS-3150 を獲得するに至った [37]。

①MR 拮抗活性をさらに向上させた化合物であれば、より強力な降圧・臓器保護効果を発揮することができるのではないかと？

②従来の「ステロイド骨格」からの脱却や、MR 選択性をさらに高めることによって、副作用のリスクを減らすことができるのではないかと？

③高カリウム血症は、MR 拮抗薬のメカニズムベースつまり薬効の延長線上に生じるも

のであるから、有効性とのバランスが重要である。エプレレノンの開発治験において高カリウム血症が頻発したことの理由として、その用量設定の問題があったとされている [35]。PK プロファイルが良好で用量反応性に優れた化合物であれば、高カリウム血症を頻発せずに降圧・臓器保護効果を発揮する用量設定が可能になるのではないかと？

本研究ではまず、CS-3150 の MR 拮抗薬としての基本的な薬理プロファイルについて明らかにした後、前述した MR 関連高血圧症の病態モデル動物を用いて、①既存 MR 拮抗薬との比較という観点からの検討、及び②CS-3150 自体の薬理作用特に腎保護作用に着目した検討を実施した。これらの検討結果について、順に論じる。

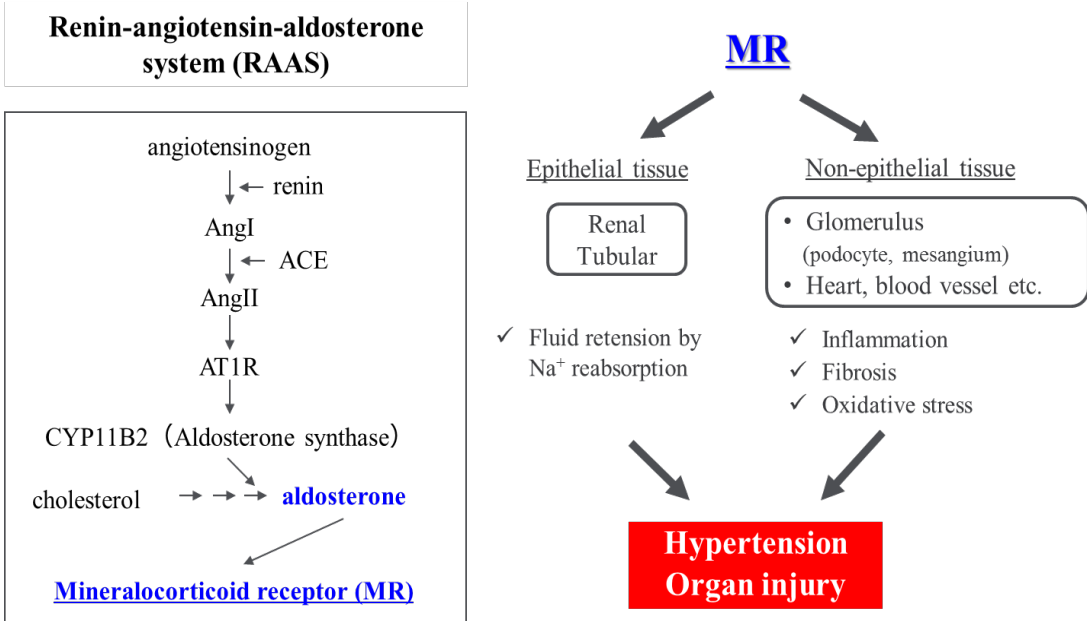


Figure 1. Mechanism of action of mineralocorticoid receptor (MR).

第 1 章 新規 MR 拮抗薬 CS-3150 の基本薬理プロファイルの 検証

第 1 節 CS-3150 の in vitro MR 及び MR 以外のステロイドホルモン受 容体に対する作用

[目的]

序論でも述べたように、我々は、既存 MR 拮抗薬のスピロノラクトン及びエプレレノンよりも MR 拮抗活性及び MR 選択性に優れた新規 MR 拮抗薬の取得を目指して探索研究を行い、非ステロイド骨格を有する CS-3150 の取得に至った。本節ではまず、CS-3150 の MR 拮抗薬としての基本プロファイルを明らかにするため、in vitro にて、CS-3150 の MR に対する作用 (MR に対する結合親和性及び拮抗様式、MR 拮抗活性、MR 選択性) を評価し、スピロノラクトン及びエプレレノンと比較検証した。

[方法]

化合物

CS-3150 は、第一三共株式会社で合成されたものを入手して使用した。スピロノラク톤は、Shanghai FWD Chemicals Ltd.から購入して使用した。エプレレノンは、セララ錠 (Pfizer Co., Ltd.) から精製したものを使用した。それぞれの化合物の構造式を Figure 2 に示す。

MR に対する結合親和性の評価

化合物の MR に対する結合親和性を、バインディングアッセイにて評価した。

7 週齢の雄性 Sprague Dawley (SD) ラット (日本エスエルシー株式会社) から腎臓を摘出し、ホモジネート緩衝液 (0.5 mmol/L DTT、1 mmol/L sodium molybdate 及び 1 mmol/L EGTA を含む 50 mmol/L Tris-HCl [pH 7.4]) を加えて氷冷下でホモジネートした。遠心分離 (4°C、120,000×g、1 時間) 後、上清を採取し、レセプター調製液とした。

続いて、バインディングアッセイを以下の手順で実施した。化合物、レセプター調製液及び³H-アルドステロン (Perkin-Elmer Inc.、終濃度：4.9 nmol/L) を混合し、インキュベート (4°C、18 時間) した。この際、アルドステロンがグルココルチコイド受容体 (Glucocorticoid receptor; GR) に結合するのを防ぐ目的で、GR アンタゴニストの RU-486 (Sigma-Aldrich、終濃度：450 nmol/L) も同時に添加した。次に、反応液にデキストランチャコール溶液を加え、インキュベート (4°C、30 分) した後、遠心分離 (4°C、1,600×g、15 分) した。得られた上清中の放射活性を液体シンチレーションカウンター (PICO-FLUORTM PLUS、Perkin-Elmer Inc.) で測定した。化合物非存在下での総結合放射活性から非特異的結合放射活性 (非標識アルドステロン [Sigma-Aldrich、10 µmol/L] を添加した群) を差し引くことで、³H-アルドステロンの特異的結合放射活性を算出した。化合物の各濃度において、³H-アルドステロンの結合に対する阻害率を算出し、Sigmoid-Emax 非線形回帰モデルを用いた解析により、各化合物の IC₅₀ 値を求めた。IC₅₀ 値は、3 回の実験結果の平均値で示した。データ処理には、EXSUS Ver.7.7 (株式会社 CAC

エクシケア) 及び Microsoft® Office Excel 2003 を使用した。

MR に対する拮抗様式の評価

化合物の MR に対する拮抗様式を、バインディングアッセイ及び Scatchard 解析により評価した。

前述の「MR に対する結合親和性の評価」の実験手順に従ってバインディングアッセイを行い、各濃度の化合物共存下／非共存下における、MR に対する ^3H -アルドステロンの結合の Scatchard 解析を実施した。Scatchard 解析は、放射活性を ^3H -アルドステロン濃度に換算 (B: 結合放射活性に相当する結合濃度、F: 遊離放射活性に相当する遊離濃度) し、縦軸に B/F、横軸に B をプロットしたのち直線回帰した。

MR 以外のステロイドホルモン受容体に対する結合親和性の評価

化合物の GR、アンドロゲン受容体 (Androgen receptor; AR) 及びプロゲステロン受容体 (Progesterone receptor; PR) に対する結合親和性を、バインディングアッセイにて評価した。

7 週齢の雄性 SD ラット (日本エスエルシー株式会社) から肝臓を摘出し、ホモジネート緩衝液 (0.5 mmol/L DTT、1 mmol/L sodium molybdate 及び 1 mmol/L EGTA を含む 50 mmol/L Tris-HCl [pH 7.4]) を加えて氷冷下でホモジネートした。遠心分離 (4°C、120,000×g、1 時間) 後、上清を採取し、GR のレセプター調製液とした。同様にラットから摘出した前立腺を、TEDG バッファー (1 mmol/L Tris、150 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L DTT、1% glycerol、100 mmol/L sodium molybdate 及び 0.1 mmol/L PMSF) でホモジネートし、遠心分離 (4°C、30,000×g、1 時間) 後、上清を採取し、AR のレセプター調製液とした。また、フナコシ株式会社から購入したウサギ子宮を、TEDG バッファーでホモジネートし、遠心分離 (4°C、30,000×g、1 時間) 後、上清を採取し、PR のレセプター調製液とした。

バインディングアッセイは、前述の「MR に対する結合親和性の評価」の実験手順から、

用いた標識/非標識リガンドを下表の通り改変して実施した。また、いずれの実験でも RU-486 は添加しなかった。

評価内容	標識リガンド	非標識リガンド
GR に対する結合親和性	³ H-デキサメタゾン (終濃度：0.5 nmol/L)	デキサメタゾン (Sigma-Aldrich)
AR に対する結合親和性	³ H-メチルトリエノロン (終濃度：0.5 nmol/L)	テストステロン (Sigma-Aldrich)
PR に対する結合親和性	³ H-プロゲステロン (終濃度：1.5 nmol/L)	プロゲステロン (Sigma-Aldrich)

化合物の各濃度において、各標識リガンドの結合に対する阻害率を算出し、Sigmoid-Emax 非線形回帰モデルを用いた解析により、各化合物の IC₅₀ 値を求めた。IC₅₀ 値は、3 回の実験結果の平均値で示した。データ処理には、EXSUS Ver.7.7 (株式会社 CAC エクシケア) 及び Microsoft® Office Excel 2003 を使用した。

MR に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用の評価

MR の転写活性に対する化合物の作用を、レポーターアッセイにて評価した。

まず、10%FBS を含む DMEM 培地 (Invitrogen) に懸濁した 293A 細胞 (Invitrogen) を、 4.5×10^6 cells/dish となるように 100 mm dish に播種し、37°C・5%CO₂ 条件下で約 24 時間培養した。翌日、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、ヒト及びラット MR 発現プラスミド (第一三共株式会社で作製) とレポータープラスミド (3×GRE-Luc2P、Promega) を細胞に導入した。4-6 時間後、遺伝子導入した 293A 細胞を 10% charcoal-stripped FBS を含む DMEM 培地に懸濁し、 1.0×10^4 cells/well となるように 96 well plate に播種して、約 24 時間培養した。翌日、培養上清を吸引除去し、アゴニスト作用の評価には化合物だけを含む試験液を、アンタゴニスト作用の評価にはアルドステロン (和光純薬工業株式会社、終濃度：1 nmol/L) と化合物を含む試験液をそれぞれ添加し、約 24 時間培養した。

培養終了後、One-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて、マルチモードアッセイシステム (AnalystGT、Molecular Devices Inc.) にて、各 well のルシフェラーゼ活性を測定した。

化合物及びアルドステロン未添加群のルシフェラーゼ活性を 0%、アルドステロンのみ添加群のルシフェラーゼ活性を 100%とし、各群の相対ルシフェラーゼ活性を算出して、Sigmoid-Emax 非線形回帰モデルを用いた解析により、各化合物の IC₅₀ 値を求めた。データ処理には、SAS System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) を使用した。

MR 以外のステロイドホルモン受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用の評価

GR、AR 及び PR の転写活性に対する化合物の作用を、レポーターアッセイにて評価した。

前述の「MR に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用の評価」の実験手順から、用いた発現プラスミド (いずれも第一三共株式会社で作製) 及びリガンドを下表の通り変更して実施した。

評価内容	発現プラスミド	リガンド (いずれも終濃度：1 nmol/L)
GR の転写活性に対する作用	ヒト GR	デキサメタゾン (Calbiochem)
AR の転写活性に対する作用	ヒト AR	スタノロン (東京化成工業株式会社)
PR の転写活性に対する作用	ヒト PR	プロゲステロン (東京化成工業株式会社)

それぞれの受容体に対し、化合物及びリガンド未添加群のルシフェラーゼ活性を 0%、リガンドのみ添加群のルシフェラーゼ活性を 100%とし、各群の相対ルシフェラーゼ活性を算出して、Sigmoid-Emax 非線形回帰モデルを用いた解析により、各化合物の IC₅₀

値を求めた。データ処理には、SAS System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) を使用した。

[結果]

MR に対する結合親和性の評価

CS-3150 は、ラット腎臓由来 MR への ^3H -アルドステロンの結合を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 9.4 nmol/L であった (Figure 3、Table 1)。また、スピロノラクトン及びエプレレノンも同様の阻害作用を示し、その IC_{50} 値は 36 及び 713 nmol/L であった。この結果から、CS-3150 の MR に対する結合親和性は、スピロノラクトン及びエプレレノンに比べ、それぞれ約 4 及び 76 倍高いことが明らかとなった。

MR に対する阻害様式の評価

MR に対する拮抗様式を Scatchard プロットにより解析した結果を Figure 4 に示す。CS-3150 の MR に対する拮抗様式は、スピロノラクトン及びエプレレノンと同様に競合的であった。

MR 以外のステロイドホルモン受容体に対する結合親和性の評価

CS-3150 は 10 $\mu\text{mol/L}$ (MR に対する IC_{50} 値の約 1000 倍) の条件下においても、GR、AR 及び PR への各標識リガンドの結合をほとんど阻害しなかった (Figure 5、Table 1)。一方スピロノラクトンは、GR、AR 及び PR への各標識リガンドの結合を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 764、133 及び 1200 nmol/L であった。またエプレレノンは、GR への ^3H -デキサメタゾンの結合を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 3060 nmol/L であった。これらの結果から、CS-3150 は MR に対して、他ステロイドホルモン受容体と比較して 1000 倍以上の高い親和性を示し、その MR 選択性はスピロノラクトン及びエプレレノンに比べて高いことが明らかとなった。

MR に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用の評価

CS-3150 は、アルドステロン刺激によるヒト MR の転写活性を濃度依存的に抑制し、その IC_{50} 値は 3.7 nmol/L であった (Figure 6A、Table 2)。スピロノラクトン及びエプレレノ

ンも同様の抑制作用を示し、その IC₅₀ 値は 66 及び 970 nmol/L であった。この結果から、CS-3150 のヒト MR に対するアンタゴニスト活性は、スピロノラクトン及びエプレレノンに比べ、それぞれ約 18 及び 260 倍強いことが明らかとなった。また、いずれの化合物も、ラット MR の転写活性に対して濃度依存的な抑制作用を示し、その IC₅₀ 値は 4.9、23 及び 300 nmol/L であった (Figure 6C、Table 2)。一方、CS-3150 はヒト及びラット MR いずれに対してもアゴニスト作用は示さなかったのに対し、スピロノラクトン及びエプレレノンは弱いながらも両受容体へのアゴニスト作用を示した (Figure 6B、6D)。

MR 以外のステロイドホルモン受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用の評価

CS-3150 は 5 µmol/L (MR に対する IC₅₀ 値の約 1400 倍) の条件下においても、各リガンド刺激によるヒト GR、AR 及び PR の転写活性を抑制せず、またいずれの受容体へもアゴニスト作用を示さなかった (Figure 7、Table 2)。これらの結果から、CS-3150 は MR に対し、他ステロイドホルモン受容体と比較して少なくとも 1400 倍以上の高い選択性を有していることが明らかとなった。一方スピロノラクトンは、各リガンド刺激によるヒト GR、AR 及び PR の転写活性を濃度依存的に抑制し、その IC₅₀ 値は 2600、640 及び 180 nmol/L で (Figure 7A、7C、7E、Table 2)、ヒト AR 及び PR に対してはアゴニスト作用も示した (Figure 7D、7F)。また、エプレレノンも各リガンド刺激によるヒト GR、AR 及び PR の転写活性を濃度依存的に抑制し、その IC₅₀ 値は 36000、42000 及び 7400 nmol/L であったが (Figure 7A、7C、7E、Table 2)、いずれの受容体へもアゴニスト作用は示さなかった。

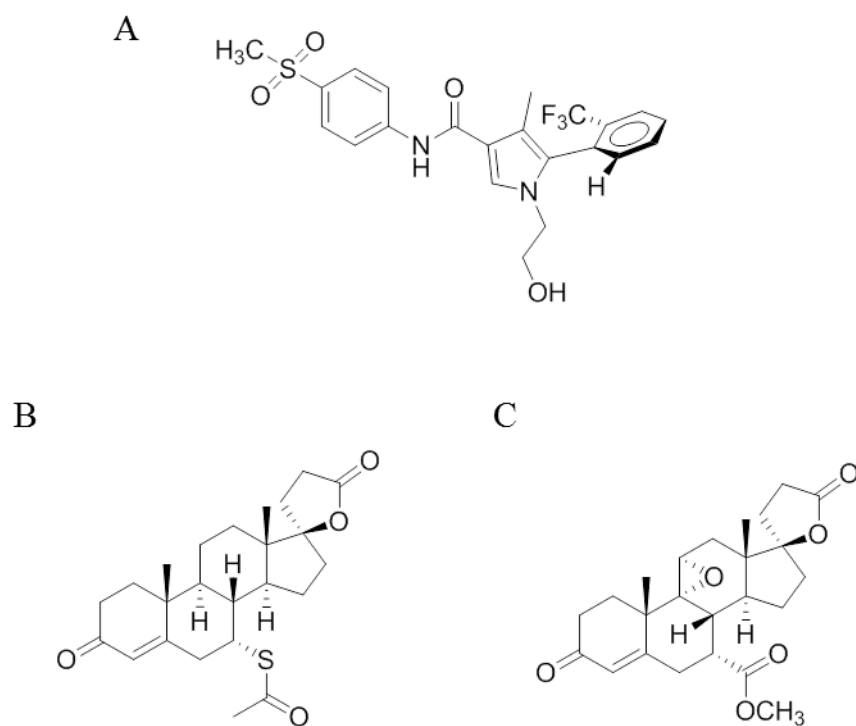


Figure 2. Chemical structures of test compounds. (A) CS-3150 ((S)-1-(2-Hydroxyethyl)-4-methyl-N-[4-(methylsulfonyl) phenyl]-5-[2-(trifluoromethyl) phenyl]-1H-pyrrole-3-carboxamide) (B) spironolactone (C) eplerenone.

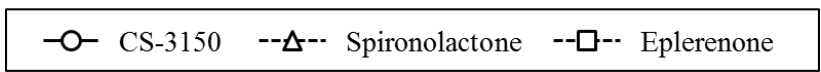
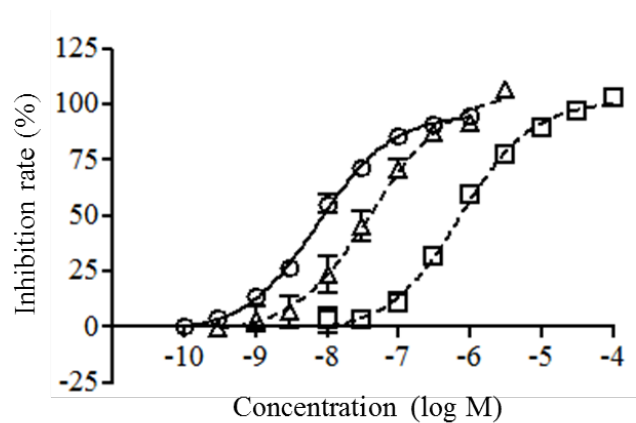


Figure 3. Effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on ^3H -aldosterone binding to rat mineralocorticoid receptor (MR). Receptor solution for MR from rat kidneys was incubated for 18 h with serial dilutions of test compounds in the presence of ^3H -aldosterone (4.9 nmol/L). The specific bound radioactivity was measured and the inhibition rate of test compound against ^3H -aldosterone binding to MR was calculated. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. The curve is a sigmoid curve generated by fitting data to the sigmoid E_{max} model.

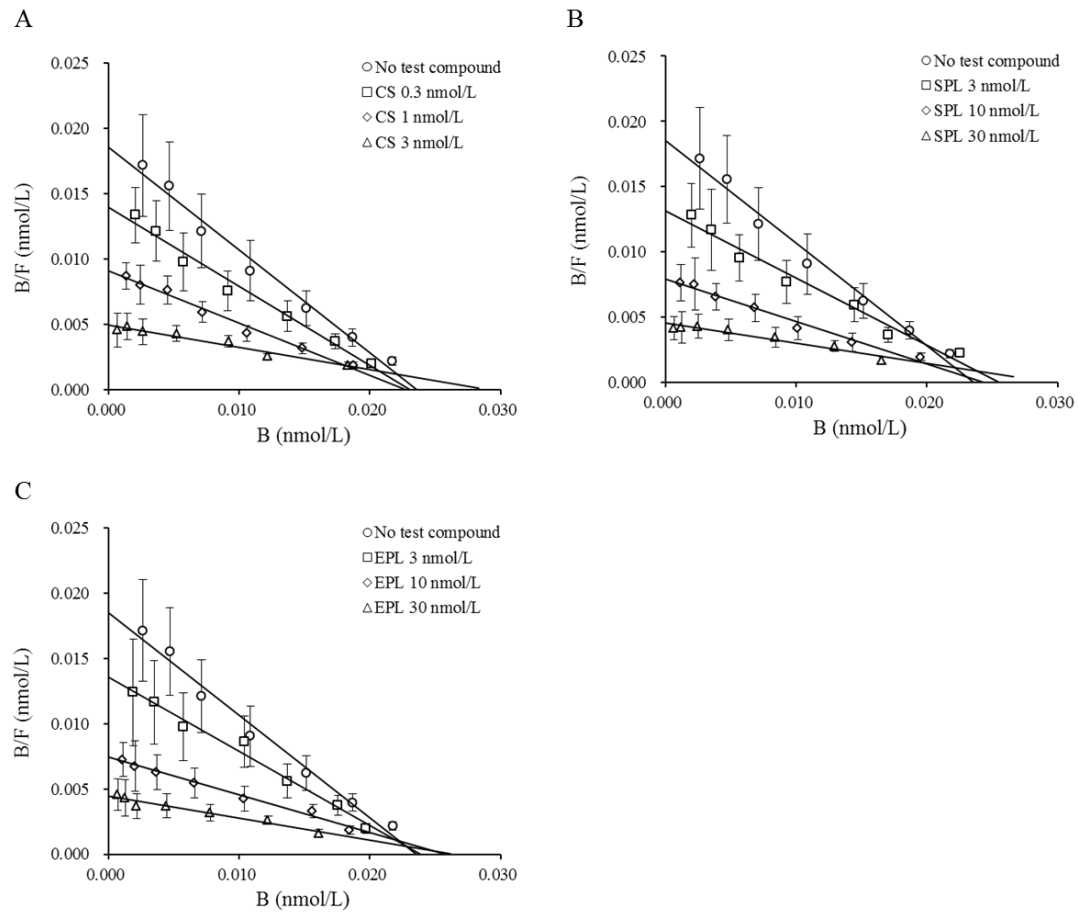


Figure 4. Scatchard analysis of antagonistic effects of CS-3150 (A), spironolactone (B) and eplerenone (C) on ^3H -aldosterone binding to rat mineralocorticoid receptor (MR). Receptor solution for MR from rat kidneys was incubated for 18 h with serial dilutions of ^3H -aldosterone in the presence or absence of test compounds. CS: CS-3150. SPL: spironolactone. EPL: eplerenone. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments.

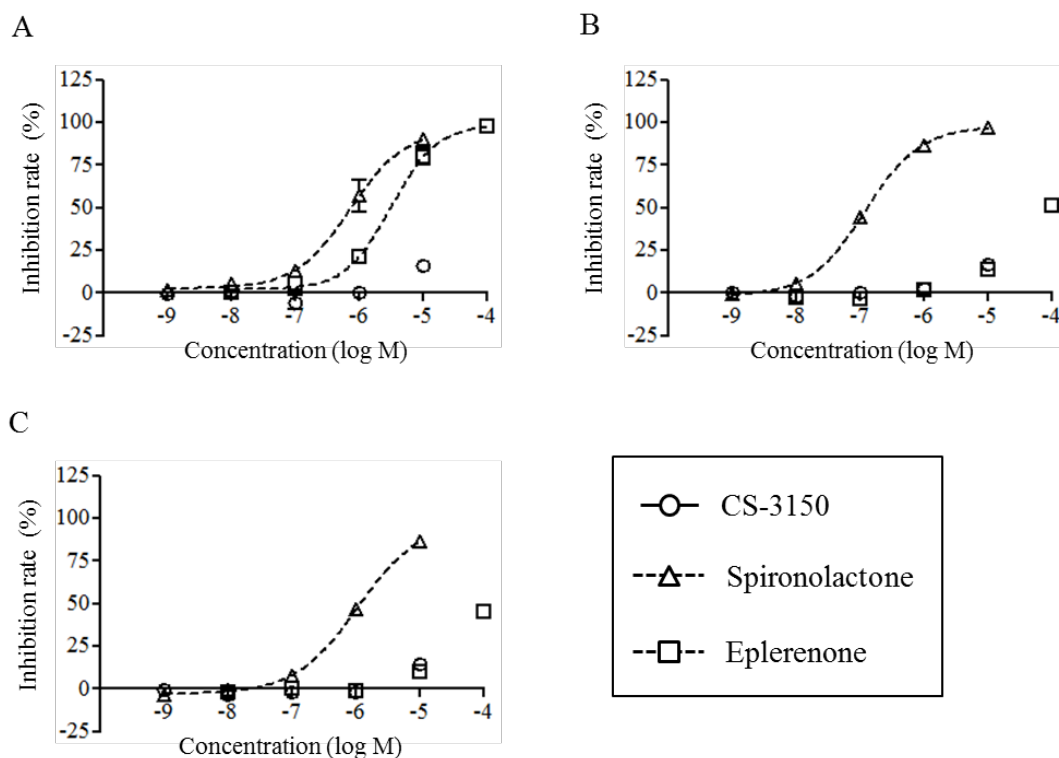


Figure 5. Effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on radioligand binding to glucocorticoid receptor (GR), androgen receptor (AR) and progesterone receptor (PR). Receptor solution for GR from rat livers (A), AR from rat prostate gland (B) or PR from rabbit uterus (C) was incubated for 18 h with serial dilutions of test compounds in the presence of ³H-dexamethasone (0.5 nmol/L), ³H-methyltrienolone (0.5 nmol/L) or ³H-progesterone (1.5 nmol/L), respectively. The specific bound radioactivity was measured and the inhibition rate of test compounds against radioligand binding to receptor was calculated. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments. The curve is a sigmoid curve generated by fitting data to the sigmoid E_{max} model. For poorly-fitting cases, however, a sigmoid curve is not indicated.

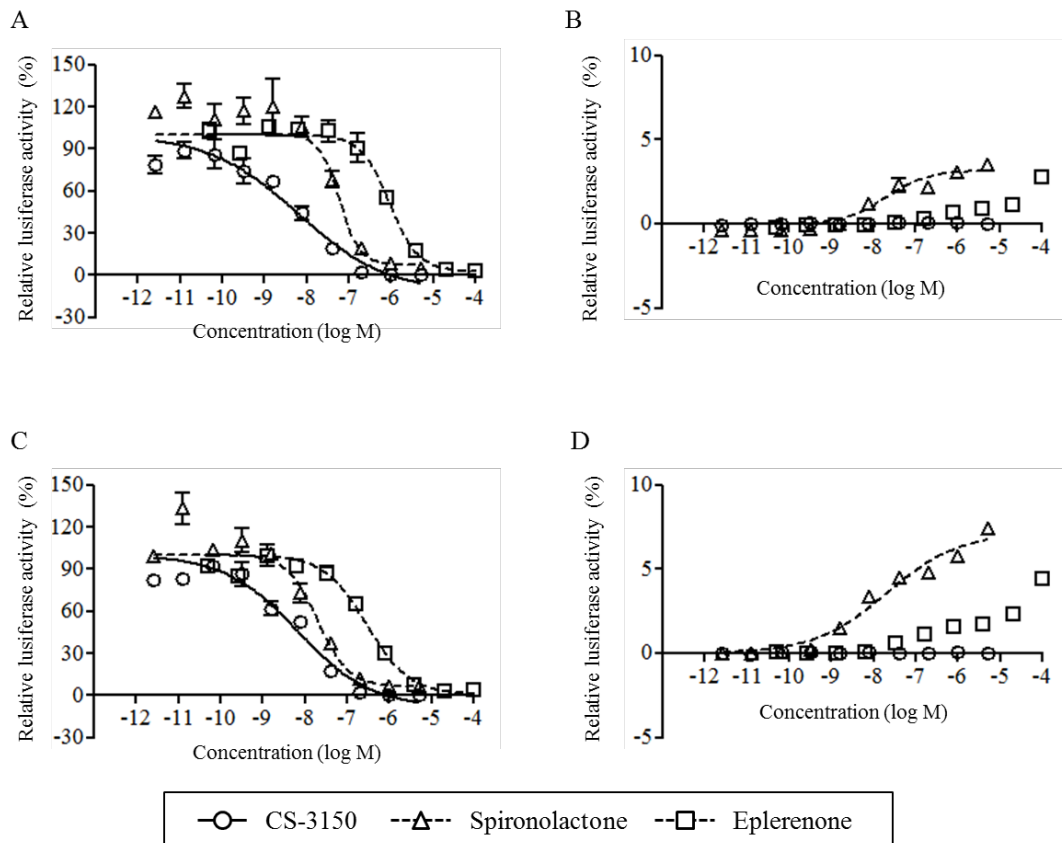


Figure 6. Effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on the transcriptional activity of human and rat mineralocorticoid receptors (MRs). 293A cells, transiently co-transfected with the expression vector of human MR (A, B) or rat MR (C, D) and the reporter plasmid, 3×GRE-Luc2P, were incubated for approximately 24 h with serial dilutions of test compounds in the presence (A, C) or absence (B, D) of 1 nmol/L aldosterone. The luciferase activity was measured and the relative luciferase activity (%) was calculated. Data are expressed as mean ± S.E.M (N = 5). The curve is a sigmoid curve generated by fitting data to the sigmoid E_{\max} model. For poorly-fitting cases, however, a sigmoid curve is not indicated.

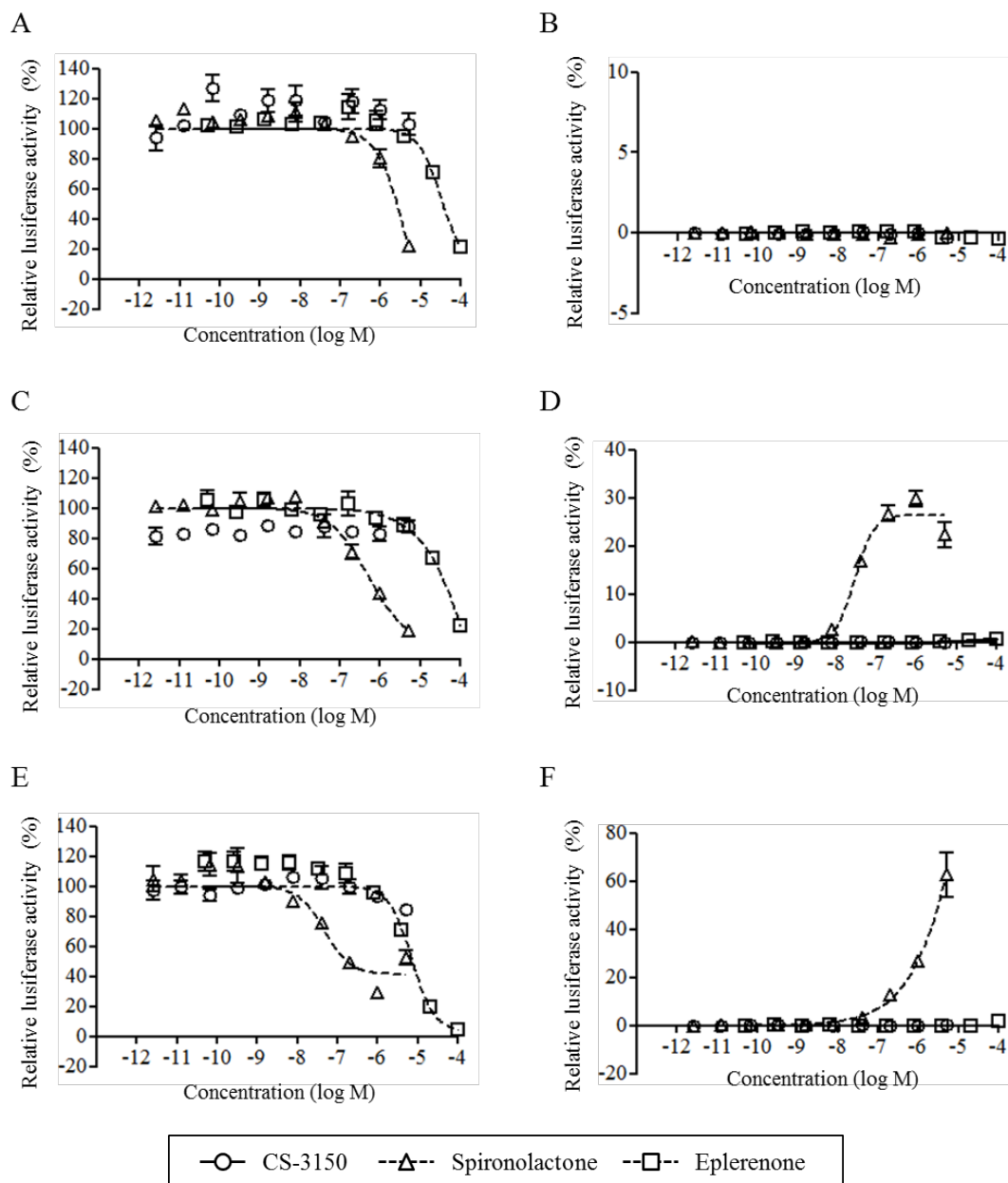


Figure 7. Effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on the transcriptional activity of human glucocorticoid receptor (GR), androgen receptor (AR) and progesterone receptor (PR). 293A cells, transiently co-transfected with the expression vector of human GR (A, B), AR (C, D) or PR (E, F) and the reporter plasmid, 3×GRE-Luc2P, were incubated for approximately 24 h with serial dilutions of test compounds in the presence (A, C, E) or absence (B, D, F) of 1 nmol/L dexamethasone, stanolone or progesterone, respectively. The luciferase activity was measured and the relative luciferase activity (%) was calculated. Data are expressed as mean ± S.E.M (N = 5). The curve is a sigmoid curve generated by fitting data to the sigmoid E_{max} model. For poorly-fitting cases, however, a sigmoid curve is not indicated.

Table 1. Effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on radioligand binding to mineralocorticoid and other steroid hormone receptors.

Test compound	IC ₅₀ (nM)			
	MR	GR	AR	PR
CS-3150	9.4	>10000	>10000	>10000
Spironolactone	36	764	133	1200
Eplerenone	713	3060	>100000	>100000

MR: mineralocorticoid receptor. GR: glucocorticoid receptor.

AR: androgen receptor. PR: progesterone receptor.

Table 2. Antagonist effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on the transcriptional activity of mineralocorticoid and other steroid hormone receptors.

Test compound	Range of concentration used in this experiment	IC ₅₀ (nM)				
		hMR	rMR	hGR	hAR	hPR
CS-3150	2.56 pM to 5 μM	3.7	4.9	>5000	>5000	>5000
Spironolactone	2.56 pM to 5 μM	66	23	2600	640	180
Eplerenone	51.2 pM to 100 μM	970	300	36000	42000	7400

hMR: human mineralocorticoid receptor. rMR: rat mineralocorticoid receptor. hGR: human glucocorticoid receptor.

hAR: human androgen receptor. hPR: human progesterone receptor.

第 1 章 新規 MR 拮抗薬 CS-3150 の基本薬理プロファイルの 検証

第 2 節 CS-3150 の in vivo MR に対する作用とその持続性

[目的]

第 1 節では、CS-3150 がスピロラクトン及びエプレレノンに比べ、MR に対する高い結合親和性、強力な MR 拮抗活性及び優れた MR 選択性を有することが明らかとなった。次に、CS-3150 の in vivo での MR 拮抗作用を評価し、スピロラクトン及びエプレレノンと比較することとした。尿中 Na^+/K^+ 比は、in vivo での尿細管における MR 活性化の指標として有用であることが知られている [38]。本節では、CS-3150 の in vivo での作用を評価する前にまず、正常ラットを用いて、CS-3150 の単回経口投与 PK 試験を実施した。続いて、両副腎を摘出して内因性のアルドステロンの影響を除いたラットを使用し、化合物を単回経口投与した際の、アルドステロン投与による尿中 Na^+/K^+ 比の変動に対する作用を評価した。

[方法]

化合物

化合物の入手は、第1節に記載の方法に準じた。後述する「ラットにおける単回経口投与 PK 試験」では、N,N-ジメチルアセトアミド (和光純薬工業株式会社)、Tween 80 (Sigma-Aldrich) 及び生理食塩水を 1:1:8 となるように調製した溶液に溶かし、2 mL/kg の用量でラットに経口投与した。「ラットにおける in vivo MR 拮抗作用の評価」及び「ラットにおける in vivo MR 拮抗作用の持続性評価」においては、0.5%メチルセルロース (MC、和光純薬工業株式会社) に懸濁し、4 mL/kg の用量でラットに経口投与した。

ラットにおける単回経口投与 PK 試験

7 週齢の雄性 SD ラットを日本チャールスリバー株式会社から購入して使用した。動物は、設定温度 22°C (許容範囲：19~25°C)、湿度 50% (許容範囲：30~70%)、12 時間明暗サイクル (明期：7~19 時) の環境下で、標準食 (CE-2、日本クレア株式会社) 及び水道水を自由に摂取させた。全ての実験操作は、株式会社新日本科学動物実験委員会のガイドラインに従って適切に実施した。

8 週齢の雄性 SD ラットに、絶食下で CS-3150 (0.3、1、3 mg/kg) を単回経口投与し、投与 0.25、0.5、1、2、4、6、8、24 及び 48 時間後に採血を行った。LC/MS/MS (Shimadzu 10A、株式会社島津製作所) により、CS-3150 の血漿中濃度を測定し、PK パラメータを算出した。

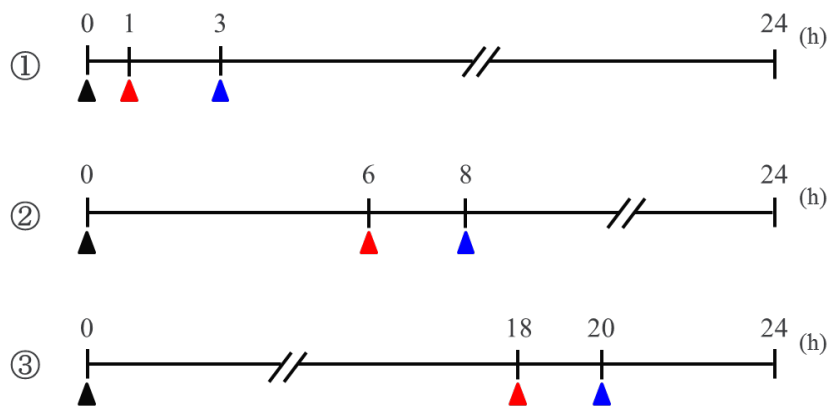
ラットにおける in vivo MR 拮抗作用の評価

4 週齢の雄性 SD ラットを日本エスエルシー株式会社から購入して使用した。動物は、設定温度 23°C (許容範囲：20~26°C)、湿度 55% (許容範囲：30~70%)、12 時間明暗サイクル (明期：7~19 時) の環境下で、標準食 (FR-2、株式会社フナバシファーム) 及び水道水を自由に摂取させた。全ての実験操作は、第一三共株式会社動物実験委員会のガイドラインに従って適切に実施した。

5 週齢の雄性 SD ラットの両副腎を摘出し、3 日間、標準食 (FR-2) 及び 1%NaCl 水を自由に摂取させた。実験当日、前日から絶食させたラットに溶媒 (0.5%MC)、CS-3150 (0.3、1、3 mg/kg)、スピロノラクトン (3、10、30 mg/kg) あるいはエプレレノン (3、10、30 mg/kg) を経口投与した。化合物投与 1 時間後、アルドステロン (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を皮下投与した。アルドステロン非投与群 (control 群) には、アルドステロンの代わりに生理食塩水を投与した。化合物投与 2 時間後、全ての群に生理食塩水 (3 mL/body) を皮下投与した。化合物投与 5 時間後、各個体のスポット尿を回収し、電解質分析装置 (STAX-2、株式会社テクノメディカ) を用いて尿中 Na^+ 及び K^+ 濃度を測定し、尿中 Na^+/K^+ 比を算出した。

ラットにおける *in vivo* MR 拮抗作用の持続性の評価

前述の「ラットにおける *in vivo* MR 拮抗作用の評価」の実験手順に従い、両副腎摘出ラットを準備し、独立した 3 つの実験を実施した。各実験の概要図を以下に示す。



▲: 化合物投与 ▲: アルドステロン & 生理食塩水投与 ▲: スポット尿採取

各実験において、ラットに溶媒 (0.5%MC)、CS-3150 (3 mg/kg)、スピロノラクトン (30 mg/kg) あるいはエプレレノン (30 mg/kg) を経口投与し、アルドステロン及び生理食塩水の投与を化合物投与 1、6、8 時間後に、スポット尿の回収を化合物投与 3、8、20 時間後に、それぞれ実施した。回収した尿中の Na^+ 及び K^+ 濃度を測定し、尿中 Na^+/K^+ 比を算

出した。また、アルドステロンの作用に対する化合物の抑制率を、以下の計算式に従い算出した。

計算式	計算に用いた値
$(C-B) / (A-B) \times 100$	A: control 群の尿中 Na ⁺ /K ⁺ 比の平均値 B: vehicle 群の尿中 Na ⁺ /K ⁺ 比の平均値 C: 化合物投与群の各個体の尿中 Na ⁺ /K ⁺ 比

統計解析

データは平均値±標準誤差で表示した。二群間の比較には Student's *t*-test もしくは Aspin-Welch's *t*-test を、多重比較には Dunnett's test を使用した。有意水準は 0.05 未満とした。解析には、SAS System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) を使用した。

[結果]

ラットにおける単回経口投与 PK 試験

ラットへの単回経口投与後の血漿中 CS-3150 濃度の推移を Figure 8 に、PK パラメータを Table 3 にそれぞれ示す。0.3、1 及び 3 mg/kg の CS-3150 を投与した際の t_{\max} は 2.0~4.5 時間、 $t_{1/2}$ は 6.5~6.9 時間で、 C_{\max} 及び $AUC_{0-\infty}$ は投与量に応じて増加していた。

ラットにおける in vivo MR 拮抗作用の評価

両副腎摘出ラットにおいて、vehicle 群では control 群と比較して、アルドステロン投与による尿中 Na^+/K^+ 比の有意な低下が認められた (Figure 9)。CS-3150 (0.3、1 及び 3 mg/kg) は 0.3 mg/kg から、用量依存的且つ有意に、アルドステロン投与による尿中 Na^+/K^+ 比の低下を抑制した (Figure 9A)。また、スピロノラクトン (3、10 及び 30 mg/kg) 及びエプレレノン (3、10 及び 30 mg/kg) はいずれも 3 mg/kg から、CS-3150 と同様の抑制作用を示した (Figure 9B、9C)。これらの結果から、CS-3150 は in vivo においても MR 拮抗作用を示し、その作用はスピロノラクトン及びエプレレノンよりも約 10 倍低用量から認められることが明らかとなった。

ラットにおける in vivo MR 拮抗作用の持続性の評価

ラットへの単回経口投与後の、in vivo MR 拮抗作用の持続性を評価するために、化合物の投与 3、8 及び 20 時間後にそれぞれ、アルドステロン投与による尿中 Na^+/K^+ 比の変動に対する化合物の作用を評価した。投与 3 時間後において、CS-3150 (3 mg/kg)、スピロノラクトン (30 mg/kg) 及びエプレレノン (30 mg/kg) はいずれも、vehicle 群で認められたアルドステロンによる尿中 Na^+/K^+ 比の低下を有意に抑制し (Figure 10A)、その抑制率はそれぞれ 38%、57%及び 46%であった (Figure 10D)。投与 8 時間後において、CS-3150 及びスピロノラクトンは投与 3 時間後と同様の高い抑制率 (75%及び 83%) を維持していたのに対し、エプレレノンの有意な抑制効果は認められなかった (Figure 10B、10D)。この結果は、CS-3150 及びスピロノラクトンの MR 拮抗作用が投与 8 時間後まで持続し

ていた一方で、エプレレノンの作用が消失したことを示している。投与 20 時間後において、CS-3150 はアルドステロンによる尿中 Na^+/K^+ 比の低下を有意に抑制していた (抑制率 : 56%) のに対し、スピロラク톤の抑制効果は消失していた (Figure 10C、10D)。以上の結果から、CS-3150 の単回投与での MR 拮抗作用は、投与 20 時間後まで持続し、スピロラク톤及びエプレレノンに比べてより長く持続することが明らかとなった。

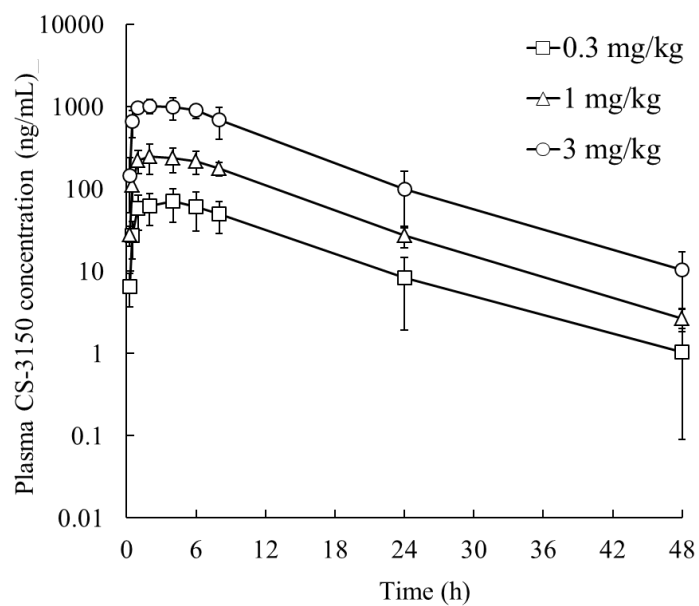


Figure 8. Plasma concentration–time curve of orally administered CS-3150 to rats. CS-3150 (0.3, 1 and 3 mg/kg) was orally administered to male SD rats, and the plasma concentration of CS-3150 was measured at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 and 48 h after administration by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Data are expressed as mean \pm S.D. (N=4).

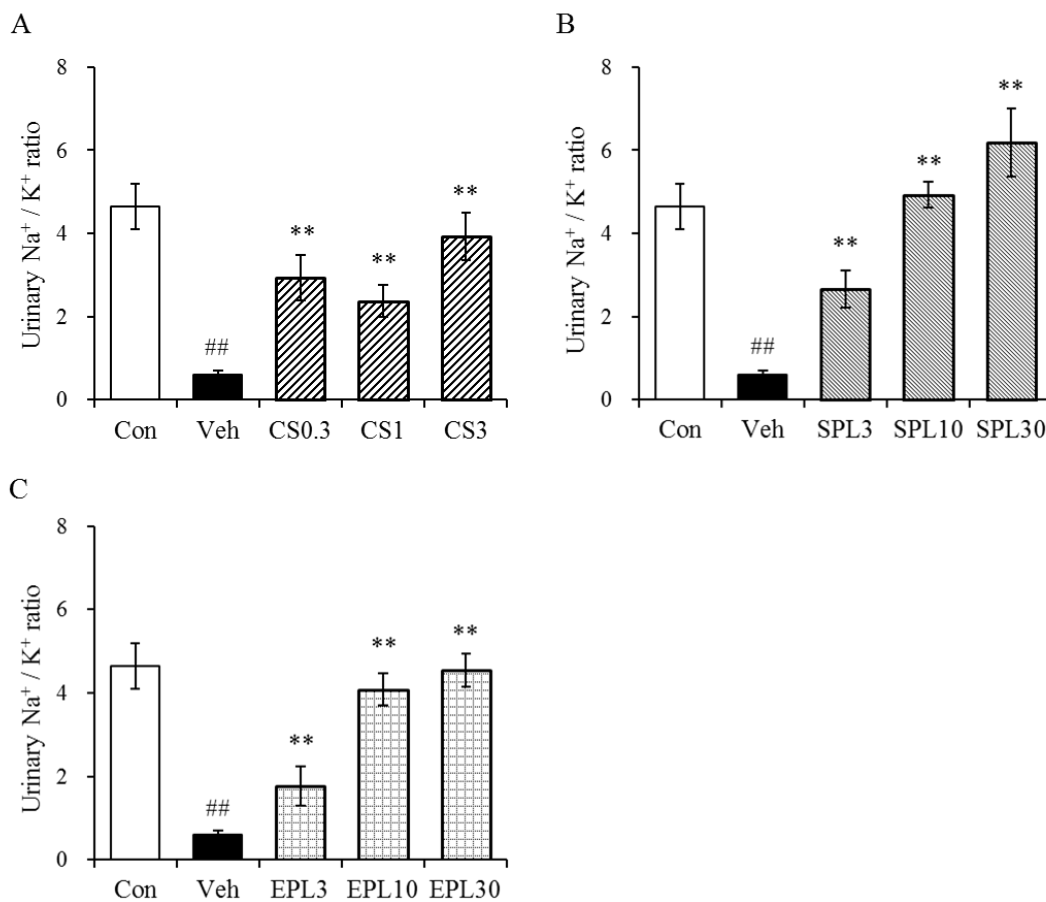


Figure 9. Effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on aldosterone-induced urinary Na⁺/K⁺ concentration ratio change in bilateral adrenalectomized rats. Test compounds were orally administered to bilateral adrenalectomized rats. Aldosterone (2 µg/kg) was subcutaneously administered at 1 h, saline (3 ml/body) was intraperitoneally administered at 2 h, and spot urine samples were collected at 5 h after compound dosing. The urinary Na⁺ and K⁺ concentrations were measured and the Na⁺/K⁺ ratio was calculated. Con: control group (no aldosterone administered). Veh: vehicle-treated group. CS0.3, CS1 and CS3: CS-3150 (0.3, 1 and 3 mg/kg)-treated groups. SPL3, SPL10 and SPL30: spironolactone (3, 10 and 30 mg/kg)-treated groups. EPL3, EPL10 and EPL30: eplerenone (3, 10 and 30 mg/kg)-treated groups. Data are expressed as mean ± S.E.M (N = 8). ^{##} *P* < 0.01 vs. Con. ^{**} *P* < 0.01 vs. Veh.

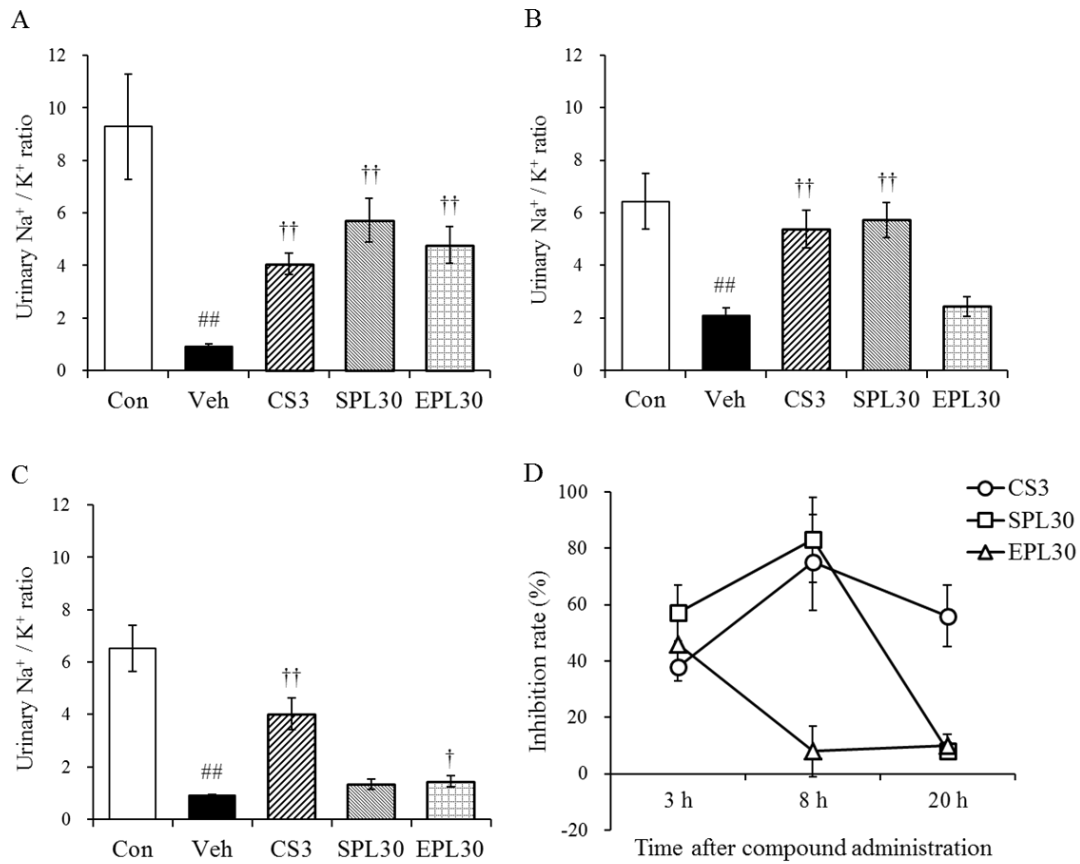


Figure 10. The time-course of the effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on aldosterone-induced urinary Na^+/K^+ concentration ratio change in bilateral adrenalectomized rats. The compounds were orally administered to bilateral adrenalectomized rats. In (A), aldosterone (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and saline (3 ml/body) were subcutaneously administered at 1 h and spot urine was collected at 3 h after compound dosing. In (B), aldosterone and saline were administered at 6 h and spot urine was collected at 8 h after compound dosing. In (C), aldosterone and saline were administered at 18 h and spot urine was collected at 20 h after compound dosing. The urinary Na^+ and K^+ concentrations were measured and the Na^+/K^+ ratio was calculated. The time-course of inhibition rate on aldosterone-induced Na^+/K^+ ratio change are shown in (D). Con: control group (no aldosterone administered). Veh: vehicle-treated group. CS3: CS-3150 (3 mg/kg)-treated group. SPL30: spironolactone (30 mg/kg)-treated group. EPL30: eplerenone (30 mg/kg)-treated group. Data are expressed as mean \pm S.E.M (N = 8).

$P < 0.01$ vs. Con. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs. Veh.

Table 3. Pharmacokinetic parameters after single oral administration of CS-3150 to rats.

Parameter	Dose (mg/kg)		
	0.3	1	3
AUC _{0-inf} (ng·h/mL)	1050	3690	14700
C _{max} (ng/mL)	72.3	267	1080
t _{max} (h)	2.8	4.5	2.0
t _{1/2} (h)	6.9	6.6	6.5

第 1 章 新規 MR 拮抗薬 CS-3150 の基本薬理プロファイルの 検証

[考察]

本章では、CS-3150 の MR 拮抗薬としての基本薬理プロファイルを明らかにすることを目的に、*in vitro* 及び *in vivo* において種々の検討を実施した。

第 1 節では、CS-3150 の MR に対する作用 (MR に対する結合親和性及び拮抗様式、MR 拮抗活性、MR 選択性) を、*in vitro* にて検証した。バインディングアッセイにおいて、CS-3150 は MR に対し、スピロノラクトン及びエプレレノンに比べてそれぞれ約 4 及び 76 倍高い結合親和性を示し、その拮抗様式はスピロノラクトン及びエプレレノンと同様に競合的であった。レポーターアッセイにおいては、CS-3150 はヒト MR に対し、スピロノラクトン及びエプレレノンの約 18 及び 260 倍強力なアンタゴニスト活性を示した。また、その MR に対する優れた結合親和性・拮抗活性だけでなく、CS-3150 はスピロノラクトン及びエプレレノンと比べ、いくつか異なる薬理学的プロファイルを有していた。第一に、レポーターアッセイにおいて、スピロノラクトン及びエプレレノンがヒト MR に対して弱いながらもアゴニスト活性を示したのに対し、CS-3150 は全くアゴニスト活性を示さなかった。動物モデルを用いた実験で、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬の有効性が減弱することが報告されている [39]。次章以降で述べる CS-3150 の *in vivo* における作用の特徴は、CS-3150 が MR に対するフルアンタゴニストであることに起因しているのかもしれない。第二に、バインディングアッセイとレポーターアッセイの両方において、スピロノラクトン及びエプレレノンが MR 以外のステロイドホルモン受容体 (GR、AR、PR) への親和性及びアゴニスト/アンタゴニスト作用を示したのに対し、CS-3150 はそれら受容体と比較して 1000 倍以上という極めて高い MR 選択性を示した。臨床においてスピロノラクトンは、本節での実験でも確認された AR 及び PR への高い親和性に起因した、性ホルモン関連の副作用 (女性化乳房や月経不順、勃起不全など) を引き起こすことが知られている [40, 41]。一方、スピロノラクトンに比べて

MR 選択性が改善されたエプレレノンは、性ホルモン関連の副作用をほとんど引き起こさないことが報告されている [42]。これらのことから、エプレレノンよりもさらに高い MR 選択性を有する CS-3150 は、臨床において性ホルモン関連の副作用を引き起こす可能性は極めて低いことが期待される。また、安全性薬理の観点から、CS-3150 は 68 種類の他の受容体やチャネル、トランスポーター、酵素に影響 ($10 \mu\text{mol/L}$ [MR に対する IC_{50} 値の約 1000 倍] で 50%以上の阻害作用) を及ぼさないことも確認されており (data not shown)、これらの結果を総合すると、CS-3150 は非常に忍容性の高い医薬品になりうると考えられる。

第 2 節では、尿中 Na^+/K^+ 比の変動を指標として、CS-3150 の *in vivo* における MR 拮抗作用を評価した。両副腎摘出ラットにおいて、CS-3150 は単回経口投与により、アルドステロンによる尿中 Na^+/K^+ 比の低下を抑制し、その作用はスピロラクトン及びエプレレノンよりも低用量から認められ、且つ長時間持続していた。また、ラットにおける PK プロファイルの解析により、CS-3150 はスピロラクトン及びエプレレノンと比べ、血中半減期が長いことが明らかとなった [43, 44]。これらの結果から、ラットにおける CS-3150 の強力且つ持続的な MR 拮抗作用は、*in vitro* での強力な MR 拮抗活性に加え、投与後の安定した血中曝露に起因するものと推察された。

以上、本章での検討により、CS-3150 は既存 MR 拮抗薬のスピロラクトン及びエプレレノンと比べて、強力且つ持続性のある MR 拮抗活性と、極めて高い MR 選択性を特徴とする、新規 MR 拮抗薬であることが明らかとなった。

第2章 Dahl 食塩感受性高血圧ラットの病態進展に対する CS-3150 の作用

[目的]

第1章において、CS-3150 はスピロノラクトン及びエプレレノンと比較して、①強力な MR 拮抗活性と非常に高い MR 選択性を有し、②単回経口投与にて強力且つ持続的な *in vivo* MR 拮抗作用を示すことが明らかとなった。そこで次に、病態モデル動物を用いて、CS-3150 を反復経口投与した際に、この薬理学的特徴がどのような薬効につながるのかを検証することとした。序論で述べたように、近年、MR の活性亢進が認められ、MR 拮抗薬の投与によって明らかな降圧を認める疾患として MR 関連高血圧症が提唱されており [27]、その代表例として食塩感受性高血圧が挙げられる [45, 46]。食塩感受性高血圧とは、本態性高血圧の中でも食塩摂取によって血圧が上昇しやすい高血圧のことを指す。その病態モデルとして、高食塩食の負荷によって高血圧及び心・腎障害が惹起される Dahl 食塩感受性高血圧ラットが知られており、MR 拮抗薬を含む降圧薬の薬効評価に汎用されている [47, 48]。本章では、この Dahl 食塩感受性高血圧ラットに CS-3150 を長期連投して、病態進展 (高血圧及び心・腎障害) に対する作用を評価し、スピロノラクトン及びエプレレノンと比較した。

[方法]

化合物

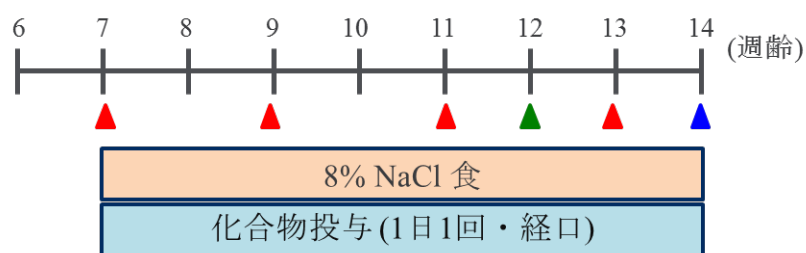
化合物の入手は、第1章・第1節に記載の方法に準じた。ラットへは、0.5%メチルセルロース (MC、和光純薬工業株式会社) に懸濁して、2 mL/kg の用量で経口投与した。

供試動物

5週齢の雄性 Dahl 食塩感受性ラット (DIS/Eis [Dahl-Iwai S]) を、日本エスエルシー株式会社より購入して使用した。動物は、設定温度 22°C (許容範囲: 19~25°C)、湿度 50% (許容範囲: 30~70%)、12 時間明暗サイクル (明期: 7~19 時) の環境下で、標準食 (FR-2、株式会社フナバシファーム) 及び水道水を自由に摂取させた。全ての実験操作は、シミック株式会社にて、シミック株式会社動物実験委員会のガイドラインに従って適切に実施した。

実験プロトコール

プロトコールの概要図を以下に示す。



▲ : 血圧測定 ▲ : 24時間蓄尿、剖検 ▲ : 採血

雄性 Dahl 食塩感受性ラットに、7 週齢より食塩食 (8%NaCl を含む FR-2、株式会社フナバシファームで調製) を摂取させた。食塩負荷と同時に、溶媒 (0.5%MC)、CS-3150 (0.25、0.5、1、2 mg/kg)、スピロノラクトン (10、30、100 mg/kg) あるいはエプレレノン (10、30、100 mg/kg) を、1 日 1 回 7 週間経口投与した。Control 群は、標準食 (FR-2) を摂取

させ、溶媒 (0.5%MC) を経口投与した。

収縮期血圧の測定

7 (投与前)、9、11 及び 13 週齢時に、非観血式自動血圧装置 (BP-98A、株式会社ソフトロン) を用いて、tail cuff 法にて収縮期血圧を測定した。個体ごと 5 回の測定値のうち、最大値及び最小値を除く 3 回の測定の平均値を算出した。

採尿及び尿中パラメータの測定

14 週齢時に、ラットをメタボリックケージに収容し、24 時間蓄尿を実施した。尿量を測定し、遠心後 (1820×g、15 分) 上清を回収した。自動分析装置 (BioMajesty、日本電子株式会社) を用いて尿中タンパク濃度を測定し、1 日尿タンパク排泄量を算出した。

CS-3150 の血中濃度の測定

12 週齢時に、CS-3150 投与群のラットについて、投与前及び投与 2、4、8、24 時間後に頸静脈採血を行い、遠心後 (1800×g、15 分) 血漿を回収した。LC/MS/MS (Shimazu 10A、株式会社島津製作所) を用いて、CS-3150 の血漿中濃度を測定し、PK パラメータを算出した。

血中パラメータの測定及び剖検

12 週齢時に頸静脈採血を行い、遠心後 (1800×g、15 分) 血清を回収した。自動分析装置 (BioMajesty) を用いて、血清中の Na^+ 及び K^+ 濃度を測定した。

剖検時 (14 週齢時)、イソフルラン吸入麻酔下にて腹大動脈からの全採血を行い、遠心後 (1800×g、15 分) 血漿を回収した。ELISA キット (AssayPro llc.) を用いて、血漿中の脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 濃度を測定した。また、左腎臓を生理食塩水で灌流後に摘出し、後述する病理組織評価に用いた。右腎臓及び心臓 (左心室) も摘出し、湿重量を測定して、体重当たりの重量を算出した。

腎臓の病理組織評価

摘出した左腎臓の一部を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋して、薄切標本スライドを作製した。作製した薄切標本に、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及びマッソントリクローム (MT) 染色をそれぞれ行い、以下の病理組織評価に用いた。

<糸球体硬化の評価>

PAS 染色スライドを用いて、各個体 50 個の糸球体を観察し、各々の糸球体硬化の程度を Uehara らの判断基準に従ってスコア化した [49]。各個体の糸球体硬化指数は、下記の方法に従って算出した。

糸球体硬化スコアと判断基準

スコア	判断基準
0	正常
1	硬化領域が糸球体全体の 25%未満
2	硬化領域が糸球体全体の 25-50%
3	硬化領域が糸球体全体の 50-75%
4	硬化領域が糸球体全体の 75%以上

糸球体硬化指数の算出方法

スコア	糸球体の個数
0	a
1	b
2	c
3	d
4	e
計	a+b+c+d+e=50

糸球体硬化指数 = $([0 \times a] + [1 \times b] + [2 \times c] + [3 \times d] + [4 \times e]) / 50$

<尿細管障害の評価>

HE 染色スライドを用いて、各個体の髓質外帯の内層及び髓放線部について、尿細管障害の程度を Uehara らの判断基準に従ってスコア化した [49]。評価は 200 倍の倍率で、各々10 視野について実施し、その平均値を算出して、各個体の尿細管障害スコアとした。

尿細管障害スコアと判断基準

スコア	判断基準
0	正常
1	尿細管の拡張が軽微で限局的
2	多数の尿細管の拡張 (間質拡大を伴う)
3	広範にわたる尿細管の拡張 (嚢胞形成、間質拡大を伴う)
4	完全に萎縮した尿細管で占められる

<尿細管間質線維化の評価>

MT 染色スライドを用いて、尿細管間質の線維化の程度 (青色に染色された領域) を、画像解析 (画像解析・計測ソフトウェア WinROOF、三谷商事株式会社) により単位面積当たりの間質線維化率 (%) として求めた。評価は 200 倍の倍率で、20 視野について実施し、その平均値を算出して、各個体の間質線維化率 (%) とした。

統計解析

統計解析は、第 1 章・第 2 節に記載の方法に準じて実施した。

[結果]

収縮期血圧

Vehicle 群では control 群に比べ、食塩負荷 2 週目 (9 週齢時) から有意な血圧上昇が認められ、その後も経時的に血圧が上昇した (Figure 11)。CS-3150 は用量依存的にその血圧上昇を抑制し、13 週齢時において、0.5、1 及び 2 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた (Figure 11A)。スピロノラクトン及びエプレレノンも同様に昇圧抑制作用を示し、13 週齢時においていずれも 100 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた (Figure 11B、11C)。CS-3150 0.5 mg/kg、スピロノラクトン 100 mg/kg 及びエプレレノン 100 mg/kg 投与群の、13 週齢時における収縮期血圧はそれぞれ 191 ± 8 mmHg、 195 ± 4 mmHg 及び 197 ± 3 mmHg であった (Figure 11D) ことから、CS-3150 は 0.5 mg/kg の用量で、スピロノラクトン及びエプレレノンの 100 mg/kg と同程度の昇圧抑制作用を示すことが明らかとなった。

尿タンパク排泄量

尿タンパク排泄量は、腎障害の指標として確立されたバイオマーカーである [50]。7 週間の食塩負荷により、vehicle 群では control 群に比べ、尿タンパク排泄量の有意な増加が認められた (Figure 12)。CS-3150 は用量依存的にその尿タンパク排泄量の増加を抑制し、0.5、1 及び 2 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた (Figure 12A)。一方、スピロノラクトンはいずれの投与群 (10、30 及び 100 mg/kg) においても有意な効果を示さなかった (Figure 12B)。また、エプレレノンは 10 及び 100 mg/kg 投与群において、尿タンパク排泄量の増加を有意に抑制したが、30 mg/kg 投与群では有意な効果は認められなかった (Figure 12C)。

臓器重量

Vehicle 群では control 群に比べ、腎臓重量/体重比及び心臓重量/体重比の有意な増加が認められ、腎肥大及び心肥大が確認できた (Table 4)。CS-3150 は、いずれの臓器重量/体重

比の増加も用量依存的に抑制し、0.5、1 及び 2 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた。スピロラク톤は、腎臓重量/体重比の増加に対しては、いずれの投与群 (10、30 及び 100 mg/kg) においても有意な作用を示さなかったが、心臓重量/体重比の増加に対しては、30 及び 100 mg/kg 投与群で有意な抑制効果が認められた。一方エプレレノンは、腎臓重量/体重比及び心臓重量/体重比の増加に対して、いずれの投与群 (10、30 及び 100 mg/kg) でも有意な抑制作用を示したが、明確な用量依存性は認められなかった。

腎臓病理評価

<糸球体硬化>

Vehicle 群では control 群に比べ、糸球体硬化指数の有意な増加が認められた (Table 5、Figure 13)。CS-3150 は用量依存的にその糸球体硬化を抑制し、0.5、1 及び 2 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた。スピロラク톤及びエプレレノンも同様に、用量依存的に糸球体硬化を抑制し、いずれも 100 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた。

<尿細管障害>

Vehicle 群では control 群に比べ、髄質外帯の内層及び髄放線部のいずれにおいても、尿細管障害スコアの有意な増加が認められた (Table 5、Figure 13)。CS-3150 は用量依存的にその尿細管障害を抑制し、髄質外帯の内層においては 1 及び 2 mg/kg、髄放線部においては 0.5、1 及び 2 mg/kg 投与群で、それぞれ有意な効果が認められた。一方スピロラク톤は、いずれの投与群 (10、30 及び 100 mg/kg) においても、髄質外帯の内層及び髄放線部の尿細管障害に対して有意な効果を示さなかった。エプレレノンは、髄質外帯の内層においては 10 mg/kg、髄放線部においては 10、30 及び 100 mg/kg 投与群で、それぞれ尿細管障害を有意に抑制したが、明確な用量依存性は認められなかった。

<尿細管間質線維化>

Vehicle 群では control 群に比べ、尿細管間質の線維化率の有意な増加が認められた (Table 5、Figure 13)。CS-3150 は用量依存的にその線維化を抑制し、1 及び 2 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた。一方スピロラク톤は、いずれの投与群 (10、30 及び 100

mg/kg) においても、尿細管間質の線維化に対して有意な効果を示さなかった。エプレレノン、CS-3150 と同様に用量依存的に尿細管間質の線維化を抑制し、30 及び 100 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた。

血中パラメータ

<血清電解質>

Vehicle 群では control 群に比べ、血清 Na⁺濃度の有意な増加及び血清 K⁺濃度の有意な低下が認められた (Table 6)。血清 Na⁺濃度については、CS-3150、スピロラクトン及びエプレレノンいずれの投与群においても、vehicle 群と比べて有意な変動は認められなかった (Table 6)。血清 K⁺濃度については、CS-3150 は 0.5、1 及び 2 mg/kg 投与群において、vehicle 群の低下に対する有意な抑制作用が認められた。スピロラクトン及びエプレレノンも同様の抑制作用を示し、エプレレノンの 100 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた。

<血中 BNP>

血中 BNP 濃度は、心不全のバイオマーカーとして広く有用されている [51]。Vehicle 群では control 群に比べ、血中 BNP の有意な増加が認められた (Table 6)。CS-3150 は用量依存的にその増加を抑制し、1 及び 2 mg/kg 投与群で有意な効果が認められた。一方スピロラクトン及びエプレレノンは、いずれの投与群 (10、30 及び 100 mg/kg) においても、血中 BNP 増加に対して有意な抑制効果は認められなかった。

CS-3150 の PK パラメータ

投与 5 週目 (12 週齢時) において、CS-3150 の t_{max} は 3.6-4.8 h で、C_{max} 及び AUC_{0-24h} の用量依存的な増加が認められた (Figure 14、Table 7)。

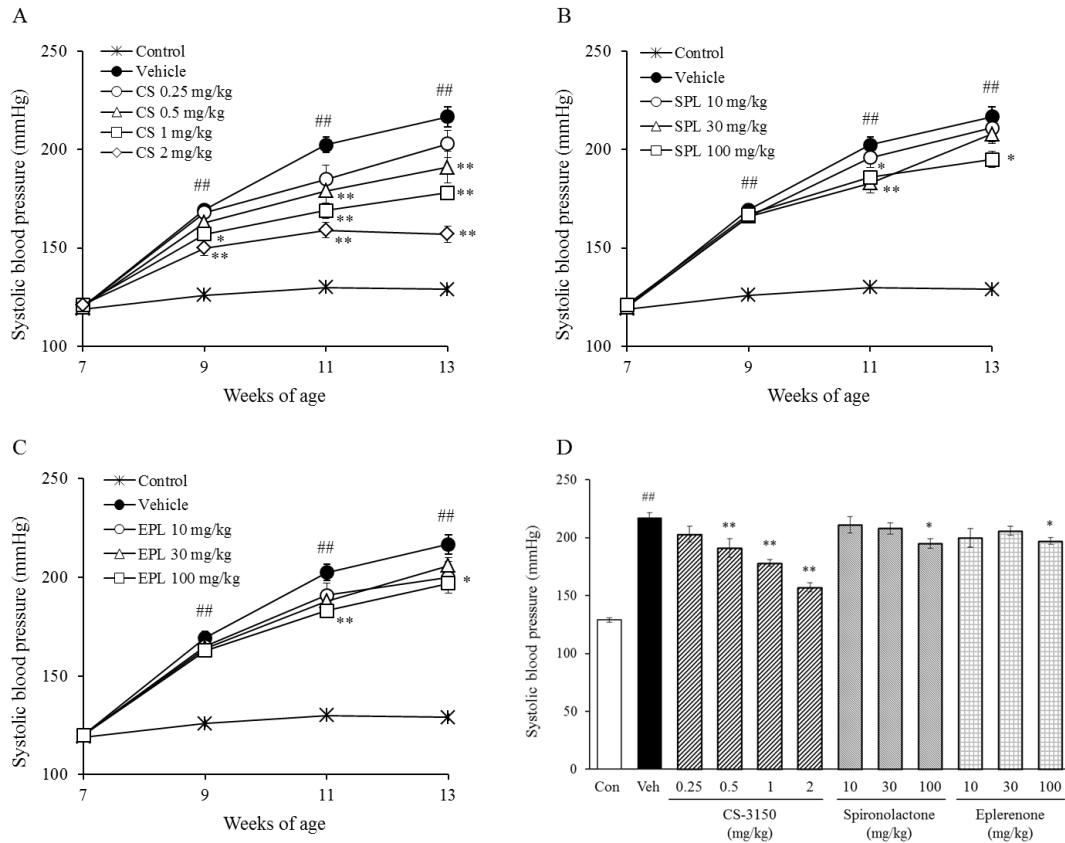


Figure 11. Effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on systolic blood pressure in Dahl salt-sensitive (DS) hypertensive rats (time course [A, B, C] and at 13 weeks of age [D]). DS rats were fed a high salt (8% NaCl) diet from 7 weeks of age. CS-3150 (0.25 to 2 mg/kg), spironolactone (10 to 100 mg/kg), eplerenone (10 to 100 mg/kg) or 0.5% MC (vehicle) was orally administered to DS rats once a day for 7 weeks in parallel with salt-loading. Systolic blood pressure was measured at 7 (before dosing), 9, 11 and 13 weeks of age. CS: CS-3150. SPL: spironolactone. EPL: eplerenone. Data are expressed as mean \pm S.E.M (N = 10 in each group, except for the vehicle group [N = 15]). ## $P < 0.01$ vs. control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle.

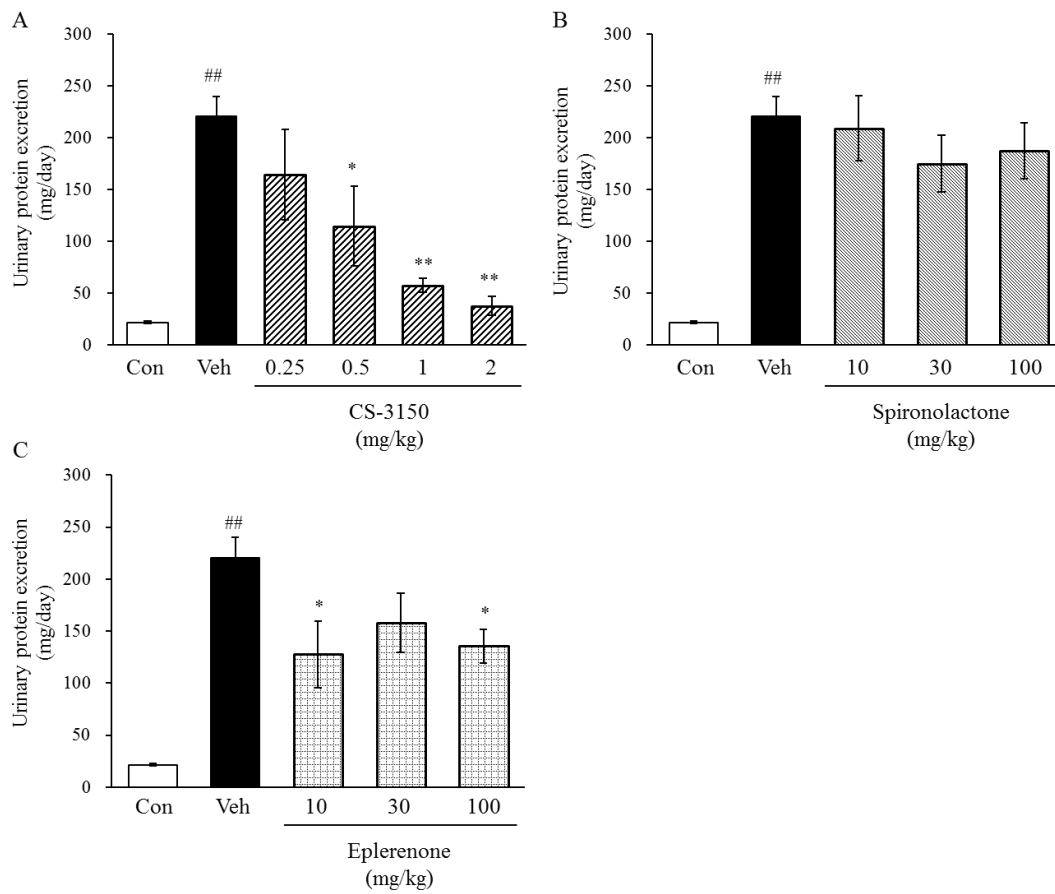


Figure 12. Effects of CS-3150 (A), spironolactone (B) and eplerenone (C) on urinary protein excretion in Dahl salt-sensitive (DS) hypertensive rats. Urine was collected for 24 h at 14 weeks of age and urinary volume and protein concentration were measured. Urinary protein excretion for 24 h was calculated. Con: control group. Veh: vehicle group. Data are expressed as mean \pm S.E.M (N = 10 in each group, except for the vehicle group [N = 15]). ^{##} $P < 0.01$ vs. control, * $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs. vehicle.

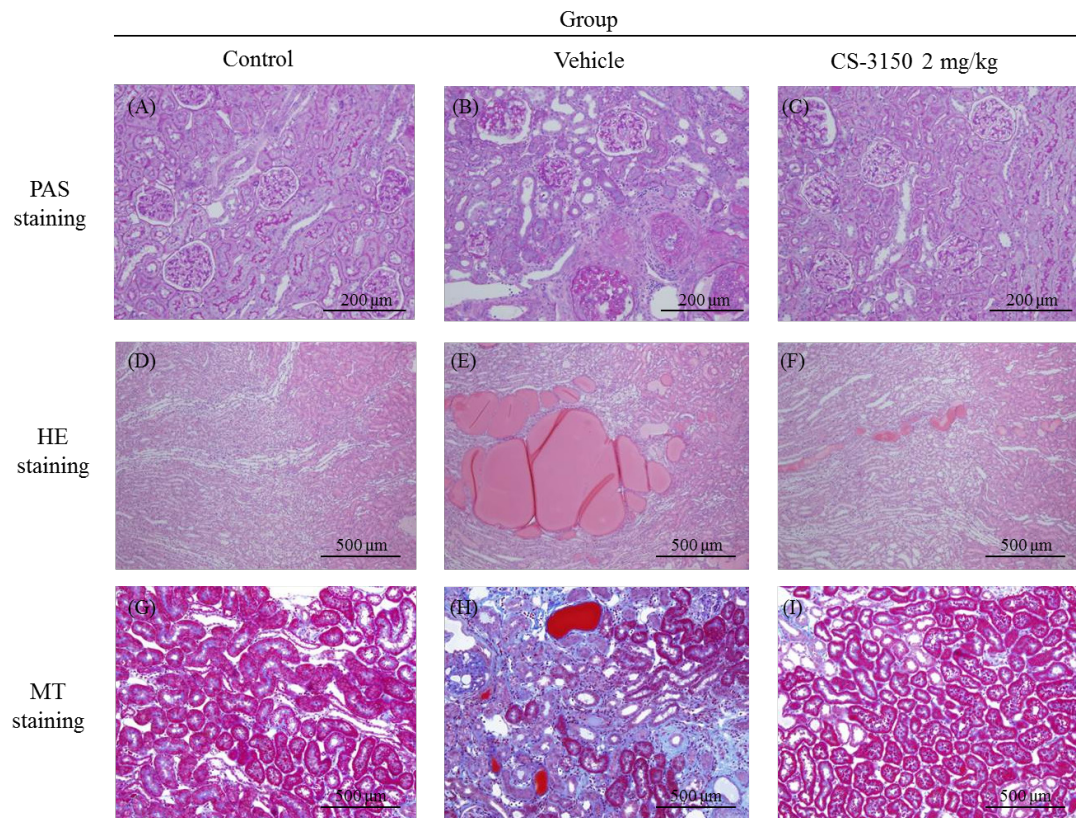


Figure 13. Representative photomicrographs showing glomerulosclerosis (A-C, PAS-staining), tubular injury (D-F, HE-staining) and tubulointerstitial fibrosis (G-I, MT-staining) in Dahl salt-sensitive (DS) hypertensive rats. Photos are from the control (A, D, G), vehicle (B, E, H) and CS-3150 (2 mg/kg)-treated groups (C, F, I) at 14 weeks of age.

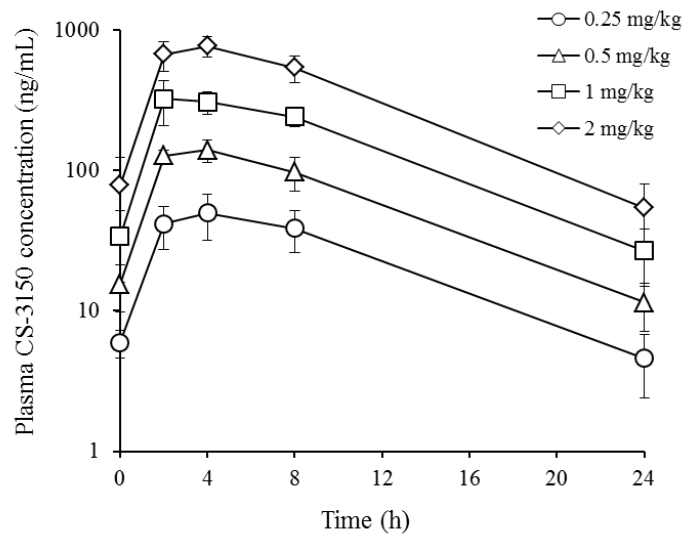


Figure 14. Plasma concentration-time curve of orally administered CS-3150 to Dahl salt-sensitive (DS) hypertensive rats. At 12 weeks of age, the plasma concentrations of CS-3150 were measured at 0, 2, 4, 8 and 24 h after compound administration by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Data are expressed as mean \pm S.D. (N = 10 in each group).

Table 4. Effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on organ weights in Dahl salt-sensitive hypertensive rats.

Group	N	Organ weights (body weight ratio)	
		Right kidney (mg/g)	LV (mg/g)
Control	10	3.48 ± 0.03	2.11 ± 0.02
Vehicle	15	5.03 ± 0.10 ##	3.28 ± 0.05 ##
CS-3150			
0.25 mg/kg	10	4.76 ± 0.17	3.08 ± 0.12
0.5 mg/kg	10	4.65 ± 0.13 *	2.85 ± 0.11 **
1 mg/kg	10	4.21 ± 0.06 **	2.65 ± 0.04 **
2 mg/kg	10	4.08 ± 0.04 **	2.40 ± 0.04 **
Spironolactone			
10 mg/kg	10	4.89 ± 0.16	3.19 ± 0.08
30 mg/kg	10	4.85 ± 0.14	3.04 ± 0.07 *
100 mg/kg	10	4.82 ± 0.17	2.89 ± 0.08 **
Eplerenone			
10 mg/kg	10	4.63 ± 0.14 *	2.94 ± 0.09 **
30 mg/kg	10	4.60 ± 0.05 **	2.94 ± 0.06 **
100 mg/kg	10	4.65 ± 0.05 *	2.86 ± 0.07 **

Data are expressed as mean ± S.E.M.

$P < 0.01$ vs. Control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Vehicle. LV: left ventricular.

Table 5. Histopathological scoring of renal injuries in Dahl salt-sensitive hypertensive rats.

Group	N	Glomerulosclerosis	Tubular injury		Tubulointerstitial fibrosis (%)
			inner stripe of outer medulla	medullar ray	
Control	10	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.38 ± 0.07
Vehicle	15	0.58 ± 0.05 ##	0.71 ± 0.09 ##	1.56 ± 0.18 ##	1.52 ± 0.22 ##
CS-3150					
0.25 mg/kg	10	0.45 ± 0.13	0.47 ± 0.10	1.05 ± 0.25	1.08 ± 0.34
0.5 mg/kg	10	0.23 ± 0.06 **	0.39 ± 0.06	0.69 ± 0.22 *	0.86 ± 0.44
1 mg/kg	10	0.14 ± 0.02 **	0.26 ± 0.05 **	0.42 ± 0.09 **	0.41 ± 0.05 *
2 mg/kg	10	0.11 ± 0.03 **	0.20 ± 0.07 **	0.29 ± 0.07 **	0.35 ± 0.04 **
Spironolactone					
10 mg/kg	10	0.54 ± 0.14	0.62 ± 0.11	1.45 ± 0.29	1.43 ± 0.28
30 mg/kg	10	0.36 ± 0.06	0.62 ± 0.12	1.15 ± 0.26	1.01 ± 0.21
100 mg/kg	10	0.27 ± 0.06 **	0.61 ± 0.17	0.91 ± 0.26	0.82 ± 0.27
Eplerenone					
10 mg/kg	10	0.47 ± 0.18	0.42 ± 0.10 *	0.62 ± 0.18 **	0.92 ± 0.40
30 mg/kg	9	0.34 ± 0.07	0.49 ± 0.10	0.66 ± 0.16 *	0.60 ± 0.13 *
100 mg/kg	10	0.26 ± 0.06 **	0.51 ± 0.11	0.67 ± 0.13 **	0.41 ± 0.04 **

Data are expressed as mean ± S.E.M. ## $P < 0.01$ vs. Control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Vehicle.

Table 6. Effects of CS-3150, spironolactone and eplerenone on blood parameters in Dahl salt-sensitive hypertensive rats.

Group	N	Blood parameters		
		Na ⁺ (mEq/L)	K ⁺ (mEq/L)	BNP (ng/mL)
Control	10	144 ± 0	5.1 ± 0.1	139.1 ± 6.1
Vehicle	15	146 ± 0 ^{##}	4.7 ± 0.1 ^{##}	246.5 ± 18.5 ^{##}
CS-3150				
0.25 mg/kg	10	145 ± 0	4.9 ± 0.1	236.2 ± 45.7
0.5 mg/kg	10	145 ± 1	5.2 ± 0.1 [*]	163.6 ± 23.9
1 mg/kg	10	145 ± 1	5.4 ± 0.1 ^{**}	153.9 ± 7.9 [*]
2 mg/kg	10	145 ± 0	5.4 ± 0.1 ^{**}	140.9 ± 10.0 ^{**}
Spironolactone				
10 mg/kg	10	145 ± 0	4.8 ± 0.2	242.3 ± 31.1
30 mg/kg	10	145 ± 0	4.7 ± 0.1	233.3 ± 14.3
100 mg/kg	10	146 ± 0	5.0 ± 0.1	200.2 ± 17.8
Eplerenone				
10 mg/kg	10	146 ± 0	4.7 ± 0.1	304.6 ± 28.4
30 mg/kg	10	145 ± 0	4.9 ± 0.1	214.5 ± 19.0
100 mg/kg	10	145 ± 0	5.2 ± 0.1 ^{**}	227.8 ± 12.3

Data are expressed as mean ± S.E.M.

^{##} *P* < 0.01 vs. Control, ^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01 vs. Vehicle. BNP: brain natriuretic peptide

Table 7. Pharmacokinetic parameters after repeated oral administration of CS-3150 to Dahl salt-sensitive hypertensive rats.

Parameter	Dose (mg/kg)			
	0.25	0.5	1	2
AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)	663	1750	4240	9530
C _{max} (ng/mL)	52.2	145	353	806
t _{max} (h)	4.8	3.6	3.6	3.8

[考察]

本章では、Dahl 食塩感受性高血圧ラット (以下 Dahl ラット) に CS-3150 を長期連投して、病態進展 (高血圧及び心・腎障害) に対する作用を評価し、スピロラクトン及びエプレレノンと比較した。CS-3150 (0.25~2 mg/kg) は、高食塩負荷による血圧上昇及び尿タンパク排泄量の増加を用量依存的に抑制した。また、腎肥大を抑制し、病理組織学的評価から糸球体硬化・尿細管障害・尿細管間質線維化の抑制作用も認められた。さらに、心肥大及び血中 BNP 上昇を抑制し、心保護効果も確認できた。これら病態進展に対する CS-3150 の抑制効果は、スピロラクトン及びエプレレノンと比べて強力であったことから、CS-3150 は食塩感受性高血圧とそれに伴う心・腎障害の進展を抑える有望な治療薬となりうると考えられた。

本検討において、CS-3150 は 0.5 mg/kg の用量で、スピロラクトンの 100 mg/kg 及びエプレレノンの 100 mg/kg と同程度の昇圧抑制作用を示したことから、長期連投による CS-3150 の薬効は、スピロラクトン及びエプレレノンに比べて用量ベースで約 200 倍強力であることが明らかとなった。第 1 章において、CS-3150 の単回投与での *in vivo* MR 拮抗作用は、スピロラクトン及びエプレレノンに比べて用量ベースで約 10 倍強力であった。この単回投与と長期連投での薬効比の違いを説明する明確な機序は不明だが、1 つの可能性として PK プロファイルの違いが考えられる。第 1 章にて、CS-3150 の単回投与での *in vivo* MR 拮抗作用は投与後 20 時間まで持続し、それはスピロラクトン及びエプレレノンに比した血中半減期の長さに起因することが示唆された。今回、Dahl ラットにおける CS-3150 の長期連投後の血中薬物濃度推移は、単回投与時とほぼ同じであった。一方エプレレノンは、ラットへの反復経口投与 (用量 : 100 mg/kg) 時に、自身の酸化的代謝の亢進が一部要因となり、単回投与時と比べてその血中曝露が著しく低下することが明らかとなっている [44]。また Karim らは、スピロラクトンが経口投与後速やかに複数の活性代謝物に代謝され、ラットにおけるスピロラクトンの様々な薬理作用はこれら活性代謝物によって調節されていることを報告している [52]。スピロラクトンが肝ミクロソームの薬物代謝酵素を増加させるとの報告もあり [53]、エプレレノン

と同様、本検討において、スピロラク톤の長期連投によってそれら活性代謝物の血中曝露が低下したのかもしれない。これらの知見を総合すると、CS-3150 はスピロラク톤及びエプレレノンと比べ、安定した血中曝露に起因して MR 拮抗が長時間持続することで、強力な昇圧抑制効果の発揮につながったものと推察される。実際、Dahl ラットにおいて、投与経路を混餌投与にして血中曝露がより維持される条件下でエプレレノンの薬効を評価したところ、経口投与時に比べて強い昇圧抑制作用が認められたというプレリミナリーな結果を得ている (data not shown)。このことから、長期に渡って MR 拮抗が持続することが、昇圧抑制効果を最大限発揮するのに重要であると考えられる。CS-3150 はその強力な昇圧抑制作用に加え、スピロラク톤及びエプレレノンと比べて、臓器保護作用の観点でいくつか異なる特徴を有していた。Dahl ラットにおいて、CS-3150 は尿タンパク排泄量の増加、腎肥大及び腎病理像の増悪を著明に抑制し、心肥大及び血中 BNP 上昇に対しても有意な抑制効果を示した。一方、前述したようにスピロラク톤は、100 mg/kg の用量において CS-3150 の 0.5 mg/kg と同程度の昇圧抑制作用を示したが、複数のパラメータに対して CS-3150 の方がより強い腎保護効果を示していた。また、エプレレノンの腎保護作用に関しては、その用量反応性が乏しく (特に尿タンパク排泄量、腎肥大及び尿細管障害に対する作用)、用量反応性という観点において CS-3150 の方が優れたプロファイルを有している点も明らかとなった。さらに、スピロラク톤及びエプレレノンは心肥大を有意に抑制したものの、いずれも血中 BNP 上昇に対する有意な抑制効果が認められなかった。これまでに複数の非臨床研究から、心・腎障害に対する MR 拮抗薬の抑制効果は、昇圧抑制作用による間接的なものだけでなく、心臓・腎臓における炎症・線維化・酸化ストレスの抑制を介した直接的な保護作用によるものであることがわかってきている [54, 55, 56]。従って、これらの結果から、CS-3150 はスピロラク톤及びエプレレノンよりも優れた、昇圧抑制作用に依存しない直接的な臓器保護作用を有することが示唆された。この両者の違いを説明する上で、いくつかの可能性が考えられる。心・腎障害の進展には心臓 (心筋細胞) 及び腎臓 (ポドサイトやメサングウム細胞) 局所での MR 活性化が関与していることが明らかとなっている [57,

58, 59]。近年 Kolkhof らは、彼らが発見した非ステロイド骨格を有する新規 MR 拮抗薬 *finerenone* が、ラットへ投与した際に心臓及び腎臓へ均等に分布し、その分布パターンがスピロラクトン及びエプレレノンと異なることを報告している [60]。この報告の中で彼らは、この組織分布の違いが、高血圧モデル動物における *finerenone* の強力な心・腎保護効果に寄与している可能性について触れていた。CS-3150 もラットへ投与した際、心臓及び腎臓に均等に分布することが確認されており (data not shown)、*finerenone* と同様の可能性が考えられるのかもしれない。また、腎臓の個々の微小组織 (ポドサイトやメサングウム細胞) における化合物の分布を正確に解析することは困難と思われるが、腎臓内の CS-3150 の分布がスピロラクトン及びエプレレノンと異なっていて、障害惹起に関わる腎局所の MR 活性化を CS-3150 がより強力に抑制しているのかもしれない。第 1 章で明らかとなった、CS-3150 の特徴である高い MR 選択性も、既存 MR 拮抗薬よりも優れた臓器保護作用を説明する 1 つの要因と考えられる。スピロラクトンは AR に対して比較的高い親和性を有することが知られている [61]。AR は腎臓特に近位尿管に発現しており [62, 63]、高血圧モデル動物においてテストステロン (AR のリガンド) が腎障害を悪化させることが報告されている [64]。従って Dahl ラットにおいて、スピロラクトンは AR への作用により、その MR 拮抗を介した腎保護効果が減弱したという可能性も考えられる。また、第 1 章にて、スピロラクトン及びエプレレノンが弱いながらも MR に対するアゴニスト活性を有していたのに対し、CS-3150 は全くアゴニスト活性を示さなかった。Nariai らは、*in vivo* において、MR に対する強いパーシャルアゴニスト活性が MR 拮抗作用を弱めることを報告している [39]。スピロラクトン及びエプレレノンの MR アゴニスト活性はわずかではあるものの、それにより両者の MR 拮抗作用が減弱し、結果として心・腎保護効果が十分に発揮されなかったのかもしれない。最近になって、前述した *finerenone* に関し、心不全モデル動物における心肥大関連遺伝子の発現増加に対する抑制パターンがエプレレノンと異なること [65] や、MR の核内移行や転写活性に関わるコファクターの種類に着目してエプレレノンとの分子レベルでの差異化点を見出そうとした研究成果 [66] が報告されてきている。臓器保護作用の観点

での、CS-3150 と既存 MR 拮抗薬の差異を説明する詳細な機序を明らかにするには、今後このような分子レベルでの検討が必要であると考えている。

高カリウム血症は、MR 拮抗薬による治療時に認められる、尿中へのカリウム排泄の抑制に起因したメカニズムベースの副作用として知られている [34]。実際、腎機能が低下した患者で、特に ACE 阻害薬や ARB を処方されている患者に対しては、高カリウム血症のリスクを考慮して MR 拮抗薬の処方が制限されている [67]。臨床において高カリウム血症は、「血清カリウム値が 5.5 mEq/L 以上」と定義されているが、動物実験においてそのリスクを評価することは容易ではない。例えば、重篤な腎障害のモデルとして汎用されている 5/6 腎摘ラットに、高カリウム食を負荷した条件下でスピロノラク톤を投与しても、高カリウム血症が認められないことが報告されている [68]。今回の Dahl ラットを用いた検討で、vehicle 群では control 群に比して血清カリウム値が有意に低下し、化合物投与によりその低下が抑えられる結果が得られた。しかし、全ての群において血清カリウム値が 5.5 mEq/L 未満であったことから、本検討結果を元に、CS-3150 がスピロノラク톤及びエプレレノンに比べて高カリウム血症を引き起こすリスクが低いかどうかを見極めることは難しいと思われた。一方で少なくとも、今回認められた、用量反応性に優れるという CS-3150 の特徴は、臨床において高カリウム血症を頻発させない適切な用量設定を可能とするであろう有用なプロファイルと考えられた。近年、既存 MR 拮抗薬に比べて高カリウム血症のリスクが低い可能性を主張した非ステロイド骨格の MR 拮抗薬に関する論文が、いくつか報告されている [69, 70, 71]。CS-3150 が、高カリウム血症のリスクの観点で既存 MR 拮抗薬と異なるプロファイルを有しているかどうかをより詳細に明らかにするには、これらの報告で示されているように、血清カリウム値に対する影響に焦点を当てた実験を実施する必要があるだろう。

以上、本章での検討により、Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおいて、CS-3150 は強力な昇圧抑制作用及び心・腎保護作用を示し、その効果はスピロノラク톤及びエプレレノンに比べて優れていることが明らかとなった。また、CS-3150 の効果は、長期連投によ

る安定した血中曝露に起因して MR 拮抗が長時間持続することで発揮されたものと推察された。さらに、同程度の昇圧抑制作用を示す用量において、CS-3150 はスピロノラクトン及びエプレレノンよりも強力な臓器保護作用を示し、昇圧抑制作用に依存しない直接的な臓器保護作用の観点で既存 MR 拮抗薬よりも優れている可能性が示唆された。

第3章 DOCA/食塩負荷高血圧ラットに対する CS-3150 の薬理作用

第1節 DOCA/食塩負荷高血圧ラットの病態進展に対する抑制作用

[目的]

第2章において、CS-3150はスピロラクトン及びエプレレノンと比較して、Dahl食塩感受性高血圧ラットにおける血圧上昇及び心・腎障害の進展を強力に抑制することが明らかとなった。序論で述べたMR関連高血圧症には、血中アルドステロン濃度が高値を示すタイプと、正常あるいは低値を示すタイプの2種類あることがわかっており [27]、第2章で用いたDahlラットは後者を反映した病態モデルに該当する。一方、MRのリガンドとして知られている deoxycorticosterone acetate (DOCA) の投与及び高食塩食の負荷によって高血圧を惹起させたラット (DOCA/食塩負荷高血圧ラット) は、前者を反映した病態モデルとされ、Dahlラットと同様に降圧薬の薬効評価に広く用いられている [72, 73]。そこで本章ではまず、DOCA/食塩負荷高血圧ラットの病態進展に対しても、CS-3150が抑制作用を示すかどうかを検討した。また、同様に DOCA/食塩負荷高血圧ラットを用いて、病態の進展抑制だけでなく、一度発症した病態に対して CS-3150 が治療効果を発揮するかどうかについて検討することとした。なお本章では、CS-3150 の腎保護効果に焦点を当て、腎臓における各種遺伝子発現を解析することで、その機序解明も試みた。第1節では、DOCA/食塩負荷の開始と同時に CS-3150 を連投して、高血圧及び腎障害の進展に対する作用を評価した。

[方法]

化合物

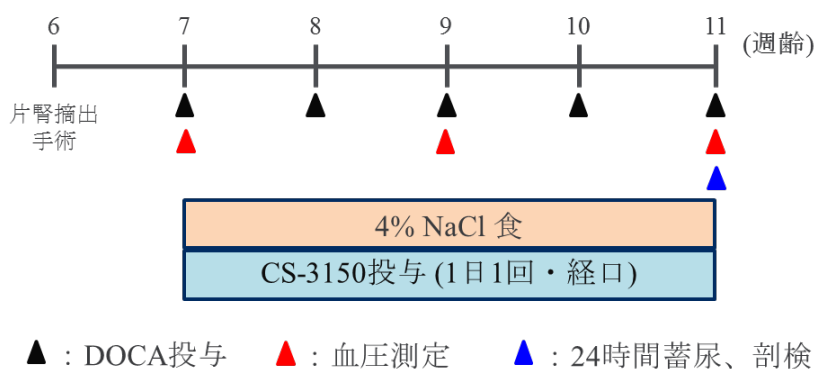
化合物の入手は、第1章・第1節に記載の方法に準じた。ラットへは、0.5%メチルセルロース (MC、和光純薬工業株式会社) に懸濁して、2 mL/kg の用量で経口投与した。

供試動物

6週齢の雄性 Wistar Kyoto (WKY/Izm) ラットを、株式会社フナバシファームより購入して使用した。動物の飼育条件は、第1章・第2節に記載の方法に準じた。

実験プロトコール

プロトコールの概要図を以下に示す。



▲ : DOCA投与 ▲ : 血圧測定 ▲ : 24時間蓄尿、剖検

6週齢の雄性 WKY/Izm ラットの左腎臓を摘出し、7週齢より食塩食 (4%NaCl を含む FR-2、株式会社フナバシファームで調製) を摂取させた。食塩負荷と同時に、0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC、和光純薬工業株式会社) に懸濁した DOCA (20 mg/kg) を、週1回4週間皮下投与した。control 群には DOCA の代わりに 0.5%CMC を投与した。DOCA/食塩負荷と同時に、溶媒 (0.5%MC) あるいは CS-3150 (0.3、1、3 mg/kg) を、1日1回4週間経口投与した。

収縮期血圧の測定

7(投与前)、9及び11週齢時に、第2章に記載の方法に準じて収縮期血圧を測定した。

採尿及び尿中パラメータの測定

11週齢時に、第2章に記載の方法に準じて尿サンプルを回収した。自動分析装置(BiOLis24i premium、東京貿易メディシス株式会社)を用いて尿中タンパク濃度を測定し、1日尿タンパク排泄量を算出した。また、電解質分析装置(STAX-2)を用いて尿中 Na^+ 及び K^+ 濃度を測定し、尿中 Na^+ 及び K^+ の1日排泄量を算出した。さらに、11週齢時の尿サンプルにおいては、ELISAキット(R&D Systems)を用いて尿中MCP-1濃度を測定し、尿中MCP-1の1日排泄量を算出した。

剖検

剖検時(11週齢時)、イソフルラン吸入麻酔下にて腹大動脈からの全採血を行った後、右腎臓を摘出して湿重量を測定し、体重当たりの重量を算出した。重量測定後の右腎臓の一部は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、後述する病理組織評価に用いた。残りの腎臓は、後述する遺伝子発現解析用に、RNAlater(Invitrogen)に入れて測定まで -80°C にて保存した。

腎臓の病理組織評価

10%中性緩衝ホルマリンで固定した腎臓をパラフィン包埋して、薄切標本スライドを作製した。作製した薄切標本に、過ヨウ素酸メセナミン銀(PAM)染色を行い、以下の病理組織評価に用いた。

<糸球体硬化の評価>

PAM染色スライドを用いて、各個体30個の糸球体を観察し、各々の糸球体硬化の程度をUeharaらの判断基準に従ってスコア化した[49]。各個体の糸球体硬化指数は、下記

の方法に従って算出した。

糸球体硬化スコアと判断基準

スコア	判断基準
0	正常
1	硬化領域が糸球体全体の 25%未満
2	硬化領域が糸球体全体の 25-50%
3	硬化領域が糸球体全体の 50-75%
4	硬化領域が糸球体全体の 75%以上

糸球体硬化指数の算出方法

スコア	糸球体の個数
0	a
1	b
2	c
3	d
4	e
計	a+b+c+d+e=30

$$\text{糸球体硬化指数} = ([0 \times a] + [1 \times b] + [2 \times c] + [3 \times d] + [4 \times e]) / 30$$

<尿細管障害の評価>

PAM 染色スライドを用いて、各個体の皮質側及び髄質側について、尿細管障害の程度を Uehara らの判断基準に従ってスコア化した [49]。評価は 200 倍の倍率で、各々 10 視野について実施し、その平均値を算出して、各個体の尿細管障害スコアとした。

尿細管障害スコアと判断基準

スコア	判断基準
0	正常
1	尿細管の拡張が軽微で限局的
2	多数の尿細管の拡張 (間質拡大を伴う)
3	広範にわたる尿細管の拡張 (嚢胞形成、間質拡大を伴う)
4	完全に萎縮した尿細管で占められる

腎臓の遺伝子発現解析

TRIzol (Invitrogen) を用いて腎臓から total RNA を抽出し、First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA と、TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) 及び TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems) を用いて、定量 PCR を実施した。使用した TaqMan Gene Expression Assays の一覧を以下に示す。PCR 反応は、7900 HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて実施した。

評価した遺伝子	Gene Expression Assays の Assay ID
Peptidylprolyl isomerase B (Ppib)	Rn03302274_m1
TGF-β1	Rn00572010_m1
Collagen 1a1 (Coll1a1)	Rn01463848_m1
IL-6	Rn01410330_m1
MCP-1	Rn00580555_m1
p47phox	Rn00586945_m1
p67phox	Rn01759079_m1
nephrin	Rn00674268_m1
podocin	Rn00709834_m1
Sgk-1	Rn01537468_g1

データの解析には SDS 2.4 software (Applied Biosystems) を使用し、Ppib を内部標準とし

て、各遺伝子について相対的 mRNA 発現量を算出した。

統計解析

統計解析は、第 1 章・第 2 節に記載の方法に準じて実施した。

[結果]

収縮期血圧

Vehicle 群では control 群に比べ、DOCA/食塩負荷 2 週目 (9 週齢時) から有意な血圧上昇が認められ、負荷 4 週目 (11 週齢時) まで経時的に血圧が上昇した。CS-3150 は用量依存的にその血圧上昇を抑制し、11 週齢時において、1 及び 3 mg/kg 投与群で有意な昇圧抑制作用が認められた (Figure 15A)。

尿タンパク排泄量

4 週間の DOCA/食塩負荷により、vehicle 群では control 群に比べ、尿タンパク排泄量の有意な増加が認められた。CS-3150 は用量依存的にその尿タンパク排泄量の増加を抑制し、全ての投与群 (0.3、1 及び 3 mg/kg) で有意な効果が認められた (Figure 15B)。

その他の尿パラメータ (尿量、尿中 Na⁺、K⁺及び MCP-1 排泄量)

Vehicle 群では control 群に比べ、尿量の有意な増加が認められ、CS-3150 投与によりその増加が有意に抑制されていた (Figure 16A)。一方で、尿中 Na⁺及び K⁺排泄量も vehicle 群で有意に増加していたが、CS-3150 投与群との有意差は認められなかった (Figure 16 B、16C)。

また、Vehicle 群では control 群に比べ、尿中 MCP-1 排泄量の有意な増加が認められ、CS-3150 投与によりその増加が有意に抑制されていた (Table 8)。

腎臓重量及び腎臓病理評価

Vehicle 群では control 群に比べ、腎臓重量/体重比の有意な増加が認められ、腎肥大が確認できた (Figure 17A)。また、Vehicle 群では control 群に比べ、糸球体硬化指数及び尿細管障害スコア (皮質・髓質いずれも) の有意な増加が認められた (Figure 17B、17C、17D、18)。CS-3150 は用量依存的に、その腎臓重量/体重比の増加、糸球体硬化及び尿細管障害

を抑制し、いずれのパラメータに関しても、全ての投与群 (0.3、1 及び 3 mg/kg) で有意な効果が認められた。

腎遺伝子発現解析

Vehicle 群では control 群に比べ、線維化マーカーである TGF- β 1・Colla1、炎症性サイトカインである IL-6・MCP-1、活性酸素産生に関与する NADPH オキシダーゼのサブユニットである p47phox・p67phox の、腎臓における mRNA 発現量がそれぞれ有意に増加していた (Table 9)。CS-3150 は用量依存的にこれらの mRNA 発現量の増加を抑制し、Colla1 に関しては全ての投与群 (0.3、1 及び 3 mg/kg) で、それ以外の遺伝子に関しては 1 及び 3 mg/kg 投与群で、それぞれ有意な抑制効果が認められた (Table 9)。

ポドサイトは糸球体においてスリット膜を形成し、蛋白尿を防ぐ最終濾過障壁を担っており、nephrin 及び podocin はスリット膜を形成する key component として知られている [74]。本実験において、vehicle 群では control 群に比べ、腎臓における nephrin 及び podocin の mRNA 発現量が低下し、nephrin に関しては有意な差が認められた (Table 9)。CS-3150 は、両遺伝子の mRNA 発現量の低下を抑制し、nephrin に関しては 1 及び 3 mg/kg 投与群で、podocin に関しては 1 mg/kg 投与群で、それぞれ有意な効果が認められた (Table 9)。Sgk-1 は、アルドステロン/MR シグナルの下流分子として知られ、腎尿細管において MR 活性化に伴いその発現量が増加することが報告されている [75]。本実験において、vehicle 群と control 群及び vehicle 群と CS-3150 投与群間で、腎臓における Sgk-1 の mRNA 発現量に有意な差は認められなかった。

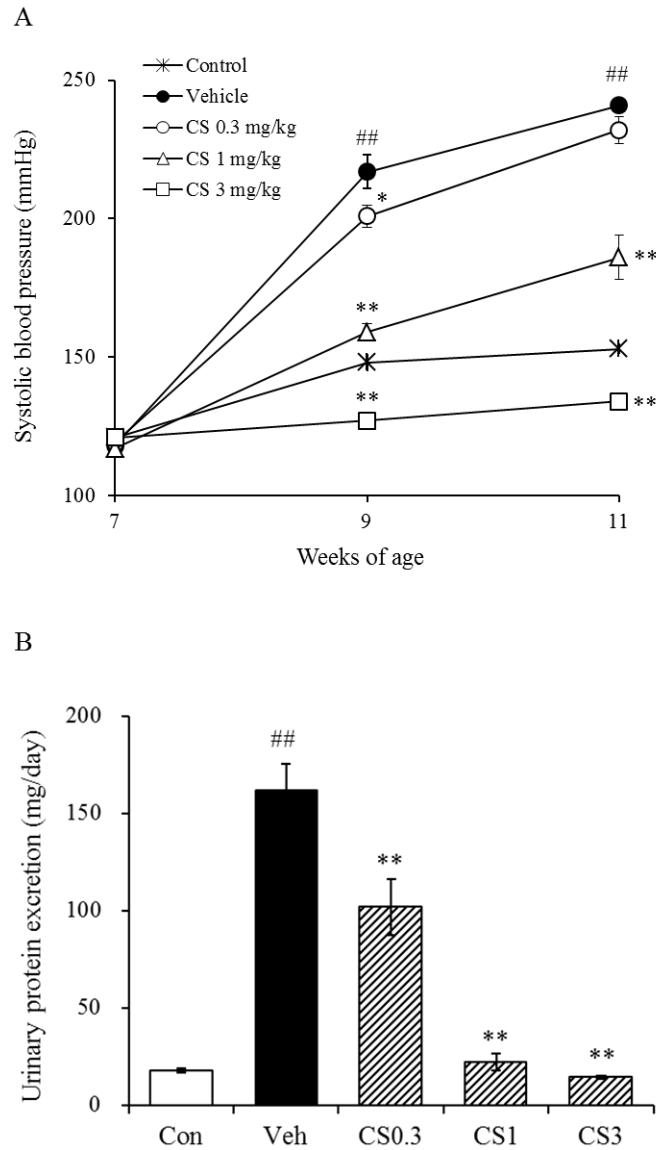


Figure 15. Effects of CS-3150 on systolic blood pressure and urinary protein excretion in DOCA/salt-induced hypertensive rats (preventive study). From 7 weeks of age, DOCA was subcutaneously administered once a week for 4 weeks to uninephrectomized rats fed a high-salt (4% NaCl) diet. CS-3150 (0.3 to 3 mg/kg) was orally administered once a day for 4 weeks from the start date of DOCA administration. (A) Systolic blood pressure was measured at 7, 9 and 11 weeks of age. CS: CS-3150. (B) Urine was collected for 24 h at 11 weeks of age, and urinary volume and protein concentration were measured. Urinary protein excretion for 24 h was calculated. Con: control group (no DOCA administered). Veh: vehicle-treated group. CS0.3: CS-3150 (0.3 mg/kg)-treated group. CS1: CS-3150 (1 mg/kg)-treated group. CS3: CS-3150 (3 mg/kg)-treated group. Data are expressed as mean \pm S.E.M (N = 6 in each group). ^{##} $P < 0.01$ vs. control, ^{**} $P < 0.01$ vs. vehicle.

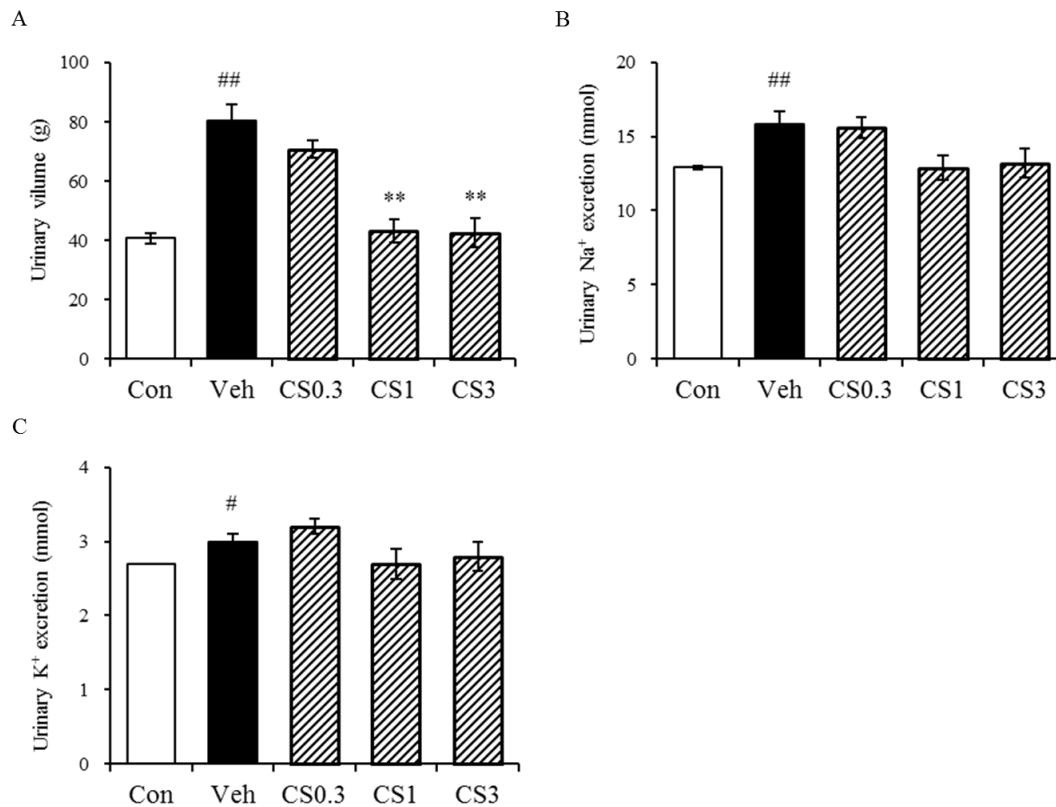


Figure 16. Effects of CS-3150 on urinary volume, Na⁺ and K⁺ excretions in DOCA/salt-induced hypertensive rats (preventive study). From 7 weeks of age, DOCA was subcutaneously administered once a week for 4 weeks to uninephrectomized rats fed a high-salt (4% NaCl) diet. CS-3150 (0.3 to 3 mg/kg) was orally administered once a day for 4 weeks from the start date of DOCA administration. Urine was collected for 24 h at 11 weeks of age, and urinary volume (A) and Na⁺ and K⁺ concentrations were measured. Urinary Na⁺ (B) and K⁺ (C) excretions for 24 h were calculated. Con: control group (no DOCA administered). Veh: vehicle-treated group. CS0.3: CS-3150 (0.3 mg/kg)-treated group. CS1: CS-3150 (1 mg/kg)-treated group. CS3: CS-3150 (3 mg/kg)-treated group. Data are expressed as mean ± S.E.M (N = 6 in each group).

[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs. control, ^{**} $P < 0.01$ vs. vehicle.

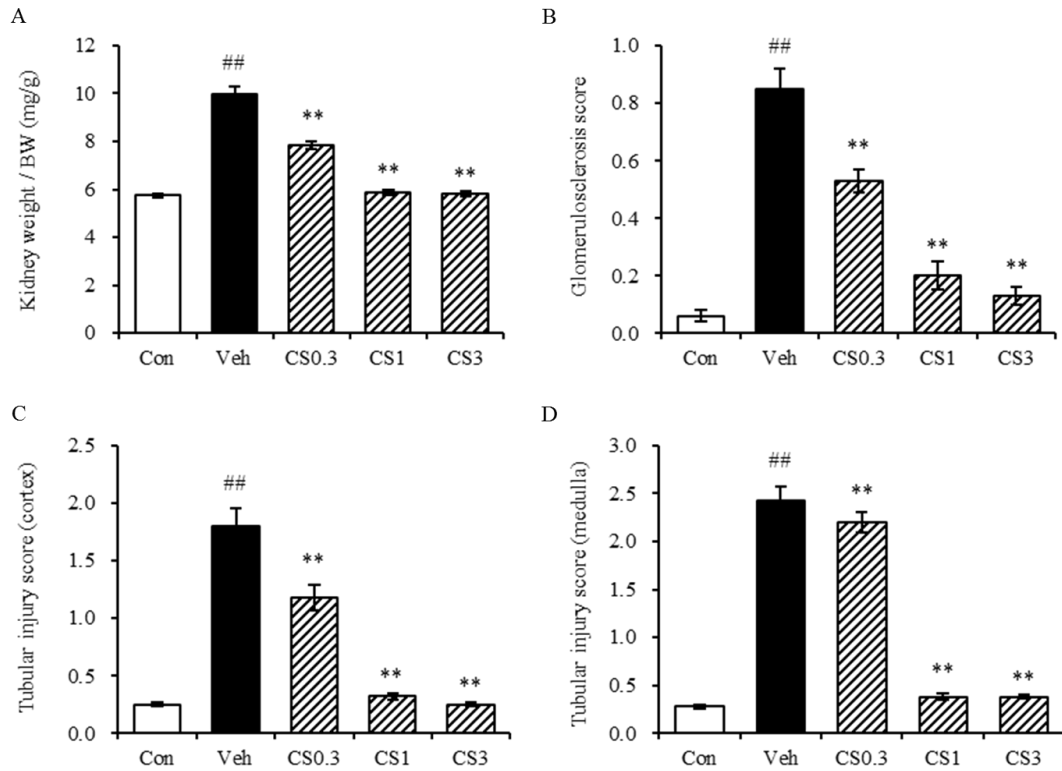


Figure 17. Effects of CS-3150 on kidney weight and histopathological changes in kidney of DOCA/salt-induced hypertensive rats (preventive study). From 7 weeks of age, DOCA was subcutaneously administered once a week for 4 weeks to uninephrectomized rats fed a high-salt (4% NaCl) diet. CS-3150 (0.3 to 3 mg/kg) was orally administered once a day for 4 weeks from the start date of DOCA administration. (A) At 11 weeks of age, the right kidney was removed under anesthesia and weighed. The kidney weight/body weight (BW) ratio was calculated. (B-D) The sections of excised right kidney were stained with periodic acid methenamine silver (PAM), and severity of glomerulosclerosis and tubular injury (cortex and medulla) was semiquantitatively evaluated. Con: control group (no DOCA administered). Veh: vehicle-treated group. CS0.3: CS-3150 (0.3 mg/kg)-treated group. CS1: CS-3150 (1 mg/kg)-treated group. CS3: CS-3150 (3 mg/kg)-treated group. Data are expressed as mean \pm S.E.M (N = 6 in each group). ## $P < 0.01$ vs. Con, ** $P < 0.01$ vs. Veh.

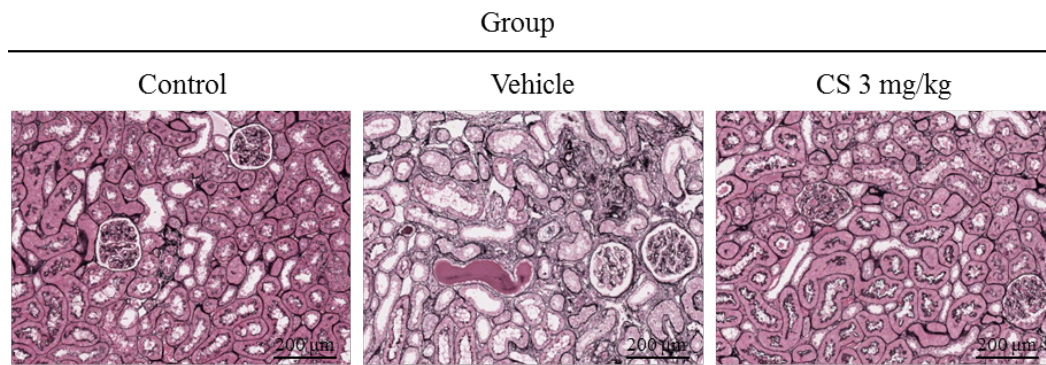


Figure 18. Representative photomicrographs showing glomerulosclerosis and tubular injury in DOCA/salt-induced hypertensive rats (preventive study).

Table 8. Effect of CS-3150 on urinary MCP-1 excretion in DOCA/salt-induced hypertensive rats at 11 weeks of age (preventive study).

Group	Urinary MCP-1 excretion (ng/day)
Control	1.7 ± 0.2
Vehicle	16.2 ± 1.9 ##
CS 0.3 mg/kg	8.0 ± 0.4 **
CS 1 mg/kg	1.9 ± 0.2 **
CS 3 mg/kg	1.5 ± 0.1 **

Data are expressed as mean ± S.E.M.

$P < 0.01$ vs. Control, ** $P < 0.01$ vs. Vehicle. CS: CS-3150.

Table 9. Effects of CS-3150 on mRNA expression levels in the kidney in DOCA/salt-induced hypertensive rats (preventive study).

Group	TGF-β1	Colla1	IL-6	MCP-1
Control	0.52 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.53 ± 0.02
Vehicle	1.40 ± 0.13 ##	2.39 ± 0.48 ##	2.54 ± 0.39 ##	1.69 ± 0.13 ##
CS 0.3 mg/kg	1.31 ± 0.10	1.44 ± 0.16 *	1.77 ± 0.17	1.43 ± 0.11
CS 1 mg/kg	0.75 ± 0.06 **	0.58 ± 0.09 **	0.59 ± 0.12 **	0.74 ± 0.09 **
CS 3 mg/kg	0.54 ± 0.01 **	0.38 ± 0.02 **	0.21 ± 0.04 **	0.55 ± 0.08 **

Group	p47phox	p67phox	nephrin	podocin	Sgk-1
Control	0.52 ± 0.04	0.56 ± 0.01	1.05 ± 0.09	1.00 ± 0.08	0.93 ± 0.11
Vehicle	1.46 ± 0.18 ##	1.55 ± 0.18 ##	0.81 ± 0.06 #	0.87 ± 0.07	0.77 ± 0.08
CS 0.3 mg/kg	1.16 ± 0.09	1.31 ± 0.13	0.92 ± 0.10	1.02 ± 0.09	0.90 ± 0.08
CS 1 mg/kg	0.74 ± 0.08 **	0.67 ± 0.05 **	1.24 ± 0.09 **	1.14 ± 0.06 *	1.06 ± 0.12
CS 3 mg/kg	0.56 ± 0.02 **	0.58 ± 0.03 **	1.21 ± 0.05 **	0.98 ± 0.08	1.17 ± 0.20

Data are expressed as mean ± S.E.M. ## $P < 0.01$ vs. Control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Vehicle. CS: CS-3150.

第3章 DOCA/食塩負荷高血圧ラットに対する CS-3150 の薬理作用

第2節 DOCA/食塩負荷高血圧ラットの病態に対する治療効果

[目的]

第1節にて、CS-3150はDOCA/食塩負荷高血圧ラットにおいて、DOCA/食塩負荷の開始と同時に投与することで、高血圧及び腎障害(尿タンパク排泄量の増加、腎肥大、腎組織病変の悪化[糸球体硬化、尿細管障害])の進展を用量依存的に抑制し、また腎臓における線維化・炎症・酸化ストレス関連遺伝子の発現増加を抑制することが明らかとなった。近年、複数の非臨床・臨床研究の結果から、これまで不可逆であると考えられていた腎障害が、病態早期からの集約的治療によって改善(=寛解)しうることがわかってきている[76, 77, 78]。第2章及び本章・第1節の検討にて、CS-3150の著明な腎保護効果が明らかとなり、CS-3150が腎障害の進展抑制だけでなく、一度発症した腎障害を改善するポテンシャルを有する可能性が考えられた。また、DOCA/食塩負荷高血圧ラットを用いて、薬剤投与による腎障害の治療効果を評価した報告は、これまでなされていない。そこで第2節では、DOCA/食塩負荷高血圧ラットにおいて、DOCA/食塩負荷を4週間実施して高血圧及び腎障害を惹起させた後にCS-3150の投与を開始して、一度発症した病態に対するCS-3150の治療効果を検討することとした。

[方法]

化合物

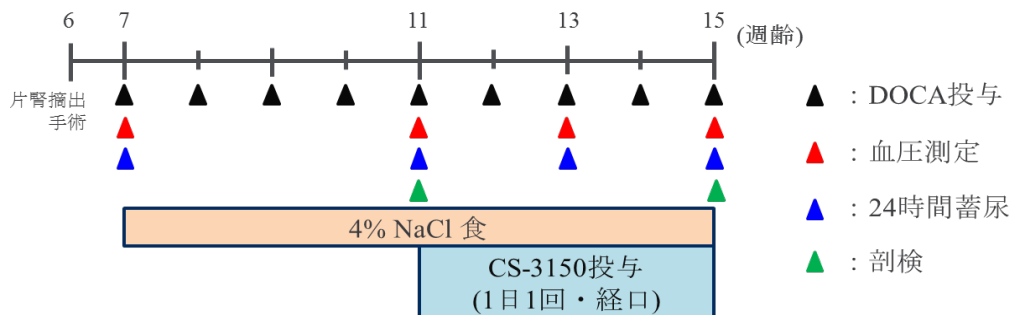
化合物の入手は、第1章・第1節に記載の方法に準じた。ラットへは、0.5%メチルセルロース (MC、和光純薬工業株式会社) に懸濁して、2 mL/kg の用量で経口投与した。

供試動物

6週齢の雄性 Wistar Kyoto (WKY/Izm) ラットを、株式会社フナバシファームより購入して使用した。動物の飼育条件は、第1章・第2節に記載の方法に準じた。

実験プロトコール

プロトコールの概要図を以下に示す。



6週齢の雄性 WKY/Izm ラットの左腎臓を摘出し、7週齢より食塩食 (4%NaCl を含む FR-2、株式会社フナバシファームで調製) を摂取させた。食塩負荷と同時に、0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC、和光純薬工業株式会社) に懸濁した DOCA (20 mg/kg) を、週1回4週間皮下投与した。control 群には DOCA の代わりに 0.5%CMC を投与した。

11週齢時に、control 群の一部の動物を剖検し、残りの動物について、0.5%CMC の週1回皮下投与及び 0.5%MC の1日1回経口投与を4週間実施した。同様に、11週齢時に DOCA 投与群の一部の動物を剖検し、残りの動物を以下の群構成の通り群分けして、化合物等の投与を4週間実施した。投与期間中、全ての動物に食塩食を摂取させた。

群	11 週齢時からの投与物質	
	週 1 回の皮下投与	1 日 1 回の経口投与
Vehicle	DOCA	0.5%MC
CS-3150 3 mg/kg	DOCA	CS-3150 3 mg/kg
Vehicle w/o DOCA	0.5%CMC	0.5%MC
CS-3150 3 mg/kg w/o DOCA	0.5%CMC	CS-3150 3 mg/kg

収縮期血圧の測定

7、11、13 及び 15 週齢時に、第 2 章に記載の方法に準じて、収縮期血圧を測定した。

採尿及び尿中パラメータの測定

7、11、13 及び 15 週齢時に、第 2 章に記載の方法に準じて尿サンプルを回収した。自動分析装置 (BiOLis24i premium) を用いて尿中タンパク濃度を測定し、1 日尿タンパク排泄量を算出した。また、電解質分析装置 (STAX-2) を用いて尿中 Na⁺及び K⁺濃度を測定し、尿中 Na⁺及び K⁺の 1 日排泄量を算出した。さらに、15 週齢時の尿サンプルにおいては、ELISA キット (R&D Systems) を用いて尿中 MCP-1 濃度を測定し、尿中 MCP-1 の 1 日排泄量を算出した。

剖検

11 及び 15 週齢時、本章・第 1 節に記載の方法に準じて、剖検を実施した。

腎臓の病理組織評価

11 及び 15 週齢時の剖検で得られた腎組織標本を用いて、糸球体硬化及び尿細管障害の評価を、いずれも本章・第 1 節に記載の方法に準じて実施した。

腎臓の遺伝子発現解析

11 及び 15 週齢時の剖検で得られた腎臓を用いて、各種遺伝子発現解析を、本章・第 1 節に記載の方法に準じて実施した。

統計解析

統計解析は、第 1 章・第 2 節に記載の方法に準じて実施した。

[結果]

収縮期血圧

本章・第1節と同様に、11週齢時において、vehicle群ではcontrol群に比べて有意な血圧上昇が認められ、DOCA投与の継続により、13及び15週齢時にはさらなる血圧上昇が認められた (Figure 19A)。DOCA投与を継続した条件下で、CS-3150 (3 mg/kg) は11週齢時からの投与により、13週齢時において有意な昇圧抑制作用を示したが、15週齢時の収縮期血圧はvehicle群と同程度であった (Figure 19A)。また、11週齢時からDOCA投与を中断した群では、13及び15週齢いずれの時点においても、vehicle群との有意な差異は認められなかった。一方、DOCA投与を中断し且つCS-3150を投与した群では、vehicle群に比べて有意な血圧低下が認められ、13及び15週齢いずれの時点においても、control群と同程度まで低下していた。

尿タンパク排泄量

本章・第1節と同様に、11週齢時において、vehicle群ではcontrol群に比べて尿タンパク排泄量の有意な増加が認められ、DOCA投与の継続により、13及び15週齢時にはさらなる尿タンパク排泄量の増加が認められた (Figure 19B)。DOCA投与を継続した条件下で、CS-3150は11週齢時からの投与により、vehicle群に比べて有意に尿タンパク排泄量を低下させた (Figure 19B)。また、11週齢時からDOCA投与を中断した群でも、尿タンパク排泄量の経時的且つ有意な低下が認められ、DOCA投与を中断し且つCS-3150を投与した群では、さらにcontrol群と同程度まで低下していた。

その他の尿パラメータ (尿量、尿中 Na⁺、K⁺及びMCP-1 排泄量)

本章・第1節と同様に、11週齢時において、vehicle群ではcontrol群に比べて尿量の有意な増加が認められ、DOCA投与の継続により13及び15週齢時においてもその高い尿量が維持されていた (Figure 20A)。11週齢時からのCS-3150の投与及び/またはDOCA投与の中断によって、その尿量は有意に低下していた (Figure 20A)。一方で、尿中 Na⁺

及び K^+ 排泄量も vehicle 群で有意に増加していたが、CS-3150 の投与及び/または DOCA 投与の中断による有意な影響は認められなかった (Figure 20B、20C)。また、Vehicle 群では control 群に比べ、尿中 MCP-1 排泄量の有意な増加が認められ、CS-3150 の投与及び/または DOCA 投与の中断によりその増加が有意に抑制されていた (Table 10)。

腎臓重量及び腎臓病理評価

本章・第 1 節と同様に、11 週齢時において、vehicle 群では control 群に比べて腎臓重量/体重比の有意な増加が認められ、DOCA 投与の継続により、15 週齢時においてもその腎肥大が維持されていた (Figure 21A)。DOCA 投与を継続した条件下で、CS-3150 は 11 週齢時からの投与により、vehicle 群に比べて有意に腎臓重量/体重比を低下させた (Figure 21A)。また、11 週齢時から DOCA 投与を中断した群でも、腎臓重量/体重比の有意な低下が認められ、DOCA 投与を中断し且つ CS-3150 を投与した群では、さらに control 群と同程度まで低下していた。

本章・第 1 節と同様に、11 週齢時において、vehicle 群では control 群に比べて糸球体硬化指数及び尿細管障害スコアの有意な増加が認められ、DOCA 投与の継続により、15 週齢時においてそれら組織病変 (特に糸球体硬化) の悪化が認められた (Figure 21B、21C、21D、22)。DOCA 投与を継続した条件下で、CS-3150 は 11 週齢時からの投与により、vehicle 群に比べて糸球体硬化指数及び尿細管障害スコアを有意に低下、つまり腎組織病変を改善した (Figure 21)。また、11 週齢時から DOCA 投与を中断した群でも、同様の腎組織病変の改善が認められ、DOCA 投与を中断し且つ CS-3150 を投与した群では、さらなる改善作用が認められた。

腎遺伝子発現解析

第 3 章・第 1 節と同様に、11 週齢時において、vehicle 群では control 群に比べ、線維化マーカーの TGF- β 1・Colla1、炎症性サイトカインの IL-6・MCP-1、活性酸素産生に関する NADPH オキシダーゼのサブユニットである p47phox・p67phox の、腎臓における

mRNA 発現量がそれぞれ有意に増加し、同様の増加が 15 週齢時にも認められた (Table 11)。CS-3150 は 11 週齢時からの投与により、これらの mRNA 発現量を有意に低下させた (Table 11)。11 週齢時から DOCA 投与を中断した群でも、同様の mRNA 発現量の低下が認められ、DOCA 投与を中断し且つ CS-3150 を投与した群では、さらに発現量が低下していた。

ポドサイトのスリット膜の key component である nephrin 及び podocin の腎臓における mRNA 発現量は、本章・第 1 節と同様に 11 週齢時において、vehicle 群では control 群に比べて低下しており、nephrin に関しては有意な差が認められた (Table 11)。DOCA 投与の継続により、15 週齢時も同様の傾向が認められた。CS-3150 は 11 週齢時からの投与により、両遺伝子の mRNA 発現量を増加させ、nephrin に関しては有意な効果が認められた (Table 11)。11 週齢時から DOCA 投与を中断した群、及び DOCA 投与を中断し且つ CS-3150 を投与した群でも、同様の mRNA 発現量の増加が認められた。

アルドステロン/MR シグナルの下流分子として知られる Sgk-1 の腎臓における mRNA 発現量は、本章・第 1 節と同様に、11 週齢時において vehicle 群と control 群の間に有意な差は認められなかった。15 週齢においては、control 群と比べ vehicle 群で若干の発現低下が認められ、11 週齢時から CS-3150 を投与した群、DOCA 投与を中断した群、及び DOCA 投与を中断し且つ CS-3150 を投与した群では、11 週齢時の vehicle 群と比較して発現低下が認められた。

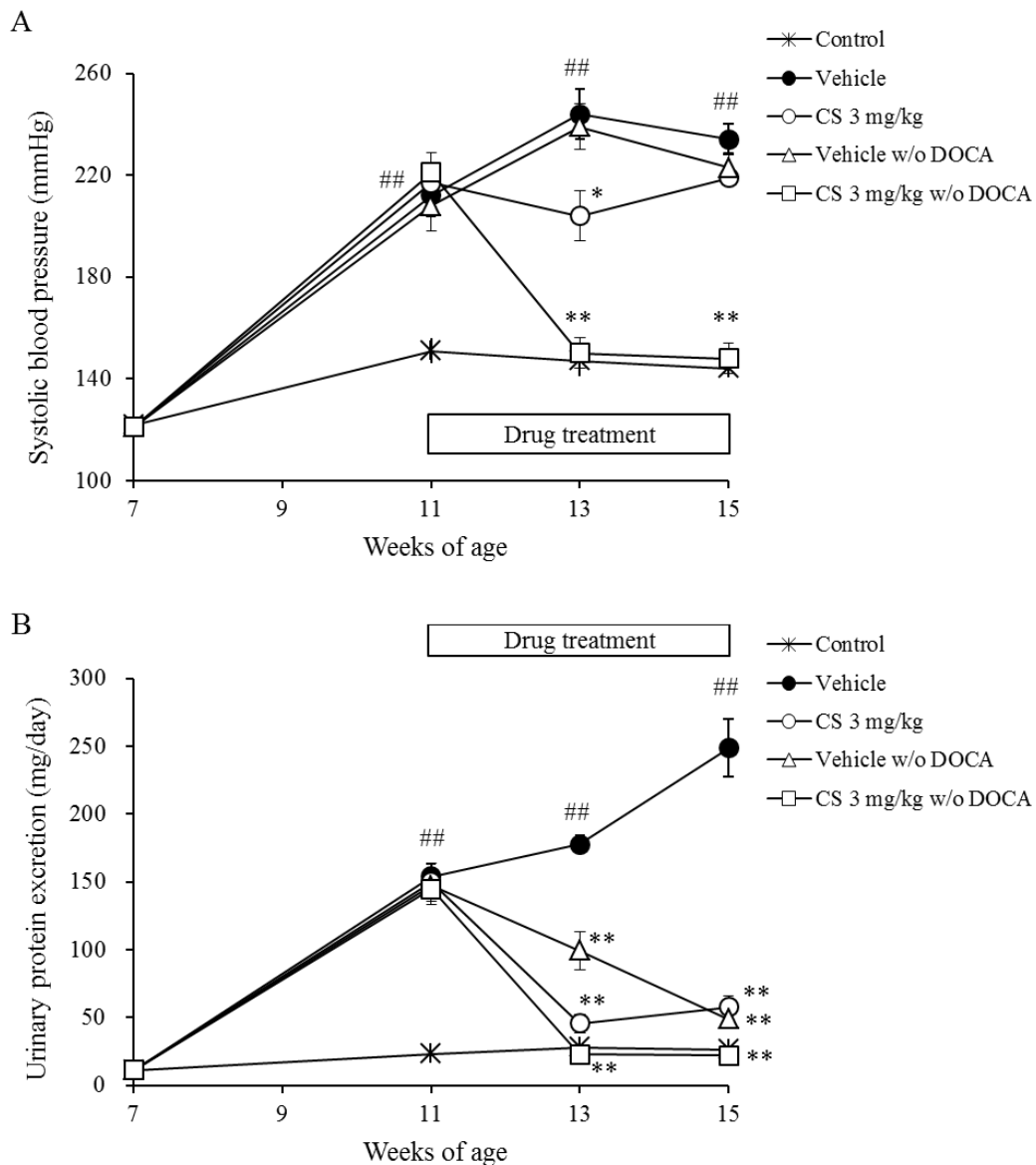


Figure 19. Effects of CS-3150 on systolic blood pressure and urinary protein excretion in DOCA/salt-induced hypertensive rats (therapeutic study). From 7 weeks of age, DOCA was subcutaneously administered once a week for 4 weeks to uninephrectomized rats fed a high-salt (4% NaCl) diet. From 11 weeks of age, CS-3150 (3 mg/kg) was orally administered once a day for 4 weeks with or without continuous DOCA administration. (A) Systolic blood pressure was measured at 7, 11, 13 and 15 weeks of age. (B) Urine was collected for 24 h at 7, 11, 13 and 15 weeks of age, and urinary volume and protein concentration were measured. Urinary protein excretion for 24 h was calculated. Data are expressed as mean \pm S.E.M (N = 6 in each group).

$P < 0.01$ vs. control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle.

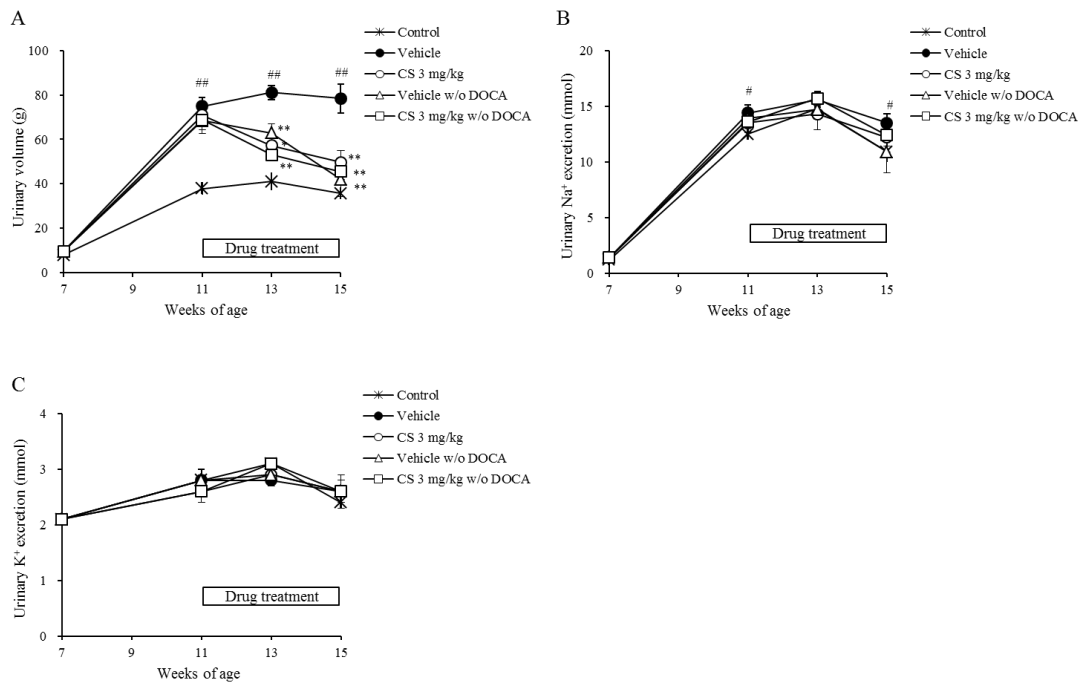


Figure 20. Effects of CS-3150 on urinary volume, Na⁺ and K⁺ excretions in DOCA/salt-induced hypertensive rats (therapeutic study). From 7 weeks of age, DOCA was subcutaneously administered once a week for 4 weeks to uninephrectomized rats fed a high-salt (4% NaCl) diet. From 11 weeks of age, CS-3150 (3 mg/kg) was orally administered once a day for 4 weeks with or without continuous DOCA administration. Urine was collected for 24 h at 7, 11, 13 and 15 weeks of age, and urinary volume (A) and Na⁺ and K⁺ concentrations were measured. Urinary Na⁺ (B) and K⁺ (C) excretions for 24 h were calculated. Data are expressed as mean ± S.E.M (N = 6 in each group). # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01 vs. control, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs. vehicle.

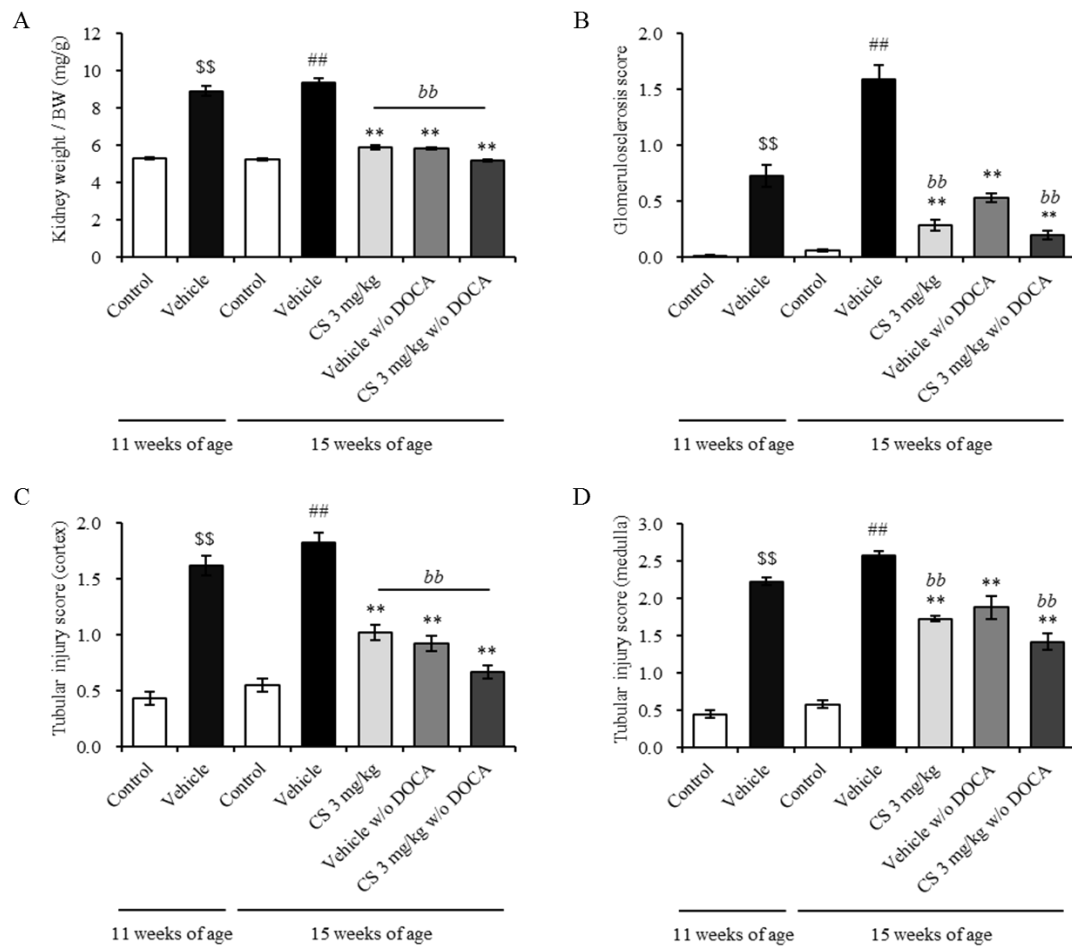


Figure 21. Effects of CS-3150 on kidney weight and histopathological changes in kidney of DOCA/salt-induced hypertensive rats (therapeutic study). From 7 weeks of age, DOCA was subcutaneously administered once a week for 4 weeks to uninephrectomized rats fed a high-salt (4% NaCl) diet. From 11 weeks of age, CS-3150 (3 mg/kg) was orally administered once a day for 4 weeks with or without continuous DOCA administration. (A) At 11 and 15 weeks of age, the right kidney was removed under anesthesia and weighed. The kidney weight/body weight (BW) ratio was calculated. (B-D) The sections of excised right kidney were stained with periodic acid methenamine silver (PAM), and severity of glomerulosclerosis and tubular injury (cortex and medulla) was semiquantitatively evaluated. \$\$ $P < 0.01$ vs. control at 11 weeks of age, ## $P < 0.01$ vs. control at 15 weeks of age, bb $P < 0.01$ vs. vehicle at 11 weeks of age, ** $P < 0.01$ vs. vehicle at 15 weeks of age.

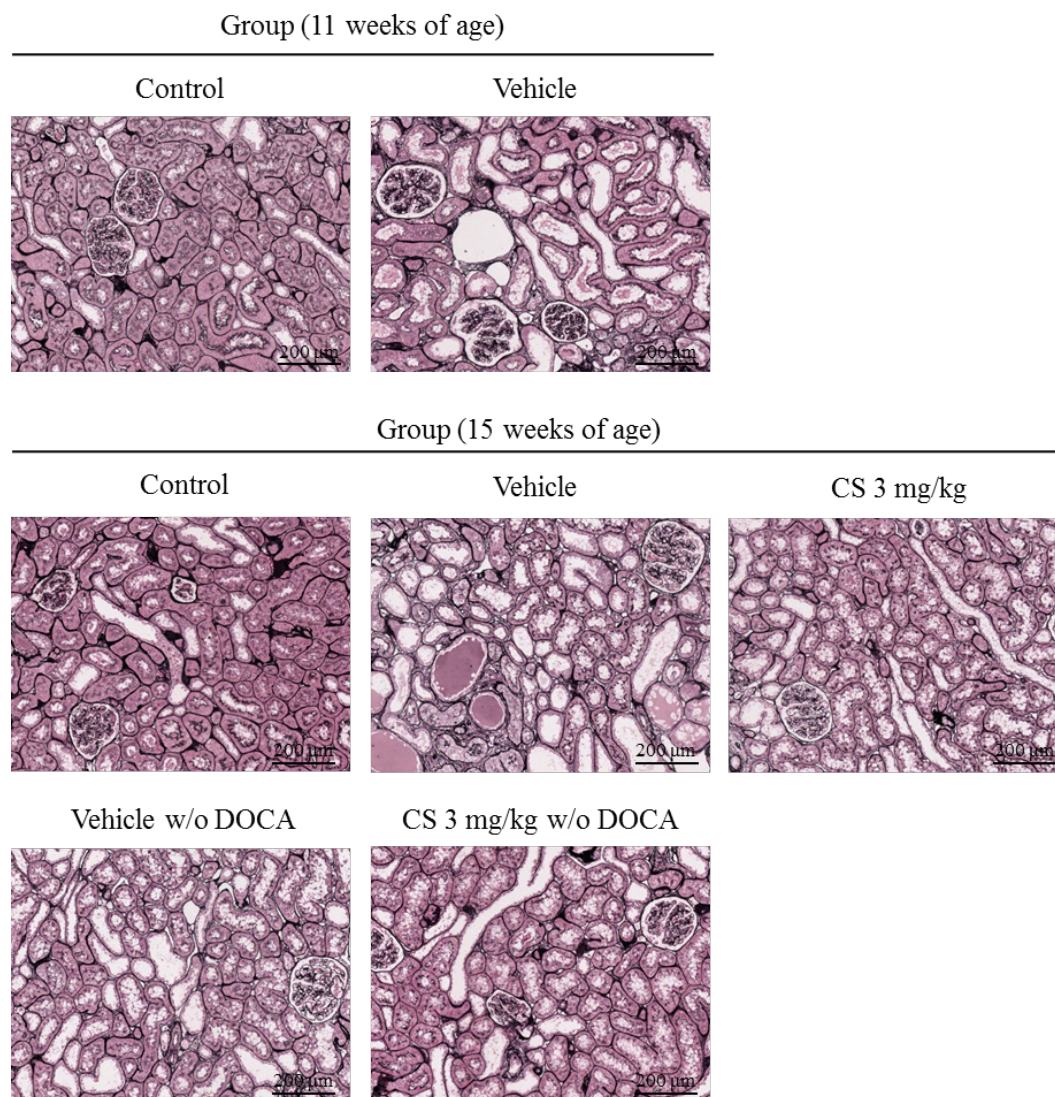


Figure 22. Representative photomicrographs showing glomerulosclerosis and tubular injury in DOCA/salt-induced hypertensive rats. CS: CS-3150.

Table 10. Effect of CS-3150 on urinary MCP-1 excretion in DOCA/salt-induced hypertensive rats at 15 weeks of age (therapeutic study)

Group	Urinary MCP-1 excretion (ng/day)
Control	1.5 ± 0.2
Vehicle	18.4 ± 1.8 ##
CS 3 mg/kg	2.3 ± 0.2 **
Vehicle w/o DOCA	2.3 ± 0.1 **
CS 3 mg/kg w/o DOCA	1.3 ± 0.1 **

Data are expressed as mean ± S.E.M.

$P < 0.01$ vs. Control, ** $P < 0.01$ vs. Vehicle. CS: CS-3150.

Table 11. Effects of CS-3150 on mRNA expression levels in the kidney in DOCA/salt-induced hypertensive rats (therapeutic study).

Weeks of age	Group	TGF- β 1	Colla1	IL-6	MCP-1
11	Control	0.47 \pm 0.02	0.47 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.43 \pm 0.03
	Vehicle	1.46 \pm 0.07 ^{\$\$}	2.54 \pm 0.24 ^{\$\$}	3.71 \pm 0.46 ^{\$\$}	1.61 \pm 0.05 ^{\$\$}
	Control	0.63 \pm 0.03	0.43 \pm 0.04	0.21 \pm 0.04	0.56 \pm 0.05
	Vehicle	1.64 \pm 0.07 ^{##}	2.79 \pm 0.31 ^{##}	1.63 \pm 0.28 ^{##}	1.58 \pm 0.07 ^{##}
15	CS 3 mg/kg	1.14 \pm 0.08 ^{**b}	1.01 \pm 0.08 ^{**bb}	0.97 \pm 0.11 ^{bb}	1.32 \pm 0.08 ^b
	Vehicle w/o DOCA	1.10 \pm 0.07 ^{**bb}	0.97 \pm 0.12 ^{**bb}	0.75 \pm 0.11 ^{*bb}	1.12 \pm 0.07 ^{**bb}
	CS 3 mg/kg w/o DOCA	0.86 \pm 0.04 ^{**bb}	0.75 \pm 0.06 ^{**bb}	0.43 \pm 0.05 ^{**bb}	0.82 \pm 0.06 ^{**bb}

Weeks of age	Group	p47phox	p67phox	nephrin	podocin	Sgk-1
11	Control	0.46 \pm 0.05	0.47 \pm 0.02	1.20 \pm 0.09	0.88 \pm 0.08	1.00 \pm 0.10
	Vehicle	1.86 \pm 0.10 ^{\$\$}	1.50 \pm 0.08 ^{\$\$}	0.77 \pm 0.05 ^{\$\$}	0.67 \pm 0.02	1.16 \pm 0.06
	Control	0.48 \pm 0.04	0.49 \pm 0.04	1.37 \pm 0.14	1.19 \pm 0.09	0.90 \pm 0.07
	Vehicle	1.09 \pm 0.14 ^{##}	1.97 \pm 0.14 ^{##}	0.63 \pm 0.07 ^{##}	1.00 \pm 0.13	0.71 \pm 0.04 [#]
15	CS 3 mg/kg	0.94 \pm 0.07 ^{bb}	0.93 \pm 0.06 ^{**bb}	1.24 \pm 0.07 ^{**b}	1.21 \pm 0.06 ^b	0.82 \pm 0.06 ^{bb}
	Vehicle w/o DOCA	0.96 \pm 0.10 ^{bb}	1.04 \pm 0.09 ^{**bb}	0.99 \pm 0.07 ^{**b}	1.09 \pm 0.08 ^{bb}	0.78 \pm 0.09 ^{bb}
	CS 3 mg/kg w/o DOCA	0.66 \pm 0.07 ^{*bb}	0.68 \pm 0.04 ^{**bb}	1.02 \pm 0.10 ^{**b}	0.99 \pm 0.09 ^b	0.72 \pm 0.03 ^{bb}

Data are expressed as mean \pm S.E.M. ^{\$\$} P < 0.01 vs. Control (11 weeks of age), ^{##} P < 0.01 vs. Control (15 weeks of age).

^b P < 0.05, ^{bb} P < 0.01 vs. Vehicle (11 weeks of age), ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01 vs. Vehicle (15 weeks of age). CS: CS-3150.

第3章 DOCA/食塩負荷高血圧ラットに対する CS-3150 の薬理作用

[考察]

本章では、DOCA/食塩負荷高血圧ラット (以下 DOCA ラット) を用いて、その病態に対する CS-3150 の進展抑制及び治療効果を評価した。

第1節では、DOCA/食塩負荷の開始と同時に CS-3150 (0.3~3 mg/kg) を4週間投与して、高血圧及び腎障害の進展に対する作用を評価した。CS-3150 は、DOCA/食塩負荷により誘発される血圧上昇及び腎障害 (尿タンパク排泄量の増加、腎肥大、腎組織病変の悪化 [糸球体硬化、尿細管障害]) を用量依存的に抑制した。本章の冒頭で述べたように、DOCA ラットは、MR 関連高血圧症のうち、MR のリガンドである血中アルドステロン濃度が高値を示す病態を反映したモデルとされている。本節の結果は、CS-3150 がこのような病態の進展を抑制する有望な治療薬となりうることを示している。

また、興味深いことに、0.3 mg/kg の用量においては、昇圧抑制作用がほとんど認められなかったにもかかわらず、腎障害に対して有意な抑制効果が認められた。この結果は、CS-3150 の腎保護効果が、その昇圧抑制作用だけでは説明できないことを示唆している。アルドステロン/MR シグナルは腎臓において、細胞外基質 (コラーゲンなど) の蓄積を介した尿細管間質線維化 [79, 80] や炎症性サイトカインの発現増加 [81, 82]、NADPH オキシダーゼ依存性の活性酸素産生 [83, 84] やポドサイト障害 [11, 59] を惹起し、腎障害の病態形成に直接的に寄与していることが、多くの研究報告から明らかとなっている。本節での検討で、DOCA ラットの腎臓において、線維化 (TGF- β 1・Coll1a1)、炎症 (IL-6・MCP-1)、酸化ストレス (p47phox・p67phox) 関連マーカーの mRNA 発現増加、及びポドサイトが形成するスリット膜の構成分子 (nephrin・podocin) の mRNA 発現低下が認められ、CS-3150 の投与によりこれらの遺伝子発現変動が抑制されていた。また、尿中 MCP-1 排泄量の増加も、CS-3150 投与により抑制されることが確認された。これらの結果から、DOCA ラットの腎障害進展に対する CS-3150 の抑制効果は、昇圧抑制による間接的な作

用だけでなく、腎臓における抗線維化、抗炎症、抗酸化ストレス及びポドサイト保護を介した直接的な作用も関与していることが示唆された。なお、残念ながら今回、DOCA ラットの腎臓において、MR 活性化の指標とされる Sgk-1 の mRNA 発現増加は認められなかった。明確な原因は不明だが、Sgk-1 の発現はアルドステロン/MR シグナル以外にも複数の経路で制御されていることが報告されており [85, 86]、DOCA による MR 活性化を、Sgk-1 の発現増加を指標として明確には検出できなかった可能性が示唆された。

第 2 節では、DOCA/食塩負荷を 4 週間実施して高血圧及び腎障害を惹起させた後に CS-3150 を 4 週間投与して、一度発症した病態、特に腎障害に対する CS-3150 の治療効果を評価した。これまで、糸球体硬化及び尿細管障害といった腎組織病変は、一度形成されてしまうと治らない不可逆的なものと考えられていた [87, 88] が、近年の非臨床及び臨床研究により、それが元に戻りうることが明らかとなってきた [89, 90, 91, 92]。実際、高血圧や糖尿病、高脂血症といった腎障害の原因に対する集約的な治療により、腎障害の寛解が達成されることが報告されている [76, 77, 78]。DOCA ラットにおける腎障害の主要因は MR 活性化であり、本節における CS-3150 の投与は、前述した病態の主要因に対する集約的な治療を模倣したものと言えるだろう。まず驚いたことに、DOCA/食塩負荷を継続した条件下において CS-3150 は、血圧にほとんど影響を与えることなく、尿タンパク排泄量及び腎臓重量を著明に低下させ、糸球体硬化及び尿細管障害を劇的に改善した。この結果は、DOCA/食塩負荷により誘発された腎障害を、CS-3150 が血圧非依存的に回復させたことを示しており、DOCA ラットにおいて薬剤投与により腎障害が改善することを明らかにした最初の知見である。この腎障害改善のメカニズムにはいくつかの仮説が考えられる。例えば、ACE 阻害薬や ARB での治療による腎臓の組織修復の過程で、硬化部位における細胞外マトリックス蛋白の分解促進が関与していることが報告されている [93, 94]。これらの報告では、細胞外マトリックス蛋白の分解を阻害することで知られる plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [95] の発現が腎臓において低下しており、その結果マトリックスメタロプロテアーゼの活性上昇及び TGF- β 1 や

Collagen type I&IV の発現低下が起きていることが示されている。本節での検討においても、腎臓において増加した TGF- β 1 及び Col1a1 の mRNA 発現量が CS-3150 の投与により低下していた。Brown らは、アルドステロンによって惹起される腎障害への PAI-1 の関与について報告しており [96]、これらの知見を総合すると、DOCA ラットの腎臓において、CS-3150 の投与による PAI-1 の発現低下を介し、一度蓄積した細胞外マトリックス蛋白の分解が進んだのかもしれない。また、最近の複数の報告では、一度障害を受けた腎臓の糸球体・尿細管で組織の修復・再生機能が働くことが示唆されており、腎臓内にも幹/前駆細胞が存在していて、隣接した障害を受けていない細胞の分裂を介して組織修復に寄与しているとも言われている [97, 98, 99]。例えば、前駆体様細胞が近位及び遠位尿細管に局在していて、虚血に伴って障害を受けた部位に遊走することが報告されている [100]。アルポート症候群 (糸球体基底膜に発現する Collagen type IV の遺伝子変異が原因で生じる糸球体腎炎 [101]) のモデルマウスにおいて、骨髄細胞の移植によりポドサイトが再生して腎機能が改善したとの報告もある [102]。本節での検討において、CS-3150 投与による DOCA ラットの腎臓の修復過程にこれらの細胞がどのように関与しているのかを明らかにするには、より詳細な検討が必要であろう。

また、DOCA 投与を中断した条件下においては、CS-3150 は著明な血圧低下を伴って、腎障害のさらなる改善作用を示した。序論でも述べたように、MR 活性化の古典的な作用として、腎尿細管における Na⁺再吸収を介した体液量調節による血圧制御が知られているが、腎臓以外の組織 (脳や血管) に発現した MR も血圧制御に関与していることが明らかとなってきた [103, 104]。例えば Rahmouni らは、DOCA ラットの脳室内に MR 拮抗薬を投与すると血圧が低下することを報告しており [105]、脳内 MR 活性化が交感神経系の活性化を介して血圧上昇を引き起こしている可能性が示唆されている [106]。また、血管平滑筋細胞特異的に MR を欠損させたマウスでは加齢に伴う血圧上昇が抑制され [107]、逆に血管内皮細胞特異的に MR を過剰発現させたマウスでは血圧が上昇する [108] など、血管組織の MR 活性化が血圧上昇に寄与していることを支持する報告がなされている。これらの知見を総合すると、本節での検討において、DOCA ラッ

トの腎臓及び腎臓以外の組織の MR 活性化が、「CS-3150 の投与」と「DOCA 投与中断」の組合せによって完全に抑制された結果、腎障害と高血圧の両方が、control 群と同程度にまで著明に改善したのではないかと推察された。なお、残念ながら本節においても、第 1 節と同様に、MR 活性化の指標とされる Sgk-1 の腎臓における mRNA 発現について、DOCA 投与や薬剤の効果を反映した明確な変動を確認することはできなかった。

尿中への Na⁺排泄促進 (いわゆる利尿作用) は、MR 拮抗薬のメカニズムベースで生じる作用として知られている [38]。しかしながら、特に高食塩負荷による高血圧モデルラットにおいて、MR 拮抗薬による利尿効果を評価することは容易ではないことが、古くから複数の研究報告により示されている [109, 110]。詳細な原因は不明だが、実際に本章の検討でも、CS-3150 を投与した DOCA ラットにおいて、尿中への Na⁺排泄量の増加は認められなかった。また、尿量の結果は血圧及び尿中タンパク排泄量の結果とよく相関しており、これは単純に、DOCA/食塩負荷によって惹起された病態に対する CS-3150 の抑制効果を反映したものと考えている。

近年、Rafiq らは、Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおいて、高食塩食 (8%NaCl) 負荷によって惹起された腎障害が、給餌を通常食 (0.3%NaCl) に切り替えることで改善することを報告している [111]。また、別の報告では、腎不全モデルの 1 つとして汎用されているアデニン負荷ラットにおいて、アデニン負荷を休止すると腎障害が回復することが示されている [112]。今回、CS-3150 を投与せずとも、DOCA 投与を中断しただけで、尿タンパク排泄量及び腎臓重量が低下し、糸球体硬化及び尿細管障害の改善が認められた。これらの結果は、病態形成に寄与している主要な因子 (つまり、Dahl ラットにおける高食塩食、アデニン負荷ラットにおけるアデニン、DOCA ラットにおける DOCA) を取り除くことが、腎障害の寛解につながる可能性があることを示唆している。臨床において、腎障害の病態形成には複数の因子が複雑に関与している [113, 114] が、それらの中で病態形成に関与するメインパスウェイを特定しそれに対する集約的治療を行うことで、腎障害の寛解を達成できるかもしれないということを、これらの知見は支持しているとも言えるだろう。

以上、本章での検討により、DOCA ラットにおいて、CS-3150 はその高血圧及び腎障害の進展を抑えるだけでなく、一度形成された病態を改善することが明らかとなった。特に、CS-3150 の著明なタンパク尿低下作用は、糸球体硬化及び尿細管障害の明確な組織学的改善を伴っており、DOCA ラットにおいてこのような腎障害の寛解を示した報告はこれまでなされておらず、本検討結果が最初の知見である。これらの結果を総合すると、CS-3150 は高血圧及び腎障害の進展を抑制する有望な治療薬になりうるるとともに、腎障害の寛解を達成するための治療手段の1つにもなりうると思われた。

総括

本研究により得られた知見を、以下にまとめる。

- 1) CS-3150 は既存 MR 拮抗薬と比べて、強力且つ持続性のある MR 拮抗活性と、極めて高い MR 選択性を示した。
- 2) MR 関連高血圧症のモデル動物である Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおいて、CS-3150 は高血圧及び心・腎障害の進展を抑制し、その効果は既存 MR 拮抗薬に比べて用量ベースで約 200 倍と極めて強力であった。また、昇圧抑制作用に依存しない直接的な臓器保護作用や用量反応性の観点でも優れている可能性が示唆された。
- 3) MR 関連高血圧症のモデル動物である DOCA/食塩負荷高血圧ラットにおいて、CS-3150 は高血圧及び腎障害の進展を抑制するだけでなく、一度形成された病態の治療効果も示した。特に腎障害においては、糸球体硬化及び尿細管障害の明確な組織学的改善を伴った著明なタンパク尿低下作用を示し、CS-3150 による腎障害の寛解を示唆する初めての知見が得られた。

本研究を通じて、既存 MR 拮抗薬に比して優れたプロファイルを有する新規 MR 拮抗薬 CS-3150 の薬理学的特徴を明らかにすることができた。特に、上記 3) 項の DOCA/食塩負荷高血圧ラットにおける腎障害改善作用は初めての知見であり、MR 拮抗薬により、これまで報告されていた腎症の「進展抑制」だけではなく「治療」が可能となることを示唆した点は、臓器保護薬としての MR 拮抗薬の新たな可能性を見出したともいえる。今後は、

1. CS-3150 の腎障害改善作用の詳細なメカニズム解明：①腎組織修復の過程で何が起きているのか？②他の腎障害モデルでも同様の事象が起こりうるのか？
2. 既存 MR 拮抗薬との分子レベルでの差異化点の追及：①血圧に依存しない直接的な臓器保護作用の観点で優れているのはなぜなのか？②他の差異化点はないのか？

という 2 つの観点からさらに検討を進め、CS-3150 特異的な性質を明らかにしていくと共に、MR 拮抗薬を用いた薬理研究の新たな展開につながるような成果を創出していきたいと考えている。

参考文献

1. Poulter NR, Prabhakaran D, Caulfield M. Hypertension. *Lancet*. 2015;386:801-812.
2. 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会編. 高血圧治療ガイドライン 2014 (JSH2014).
3. アンメット・メディカル・ニーズに対する医薬品の開発・承認状況. JPMA News Letter 2010;140 24-26.
4. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ*. 2009;338:b1665.
5. Egan BM, Li J, Hutchison FN, et al. Hypertension in the United States, 1999 to 2012: progress toward Healthy People 2020 goals. *Circulation*. 2014;130:1692-1699.
6. Persell SD. Prevalence of resistant hypertension in the United States, 2003-2008. *Hypertension* 2011;57:1076-1080.
7. Calhoun DA, Jones D, Textor S, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. 2008;117:e510-526.
8. Sim JJ, Bhandari SK, Shi J, et al. Comparative risk of renal, cardiovascular, and mortality outcomes in controlled, uncontrolled resistant, and nonresistant hypertension. *Kidney Int*. 2015;88:622-632.
9. Marver D, Kokko JP. Renal target sites and the mechanism of action of aldosterone. *Miner. Electrolyte Metab*. 1983;9:1-18.
10. Nishiyama A, Yao L, Fan Y, et al. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension*. 2005;45:710-716.

11. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, et al. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension*. 2007;49:355-364.
12. Lombès M, Alfaidy N, Eugene E, et al. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation*. 1995;92:175-182.
13. Takeda R, Hatakeyama H, Takeda Y, et al. Aldosterone biosynthesis and action in vascular cells. *Steroids*. 1995;60:120-124.
14. Gilbert KC, Brown NJ. Aldosterone and inflammation. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes*. 2010;17:199-204.
15. Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2008;17:174-180.
16. Fiebeler A, Luft FC. The mineralocorticoid receptor and oxidative stress. *Heart Fail. Rev*. 2005;10:47-52.
17. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, et al. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2005;45:1243-1248.
18. Catena C, Colussi G, Nadalini E, et al. Cardiovascular outcomes in patients with primary aldosteronism after treatment. *Arch. Intern. Med*. 2008;168:80-85.
19. Ouzan J, Pérault C, Lincoff AM, et al. The role of spironolactone in the treatment of patients with refractory hypertension. *Am. J. Hypertens*. 2002;15:333-339.
20. Saruta T, Kageyama S, Ogihara T, et al. Efficacy and safety of the selective aldosterone blocker eplerenone in Japanese patients with hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study. *J. Clin. Hypertens (Greenwich)*. 2004;6:175-183.
21. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med*. 1999;341:709-717.
22. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients

- with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:1309-1321.
23. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N. Engl. J. Med.* 2011;364:11-21.
 24. Rossing K, Schjoedt KJ, Smidt UM, et al. Beneficial effects of adding spironolactone to recommended antihypertensive treatment in diabetic nephropathy: a randomized, double-masked, cross-over study. *Diabetes Care.* 2005;28:2106-2112.
 25. Epstein M, Williams GH, Weinberger M, et al. Selective aldosterone blockade with eplerenone reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;1:940-951.
 26. Furumatsu Y, Nagasawa Y, Tomida K, et al. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system triple blockade on non-diabetic renal disease: addition of an aldosterone blocker, spironolactone, to combination treatment with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker. *Hypertens. Res.* 2008;31:59-67.
 27. Shibata H, Itoh H. Mineralocorticoid receptor-associated hypertension and its organ damage: clinical relevance for resistant hypertension. *Am J Hypertens.* 2012;25:514-523.
 28. Glicklich D, Frishman WH. Drug therapy of apparent treatment-resistant hypertension: focus on mineralocorticoid receptor antagonists. *Drugs.* 2015;75:473-485.
 29. Solomon SD, Claggett B, Lewis EF, et al.. Influence of ejection fraction on outcomes and efficacy of spironolactone in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J.* 2016;37:455-462.
 30. Rose LI, Underwood RH, Newmark SR, et al. Pathophysiology of spironolactone-induced gynecomastia. *Ann. Intern. Med.* 1977;87:398-403.
 31. Jeunemaitre X, Chatellier G, Kreft-Jais C, et al. Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. *Am. J. Cardiol.* 1987;60:820-825.
 32. Cook CS, Berry LM, Bible RH, et al. Pharmacokinetics and metabolism of [¹⁴C]eplerenone

- after oral administration to humans. *Drug Metab. Dispos.* 2003;31:1448-1455.
33. Weinberger MH, Roniker B, Krause SL, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2002;15:709-716.
 34. Sica DA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mineralocorticoid blocking agents and their effects on potassium homeostasis. *Heart. Fail. Rev.* 2005;10:23-29.
 35. Croom KF, Perry CM. Eplerenone: a review of its use in essential hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2005;5:51-69.
 36. Canne BL, Chen J, Dalrymple LE, et al. WO Patent WO2006/012642.
 37. Asoh Y, Tsuruoka H, Hayashi N, et al. Discovery of novel atropisomerism in CS-3150 as a potent non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist. Unpublished results.
 38. Muller OG, Parnova RG, Centeno G, et al. Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14:1107-1115.
 39. Nariai T, Fujita K, Mori M, et al. SM-368229, a novel promising mineralocorticoid receptor antagonist, shows antihypertensive efficacy with minimal effect on serum potassium level in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2012;59:458-464.
 40. Corvol P, Mahoudeau JA, Valcke JC, et al. Sexual side-effects of spironolactones. Possible mechanisms of their anti-androgen action. *Nouv. Presse Med.* 1976;5:691-694.
 41. de Gasparo M, Whitebread SE, Preiswerk G, et al. Antialdosterones: incidence and prevention of sexual side effects. *J. Steroid Biochem.* 1989;32:223-227.
 42. Delyani JA, Rocha R, Cook CS, et al. Eplerenone: a selective aldosterone receptor antagonist (SARA). *Cardiovasc. Drug Rev.* 2001;19:185-200.
 43. Kaukonen AM, Lennernäs H, Mannermaa JP, et al. Water-soluble beta-cyclodextrins in paediatric oral solutions of spironolactone: preclinical evaluation of spironolactone bioavailability from solutions of beta-cyclodextrin derivatives in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 1998;50:611-619.

44. Cook CS, Zhang L, Ames GB, et al. Single- and repeated-dose pharmacokinetics of eplerenone, a selective aldosterone receptor blocker, in rats. *Xenobiotica*. 2003;33:305-321.
45. Takeda Y. Effects of eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor antagonist, on clinical and experimental salt-sensitive hypertension. *Hypertens. Res*. 2009;32:321-324.
46. Ayuzawa N, Fujita T. Activation of mineralocorticoid receptor in salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2015;17:552.
47. Bayorh MA, Mann G, Walton M, et al. Effects of enalapril, tempol, and eplerenone on salt-induced hypertension in dahl salt-sensitive rats. *Clin. Exp. Hypertens*. 2006;28:121-132.
48. Buss SJ, Backs J, Kreusser MM, et al. Spironolactone preserves cardiac norepinephrine reuptake in salt-sensitive Dahl rats. *Endocrinology*. 2006;147:2526-2534.
49. Uehara Y, Kawabata Y, Shirahase H, et al. Radical Scavenging Properties of Indapamide and Renal Protection in Dahl Salt-Sensitive Rats. *Hypertens. Res*. 1992;15:17-26.
50. Palmer BF. Proteinuria as a therapeutic target in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol*. 2007;27:287-293.
51. Nishikimi T. Clinical significance of BNP as a biomarker for cardiac disease--from a viewpoint of basic science and clinical aspect. *Nihon Rinsho*. 2012;70:774-784.
52. Karim A. Spironolactone: disposition, metabolism, pharmacodynamics, and bioavailability. *Drug Metab. Rev*. 1978;8:151-188.
53. Feller DR, Gerald MC. Stimulation of liver microsomal drug metabolism in male and female mice by spironolactone and aldadiene. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1971;136:1347-1350.
54. Rocha R, Chander PN, Khanna K, et al. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;31:451-458.
55. Nishiyama A, Abe Y. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: renoprotective effects of aldosterone blockade. *J. Pharmacol. Sci*. 2006;100:9-16.
56. Matsui H, Ando K, Kawarazaki H, et al. Salt excess causes left ventricular diastolic

- dysfunction in rats with metabolic disorder. *Hypertension*. 2008;52:287-294.
57. Terada Y, Kobayashi T, Kuwana H, et al. Aldosterone stimulates proliferation of mesangial cells by activating mitogen-activated protein kinase 1/2, cyclin D1, and cyclin A. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005;16:2296-2305.
 58. Ohtani T, Ohta M, Yamamoto K, et al. Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;292:R946-954.
 59. Lee SH, Yoo TH, Nam BY, et al. Activation of local aldosterone system within podocytes is involved in apoptosis under diabetic conditions. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2009;297:F1381-1390.
 60. Kolkhof P, Delbeck M, Kretschmer A, et al. Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2014;64:69-78.
 61. LaLone CA, Villeneuve DL, Cavallin JE, et al. Cross-species sensitivity to a novel androgen receptor agonist of potential environmental concern, spironolactone. *Environ. Toxicol. Chem.* 2013;32:2528-2541.
 62. Stefani S, Aguiari GL, Bozza A, et al. Androgen responsiveness and androgen receptor gene expression in human kidney cells in continuous culture. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1994;32:597-604.
 63. Verzola D, Gandolfo MT, Salvatore F, et al. Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. *Kidney Int.* 2004;65:1252-1261.
 64. Baltatu O, Cayla C, Iliescu R, et al. Abolition of hypertension-induced end-organ damage by androgen receptor blockade in transgenic rats harboring the mouse ren-2 gene. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002;13:2681-2687.
 65. Grune J, Benz V, Brix S, et al. Steroidal and Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonists Cause Differential Cardiac Gene Expression in Pressure Overload-Induced

- Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016;67:402-411.
66. Amazit L, Le Billan F, Kolkhof P, et al. Finerenone Impedes Aldosterone-dependent Nuclear Import of the Mineralocorticoid Receptor and Prevents Genomic Recruitment of Steroid Receptor Coactivator-1. *J Biol Chem*. 2015;290:21876-21889.
 67. Mavrakanas TA, Gariani K, Martin PY, et al. Mineralocorticoid receptor blockade in addition to angiotensin converting enzyme inhibitor or angiotensin II receptor blocker treatment: an emerging paradigm in diabetic nephropathy: a systematic review. *Eur. J. Intern. Med*. 2013;25:173-176.
 68. García NH, Baigorria ST, Juncos LI, et al. Hyperkalemia, renal failure, and converting-enzyme inhibition: an overrated connection. *Hypertension*. 2001;38:639-644.
 69. Orena S, Maurer TS, She L, et al. PF-03882845, a non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist, prevents renal injury with reduced risk of hyperkalemia in an animal model of nephropathy. *Front Pharmacol*. 2013;4:115.
 70. Liu LC, Schutte E, Gansevoort RT, et al. Finerenone : third-generation mineralocorticoid receptor antagonist for the treatment of heart failure and diabetic kidney disease. *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 2015;24:1123-1135.
 71. Nariai T, Fujita K, Kawane K, et al. DSR-71167, a novel mineralocorticoid receptor antagonist with carbonic anhydrase inhibitory activity, separates urinary sodium excretion and serum potassium elevation in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2015;354:2-9.
 72. Klanke B, Cordasic N, Hartner A, et al. Blood pressure versus direct mineralocorticoid effects on kidney inflammation and fibrosis in DOCA-salt hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:3456-3463.
 73. Seifi B, Kadkhodae M, Karimian SM, et al. Evaluation of renal oxidative stress in the development of DOCA-salt induced hypertension and its renal damage. *Clin Exp Hypertens*. 2010;32:90-97.
 74. Coward RJ, Foster RR, Patton D, et al. Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent

- signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:629-637.
75. Náráy-Fejes-Tóth A, Canessa C, Cleaveland ES, et al. Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. *J Biol Chem*. 1999;274:16973-16978.
76. Hovind P, Rossing P, Tarnow L, et al. Remission and regression in the nephropathy of type 1 diabetes when blood pressure is controlled aggressively. *Kidney Int*. 2001;60:277-283.
77. Fioretto P, Bruseghin M, Berto I, et al. Renal protection in diabetes: role of glycemic control. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:S86-89.
78. Zoja C, Corna D, Gagliardini E, et al. Adding a statin to a combination of ACE inhibitor and ARB normalizes proteinuria in experimental diabetes, which translates into full renoprotection. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299:F1203-1211.
79. Sun GP, Kohno M, Guo P, et al. Involvements of Rho-kinase and TGF-beta pathways in aldosterone-induced renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2193-2201.
80. Diah S, Zhang GX, Nagai Y, et al. Aldosterone induces myofibroblastic transdifferentiation and collagen gene expression through the Rho-kinase dependent signaling pathway in rat mesangial cells. *Exp Cell Res*. 2008;314:3654-3662.
81. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, et al. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int*. 2003;63:1791-1800.
82. Ikeda H, Tsuruya K, Toyonaga J, et al. Spironolactone suppresses inflammation and prevents L-NAME-induced renal injury in rats. *Kidney Int*. 2009;75:147-155.
83. Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, et al. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*. 2001;38:1107-1111.
84. Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, et al. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive

- rats. *Hypertension*. 2004;43:841-848.
85. Vallon V, Lang F. New insights into the role of serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 in the regulation of renal function and blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:59-66.
 86. Park J, Leong ML, Buse P, et al. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J*. 1999;18:3024-3033.
 87. Klahr S. Mechanisms of progression of chronic renal damage. *J Nephrol*. 1999;12:S53-62.
 88. Phillips A, Janssen U, Floege J. Progression of diabetic nephropathy. Insights from cell culture studies and animal models. *Kidney Blood Press Res*. 1999;22:81-97.
 89. Adamczak M, Gross ML, Krtil J, et al. Reversal of glomerulosclerosis after high-dose enalapril treatment in subtotaly nephrectomized rats. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:2833-2842.
 90. Gaede P, Tarnow L, Vedel P, et al. Remission to normoalbuminuria during multifactorial treatment preserves kidney function in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:2784-2788.
 91. Rossing K, Christensen PK, Hovind P, et al. Remission of nephrotic-range albuminuria reduces risk of end-stage renal disease and improves survival in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2005;48:2241-2247.
 92. Teles F, Machado FG, Ventura BH, et al. Regression of glomerular injury by losartan in experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2009;75:72-79.
 93. Boffa JJ, Lu Y, Placier S, et al. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1132-1144.
 94. Remuzzi A, Gagliardini E, Sangalli F, et al. ACE inhibition reduces glomerulosclerosis and regenerates glomerular tissue in a model of progressive renal disease. *Kidney Int*. 2006;69:1124-1130.

95. Ma LJ, Nakamura S, Whitsitt JS, et al. Regression of sclerosis in aging by an angiotensin inhibition-induced decrease in PAI-1. *Kidney Int.* 2000;58:2425-2436.
96. Brown NJ, Nakamura S, Ma L, et al. Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo. *Kidney Int.* 2000;58:1219-1227.
97. Choi S, Park M, Kim J, et al. The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure. *Stem Cells Dev.* 2009;18:521-529.
98. Benigni A, Morigi M, Remuzzi G. Kidney regeneration. *Lancet.* 2010;375:1310-1317.
99. Romagnani P, Lasagni L, Remuzzi G. Renal progenitors: an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9:137-146.
100. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:3138-3146.
101. Kruegel J, Rubel D, Gross O. Alport syndrome--insights from basic and clinical research. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9:170-178.
102. Prodromidi EI, Poulosom R, Jeffery R, et al. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells.* 2006;24:2448-2455.
103. Oki K, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. Role of mineralocorticoid action in the brain in salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39:90-95.
104. Barrett KV, McCurley AT, Jaffe IZ. Direct contribution of vascular mineralocorticoid receptors to blood pressure regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013;40:902-909.
105. Rahmouni K, Sibug RM, De Kloet ER, et al. Effects of brain mineralocorticoid receptor blockade on blood pressure and renal functions in DOCA-salt hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2002;436:207-216.
106. Huang BS, White RA, Jeng AY, et al. Role of central nervous system aldosterone synthase and mineralocorticoid receptors in salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Am*

- J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:R994-R1000.
107. McCurley A, Pires PW, Bender SB, et al. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med.* 2012;18:1429-1433.
108. Rickard AJ, Morgan J, Chrissobolis S, et al. Endothelial cell mineralocorticoid receptors regulate deoxycorticosterone/salt-mediated cardiac remodeling and vascular reactivity but not blood pressure. *Hypertension.* 2014;63:1033-1040.
109. Chabert PR, Guelpa-Decorzant C, Riondel AM, et al. Effect of spironolactone on electrolytes, renin, ACTH and corticosteroids in the rat. *J Steroid Biochem.* 1984;20:1253-1259.
110. Jiménez W, Martínez-Pardo A, Arroyo V, et al. Effect of spironolactone on the renin-aldosterone system in rats. *Rev Esp Fisiol.* 1988;44:257-263.
111. Rafiq K, Nishiyama A, Konishi Y, et al. Regression of glomerular and tubulointerstitial injuries by dietary salt reduction with combination therapy of angiotensin II receptor blocker and calcium channel blocker in Dahl salt-sensitive rats. *PLoS One.* 2014;9:e107853.
112. Shuvy M, Nyska A, Beerl R, et al. Histopathology and apoptosis in an animal model of reversible renal injury. *Exp Toxicol Pathol.* 2011;63:303-306.
113. Macisaac RJ, Ekinici EI, Jerums G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2014;63:S39-62.
114. Drawz P, Rahman M. Chronic kidney disease. *Ann Intern Med.* 2015;162:ITC1-16.

謝辞

本論文提出の機会をお与え頂き、有益なる御助言と温かい御指導を賜りました、東京大学大学院 薬学系研究科 細胞情報学教室 一條秀憲教授および創薬機構 岡部隆義特任教授に、心より厚く御礼申し上げます。

本論文提出の機会ならびに多大なるご便宜を賜りました、第一三共株式会社 臓器保護ラボラトリー 高橋正明ラボラトリー長に深く感謝致します。また、本研究の遂行ならびに本稿の執筆全般を通じて、長年に渡り多大なる御助言・御指導を賜りました、第一三共株式会社 臓器保護ラボラトリー 本間剛研究員に深く感謝致します。加えて、研究全般を通じて多大なご協力を賜りました、第一三共株式会社 希少疾患・LCM ラボラトリー 森川由香研究員および臓器保護ラボラトリー 生方尚子研究員をはじめ、多くの皆様に深く感謝致します。

最後に、本稿を執筆するにあたり、多大なご協力、支援をして下さりました家族に深く感謝致します。