The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	パーシャルアゴニスト活性を有する新規MR 拮抗薬の薬理作用に関する研究 : 高カリウム血症リスク低減化に着目した新規治療戦略
Author(s)	成相, 哲朗
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24739
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

パーシャルアゴニスト活性を有する新規 MR 拮抗薬の

薬理作用に関する研究

-高カリウム血症リスク低減化に着目した新規治療戦略-

2012 年

成相　哲朗

目次

緒論 4
本論 7
第１章　新規 MR 拮抗薬の高カリウム血症リスクに対する作用 7
第１節　新規 MR 拮抗薬の in vitro MR に対する作用 7
第２節　新規 MR 拮抗薬の in vivo MR に対する作用 11
第３節　新規 MR 拮抗薬の高カリウム血症リスクに対する作用 17
第４節　考察および小括 22
第２章　高血圧自然発症ラットでの新規 MR 拮抗薬の作用 24
第１節　血圧と血清カリウム濃度に対する作用 24
第２節　考察および小括 28
第３章　アルドステロン/食塩負荷ラットでの新規 MR 拮抗薬の作用 30
第１節　アルドステロン/食塩負荷と同時投与の作用 30
第２節　アルドステロン/食塩負荷後による病態形成後投与の作用 38
第３節　考察および小括 44
第４章　新規 MR 拮抗薬の MR 選択性 47
第１節　新規 MR 拮抗薬の他の核内受容体に対する作用 47
第２節　新規 MR 拮抗薬の受容体およびイオンチャネルに対する作用 53
第３節　考察および小括 55
総括 57
結論 61
謝辞 62
引用文献 63

・本文中で用いた略語一覧

ACE: Angiotensin-converting enzyme

ANP: Atrial natriuretic peptide

AR: Androgen receptor

ARBs: Angiotensin II receptor blockers

AUC: Area under the curve

BA: Bioavailability

β-MHC: β-Myosin heavy chain

Cmax: Maximum concentration

Collagen-III: Collagen type III

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DOCA: Deoxycorticosterone acetate

DTT: Dithiothreitol

ED_{50}: 50% Effective dose

eGFR: estimated Glomerular filtration rate

EMPHASIS-HF: Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure

EPHESUS: Eplerenone Post–Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study

EVALUATE: Eplerenone Combination Versus conventional Agent to Lower blood pressure on Urinary Antiproteinuric Treatment Effect

FBS: Fetal bovine serum

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GR: Glucocorticoid receptor

$IC_{50:}$ 50% Inhibitory concentration

ID_{30}: 30% Inhibitory dose

ID_{50}: 50% Inhibitory dose

LBD: Ligand binding domein

LC/MS/MS: Liquid chromatography/tandem mass spectrometer

LH-RH: Luteinizing hormone-releasing hormone

MC: Methyl cellulose

MEM/NEAA: Minimum essential medium with non-essential amino acids

MMTV: Mouse mammary tumor virus

MR: Mineralocorticoid receptor

MT: Methyltestosterone

NAG: N-Acetyl-β-glucosaminidase

NYHA: New York Heart Association

OPN: Osteopontin

PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1

phRL-TK: plasmid renilla luciferase-thymidine kinase

PK: Pharmacokinetics

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor

PR: Progesterone receptor

RALES: Randomized Aldactone Evaluation Study

qPCR: quantitative Polymerase chain reaction

SD: Sprague-Dawley

S.D.: Standard deviation

SHRs: Spontanousely hypertensive rats

TOPCAT: Trial of Aldosterone Antagonist Therapy in Adults with Preserved Ejection Fraction Congestive Heart Failure

緒論

高血圧は、心血管系疾患を引き起こす最も重要な危険因子のひとつである。これまで高血圧を治療するために、利尿薬、β受容体遮断薬、カルシウム拮抗薬、ACE 阻害薬や ARBs など様々な薬剤が開発され高血圧治療に貢献してきた。特にレニン・アンジオテンシン系を阻害する ACE 阻害薬や ARBs は、優れた降圧作用に加え心不全患者および糖尿病性腎症患者でそれぞれ心臓および腎臓の臓器保護作用を示すことが臨床試験により証明されている[1-4]。一方、このような状況にもかかわらず、いまだ降圧目標達成率は十分とは言えず[5, 6]、心疾患による死亡も依然として高いままであり[7, 8]、新たな薬剤、特に臓器保護作用に優れた高血圧治療薬が求められている。

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の最終産物であるアルドステロンは、1953 年に Dr.Simpson によって単離されたホルモンであり[9]、レニン・アンジオテンシン刺激によって副腎皮質から分泌され、主として腎臓の遠位尿細管に存在する MR（mineralocorticoid receptor）に作用してナトリウム再吸収とカリウム排泄作用を示し、血圧の恒常性に関与する電解質ホルモンと考えられていた。しかしながら、1990 年代に入りパラダイムシフトが起こり、アルドステロンは単なる電解質ホルモンとしてではなく心血管リスクホルモンとして考えられ、その重要性が広く認識されるようになった。これまでにアルドステロンの心臓および血管の線維化、心肥大、心室性不整脈、脳卒中および腎障害への関与等が多数報告されている[10-18]。アルドステロンを阻害することの臨床的重要性を示したのが、1999 年に報告された RALES である。RALES は NYHA クラス III-IV、左室駆出率 35%以下の重症の慢性心不全患者 1663 例を対象にした試験で、標準治療群に、MR 拮抗薬であるスピロノラクトンを少量併用することで生存率を 30%改善した[19]。また、2003 年に報告された急性心筋梗塞患者を対象にした EPHESUS[20]、2011 年に報告された軽症の慢性不全患者を対象にした EMPHASIS-HF[21] において、MR 拮抗薬エプレレノンによる好成績が発表され、心不全治療における MR 拮抗薬の地位は確固たるものとなっている。

またエプレレノンは、承認用量以上の 200 mg/day を用いた臨床試験において、低レニン性高血圧患者では ARB のロサルタンよりも優れた降圧作用を示すこと[22, 23]、収縮期高血圧患者ではカルシウム拮抗薬のアムロジピンと同等の降圧作用を示すこと[24]、左室肥大を有する高血圧患者では ACE 阻害薬エナラプリルと同等の心肥大抑制作用を示すこと[25]、アルブミン尿を有する 2 型糖尿病患者ではエナラプリルより優れた尿アルブミン排泄減少作用を示すことから[26]、MR 拮抗薬は既存薬と遜色ない心臓および腎臓の臓器保護作用を有する高血圧治療薬として期待されている。

さらに、MR 拮抗薬は単剤として優れたポテンシャルを有しているだけではなく、既存薬に併用することでさらなる治療効果が期待できる。例をあげると、利尿薬、ACE 阻害薬、ARBs およびカルシウム拮抗薬を含む 3 剤以上の既存高血圧治療薬を服用しても、降圧目標を達成できない治療抵抗性高血圧患者[27]に対して、MR 拮抗薬を追加投与することで明確な降圧効果が認められ、降圧目標を達成できることが報告されている[28-32]。また、ACE 阻害薬や ARBs でレニン・アンジオテンシン系を抑制しても、やがてアルドステロン濃度が上昇してくる「アルドステロンブレークスルー現象」が ACE 阻害薬や ARBs で治療中患者の約 40-53%と高頻度に認められ[33]、そのような患者では ACE 阻害薬や ARBs による心肥大抑制作用や尿アルブミン排泄減少作用が減弱するが、MR 拮抗薬を追加投与することで心肥大抑制作用やアルブミン尿低下作用が認められる[34-36]。以上のことから、MR 拮抗薬は、既存の高血圧治療薬で降圧目標を達成できない患者に対して新たな治療選択肢を提供することができるだけでなく、レニン・アンジオテンシン系阻害薬などの既存療法で治療が不十分な心臓および腎臓の臓器障害に対して優れた上乗せ効果が期待できると考えられる。

上述のように MR 拮抗薬は優れた薬理プロフィールを有しているにも関わらず、RALES 以降にスピロノラクトンの処方が増加し、高カリウム血症が原因の入院や死亡率が上昇し社会的問題になった[37-39]。高カリウム血症は致死的な不整脈を引き起こす副作用であり[40, 41]、MR 拮抗作用により腎臓でのカリウム排泄作用が抑制されることで引き起こされる。既存の MR 拮抗薬であるスピロノラクトンやエプレレノンは、心疾患や腎疾患に対して優れた薬効を示すにも関わらず、高カリウム血症リスクのために[18]、臨床においてその処方が制限されている[16, 42]。すなわち、上述したレニン・アンジオテンシン系阻害薬を含む複数の治療薬が処方されている治療抵抗性高血圧患者、心不全患者および糖尿病性腎症患者では、MR 拮抗薬による高カリウム血症がそれぞれ 17%[43]、32%[44]および 24%[45]もの高頻度で認められることが報告されている。このような患者は、レニン・アンジオテンシン系阻害薬を標準治療薬として服用しているため、MR 拮抗薬を併用することで高カリウム血症リスクが非常に高くなっていると考えられている。こういった高カリウム血症の懸念から、MR 拮抗薬の処方が敬遠されがちであるとともに、処方されても用量制限により MR 拮抗薬の本来の優れた薬効を最大限に発揮できていない[45]。

以上の背景より、MR 拮抗薬の優れた薬理作用を最大限に発揮するために、高カリウム血症リスク低減化に着目した治療戦略を考えた。これまで、スピロノラクトンの性ホルモン関連副作用およびエプレレノンの弱い薬効を改善した非ステロイド骨格の MR 拮抗薬の創薬研究が主に行われてきた[46-48]。そして、近年になり、MR 拮抗薬の薬効と副作用（高カリウム血症リスク）を乖離させる方向での創薬研究が行われるようになった。例えば、Blandish らは、ジヒドロピリジン

骨格の化合物に、MR 拮抗作用とカルシウムチャネル拮抗作用を付与することで、薬効と副作用を乖離できる可能性を述べている[49]。また、Kolkhof らは、MR 拮抗薬のコファクター選択性により、組織選択性を腎臓から心臓へと向上させ、心保護作用を保持したまま高カリウム血症リスクが低減化できる新たな心不全治療薬創製の可能性を提唱している[50]。Yang らは、アルドステロン/MR ではなく、コルチゾール/MR と相互作用するリガンド選択的なペプチドを見出し、腎臓におけるアルドステロンの機能を抑制しない物質の探索を行っている[51, 52]。上記のようなアプローチは高カリウム血症リスク低減化の新たな創薬戦略として興味深いものの、in vivo で明確な主薬効を発現する用量において高カリウム血症リスクが低減されているといったコンセプトの証明には至っていない。

他方、我々は、以下の報告を参考に MR 拮抗作用にパーシャルアゴニスト活性を付与することで、高カリウム血症リスクが低減化できるのではないかと考えた。MR のホモ欠損マウスは、野生型と比較して血漿カリウム濃度が顕著に上昇するが（6.3 vs. 8.1 mmol/L）、ヘテロ欠損マウスは野生型と同等である（6.3 mmol/L）[53]。また、副腎摘出ラットを用いた検討において、カリウム負荷を行うことで上昇した血漿カリウム濃度が（カリウム無負荷：6.1 vs. カリウム負荷：10 mmol/L）、アルドステロン併用投与によって減少する（7.4 mmol/L）[54]。加えて、MR 以外の標的分子（例えば、アドレナリン β 受容体、ドパミン D_2 受容体、$\alpha_4\beta_2$ ニコチン受容体、PPARγ など）において、パーシャルアゴニスト活性を有する化合物が、薬効を保持しつつ、薬効の延長線上の副作用リスクに対してブレーキをかけることで薬効と副作用のバランスを保ち[55-63]、医薬品として開発に成功した例が幾つか知られている。

そこで、上記の作業仮説を検証するために、MR に対してパーシャルアゴニスト活性を有する新規の MR 拮抗薬を見出し、幾つかの異なるパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬を用いて、その薬理作用（MR 拮抗作用、抗高血圧作用および心臓や腎臓の臓器保護作用）および高カリウム血症リスク）について検討し、新たな知見が得られたのでここに報告する。

本論

第 1 章 新規 MR 拮抗薬の高カリウム血症リスクに対する作用

第 1 節　新規 MR 拮抗薬の in vitro MR に対する作用

・背景と目的

MR 拮抗薬の MR に対するパーシャルアゴニストとしての薬理作用を検討するため、コンセプト検証に使用可能な化合物の探索を試みた。我々は新規 MR 拮抗薬の探索研究を行う中で、非ステロイド骨格のベンズオキサジン誘導体の中に、MR 拮抗作用と MR パーシャルアゴニスト活性を有する化合物があることを初めて見出した。そこで、ベンズオキサジン誘導体の中から、物性パラメータ（溶解度、脂溶性、膜透過性および肝ミクロソームによる代謝安定性）の良好な化合物として、DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 を選択した。本節では、DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 を用いて、その in vitro での MR に対する作用をスピロノラクトンおよびエプレレノンと比較検討することとした。そのために、被験物質のラット腎細胞質画分を用いた MR 結合親和性と、COS-7 細胞を用いたヒト MR の転写活性に対する作用を評価した。

・実験方法

被験物質

DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 は大日本住友製薬株式会社化学研究所にて合成したものを使用した（Figure 1）。スピロノラクトンは Sigma-Aldrich から購入した。エプレレノンは Inspra 錠®（Pfizer Inc.）を粉砕・抽出後、精製したものを使用した。In vitro 試験用の被験物質は、DMSO に溶解したものを使用した。In vivo 試験の経口投与用の被験物質は、0.5% MC（ナカライテスク株式会社）に懸濁させたものを使用した。

ラット腎細胞質画分を用いた MR への結合親和性評価

細胞質画分の調製は、Murase らの報告を参考に行った [64]。副腎摘出 2-3 日後に、ラットから単離した腎臓を TSM バッファー（0.1 mol/L Tris-HCl、0.25 mol/L Sucrose、0.1 mol/L Sodium molybdate、2 mmol/L DTT、pH 7.4）に攪拌し、4℃、34,000 *g* で 60 分間遠心操作を行い、上清を MR バインディングアッセイに使用した。全ての操作は氷上にて行った。被験物質の MR への結合親和性は、Grekin らの方法を参考にして評価した [65]。まず、被験物質と腎細胞質画分を混合し、アルドステ

ロンが GR へ結合するのを抑制するため GR 拮抗薬の mifepristone（Sigma-Aldrich、Final 2 μmol/L）を添加し、プレインキュベートした。その後、^{3}H-アルドステロン（PerkinElmer、Final 2 nmol/L）を添加・混合した後、4℃で 18 時間インキュベートした。MR に結合していない ^{3}H-アルドステロンを除くために、dextran-coated charcoal（Sigma-Aldrich）を添加・混合した後、4℃、700 *g* で 5 分間遠心操作を行った。上清中の放射活性は液体シンチレーションカウンター（Tri-carb 2900TR、PerkinElmer）を用いて測定した。^{3}H-アルドステロンの結合率は、全結合率から非特異的結合率（アルドステロン 2 μmol/L 添加群）の放射活性を差し引くことで算出した。各被験物質の IC_{50} は、^{3}H-アルドステロン特異的結合率を 50%抑制する濃度として算出し、2-3 回の実験結果の平均値で示した。

COS-7 細胞を用いた MR のアゴニスト/アンタゴニスト作用評価

腎細胞質画分を用いた MR への結合親和性評価では、被験物質が MR へ結合した後に、アゴニストあるいはアンタゴニストとして作用するかは明らかでない。アルドステロンは核内受容体である MR に結合後、核内に移行し転写を活性化することが知られている。そこで、MR の転写活性を指標に、被験物質の MR アゴニストあるいはアンタゴニスト作用を検討した。被験物質の MR に対する転写活性は、Hu らの方法を参考にレポータージーンアッセイを用いて評価した [66]。COS-7 細胞は、DMEM 基本培地（MEM-NEAA、2 mmol/L L-glutamine、1 mol/L Sodium pyruvate、Invitrogen）、10% FBS（MP Biomedical）を用いて 37℃、5%CO_2 条件下で培養した。アッセイ時には、6-7×10^{4}cells/mL の COS-7 細胞を、5% charcoal/dextran-treated FBS（Thermo Fisher Scientific Inc.）を含有した DMEM に懸濁させ 96 ウェルプレートに播種した。翌日、TransIT-LT1（Mirus Bio LLC）を用いて、MR 発現プラスミド（大日本住友製薬株式会社ゲノム科学研究所作製）、pGL3-MMTV および phRL-TK（Promega）を細胞に遺伝子導入した。phRL-TK プラスミドは、内部標準のために使用した。遺伝子導入 6 時間後、被験物質±アルドステロン（和光純薬工業株式会社、Final 1 nmol/L）を添加し、さらに 18 時間インキュベートした。翌日、培養上清を除去し、細胞を溶解させ、ルミノメーター（LB96V、Berthold Japan）を用いて細胞中のルシフェラーゼ活性を測定した。各被験物質の IC_{50} は、被験物質未添加の細胞と比較して、アルドステロン 1 nmol/L 添加細胞のルシフェラーゼ活性を 50%抑制する濃度として算出した。各被験物質のパーシャルアゴニスト活性は、アルドステロン 1 nmol/L 添加細胞と比較した被験物質 10 μmol/L 添加細胞のルシフェラーゼ活性から算出した。被験物質の IC_{50} およびパーシャルアゴニスト活性は、3-4 回の実験結果の平均値で示した。

・結果

ラット腎細胞質画分を用いた MR への結合親和性評価

スピロノラクトンおよびエプレレノンは、^{3}H-アルドステロンの特異的結合を濃度依存的に抑制し、IC_{50} はそれぞれ 0.0051 および 0.12 μmol/L となった。DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 はいずれも濃度依存的に ^{3}H-アルドステロンの特異的結合を抑制し、IC_{50} はそれぞれ 0.66、0.021 および 0.037 μmol/L となった（Figure 2）。

COS-7 細胞を用いた MR のアゴニスト/アンタゴニスト作用評価

スピロノラクトンおよびエプレレノンは、アルドステロン刺激で上昇するルシフェラーゼ活性の上昇を濃度依存的に抑制し、IC_{50} はそれぞれ 0.012 および 0.42 μmol/L となった。また両化合物ともアルドステロン非刺激条件下では、10 μmol/L でルシフェラーゼ活性を上昇させなかった。DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 は、アルドステロン刺激で上昇するルシフェラーゼ活性を濃度依存的に抑制し、IC_{50} はそれぞれ 4.0、0.13 および 0.13 μmol/L となった。10 μmol/L において SM-368229 および DSR-14397 は、アルドステロン非刺激条件下で、それぞれ 12 および 36% ルシフェラーゼ活性を上昇させたが、DSR-11861 は上昇させなかった（Figure 3）。

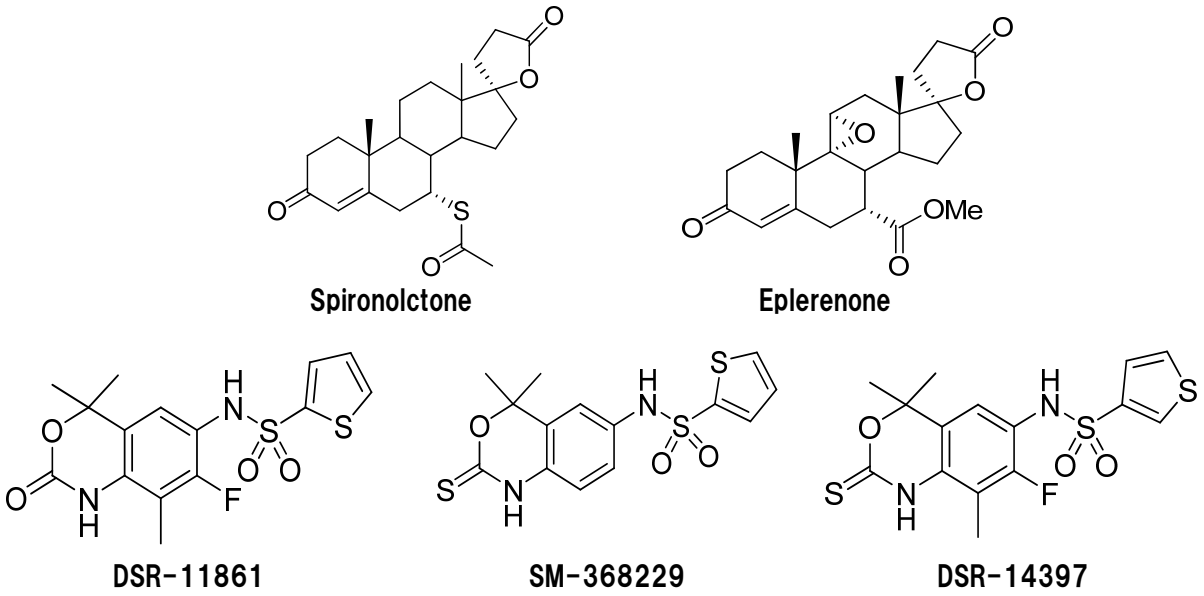

Figure 1 Chemical structures of spironolactone, eplerenone, DSR-11861, SM-368229, and DSR-14397

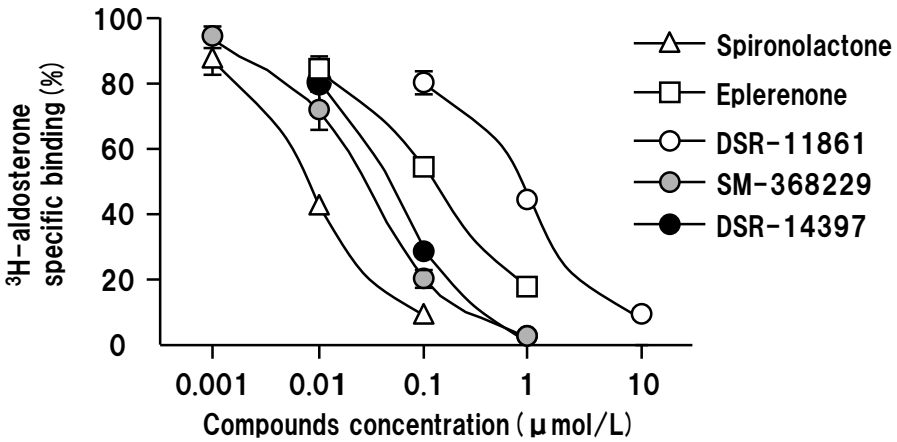

Figure 2 Effects of test compounds on MR binding affinity in rat kidney cytosolic fraction

^{3}H-Aldosterone competition binding assay was performed using rat kidney cytosolic fraction with increasing concentrations of test compounds (white triangle: spironolactone, white square: eplerenone, white circle: DSR-11861, grey circle: SM-368229, and black circle: DSR-14397) and ^{3}H-aldosterone (final 2 nmol/L). Following overnight incubation at 4°C, free ^{3}H-aldosterone and bound ^{3}H-aldosterone was separated using dextran-coated charcoal. MR-bound ^{3}H-aldosterone was then counted. Data are shown as means ± S.D. (n = 2-3)

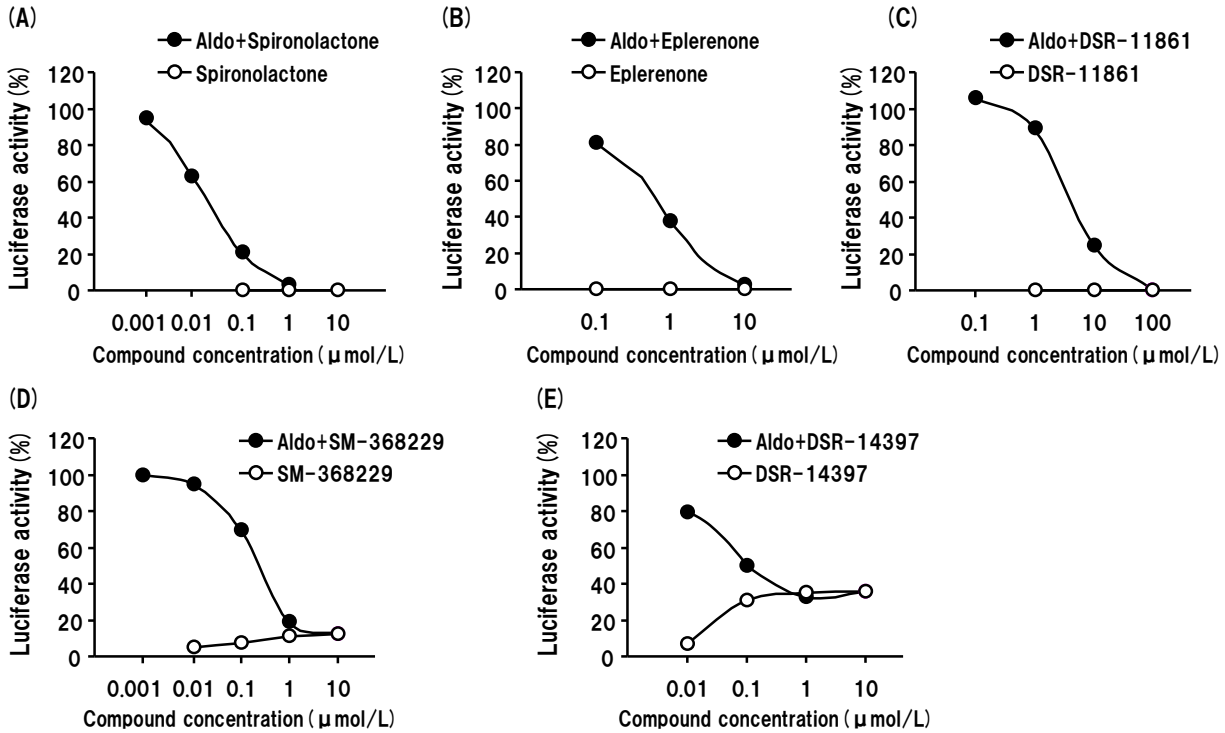

Figure 3 Effects of test compounds on MR transcriptional activity in COS-7 cells

COS-7 cells were transiently transfected with MR expression vector, pGL3-MMTV, and phRL-TK. Following incubation for 6 hour, (A) spironolactone, (B) eplerenone, (C) DSR-11861, (D) SM-369229, or (E) DSR-14397 was added with aldosterone (final 1 nmol/L) (black circle) or without aldosterone condition (white circle). On the next day, luciferase activity was measured. Data are shown as means (n = 3).

第２節　　新規 MR 拮抗薬の in vivo MR に対する作用

・背景と目的

第１節にて、3 種類のベンズオキサジン誘導体が MR への結合親和性を示し、MR アンタゴニストあるいはアゴニスト作用を示すことが明らかになった。次にこれら新規 MR 拮抗薬の in vivo MR 拮抗作用および in vivo MR アゴニスト作用を検討することとした。まず初めに新規 MR 拮抗薬を in vivo 実験に用いることが可能かどうか検証するため、ラット PK 試験を実施し、薬物動態プロフィールについて検討した。次に、in vivo MR 拮抗作用を評価するための評価系を構築し、新規 MR 拮抗薬の in vivo MR 拮抗作用を評価した。最後に、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬の in vivo MR アゴニスト作用を評価した。

・実験方法

被験物質

被験物質の入手および調製は、第１章、第１節に記載の方法に準じた。静脈内投与時は、生理食塩水に溶解し、1 mL/kg の用量で投与した。

実験動物

実験動物は日本エスエルシー株式会社または日本チャールス・リバー株式会社から購入した。動物は、3-5 匹/ケージで温度（23±2℃）、湿度（55±10%）、照明（12 時間点灯/消灯サイクル、8:00 AM 点灯）がコントロールされた部屋で飼育した。飼料（CE-2、日本クレア株式会社）とフィルター濾過水は自由に摂取させた。全ての動物は、1 週間の検疫期間中に異常のなかった個体を使用した。本試験は、大日本住友製薬株式会社研究本部の動物実験委員会により承認されており、本研究本部の動物実験規約に従って実施した。

薬物動態試験

7 週齢の雄性 SD ラット（日本チャールスリバー株式会社）に非絶食の条件下で被験物質（DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397）を 10 mg/kg で強制経口投与もしくは 1 mg/kg の用量で静脈内投与した。投与 0.08（静脈内投与のみ）、0.25、0.5、1、2、4、6 および 24 時間後に静脈より採血を実施し、血漿サンプルを回収した。血漿中の被験物質濃度は LC/MS/MS（Alliance 2690, Waters Corporation、API3000, Applied Biosystems）を用いて測定した。結果は、平均値±標準偏差で示した（n = 2-3）。

In vivo MR 拮抗作用評価

Kagawa および de Gasparo らの方法を参考に行った[67-69]。7 週齢の雄性 SD ラット（日本エスエルシー株式会社）の副腎を摘出し、2-3 日の経過観察の後、術後管理の良好な個体を試験に使用した。副腎摘出後の動物は、通常給餌で飼育したが、飲水は生理食塩水にて飼育した。そして、食餌によるナトリウム摂取量の個体差をなくすため、試験前日から試験期間中は絶食・自由飲水条件下で実施した。

In vivo MR 拮抗作用評価系の確立のために、副腎摘出ラットに、MR アゴニストである DOCA（和光純薬工業株式会社、0.01、0.1 および 1 mg/kg, sc.）と 20 mL/kg の生理食塩水を投与した後、代謝ケージに収容し 23 時間の飲水量と尿量を測定した。DOCA は、コーン油に溶解し、1 mL/kg の用量で皮下投与した。その後、尿中のナトリウム濃度を分光光度計（JCA-BM 1650、日本電子株式会社）を用いて測定した。試験期間中における「ナトリウムの摂取量」と「ナトリウム排泄量」の差からナトリウムバランスを算出し、in vivo MR に対する薬理作用の指標として用いた。

被験物質の in vivo MR 拮抗作用を評価する際は、副腎摘出ラットに被験物質を経口投与し、その 30 分後に DOCA（1 mg/kg, sc.）と、20 mL/kg の生理食塩水を投与した後、代謝ケージにて 23 時間におけるナトリウムバランスを算出した。そして、Control（0.5% MC + コーン油投与）群と比較して、DOCA で上昇するナトリウムバランスを 50%抑制する用量を各被験物質の ED_{50} として算出した。

各被験物質投与群の用量および例数は以下の通りとした。スピロノラクトンおよびエプレレノンの用量は、ともに 30、100 および 300 mg/kg に設定した。DSR-11861 の用量は、10、30 および 100 mg/kg に設定した。SM-368229 および DSR-14397 の用量は、ともに 1、3、10 および 30 mg/kg に設定した。各実験群は、4～5 例で実施した。

In vivo MR アゴニスト作用評価

Kagawa の方法[69]を改変し、in vivo MR アゴニスト作用の評価を実施した。7 週齢の雄性 SD ラット（日本エスエルシー株式会社）の副腎を摘出した後に、被験物質を経口投与し、その 30 分後に DOCA（1 mg/kg, sc.）もしくは corn oil（1 mL/kg, sc.）と、20 mL/kg の生理食塩水を投与した後、代謝ケージにて 23 時間尿を回収し、分光光度計（JCA-BM 1650、日本電子株式会社）にて尿中のナトリウムおよびカリウム濃度を測定し、MR アゴニスト作用の指標として尿中ナトリウム/カリウム比を算出した。

各被験物質投与群の用量および例数は以下の通りとした。スピロノラクトンの用量は、100

mg/kg に設定した。SM-368229 の用量は、3、10 および 30 mg/kg に設定した。DSR-14397 の用量は、1、3 および 10 mg/kg に設定した。各実験群は、すべて 5 例で実施した。

統計解析

結果は平均値±標準偏差で示した。統計解析は、Stat Preclinica（株式会社タクミインフォメーションテクノロジー）を用い、分散分析を実施後、スチューデントの *t* 検定またはダネットの多重比較検定を実施した。*P* 値が 0.05 未満の場合に有意差があると判定した。

・結果

薬物動態試験

DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 の BA を求めると、それぞれ 88.5、61.1 および 99.6（%）となり、いずれの被験物質も良好な経口活性を示した。さらに、DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 の Cmax は、それぞれ 9.7±0.8、8.0±0.8 および 10.2±0.7（μg/mL）、AUC は、それぞれ 29±2、107±6 および 91±8（μg•hour/mL）となり、充分な血中暴露を示した（Table 1）。

In vivo MR 拮抗作用評価

<u>In vivo MR 拮抗作用の評価系構築</u>

Control 群と比較して、DOCA（0.01、0.1 および 1 mg/kg）は用量依存的にナトリウムバランスを上昇させ（Control: -0.54 mmol; DOCA: それぞれ-0.52、-0.09 および 0.92 mmoL）、1 mg/kg の用量において有意な上昇作用を示した（Figure 4）。この結果から、以降の各被験物質の MR 拮抗作用の評価には DOCA（1 mg/kg）を用いた。

<u>スピロノラクトン評価</u>

Control 群と比較して、DOCA（1 mg/kg）はナトリウムバランスを有意に上昇させた（-0.22 vs. 1.24 mmoL）。スピロノラクトン（30、100 および 300 mg/kg）は、DOCA 誘発ナトリウムバランス上昇を用量依存的に、かつ 100 および 300 mg/kg 群においては有意に抑制した（それぞれ 0.88、0.48 および 0.10 mmoL）（Figure 5A）。スピロノラクトンの ED_{50} は 91 mg/kg となった。

<u>エプレレノン評価</u>

Control 群と比較して、DOCA（1 mg/kg）はナトリウムバランスを有意に上昇させた（-0.38 vs. 1.45 mmoL）。エプレレノン（30、100 および 300 mg/kg）は、DOCA 誘発ナトリウムバランス上昇を用量依存的に、かつ 100 および 300 mg/kg 群においては有意に抑制した（それぞれ 1.42、0.78 およ

び 0.42 mmoL）（Figure 5B）。エプレレノンの ED_{50} は 208 mg/kg となった。

DSR-11861 評価

Control 群と比較して、DOCA（1 mg/kg）はナトリウムバランスを有意に上昇させた（-0.17 vs. 1.50 mmoL）。DSR-11861（10、30 および 100 mg/kg）は、DOCA 誘発ナトリウムバランス上昇を用量依存的に、かつ 30 および 100 mg/kg 群においては有意に抑制した（それぞれ 1.09、0.66 および 0.32 mmoL）（Figure 5C）。DSR-11861 の ED_{50} は 30 mg/kg となった。

SM-368229 評価

Control 群と比較して、DOCA（1 mg/kg）はナトリウムバランスを有意に上昇させた（-0.32 vs. 1.99 mmoL）。SM-368229（1、3、10 および 30 mg/kg）は、DOCA 誘発ナトリウムバランス上昇を用量依存的に、かつ 3、10 および 30 mg/kg 群においては有意に抑制した（それぞれ 1.33、0.72、0.46 および 0.01 mmoL）（Figure 5D）。SM-368229 の ED_{50} は 2.4 mg/kg となった。

DSR-14397 評価

Control 群と比較して、DOCA（1 mg/kg）はナトリウムバランスを有意に上昇させた（-0.23 vs. 1.46 mmoL）。DSR-14397（1、3、10 および 30 mg/kg）は、いずれの用量においても、DOCA で誘発されるナトリウムバランスの上昇を有意に抑制することはできなかった（それぞれ 1.31、0.97、1.10 および 0.92 mmoL）（Figure 5E）。DSR-14397 の ED_{50} は 30 mg/kg 以上となった。

In vivo MR アゴニスト作用評価

SM-368229 およびスピロノラクトン評価

Control 群と比較して、DOCA（1 mg/kg）は尿中ナトリウム/カリウム比を有意に減少させた（11.7 vs. 1.8）。SM-368229（3、10 および 30 mg/kg）は、尿中ナトリウム/カリウム比の減少作用を示し、10 mg/kg 群においては有意な作用を示した（それぞれ 8.7、6.5 および 7.7）。スピロノラクトンは、尿中ナトリウム/カリウム比に対しては作用を示さなかった（13.9）（Figure 6A）。

DSR-14397 評価

Control 群と比較して、DOCA（1 mg/kg）は尿中ナトリウム/カリウム比を有意に減少させた（11.5 vs. 1.4）。DSR-14397（1、3 および 10 mg/kg）は、尿中ナトリウム/カリウム比の減少作用を示し、いずれの用量においても有意な作用を示した（それぞれ 3.1、2.3 および 3.5）（Figure 6B）。

Table 1 Effects of test compounds on PK parameters in rats

Test compounds	BA (%)	Cmax (μg/mL)	AUC (μg•hour/mL)
Spironolactone	N.D.	N.D.	N.D.
Eplerenone	*25.6	*1.7	*2.4
DSR-11861	88.5	9.7±0.8	29±2
SM-368229	61.1	8.0±0.8	107±6
DSR-14397	99.6	10.2±0.7	91±8

Male SD rats were treated with DSR-11861, SM-368229, and DSR-14397 orally (10 mg/kg) or intravenously (1 mg/kg). Plasma concentrations of test compounds were measured 0.08 (only intravenously), 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, and 24 hour after administration using a LC/MS/MS. Data are shown as means ± S.D. (n = 2-3).
*The pharmacokinetics data of eplerenone (15 mg/kg, p.o. in rats) are cited from reference 72.

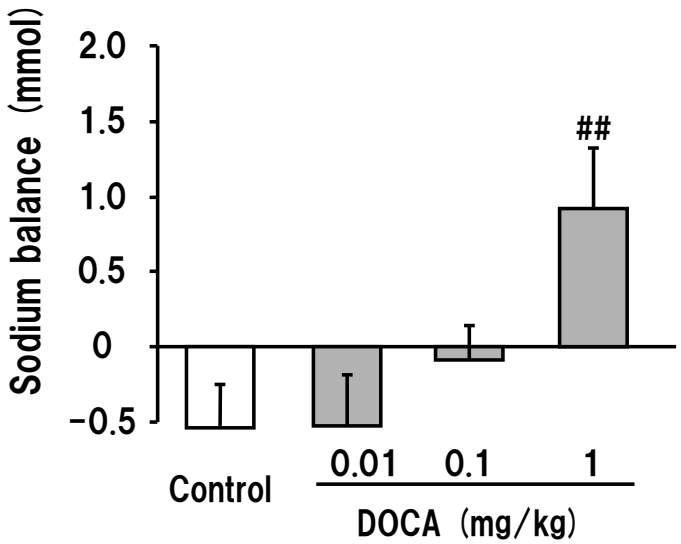

Figure 4 Effects of DOCA on sodium balance in adrenalectomized rats
Adrenalectomized SD rats were subcutaneously administered DOCA (0.01, 0.1, and 1 mg/kg) and orally 0.9% NaCl (20 mL/kg), and maintained in metabolic cages for 23 hours. The sodium balance was calculated as the sodium excretion subtracted from sodium intake. Data are shown as means ± S.D. (n = 4-5). ## $P < 0.01$ vs. Control by Dunnett's multiple comparison test

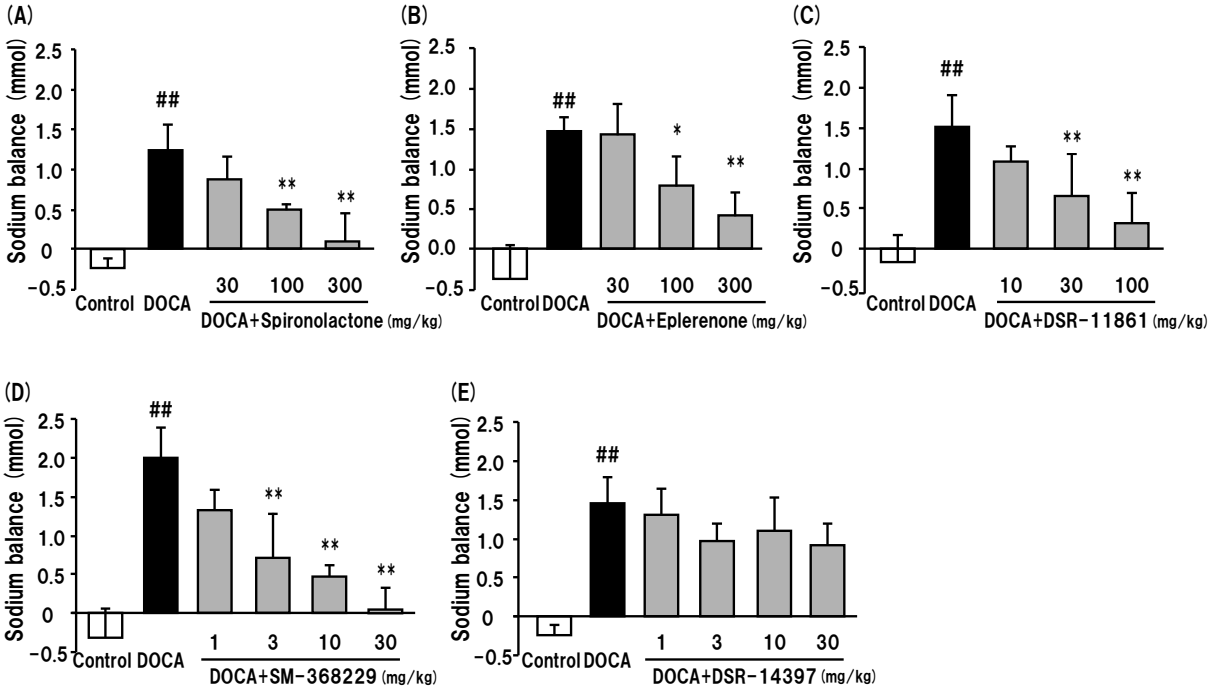

Figure 5 Effects of test compounds on sodium balance in adrenalectomized rats

Adrenalectomized SD rats were orally administered (A) spironolactone (30, 100, and 300 mg/kg), (B) eplerenone (30, 100, and 300 mg/kg), (C) DSR-11861 (10, 30, and 100 mg/kg), (D) SM-368229 (1, 3, 10, and 30 mg/kg), or (E) DSR-14397 (1, 3, 10, and 30 mg/kg), and 30 minutes later, 0.9% NaCl (20 mL/kg, p.o.) and DOCA (1 mg/kg, s.c.) were administered, and maintained in metabolic cages for 23 hours. The sodium balance was calculated as the sodium excretion subtracted from sodium intake. Data are shown as means ± S.D. (n = 4-5). ## $P < 0.01$ vs. Control by Student's *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. DOCA by Dunnett's multiple comparison test

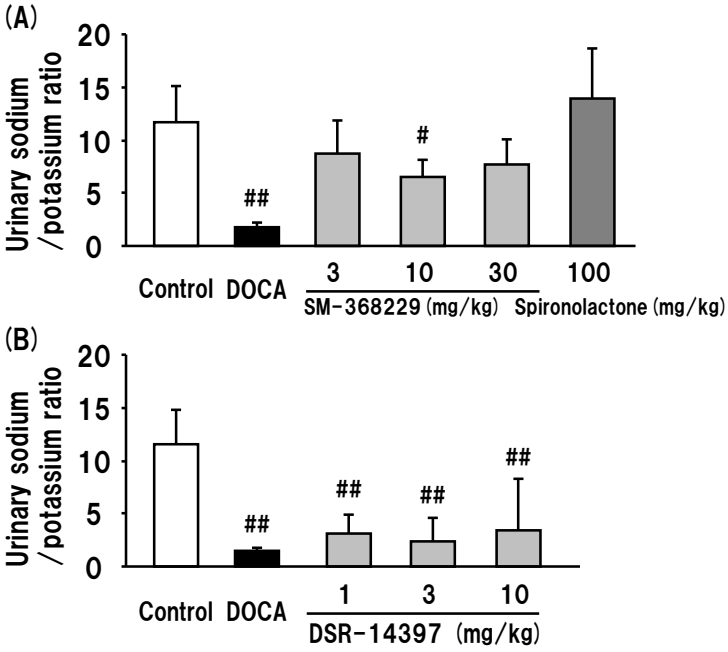

Figure 6 Effects of SM-368229 and DSR-14397 on MR agonistic activity in adrenalectomized rats

Adrenalectomized SD rats were administered (A) SM-368229 (3, 10, and 30 mg/kg, p.o.), or spironolactone (100 mg/kg, p.o.), (B) DSR-14397 (1, 3, and 10 mg/kg, p.o.), and 30 minutes later, 0.9% NaCl (20 mL/kg, p.o.) and DOCA (1 mg/kg, s.c.) or corn oil (1 mL/kg, s.c.) were administered, and maintained in metabolic cages for 23 hours. The urinary sodium/potassium ratio was measured. Data are shown as means ± S.D. (n = 5). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. Control by Dunnett's multiple comparison test

第３節　新規 MR 拮抗薬の高カリウム血症リスクに対する作用

・背景と目的

第２節にて、新規 MR 拮抗薬の DSR-11861 と SM-368229 がスピロノラクトンやエプレレノンよりも強い DOCA 誘発ナトリウムバランス上昇に対する抑制作用を示すことが明らかになった。MR 拮抗薬による高カリウム血症は、腎臓での MR 活性抑制によりカリウム排泄が減少することで引き起こされる。そのため、新規 MR 拮抗薬が既存薬よりも強い MR 拮抗作用を示したとしても、血清カリウム濃度上昇作用との安全マージンがなければ、既存の MR 拮抗薬が抱えている高カリウム血症リスクの課題を克服できない。そこで、新規 MR 拮抗薬と既存 MR 拮抗薬の高カリウム血症リスクを評価するための評価系を構築し、その系を用いて被験物質の血清カリウム濃度に対する作用を検討することとした。さらに、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬の代わりに、スピロノラクトンとアルドステロンを併用し、血清カリウム濃度に対する作用を検討することとした。

・実験方法

被験物質

被験物質の入手および調製は、第１章、第１節に記載の方法に準じた。

実験動物

実験動物の入手および飼育に関しては、第１章、第２節に記載の方法に準じた。

経口カリウム負荷試験

Adam らの方法 [54, 70] を改変して実施した。すなわち、雄性 SD ラット（日本エスエルシー株式会社）にスピロノラクトン（300 mg/kg）もしくは 0.5% MC を経口投与し、その 1 時間後に 15% KCl 溶液もしくは蒸留水を 10 mL/kg で経口投与した。KCl 溶液もしくは蒸留水投与 23 時間後に、血液サンプルを回収し、分光光度計（JCA-BM 1650、日本電子株式会社）にて血清カリウム濃度を測定した。なお、食餌による血清カリウム濃度の影響を少なくするため、試験前日から試験期間中は絶食・自由飲水条件下で実施した。

被験物質の高カリウム血症リスク評価時は、被験物質を経口投与し、その 1 時間後に 15% KCl を 10 mL/kg で経口投与した。KCl 投与 23 時間後に、血液サンプルを回収し、血清カリウム濃度を測定した。Control（0.5% MC + 1.5 g/kg KCl）群と比較して、血清カリウム濃度を 0.5 mmol/L 上

昇させる用量を各被験物質の $ED_{0.5}$ として算出した。

各被験物質投与群の用量および例数は以下の通りとした。スピロノラクトン、DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 はいずれも 30、100 および 300 mg/kg に、エプレレノンは 100、300 および 1000 mg/kg に設定した。スピロノラクトンとアルドステロン併用実験において、スピロノラクトンの用量は 300 mg/kg に、アルドステロンの用量は 1、3 および 10 mg/kg に設定した。各実験群は、4～5 例で実施した。

統計解析

統計解析は、第１章、第２節に記載の方法に準じた。

・結果

高カリウム血症リスクの評価系構築

カリウム無負荷時において、スピロノラクトン（300 mg/kg）は、血清カリウム濃度を有意に上昇させた（5.1 vs. 5.9 mmol/L）。また、カリウム負荷のみを行っても、血清カリウム濃度は全く上昇しなかったが（5.1 mmol/L）、スピロノラクトン 300 mg/kg 投与後にカリウム負荷を行うと、血清カリウム濃度は顕著に上昇した（7.0 mmol/L）（Figure 7）。以上の結果から、被験物質の評価を安定して行うために、血清カリウム濃度上昇幅の大きい 1.5 g/kg KCl 負荷条件を用いて、高カリウム血症リスクを評価した。

スピロノラクトン評価

Control 群と比較して、スピロノラクトン（30、100 および 300 mg/kg）は、用量依存的に、かつ 300 mg/kg 群においては有意に血清カリウム濃度を上昇させた（Control: 5.2 mmol/L; スピロノラクトン: それぞれ 5.4、5.9 および 6.5 mmol/L）（Figure 8A）。スピロノラクトンの $ED_{0.5}$ は、58 mg/kg となった。

エプレレノン評価

Control 群と比較して、エプレレノン（100、300 および 1000 mg/kg）は、用量依存的に、かつ 1000 mg/kg 群においては有意に血清カリウム濃度を上昇させた（Control: 5.5 mmol/L; エプレレノン: それぞれ 5.7、5.8 および 6.2 mmol/L）（Figure 8B）。エプレレノンの $ED_{0.5}$ は、512 mg/kg となった。

DSR-11861 評価

Control 群と比較して、DSR-11861（30、100 および 300 mg/kg）は、用量依存的に、かつ 100 および 300 mg/kg 群においては有意に血清カリウム濃度を上昇させた（Control: 5.0 mmol/L; DSR-11861: それぞれ 5.2、5.9 および 5.9 mmol/L）（Figure 8C）。DSR-11861 の $ED_{0.5}$ は、52 mg/kg となった。

SM-368229 評価

Control 群と比較して、SM-368229（30、100 および 300 mg/kg）は、いずれの用量においても明確な血清カリウム濃度上昇作用を示さなかった（Control: 5.4 mmol/L; SM-368229: それぞれ 5.6、5.5 および 5.7 mmol/L）（Figure 8D）。SM-368229 の $ED_{0.5}$ は、300 mg/kg 以上となった。

DSR-14397 評価

Control 群と比較して、DSR-14397（30、100 および 300 mg/kg）は、いずれの用量においても明確な血清カリウム濃度上昇作用を示さなかった（Control: 5.3 mmol/L; DSR-14397: それぞれ 5.1、5.4 および 5.5 mmol/L）（Figure 8E）。DSR-14397 の $ED_{0.5}$ は、300 mg/kg 以上となった。

MR 拮抗作用と高カリウム血症リスクの関連性

被験物質による MR 拮抗作用と高カリウム血症リスクを横並びで比較するため、副腎摘出ラットにおけるナトリウムバランス抑制率と経口カリウム負荷ラットにおける血清カリウム濃度作用の変化量を縦軸に、横軸に各被験物質の用量をプロットした。パーシャルアゴニスト活性を有していない MR 拮抗薬（スピロノラクトン、エプレレノンおよび DSR-11861）および DSR-14397 は、MR 拮抗作用と血清カリウム濃度上昇作用の用量相関はほぼパラレルとなったが、SM-368229 は MR 拮抗作用と血清カリウム濃度上昇作用が大きく乖離した（Figure 9）。

スピロノラクトンとアルドステロン併用による評価

Control 群と比較して、スピロノラクトン（300 mg/kg）は、血清カリウム濃度を有意に上昇させた（5.2 vs. 6.9 mmol/L）。アルドステロン（1、3 および 10 mg/kg）を併用することで、スピロノラクトンで上昇する血清カリウム濃度は用量依存的に抑制され（それぞれ 6.7、5.9 および 5.1 mmol/L）、10 mg/kg 群において有意な抑制作用を示した。一方、アルドステロン単独投与（10 mg/kg）は、血清カリウム濃度の低下傾向を示したが（4.9 mmol/L）、統計学的に有意な作用を示さなかった（Figure 10）。

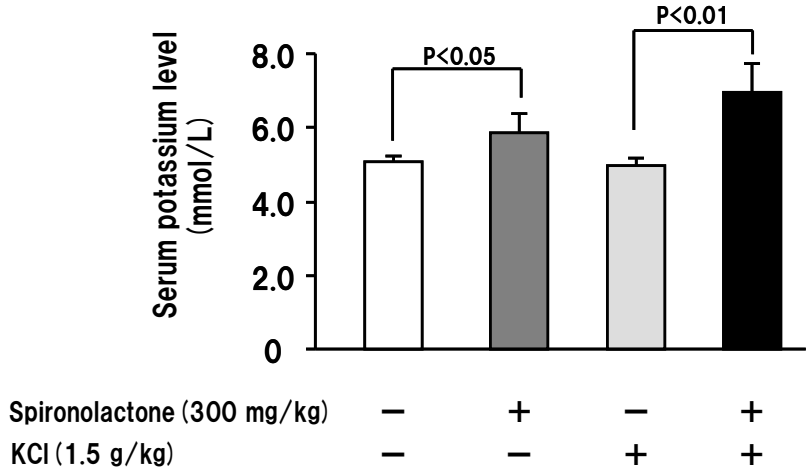

Figure 7 Effects of spironolactone on serum potassium level in potassium-loaded rats
SD rats were orally administered spironolactone (300 mg/kg) or 0.5% MC, and 60 minutes later, 15% KCl or distilled water (10 mL/kg) was administered. Serum potassium level was measured 23 hours after KCl or distilled water administration. Data are shown as means ± S.D. (n = 5). Statistical significance was determined using Student's *t*-test.

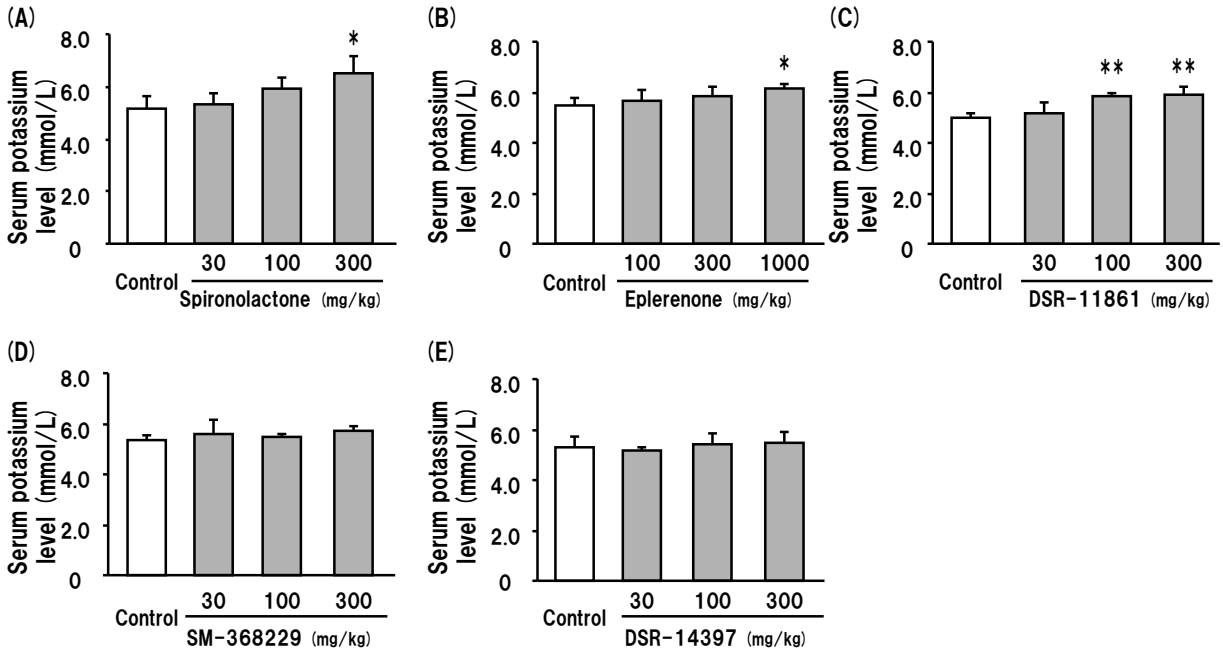

Figure 8 Effects of test compounds on serum potassium level in potassium-loaded rats
SD rats were orally administered (A) spironolactone (30, 100, and 300 mg/kg), (B) eplerenone (100, 300, and 1000 mg/kg), (C) DSR-11861 (30, 100, and 300 mg/kg), (D) SM-368229 (30, 100, and 300 mg/kg), or (E) DSR-14397 (30, 100, and 300 mg/kg), and 60 minutes later, KCl solution (1.5 g/kg) was orally administered. Serum potassium level was measured 23 hours after KCl administration. Data are shown as means ± S.D. (n = 4-5). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Control by Dunnett's multiple comparison test

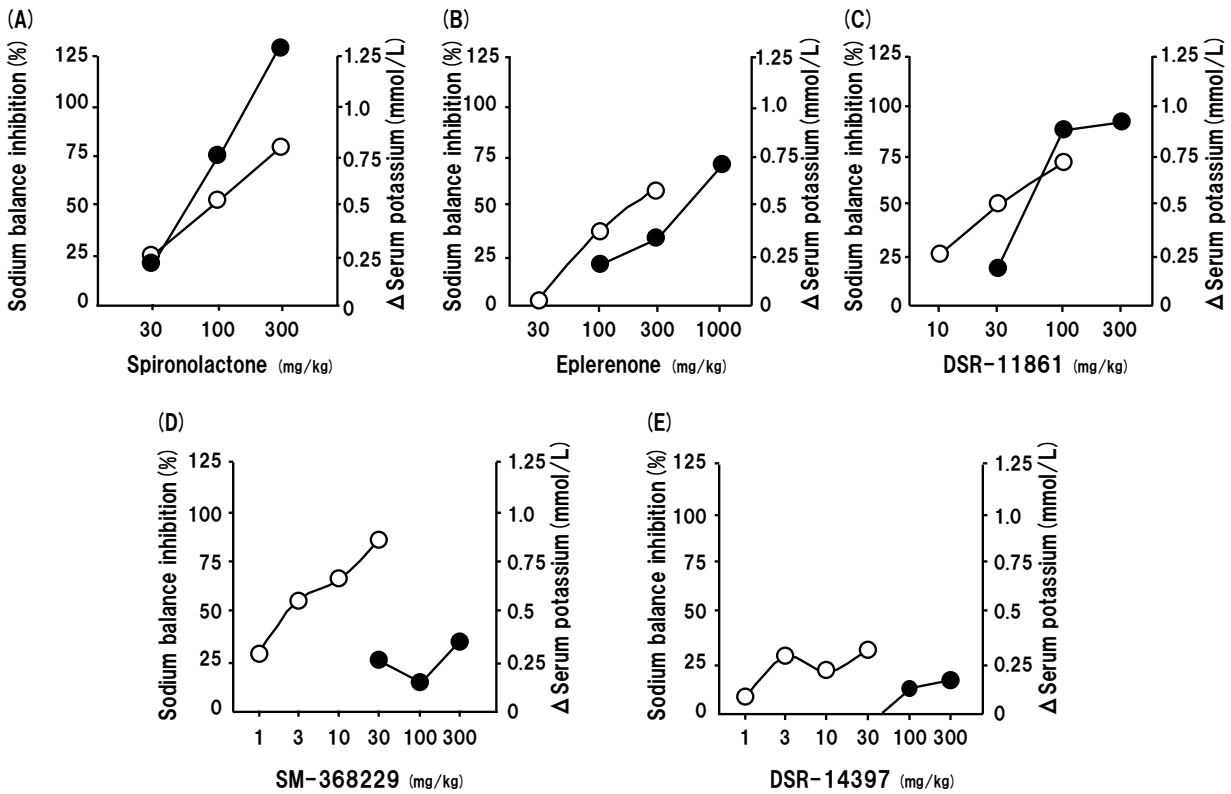

Figure 9 The relationships between sodium balance inhibition and serum potassium elevation in rats
The effects of (A) spironolactone, (B) eplerenone, (C) DSR-11861, (D) SM-368229, and (E) DSR-14397 on the sodium balance inhibition (%) were evaluated in adrenalectomized rats (white circles), and those of (A) spironolactone, (B) eplerenone, (C) DSR-11861, (D) SM-368229, and (E) DSR-14397 on the serum potassium elevation (mmol/L) were evaluated in potassium-loaded rats (black circles). Data are shown as means (n = 4-5)

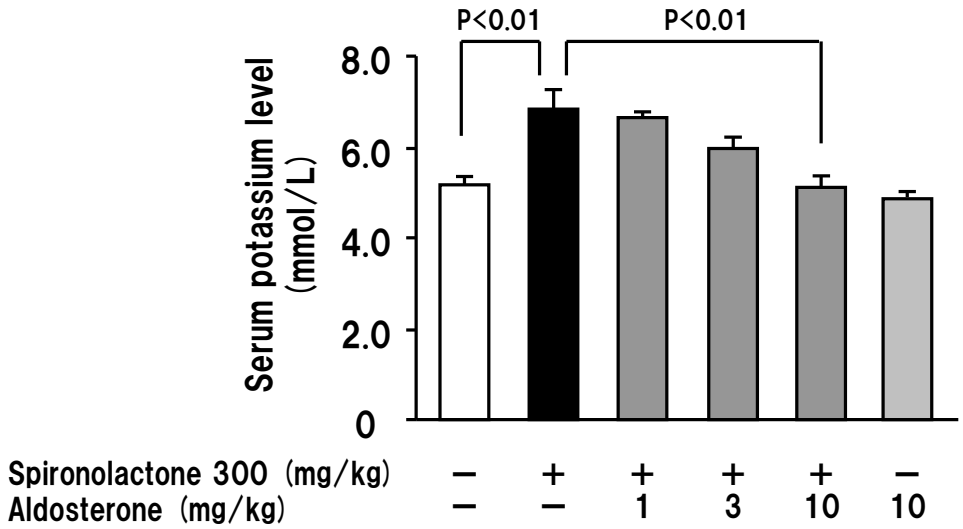

Figure 10 Effects of aldosterone on serum potassium level in potassium-loaded rats
SD rats were orally administered spironolactone (300 mg/kg) and subcutaneously aldosterone (1, 3, and 10 mg/kg), and 60 minutes later, KCl solution (1.5 g/kg) was orally administered. Serum potassium level was measured 23 hours after KCl administration. Data are shown as means ± S.D. (n = 4). Statistical significance was determined using Student's *t*-test or Dunnett's multiple comparison test

第４節　考察および小括

本章では、MR パーシャルアゴニスト活性の高カリウム血症リスクに対する作用を明らかにすることを目的に、種々の検討を実施した。

第 1 節では、新規のベンズオキサジン誘導体である DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 の MR に対する作用を in vitro で検討した。ベンズオキサジン誘導体は、スピロノラクトンやエプレレノンと同様に、^{3}H-アルドステロンの特異的結合を用量依存的に、かつ完全に抑制したことより、MR の LBD に対する競合拮抗作用を示すと考えられた。また、in vitro における MR 拮抗作用の順列は、スピロノラクトン>SM-368229≧DSR-14397>エプレレノン>DSR-11861 となり、SM-368229 と DSR-14397 は、エプレレノンよりも強く MR へ結合することが明らかになった。さらに、DSR-11861、SM-368229 および DSR-14397 は、10 μmol/L において、それぞれ 0%、12%および 36%と異なる MR パーシャルアゴニスト活性を示したことより、パーシャルアゴニスト活性の違いによる薬理作用を検討することが可能になると考えられた。

第 2 節では、新規 MR 拮抗薬の MR に対する作用を in vivo で検討した。in vivo における MR 拮抗作用の順列は、SM-368229>DSR-11861>スピロノラクトン>エプレレノン>DSR-14397 となった。DSR-11861 は、in vitro における MR 拮抗作用がエプレレノンよりも弱いにも関わらず、in vivo MR 拮抗作用はエプレレノンよりも強い作用を示した。この理由として、DSR-11861 がエプレレノンよりも良好な薬物動態プロフィールを示すことが関与していると考えられた。エプレレノンは、ヒトおよびラットにおける AUC が小さく [71, 72]、スピロノラクトンより in vitro の MR 拮抗作用が弱いため [66]、臨床においても抗高血圧作用が弱いことが問題となっている [73, 74]。スピロノラクトンも、in vitro MR 拮抗作用が SM-368229 や DSR-11861 より強いにも関わらず、in vivo MR 拮抗作用は両化合物よりも弱い結果となった。しかし、スピロノラクトンは、複数の活性代謝体を有することや、ラットとヒトでの代謝パターンが異なることより [75, 76]、薬物動態プロフィールによる考察は難しいと考えられた。また、DSR-14397 の in vitro MR 拮抗作用やラット PK 試験の AUC は SM-368229 と同程度にも関わらず、DSR-14397 がナトリウムバランスを明確に抑制できなかったことより、強い MR パーシャルアゴニスト活性は in vivo MR 拮抗作用を減弱させると考えられた。

第 3 節では、新規および既存 MR 拮抗薬の高カリウム血症リスクを評価するため、ラットの経口カリウム負荷試験を実施した。慢性心不全患者では、利尿薬による低カリウム血症を予防するために、カリウムサプリメントを服用することがあるが [77]、Poggio らは、スピロノラクトンとカリウムサプリメントを服用している心不全患者において、高カリウム血症が高頻度でみられると報告しており [78]、今回用いた経口カリウム負荷ラットは、MR 拮抗薬とカリウム摂取により惹起

される高カリウム血症を反映したモデルに成り得ると考えられる。実際、本評価系において、パーシャルアゴニスト活性のない MR 拮抗薬スピロノラクトン、エプレレノンおよび DSR-11861 は、ナトリウムバランス抑制作用の ED_{50}（それぞれ 91、208 および 30 mg/kg）と、血清カリウム濃度上昇作用の $ED_{0.5}$ が近い値を示した（それぞれ 58、512 および 52 mg/kg）。一方、SM-368229 や DSR-14397 のようなパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬は、本モデルにおいて明確な血清カリウム濃度上昇作用を示さなかったことより、MR のパーシャルアゴニスト活性が、高カリウム血症リスク低減化に大きく寄与していると考えられた。さらに、スピロノラクトンで誘発される血清カリウム濃度上昇作用が、アルドステロン併用で用量依存的に、かつ完全に抑制されたことからも、我々の作業仮説を支持する結果が得られたと考えている。加えて、SM-368229 のように、適度（12%）のパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬が、薬効を保持しつつ、高カリウム血症リスクを低減化させることが可能になると考えられた（Figure 9）。

MR 拮抗薬の血清カリウム濃度上昇作用は、MR 拮抗作用により腎臓におけるカリウム排泄が減少することに起因すると考えられるため、経口カリウム負荷ラットにおける尿中カリウム排泄量を予備的に測定した。Control 群と比較して、スピロノラクトン（300 mg/kg）は、有意な尿中カリウム排泄量の低下作用を示したが（4.7 vs. 3.9 mmol）、SM-368229（300 mg/kg）は、尿中カリウム排泄量の有意な低下作用を示さなかった（4.8 vs. 4.6 mmol）。これらの結果より、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬は、カリウム排泄を過度に抑制しないことから、高カリウム血症リスクの低減化につながると考えられた。

また、カリウム摂取だけでなく、腎機能低下も MR 拮抗薬による高カリウム血症リスクを上昇させる大きな要因となっている[40, 45]。EPHESUS サブ解析においても、eGFR が 60 mL/min/1.73 m^2 以下の腎機能低下患者では、高カリウム血症の頻度が多いことが報告されている（プラセボ：13.8% vs. エプレレノン：22.1%）[79]。従って、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬の高カリウム血症リスクをより明確化するためにも、5/6 腎摘出ラットのような腎機能低下動物を用いて[80, 81]、高カリウム血症リスクを評価することが重要になると考えられる。

第 1 章の結果をまとめると、MR のパーシャルアゴニスト活性が、高カリウム血症リスク低減化に大きく寄与していると考えられた。しかしながら、比較的強いパーシャルアゴニスト活性は、主作用である MR 拮抗作用を減弱させるため、適度のパーシャルアゴニスト活性を付与することで、MR 拮抗作用を保持しつつ高カリウム血症リスク低減化作用を発揮できると考えられた。

第２章 高血圧自然発症ラットでの新規 MR 拮抗薬の作用

第１節　血圧と血清カリウム濃度に対する作用

・背景と目的

第１章にて、新規 MR 拮抗薬の薬効と高カリウム血症リスクを、それぞれ異なるモデルで単回投与の試験系で評価したが、その高カリウム血症リスク低減化作用が、同一個体で反復投与試験でも維持されているか否かは不明である。そこで、高血圧自然発症ラット（SHRs）を用いて、SM-368229 および DSR-14397 の反復経口投与時における血圧と血清カリウム濃度に対する作用を、スピロノラクトンおよびエプレレノンと比較検討することとした。SHRs は、ヒトの本態性高血圧の病態に類似した特徴を示すラットであり、若週齢から血圧が自然に上昇するため、これまでに多くの高血圧治療薬の薬効評価に使用されている病態モデル動物である[82-84]。

・実験方法

被験物質

被験物質の入手および調製は、第１章、第１節に記載の方法に準じた。

実験動物

実験動物の入手および飼育に関しては、第１章、第２節に記載の方法に準じた。

試験デザイン

血圧測定に馴致させた 11 週齢の雄性 SHR/Hos（日本エスエルシー株式会社）を試験に用いた。試験前日までに、SHRs の収縮期血圧および血清カリウム濃度を測定し、それらのパラメータを用いて群分けを実施した。その後、被験物質を 1 日 1 回、2 週間反復経口投与し、2 週間投与後に血圧を測定した。その後、エーテル麻酔下において腹部大動脈から全採血を実施し、血清カリウム濃度測定用の血液サンプルを回収した。

各被験物質投与群の用量および例数は以下の通りとした。第１章、第２節でナトリウムバランス抑制作用を示した用量を参考に、スピロノラクトンは、30、100 および 300 mg/kg に、エプレレノンは、10、30 および 100 mg/kg に、SM-368229 は、1、3 および 10 mg/kg に、DSR-14397 は、3、10 および 30 mg/kg に設定した。各実験群は、6～8 例で実施した。

収縮期血圧の測定

収縮期血圧の測定は、群分け前日および投与 2 週間後に行った。ラットをホルダーに挿入し、38-40℃で 5-10 分間加温後、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、無麻酔下 tail cuff 法にて測定し、3 回の測定の平均値を求めた。

統計解析

統計解析は、第１章、第２節に記載の方法に準じた。

・結果

スピロノラクトン評価

Control 群では、2 週間の試験期間を通じて収縮期血圧は自然に上昇した（183.3→215.0 mmHg）。スピロノラクトン（30、100 および 300 mg/kg）は、用量依存的に、かつ 100 および 300 mg/kg 群において有意な昇圧抑制作用を示した（それぞれ 207.0、193.5 および 189.4 mmHg）（Figure 11A）。

血清カリウム濃度に対しては、Control 群では、2 週間の試験期間を通じてほとんど変化がみられなかった（4.3→4.4 mmol/L）。スピロノラクトン（30、100 および 300 mg/kg）は、用量依存的に、かつ 300 mg/kg 群において有意に血清カリウム濃度を上昇させた（それぞれ 4.5、4.8 および 4.9 mmol/L）（Figure 12A）。

エプレレノン評価

Control 群では、2 週間の試験期間を通じて収縮期血圧は自然に上昇した（192.0→205.5 mmHg）。エプレレノン（10、30 および 100 mg/kg）は、用量を上げても明確な昇圧抑制作用を示さなかった（それぞれ 203.5、202.5 および 199.8 mmHg）（Figure 11B）。

血清カリウム濃度に対しては、Control 群では、2 週間の試験期間を通じてほとんど変化がみられなかった（4.3→4.2 mmol/L）。エプレレノン（10、30 および 100 mg/kg）は、いずれの用量においても明確な血清カリウム濃度に対する作用を示さなかった（それぞれ 4.2、4.3 および 4.1 mmol/L）（Figure 12B）。

SM-368229 評価

Control 群では、2 週間の試験期間を通じて収縮期血圧は自然に上昇した（192.0→215.5 mmHg）。SM-368229（1、3 および 10 mg/kg）は、用量依存的に、かついずれの用量においても有意な昇圧抑制作用を示した（それぞれ 198.0、195.2 および 189.7 mmHg）（Figure 11C）。

血清カリウム濃度に対しては、Control 群では、2 週間の試験期間を通じてほとんど変化がみら

れなかった（4.4→4.5 mmol/L）。SM-368229（1、3 および 10 mg/kg）は、いずれの用量においても明確な血清カリウム濃度に対する作用を示さなかった（それぞれ 4.4、4.4 および 4.5 mmol/L）（Figure 12C）。

DSR-14397 評価

Control 群では、2 週間の試験期間を通じて収縮期血圧は自然に上昇した（183.3→210.1 mmHg）。DSR-14397（3、10 および 30 mg/kg）は、用量を上げても明確な昇圧抑制作用を示さなかった（それぞれ 204.9、199.6 および 200.6 mmHg）（Figure 11D）

血清カリウム濃度に対しては、Control 群では、2 週間の試験期間を通じてほとんど変化がみられなかった（4.3→4.5 mmol/L）。DSR-14397（3、10 および 30 mg/kg）は、用量依存的に、かつ 10 および 30 mg/kg 群において有意に血清カリウム濃度を低下させた（それぞれ 4.4、4.1 および 4.0 mmol/L）（Figure 12D）。

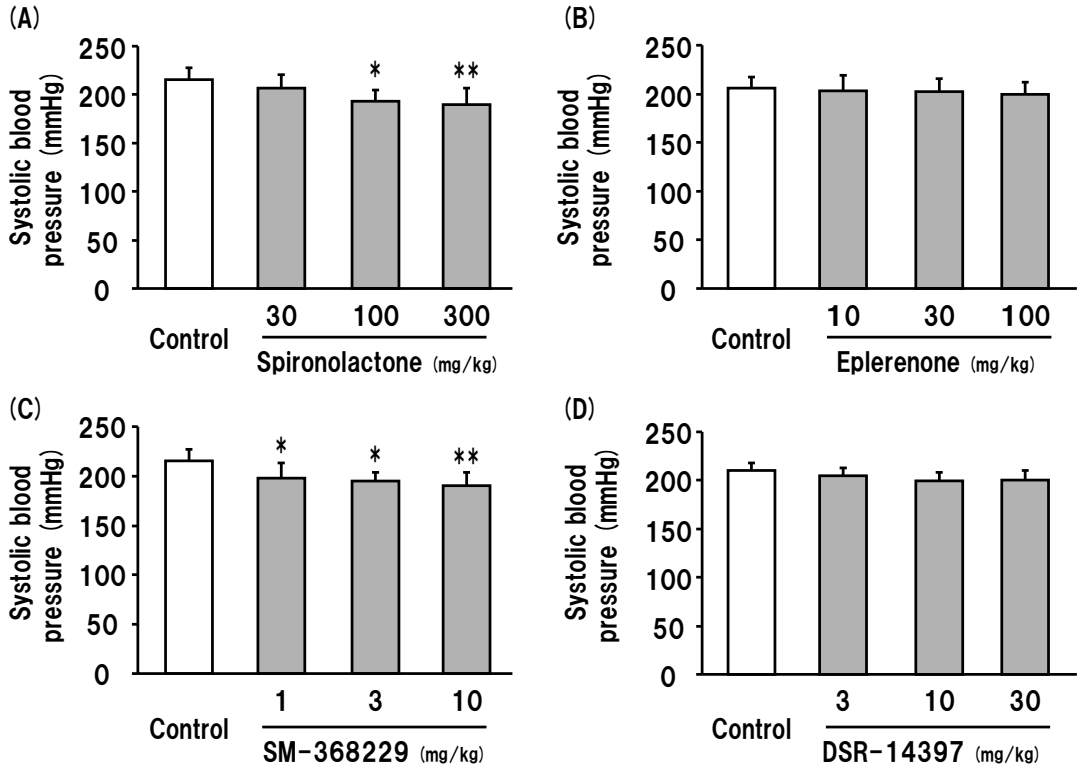

Figure 11 Effects of test compounds on systolic blood pressure in SHRs

SHRs were orally administered (A) spironolactone (30, 100, and 300 mg/kg), (B) eplerenone (10, 30, and 100 mg/kg), (C) SM-368229 (1, 3, and 10 mg/kg), or (D) DSR-14397 (3, 10, and 30 mg/kg) once a day for 2 weeks. Trough systolic blood pressure was measured after 2 weeks drug treatments in the morning in conscious rats by tail-cuff method. Data are shown as means ± S.D. (n = 6-8). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Control by Dunnett's multiple comparison test

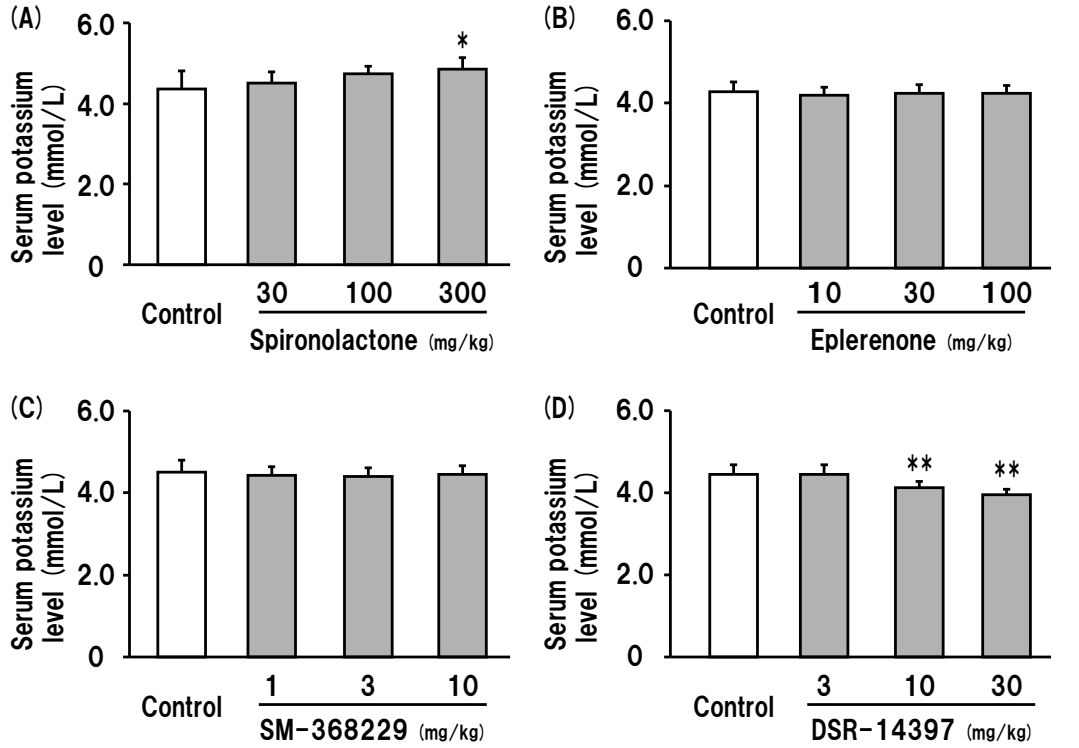

Figure 12 Effects of test compounds on serum potassium level in SHRs

SHRs were orally administered (A) spironolactone (30, 100, and 300 mg/kg), (B) eplerenone (10, 30, and 100 mg/kg), (C) SM-368229 (1, 3, and 10 mg/kg), or (D) DSR-14397 (3, 10, and 30 mg/kg) once a day for 2 weeks. Trough serum potassium level was measured after 2 weeks drug treatments. Data are shown as means ± S.D. (n = 6-8). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Control by Dunnett's multiple comparison test

第２節　考察および小括

本章では、パーシャルアゴニスト活性を有する新規 MR 拮抗薬の血圧と血清カリウム濃度に対する作用を、SHRs を用いて評価した。

スピロノラクトンおよびSM-368229は、有意な昇圧抑制作用を示し、それぞれの血圧を20 mmHg低下させる用量 ED_{20} は 94 および 2.7 mg/kg となり、ナトリウムバランス抑制作用を示す ED_{50} の 91 および 2.4 mg/kg とほぼ同様の値になった。これらの結果から、SHRs での反復経口投与による降圧作用は、MR 拮抗作用（ナトリウムバランス抑制作用）に起因する可能性を示唆しているものと考えられた。他方、SHRs において、エプレレノンで明確な抗高血圧作用が認められなかった点に関して、エプレレノンのナトリウムバランス抑制作用を示す ED_{50} は 208 mg/kg であり、本試験で用いた最高用量の 100 mg/kg では、用量が低かったと推測される。実際、Brandish らは、エプレレノン 300 mg/kg を反復経口投与することで、SHRs において降圧作用と血清カリウム濃度上昇作用がみられることを報告していることより [84]、エプレレノンの用量を上げることで、SHRs における降圧作用および血清カリウム濃度上昇作用を評価できると考えられた。

SM-368229 は、SHRs において、10 mg/kg の低用量でスピロノラクトンの 300 mg/kg に匹敵する抗高血圧作用を示したが、血清カリウム濃度には影響を及ぼさなかった。なお、SM-368229 (100、300 および 1000 mg/kg）は、SD ラットに 2 週間反復経口投与した試験において、血清カリウム濃度に影響を及ぼさなかった（Control: 4.1 mmol/L; SM-368229: それぞれ 4.2、4.2 および 4.0 mmol/L）。

DSR-14397 が in vivo MR 拮抗作用の検討結果と同様に、抗高血圧作用を示すことができなかったことは、比較的強いパーシャルアゴニスト活性が MR 拮抗作用による本来の薬効を減弱させているものと考えられる。しかし、DSR-14397 は、腎臓での MR アゴニスト作用に基づく血清カリウム濃度低下作用を示したにも関わらず、血圧上昇作用を示さなかった。この詳細は不明であるが、MR 活性化による血圧上昇作用には、アゴニスト作用に加えて食塩負荷が必要なのかもしれないと考えている。事実、Shibata らは、ラットを用いた検討において、0.3%NaCl を含有している通常食では、アルドステロン投与による血圧上昇作用はみられないが、8%NaCl 食と同時にアルドステロンを投与することで、顕著に血圧が上昇することを報告している [85]。

パーシャルアゴニスト活性のない MR 拮抗薬であるスピロノラクトンやエプレレノンの用量を下げることで、血清カリウム濃度を上昇させずに、抗高血圧作用を示すことができれば、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬と同じ薬効が期待できると考えられる。しかしながら、SHRs を用いた今回の検討結果から、スピロノラクトンは、30 mg/kg の低用量では、血清カリウム濃度をほとんど変化させなかったが、明確な降圧作用も示さなかった。そして、100 mg/kg という

有意な抗高血圧作用を示す用量では、血清カリウム濃度が 4.33 から 4.75 mmol/L へ上昇傾向を示し、300 mg/kg では有意な抗高血圧作用および血清カリウム濃度上昇作用を示した。このことは、スピロノラクトンが SHRs において抗高血圧作用を示すには、充分な MR 拮抗作用を示す必要があると考えられる。一方、ヒトへの外挿性が高い高血圧モデル動物である SHRs で抗高血圧作用を示すような薬剤は、ヒトの本態性高血圧患者においても抗高血圧作用が期待できると考えられている。本態性高血圧患者を対象にした臨床試験においても、スピロノラクトン 100 mg/day を 8 週間反復経口投与することで、有意な収縮期血圧の低下作用を示し（-15.8 mmHg）、血清カリウム濃度を 4.20 から 4.50 mmol/L と有意に上昇させた [73]。同じ試験において、エプレレノン（50、100 および 400 mg/day）は、有意な収縮期血圧の低下作用を示し（それぞれ-7.5、-11.6 および-16.1 mmHg）、血清カリウム濃度も有意に上昇させた（それぞれ+0.16、+0.15 および+0.33 mmol/L）。これらの知見を総合すると、MR 拮抗作用による降圧作用と血清カリウム濃度上昇作用はパラレルに変動すると考えられる。

高カリウム血症の定義は、血清カリウム濃度が 5.5 mmol/L 以上とする場合が多く、今回の SHRs や本態性高血圧患者の結果のように MR 拮抗薬で血清カリウム濃度をわずかに上昇させた程度では、高カリウム血症を惹起するとは考えにくい。しかしながら、実臨床においては、MR 拮抗薬は、単剤で処方されることは少なく、他の高血圧治療薬や心不全治療薬との併用療法が主体である。特にレニン・アンジオテンシン系阻害薬を服用している患者では、高カリウム血症リスクがさらに高くなる。Khosla らは、ACE 阻害薬、ARBs および利尿薬を用いて治療しても降圧目標を達成できない治療抵抗性高血圧患者に、スピロノラクトン（25 mg/day）もしくはエプレレノン（50 mg/day）を併用すると、収縮期血圧は 157 から 142 mmHg へと有意に低下したが、血清カリウム濃度は 4.1→4.5 mmol/L と有意に上昇し、17%もの高頻度で高カリウム血症が認められたと報告している [43]。Cruz らは、ACE 阻害薬およびループ利尿薬で治療中の心不全患者と比較して、スピロノラクトン併用患者では高カリウム血症リスクが顕著に増加した（2% vs. 32%）と報告している [44]。そのため、単剤で血清カリウム濃度を上昇させるポテンシャルを有している既存の MR 拮抗薬は、実臨床で処方される中で高カリウム血症を惹起する可能性が他剤よりも高いため、処方を敬遠されがちである。SM-368229 のように、用量依存的に抗高血圧作用を増強するが、血清カリウム濃度にはほとんど影響を与えないような薬理プロフィールを有している薬剤であれば、既存 MR 拮抗薬が抱えている課題を改善できると考えられる。

第２章の結果をまとめると、適度のパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬は、SHRs を用いた反復経口投与実験において、抗高血圧作用を発揮しつつ高カリウム血症リスクを低減化できると考えられた。

第３章 アルドステロン/食塩負荷ラットでの新規 MR 拮抗薬の作用

第１節　アルドステロン/食塩負荷と同時投与の作用

・背景と目的

第１章および第２章にて、適度のパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬 SM-368229 が、スピロノラクトンより強い MR 拮抗作用および抗高血圧作用を示すことが明らかになった。しかしながら、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬のアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性が、臓器障害に対して促進的あるいは抑制的に作用するか否かは明らかではない。そこで、アルドステロン/食塩負荷ラットを用い、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬が、血圧や心臓・腎臓の臓器障害にどのような影響を及ぼすかを検討することとした。アルドステロン/食塩負荷ラットは、アルドステロンによる MR の活性化と高食塩状態により、重度の高血圧病態を示すだけでなく、心臓、腎臓および血管の線維化、炎症、酸化ストレスを惹起する病態モデルである [86-89]。また、アルドステロン/食塩負荷で惹起された病態は、MR 拮抗薬（スピロノラクトンやエプレレノン）で抑制されることより、MR 拮抗薬の血圧や臓器障害に対する作用を検討するのに適したモデルであると考えられている。

第１節では、まず、食塩負荷ラットを用いて、MR のパーシャルアゴニストである SM-368229 が、血圧や心臓・腎臓の臓器重量および腎機能障害マーカーに悪影響を及ぼさないか否かを検討した。次に、アルドステロン/食塩負荷ラットを用いて、SM-368229 のアルドステロン/食塩負荷で誘発される血圧上昇、心臓・腎臓の臓器重量および腎機能障害マーカーに対する作用をスピロノラクトンと比較検討することとした。

・実験方法

被験物質

被験物質の入手および調製は、第１章、第１節に記載の方法に準じた。

実験動物

実験動物の入手および飼育に関しては、第１章、第２節に記載の方法に準じた。

アルドステロン/食塩誘発高血圧モデルの作製

Rocha らの方法を参考にアルドステロン/食塩誘発高血圧モデルを作製した [89]。すなわち、SD ラット（日本エスエルシー株式会社）をペントバルビタール（50 mg/kg i.p.、ネンブタール、大日本

住友製薬株式会社）にて麻酔し、左腎の摘出を行った。その後、アルドステロン溶液あるいは溶媒（87%プロピレングリコール、9%エタノール、4%蒸留水）を充填した浸透圧ポンプ（アルゼット Model2004、DURECT Corporation）を背部に埋め込んだ。アルドステロンの投与量は既報に従い[89]、0.75 μg/hr に設定した。術後、飲料水は 1% NaCl + 0.3% KCl 溶液に変更した。

試験デザイン

食塩負荷モデルでの検討時は、被験物質を食塩負荷と同時に、1 日 1 回、20 日間反復経口投与した。アルドステロン/食塩負荷モデルでの検討時は、被験物質をアルドステロン/食塩負荷と同時に、1 日 1 回、14 日間強制反復経口投与した。何れの試験においても、投与最終日に、代謝ケージに収容し、18 時間尿を回収した。採取した尿サンプルを用いて、尿タンパク排泄量（マイクロ TP-テストワコー、和光純薬工業株式会社）および尿 NAG 排泄量（JCA-BM 1650、日本電子株式会社）を測定した。最終投与翌日に、エーテル麻酔下において腹部大動脈から全採血を実施し、血清電解質パラメータ測定用の血液サンプルを回収した。採血後、心臓および腎臓を摘出し、臓器重量を測定した。

各被験物質投与群の用量および例数は以下の通りとした。食塩負荷モデルでの検討において、SM-368229 の用量は 30 mg/kg に設定した。アルドステロン/食塩負荷モデルでの検討において、SM-368229 の用量は 10 および 30 mg/kg に、スピロノラクトンは 100 mg/kg に設定した。各実験群は、4～6 例で実施した。

収縮期血圧の測定

収縮期血圧の測定は、手術前日および術後 1 週間に 2 回の割合で行った。ラットをホルダーに挿入し、38-40℃で 5-10 分間加温後、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、無麻酔下 tail cuff 法にて測定し、3 回の測定の平均値を求めた。

統計解析

統計解析は、第 1 章、第 2 節に記載の方法に準じた。収縮期血圧の統計解析は、最終測定日のデータのみを用いた。

・結果

食塩負荷モデルでの検討

Control 群と比較して、アルドステロン群では血圧は上昇し試験終了時には、有意に上昇した（122.1 vs. 185.6 mmHg）。SM-368229 は、血圧上昇作用を示さなかった（122.1 mmHg）（Figure 13）。

また、被験物質による心拍数への作用はみられなかった（Data not shown）。

Control 群と比較して、アルドステロン群では心臓重量が有意に増加し（0.83 vs. 0.95 mg）、体重は有意に低下し（303 vs. 271 g）、心臓重量/体重比は有意に増加した（2.7 vs. 3.5 mg/g）。SM-368229 は心臓重量および体重には影響を及ぼさず（0.80 mg および 302 g）、心臓重量/体重比の増加作用を示さなかった（2.7 mg/g）（Figure 14A, B, and C）。（Figure 14A, B, and C）。腎臓に関しても、Control 群と比較して、アルドステロン群では腎臓重量の有意な増加作用を示し（1.5 vs. 2.0 mg）、腎臓重量/体重比は有意に増加したが（4.7 vs. 7.3 mg/g）、SM-368229 は腎臓重量および腎臓重量/体重比の増加作用を示さなかった（それぞれ 1.4 mg および 4.6 mg/g）（Figure 14D and E）。

尿パラメータに関して、Control 群と比較してアルドステロン群で腎機能障害のマーカーである尿タンパク排泄量が有意に増加したが（18.7 vs. 113 mg/18hr）、SM-368229 は増加作用を示さなかった（20.1 mg/18hr）（Figure 14F）。近位尿細管の障害マーカーである尿 NAG 排泄量に関しても、Control 群と比較してアルドステロン群では有意に増加したが（0.14 vs. 0.35 U/18hr）、SM-368229 は増加作用を示さなかった（0.09 U/18hr）（Figure 14 G）。

血清電解質に関しては、Control 群と比較してアルドステロン群で血清ナトリウム濃度は有意に上昇し（146.5 vs. 151.7 mmol/L）、血清カリウム濃度は有意に低下した（5.2 vs. 3.8 mmol/L）。SM-368229 は、血清ナトリウム濃度および血清カリウム濃度にほとんど影響を与えなかった（それぞれ 147.0 mmol/L および 5.3 mmol/L）（Figure 15 A and B）。

<u>アルドステロン/食塩負荷モデルでの検討</u>

Control 群と比較してアルドステロン群では、試験期間を通して血圧は徐々に上昇し、試験終了時には、有意に上昇した（126.9 vs. 184.4 mmHg）。SM-368229（10 および 30 mg/kg）およびスピロノラクトンは、アルドステロン/食塩負荷による血圧上昇を有意に抑制した（それぞれ 146.2、133.0 および 148.3 mmHg）（Figure 16）。また、被験物質による心拍数への作用はみられなかった（Data not shown）。

Control 群と比較してアルドステロン群では、心臓重量および体重に有意な変化はみらなかったが（それぞれ 0.79 vs. 0.88 mg および 277 vs. 255 g）、心臓重量/体重比は有意に増加した（2.9 vs. 3.5 mg/g）。SM-368229 （10 および 30 mg/kg）およびスピロノラクトンは、アルドステロン/食塩負荷で誘発される心臓重量の増加には影響を与えなかったが（それぞれ 0.87、0.80 および 0.83 mg）、体重の減少を有意に抑制し（それぞれ 292、283 および 276 g）、心臓重量/体重比の増加を有意に抑制した（それぞれ 3.0、2.8 および 3.0 mg/g）（Figure 17A, B, and C）。腎臓に関しても、Control 群と比較してアルドステロン群では、腎臓重量および腎臓重量/体重比の有意な増加作用を示した

（1.5 vs. 1.7 mg および 5.5 vs. 6.7 mg/g）。SM-368229 （10 および 30 mg/kg）およびスピロノラクトンは、アルドステロン/食塩負荷で誘発される腎臓重量の増加抑制傾向を示し（それぞれ 1.6、1.4 および 1.6 mg）、腎臓重量/体重比の増加を有意に抑制した（それぞれ 5.6、5.1 および 5.9 mg/g）（Figure 17D and E）。

尿パラメータに関しては、Control 群と比較してアルドステロン群で尿タンパク排泄量が有意に増加した（21 vs. 50 mg/18hr）。SM-368229（10 および 30 mg/kg）は、アルドステロン/食塩負荷で誘発される尿タンパク排泄量の増加を有意に抑制したが（それぞれ 22 および 24 mg/18hr）、スピロノラクトンは抑制傾向を示したに過ぎなかった（27 mg/18hr）（Figure 17F）。尿 NAG 排泄量も、Control 群と比較してアルドステロン群で有意に増加した（0.20 vs. 0.31 U/18hr）。SM-368229（10 および 30 mg/kg）は、アルドステロン/食塩負荷で誘発される尿 NAG 排泄量の増加を有意に抑制したが（それぞれ 0.20 および 0.19 U/18hr）、スピロノラクトンは抑制傾向を示したに過ぎなかった（0.23 U/18hr）（Figure 17G）。

血清電解質に関しては、Control 群と比較してアルドステロン群で血清ナトリウム濃度は有意に上昇し（142.0 vs. 145.3 mmol/L）、血清カリウム濃度は有意に低下した（5.7 vs. 3.5 mmol/L）。SM-368229（10 および 30 mg/kg）は、アルドステロン/食塩負荷で誘発される血清ナトリウム濃度上昇作用を有意に抑制しただけでなく（それぞれ 142.8 および 142.7 mmol/L）、血清カリウム濃度低下作用も有意に抑制した（それぞれ 4.4 および 4.7 mmol/L）。一方、スピロノラクトンは、アルドステロン/食塩負荷で誘発される血清ナトリウム濃度上昇を抑制しなかったが（145.8 mmol/L）、血清カリウム濃度低下作用を有意に抑制した（4.1 mmol/L）（Figure 18A and B）。

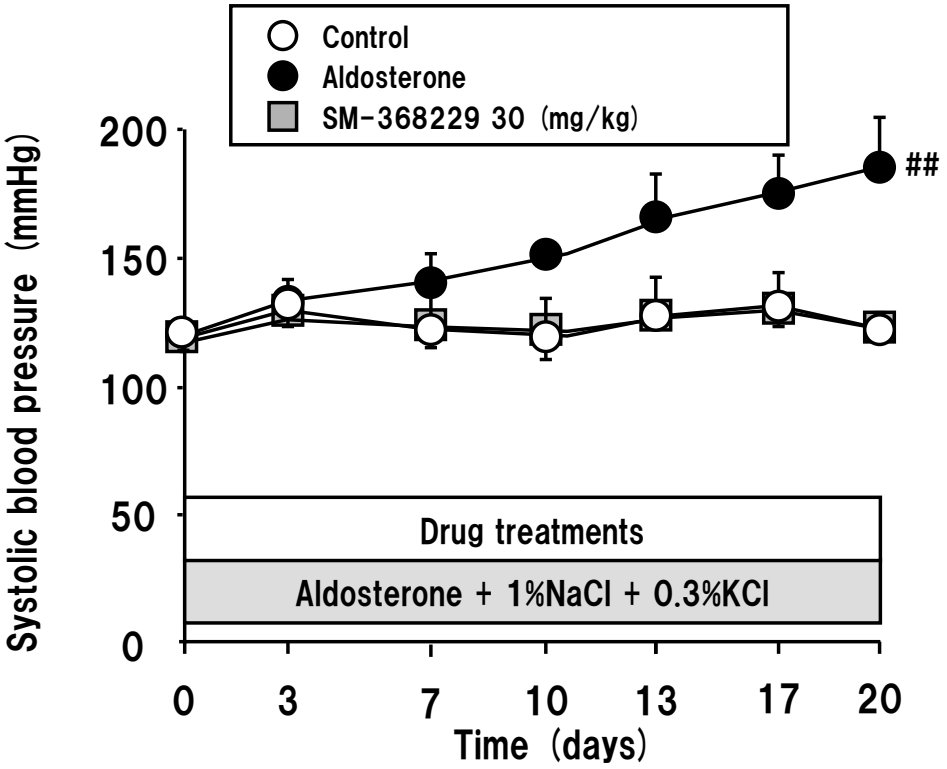

Figure 13 Effects of SM-368229 on systolic blood pressure in salt-treated rats
SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone or vehicle was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (30 mg/kg) was orally administered for 20 days at the same time with salt loading. Systolic blood pressure was measured twice a week in conscious rats by tail-cuff method. Data are shown as means ± S.D. (n = 6). ## $P < 0.01$ vs. Control by Dunnett's multiple comparison test

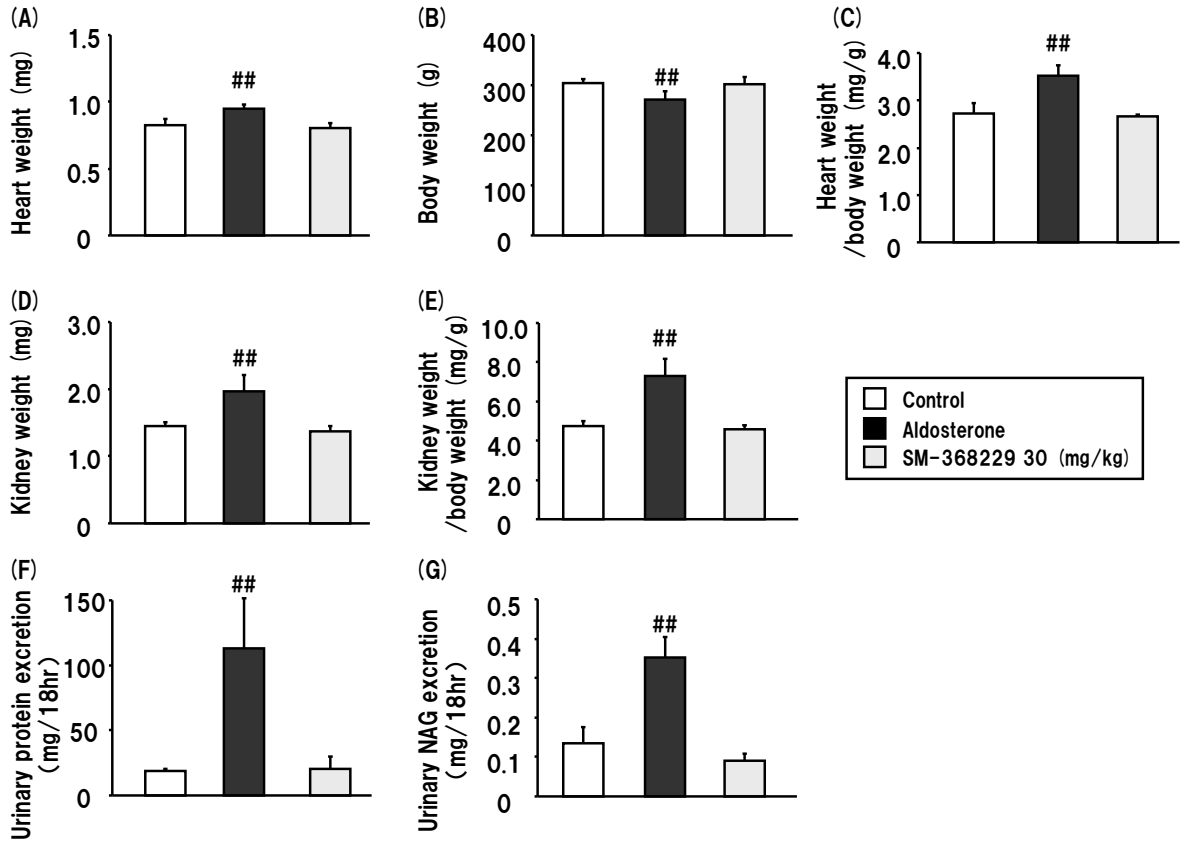

Figure 14 Effects of SM-368229 on heart/kidney weights and urinary protein/NAG excretions in salt-treated rats
SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone or vehicle was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (30 mg/kg) was orally administered for 20 days at the same time with salt loading. Samples for (A) heart weight, (B) body weight, (C) heart weight/body weight, (D) kidney weight, (E) kidney weight/body weight, (F) urinary protein excretion, and (G) urinary NAG excretion were collected on the final day of experiment. Data are shown as means ± S.D. (n = 6). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. Control by Dunnett's multiple comparison test

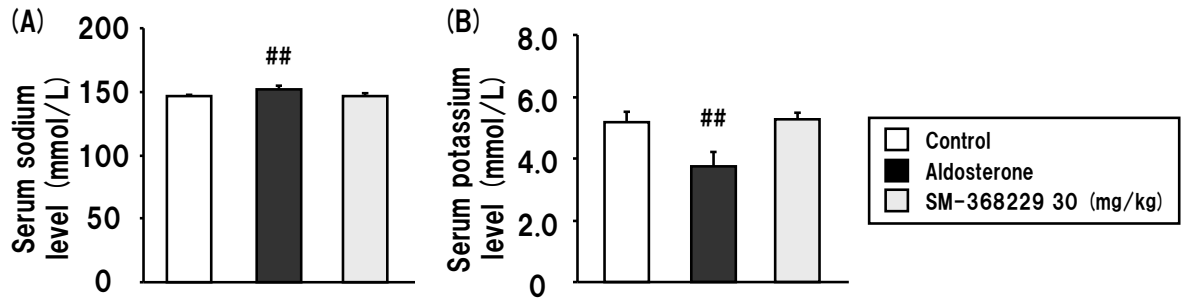

Figure 15 Effects of SM-368229 on serum sodium and potassium levels in salt-treated rats
SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone or vehicle was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (30 mg/kg) was orally administered for 20 days at the same time with salt loading. Blood samples for (A) serum sodium and (B) serum potassium levels were collected on the final day of experiment. Data are shown as means ± S.D. (n = 6). ## $P < 0.01$ vs. Control by Dunnett's multiple comparison test

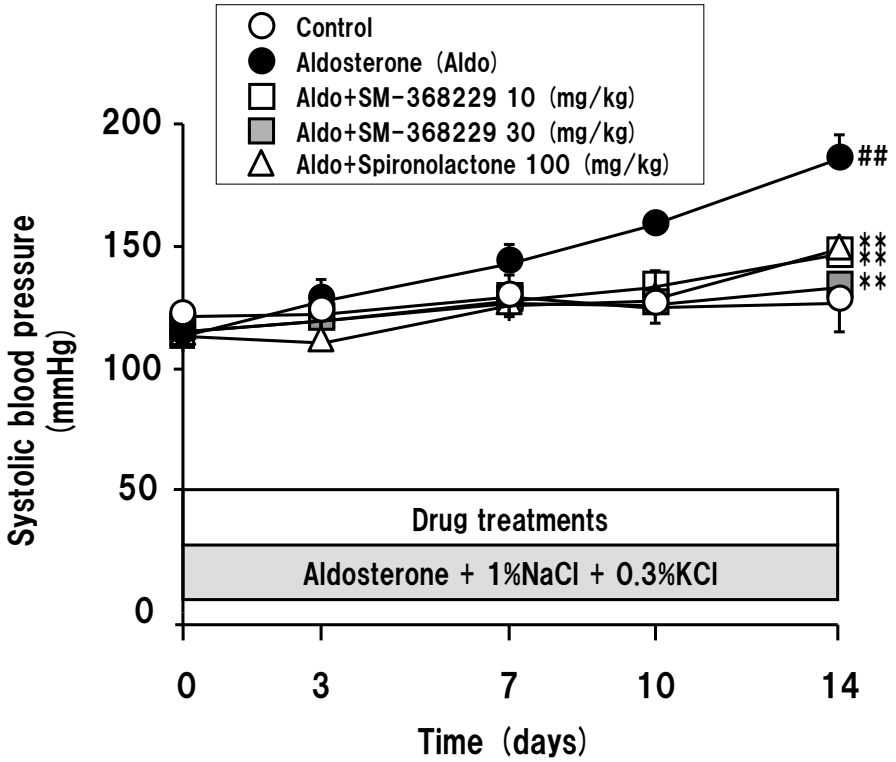

Figure 16 Effects of SM-368229 and spironolactone on systolic blood pressure in aldosterone/salt-treated rats
SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (10 and 30 mg/kg) or spironolactone (100 mg/kg) was orally administered for 14 days at the same time with aldosterone/salt loading. Systolic blood pressure was measured twice a week in conscious rats by tail-cuff method. Data are shown as means ± S.D. (n = 4-6). ## $P < 0.01$ vs. Control by Student's *t*-test, ** $P < 0.01$ vs. Aldo by Dunnett's multiple comparison test

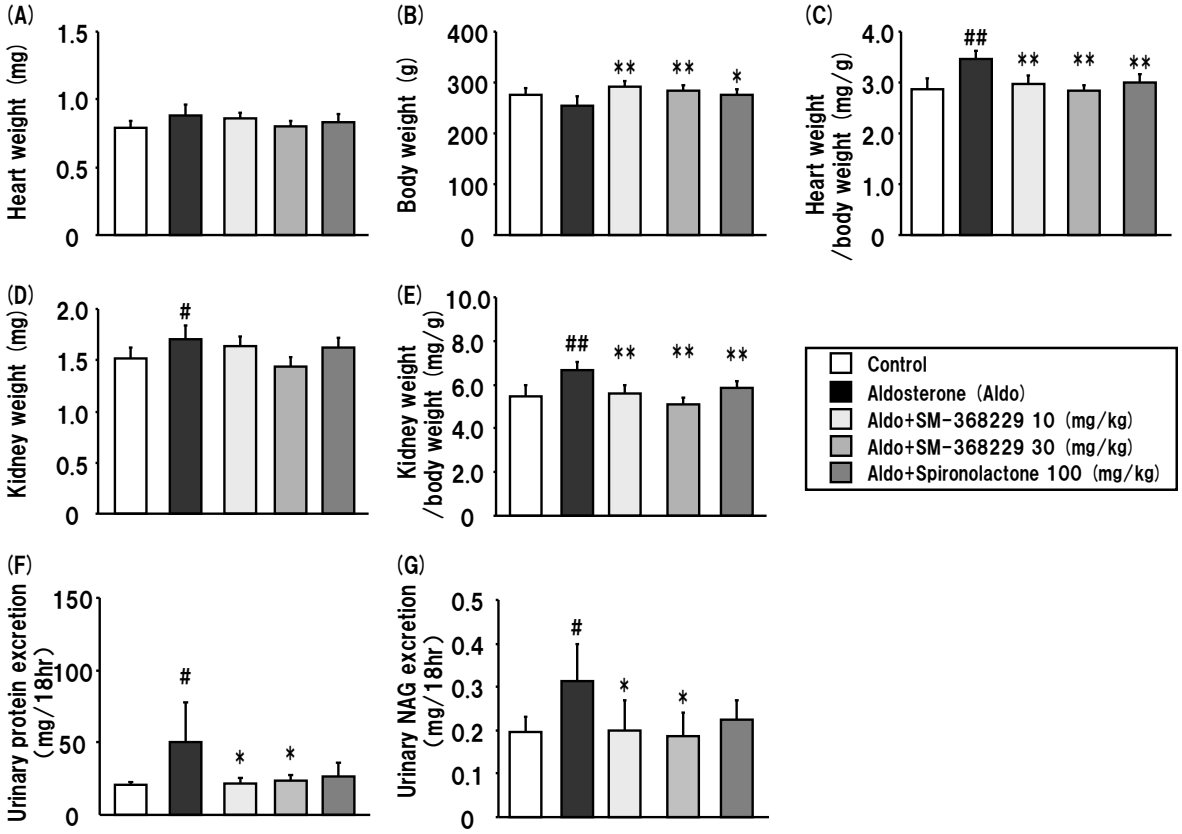

Figure 17 Effects of SM-368229 and spironolactone on heart/kidney weights and urinary protein/NAG excretions in aldosterone/salt-treated rats

SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (10 and 30 mg/kg) or spironolactone (100 mg/kg) was orally administered for 14 days at the same time with aldosterone/salt loading. Samples for (A) heart weight, (B) body weight, (C) heart weight/body weight, (D) kidney weight, (E) kidney weight/body weight, (F) urinary protein excretion, and (G) urinary NAG excretion were collected on the final day of experiment. Data are shown as means ± S.D. (n = 4-6). # P <0.05, ## P < 0.01 vs. Control by Student's t-test, *P < 0.05, ** P < 0.01 vs. Aldo by Dunnett's multiple comparison test

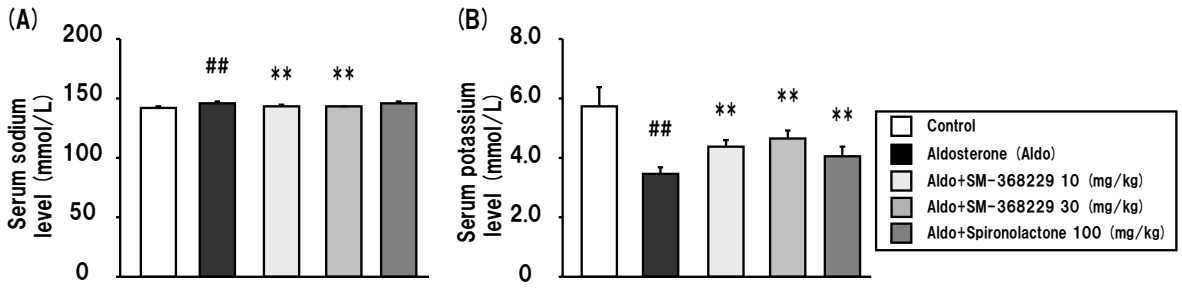

Figure 18 Effects of SM-368229 and spironolactone on serum sodium and potassium levels in aldosterone/salt-treated rats

SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (10 and 30 mg/kg) or spironolactone (100 mg/kg) was orally administered for 14 days at the same time with aldosterone/salt loading. Blood samples for (A) serum sodium and (B) serum potassium levels were collected on the final day of experiment. Data are shown as means ± S.D. (n = 4-6). ## P < 0.01 vs. Control by Student's t-test, ** P < 0.01 vs. Aldo by Dunnett's multiple comparison test

第２節　アルドステロン/食塩負荷後による病態形成後投与の作用

・背景と目的

第１節にて、SM-368229（10 および 30 mg/kg）もしくはスピロノラクトン（100 mg/kg）を、アルドステロン/食塩負荷と同時に投与することで、アルドステロン/食塩誘発の血圧上昇、心臓・腎臓の臓器重量の増加および腎機能障害マーカーの上昇を抑制できることが明らかになった。第２節では、SM-368229 とスピロノラクトンの血圧、心臓および腎臓の臓器障害マーカーに対する作用をさらに検討するため、アルドステロン/食塩負荷後、高血圧病態が惹起された後から被験物質の投与を開始した。

・実験方法

被験物質

被験物質の入手および調製は、第１章、第１節に記載した方法に準じた。

実験動物

実験動物の入手および飼育に関しては、第１章、第２節に記載した方法に準じた。

アルドステロン/食塩誘発高血圧モデルの作製

第３章、第１節に記載の方法に準じた。

試験デザイン

被験物質は、アルドステロン/食塩負荷 10 日後の病態形成後から 1 日 1 回、10 日間強制反復経口投与した。投与最終日に、代謝ケージに収容し、18 時間尿を回収した。採取した尿サンプルを用いて、尿タンパク排泄量および尿 NAG 排泄量を測定した。最終投与翌日に、エーテル麻酔下において腹部大動脈から全採血を実施し、血清電解質パラメータ測定用の血液サンプルを回収した。採血後、心臓および腎臓を摘出し、臓器重量を測定した後、遺伝子発現解析用に心臓の左心室および腎臓の皮質を液体窒素に入れ瞬時凍結し、測定まで-80℃にて保存した。

各被験物質投与群の用量および例数は以下の通りとした。用量としては、第１節で同等の降圧作用を示した SM-368229 10 mg/kg とスピロノラクトン 100 mg/kg に設定した。各実験群は、5～6 例で実施した。

収縮期血圧の測定

第３章、第１節に記載の方法に準じた。

遺伝子発現解析

左心室および腎皮質の total RNA は、Trizol（Invitrogen）を用いて調製した。調製した total RNA を Reverse Transcriptase（Applied Biosystems）を用いて逆転写を行い、合成された cDNA と SYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystem）を用いて qPCR を実施した（LightCycler, Applied Biosystems）。反応条件は、95℃, 120 秒, 1 サイクル、95℃, 15 秒と 60℃, 60 秒, 45 サイクルで実施した。qPCR に用いたプライマーは以下のように設計した。

ANP; forward: CGTATACAGTGCGGTGTCCAAC, reverse: AGCCCTCAGTTTGCTTTTCAAG

β-MHC; forward: TGTCCAAGTTCCGCAAGGT, reverse: CAAGATCTACTCTTCATTCAGGCC

OPN; forward: CCAGCACACAAGCAGACGTT, reverse: TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCAC

PAI-1; forward: GACAATGGAAGAGCAACATG, reverse: ACCTCGATCTTGACCTTTTG

Collagen-III; forward: CAGCTGGCCTTCCTCAGACT, reverse: TGCTGTTTTTGCAGTGGTATGTAA

$p22^{phox}$; forward: ACCTGACCGCTGTGGTGAA, reverse: GTGGAGGACAGCCCGGA

GAPDH; forward: GAAGGGCTCATGACCACAGT, reverse: GGATGCAGGGATGATGTTCT

GAPDH は内部標準として使用した。

統計解析

統計解析は、第３章、第１節に記載の方法に準じた。

・結果

SM-368229 とスピロノラクトンの降圧作用をさらに検討するために、アルドステロン/食塩負荷 10 日後の血圧が上昇した時点（平均収縮期血圧 156.5 mmHg）から被験物質の投与を開始した。アルドステロン群はその後も血圧は上昇し、試験終了時には Control 群と比較して有意に上昇した（120.5 vs. 198.2 mmHg）。SM-368229 およびスピロノラクトンは、アルドステロン/食塩負荷による血圧上昇を有意に抑制した（それぞれ 162.2 および 158.9 mmHg）（Figure 19）。また、被験物質による心拍数への作用はみられなかった（Data not shown）。

Control 群と比較してアルドステロン群では、心臓重量は増加傾向を示し（0.92 vs. 0.98 mg）、体重は有意に減少し（338 vs. 291 g）、心臓重量/体重比は有意に増加した（2.7 vs. 3.6 mg/g）。SM-368229 およびスピロノラクトンは、アルドステロン/食塩負荷で誘発される心臓重量と体重の変化には有

意な作用を示さず（それぞれ 0.98 および 0.91 mg と 311 および 315 g）、心臓重量/体重比の増加を有意に抑制した（それぞれ 3.1 および 2.9 mg/g）（Figure 20A, B, and C）。腎臓に関しても、Control 群と比較してアルドステロン群では、腎臓重量および腎臓重量/体重比が有意に増加した（それぞれ 1.6 vs. 2.2 mg および 4.8 vs. 7.9 mg/g）。SM-368229 およびスピロノラクトンは、アルドステロン/食塩負荷で誘発される腎臓重量の増加に対して抑制あるいは抑制傾向を示し（それぞれ 1.9 および 1.7 mg）、腎臓重量/体重比の増加を有意に抑制した（それぞれ 6.1 および 5.4 mg/g）（Figure 20D and E）。

尿パラメータに関しても、Control 群と比較してアルドステロン群で尿タンパク排泄量および尿 NAG 排泄量が有意に増加した（それぞれ 24 vs. 88 mg/18hr および 0.15 vs. 0.34 U/18hr）。SM-368229 およびスピロノラクトンは、アルドステロン/食塩負荷で誘発される尿タンパク排泄量と尿 NAG 排泄量の増加を有意に抑制した（それぞれ 27 および 31 mg/18hr と 0.23 および 0.18 U/18hr）（Figure 20F and G）。

血清電解質に関しては、Control 群と比較してアルドステロン群で血清ナトリウム濃度は有意に上昇し（143.5 vs. 147.8 mmol/L）、血清カリウム濃度は有意に低下した（5.2 vs. 3.5 mmol/L）。SM-368229 は、アルドステロン/食塩負荷で変動する血清ナトリウム濃度および血清カリウム濃度を有意に抑制した（それぞれ 144.2 mmol/L および 4.8 mmol/L）。一方、スピロノラクトンは、アルドステロン/食塩負荷で誘発される血清ナトリウム濃度上昇を抑制しなかったが（146.6 mmol/L）、血清カリウム濃度低下作用は有意に抑制した（4.2 mmol/L）（Figure 21A and B）。

心臓および腎臓の遺伝子発現解析に関しては、Control 群と比較してアルドステロン群で、心臓の肥大マーカーである ANP や β-MHC、心臓・腎臓における炎症マーカーである OPN や PAI-1、繊維化マーカーである Collagen-III、酸化ストレスマーカーである $P22^{phox}$ の遺伝子発現が有意に上昇した。心臓におけるスピロノラクトンの $P22^{phox}$ を除いて、SM-368229 とスピロノラクトンは、アルドステロン/食塩で誘発されるこれらの遺伝子発現上昇を有意に、かつ Control 群と同程度にまで抑制した（Figure 22 and 23）

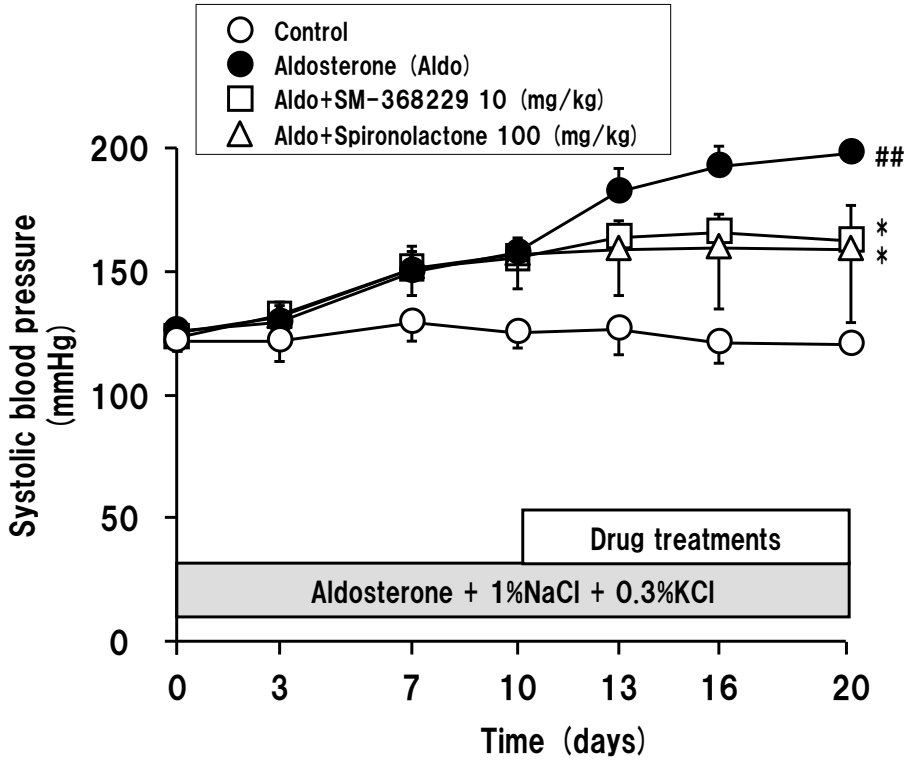

Figure 19 Effects of SM-368229 and spironolactone on systolic blood pressure in aldosterone/salt-treated rats
SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (10 mg/kg) or spironolactone (100 mg/kg) was orally administered for 10 days after 10 days of aldosterone/salt loading. Systolic blood pressure was measured twice a week in conscious rats by tail-cuff method. Data are shown as means ± S.D. (n = 5-6). ## $P < 0.01$ vs. Control Student's *t*-test, * $P < 0.05$ vs. Aldo by Dunnett's multiple comparison test

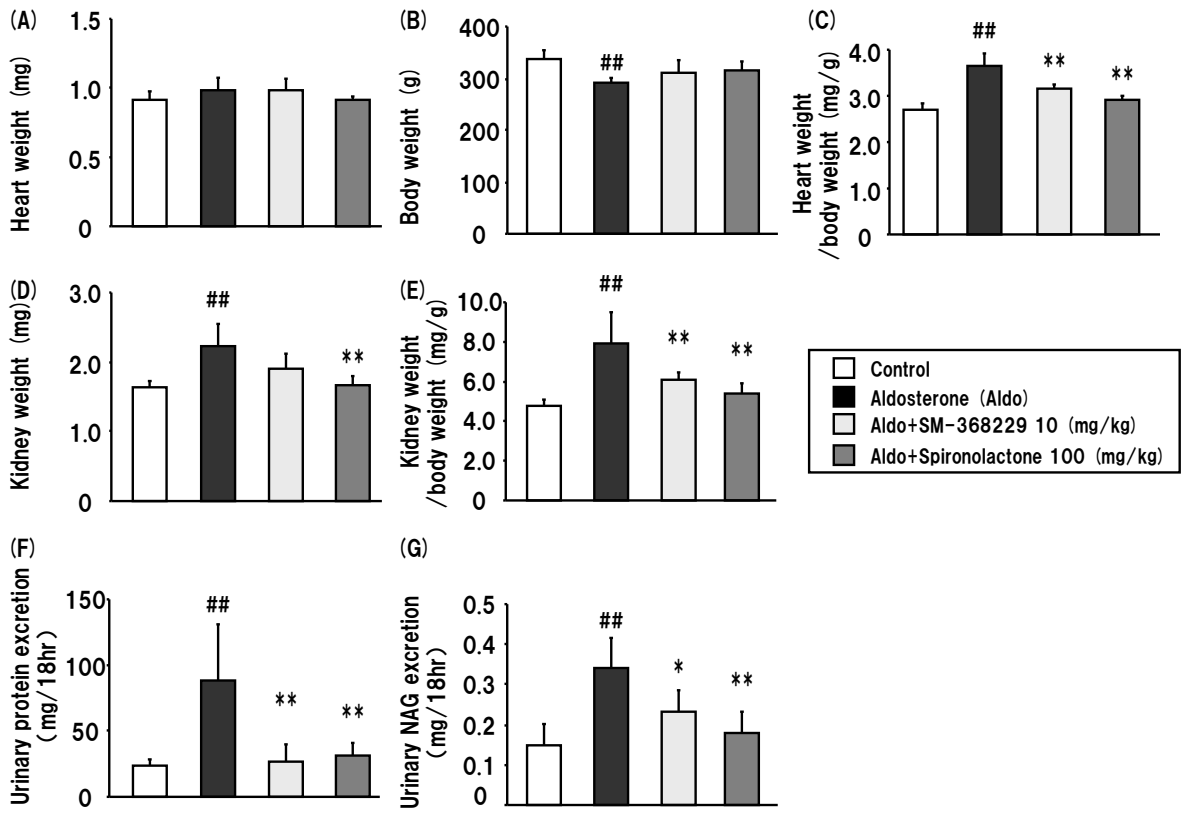

Figure 20 Effects of SM-368229 and spironolactone on heart/kidney weights and urinary protein/NAG excretions in aldosterone/salt-treated rats

SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (10 mg/kg) or spironolactone (100 mg/kg) was orally administered for 10 days after 10 days of aldosterone/salt loading. Samples for (A) heart weight, (B) body weight, (C) heart weight/body weight, (D) kidney weight, (E) kidney weight/body weight, (F) urinary protein excretion, and (G) urinary NAG excretion were collected on the final day of experiment. Data are shown as means ± S.D. (n = 5-6). ## $P < 0.01$ vs. Control by Student's *t*-test, *$P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Aldo by Dunnett's multiple comparison test

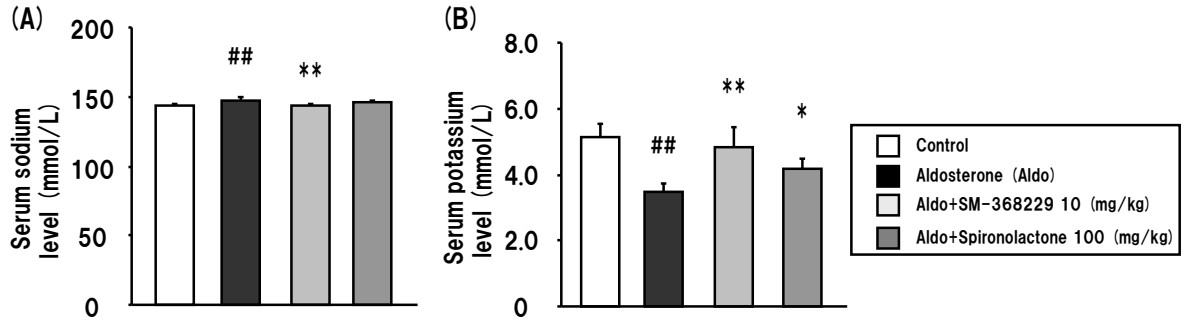

Figure 21 Effects of SM-368229 and spironolactone on serum sodium and potassium levels in aldosterone/salt-treated rats

SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (10 mg/kg) or spironolactone (100 mg/kg) was orally administered for 10 days after 10 days of aldosterone/salt loading. Blood samples for (A) serum sodium and (B) serum potassium levels were collected on the final day of experiment. Data are shown as means ± S.D. (n = 5-6). ## $P < 0.01$ vs. Control by Student's *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Aldo by Dunnett's multiple comparison test

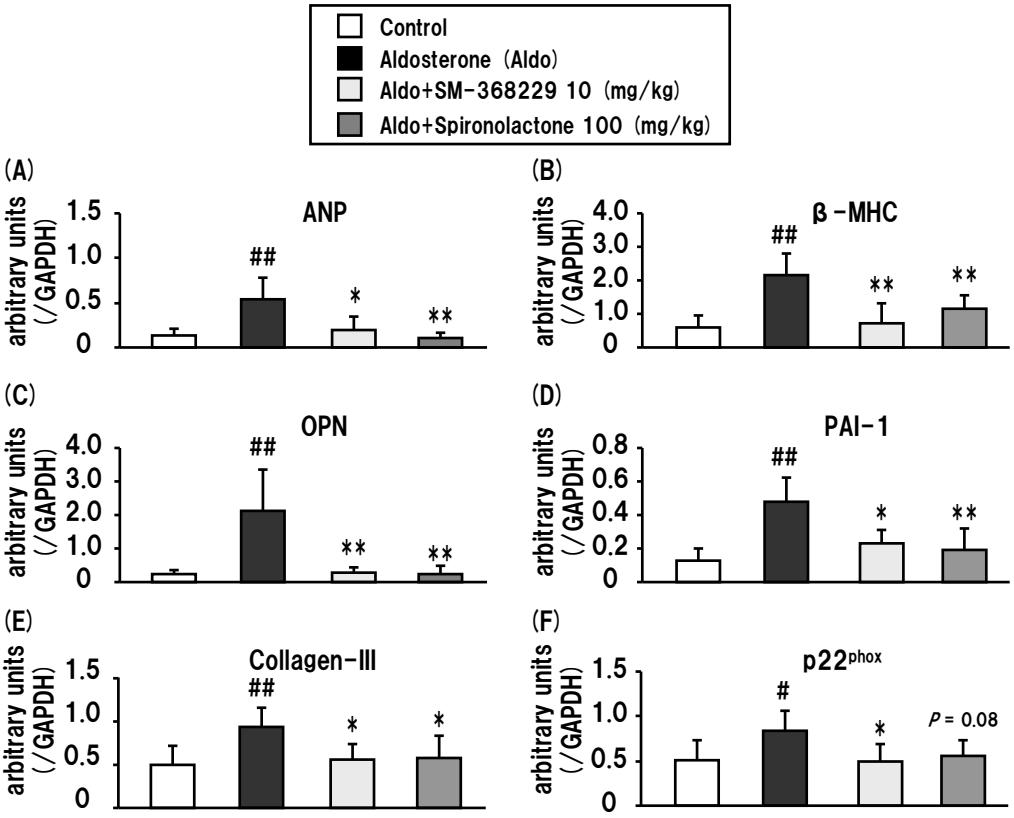

Figure 22 Effects of SM-368229 and spironolactone on gene expression levels in the heart in aldosterone/salt-treated rats

SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (10 mg/kg) or spironolactone (100 mg/kg) was orally administered for 10 days after 10 days of aldosterone/salt loading. Samples for qPCR analysis were collected from the left ventricular tissue on the final day of experiment. Data are shown as means ± S.D. (n = 5-6). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. Control by Student's *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Aldo by Dunnett's multiple comparison test

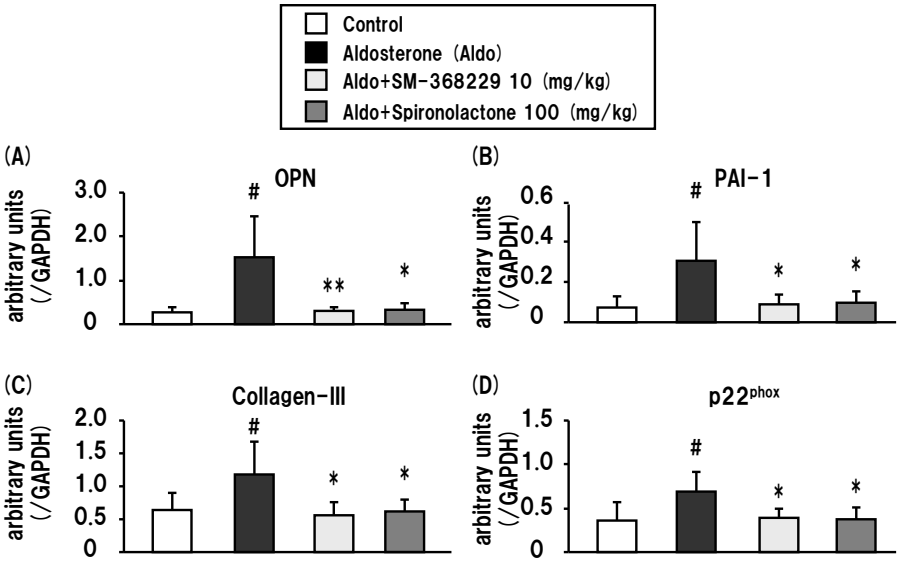

Figure 23 Effects of SM-368229 and spironolactone on gene expression levels in the kidney in aldosterone/salt-treated rats

SD rats were uninephrectomized, and were given high-salt water containing 1% NaCl and 0.3% KCl. Aldosterone was treated subcutaneously at the rate of 0.75 μg/hr. SM-368229 (10 mg/kg) or spironolactone (100 mg/kg) was orally administered for 10 days after 10 days of aldosterone/salt loading. Samples for qPCR analysis were collected from the kidney cortex tissue on the final day of experiment. Data are shown as means ± S.D. (n = 5-6). # $P < 0.05$ vs. Control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Aldo by Dunnett's multiple comparison test

第３節　考察および小括

本章では、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬の血圧や心臓・腎臓の臓器障害マーカーに対する作用を、食塩負荷あるいはアルドステロン/食塩負荷ラットを用いて検討した。

第 1 節では、まず　パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬 SM-368229 のアゴニスト活性が、血圧上昇、心臓および腎臓の臓器重量の増加や腎機能障害マーカーを上昇させるか否かを検討した。SM-368229 のような適度の MR パーシャルアゴニスト活性であれば、食塩と同時に負荷しても高血圧や心肥大および腎機能障害などの病態を惹起するポテンシャルは低いものと考えられた。次に、SM-368229 のアルドステロン/食塩で誘発される高血圧、心臓・腎臓の臓器障害マーカーに対する予防効果を調べるため、被験物質をアルドステロン/食塩負荷と同時処置により検討した。SM-368229 は、アルドステロン/食塩誘発の血圧上昇を有意に抑制しただけなく、心臓および腎臓の臓器重量の増加や尿タンパク排泄量の増加などを完全に抑制した。また、SM-368229（10 mg/kg）の降圧作用はスピロノラクトン（100 mg/kg）と同等であった。この点に関して、SM-368229（10 mg/kg）およびスピロノラクトン（100 mg/kg）の in vivo MR 拮抗作用（ナトリウムバランス抑制率；それぞれ 66%および 52%）や SHRs における降圧作用（それぞれ-25.8 および -21.5 mmHg）がほぼ同等であることから、パーシャルアゴニスト活性を有していても、本モデルにおいて SM-368229 は充分に MR 拮抗作用を発揮できると考えられた。

第 2 節では、SM-368229 のアルドステロン/食塩で誘発される高血圧、心臓・腎臓の臓器障害マーカーに対する治療効果を調べるため、被験物質を高血圧病態惹起後からの処置により検討した。SM-368229（10 mg/kg）およびスピロノラクトン（100 mg/kg）は、同時投与の検討結果と同様に、アルドステロン/食塩誘発の血圧上昇、心臓および腎臓の臓器重量の増加や尿タンパク排泄量の増加などを有意に抑制した。よって、SM-368229 は投与開始時期に関わらず、スピロノラクトンと同様に降圧作用および臓器保護作用が期待できると考えられた。なお、今回用いた SM-368229（10 mg/kg）およびスピロノラクトン（100 mg/kg）では、正常レベルまでの改善作用を示すことはできなかった。この点に関して、第 1 節の検討で、SM-368229 は 30 mg/kg の高用量の同時投与によりアルドステロン/食塩による血圧上昇作用をほぼ完全に抑制したこと、スピロノラクトンは、Park らが検討した 200 mg/kg の同時投与により血圧上昇作用を完全に抑制すること [88]、我々の予備検討においてスピロノラクトン 300 mg/kg の後投与で血圧低下作用を示すこと（Data not shown）などを考え合わせると、SM-368229 の用量を増加することで、後投与における治療効果が期待される。

SM-368229 はアルドステロン/食塩誘発の心肥大を有意に抑制し、その作用は心肥大マーカーで

ある ANP や β-MHC の遺伝子発現抑制を伴っていた。本作用の一部には、心臓における直接的な MR 拮抗作用が関与していると考えられる。なぜなら、新生仔ラットの培養心筋細胞を用いた検討において、アルドステロンが心肥大を惹起し、その作用が MR 拮抗薬により抑制されることや[90-92]、降圧作用を示さない低用量のスピロノラクトン（20 mg/kg）投与で、アルドステロン/食塩負荷ラットにおける心肥大が抑制されることが報告されている[93]。また、SM-368229 の心肥大抑制作用には、降圧作用も寄与していると考えられるが、アルドステロン/食塩負荷で誘発される心肥大が、スピロノラクトンと同等に血圧をコントロールした血管拡張薬（ヒドララジン）投与では抑制されなかったことより[94]、単なる血圧低下作用のみでは、SM-368229 の心肥大抑制作用を説明できないと考えられる。これらの知見を総合すると、SM-368229 の MR 拮抗作用の心臓重量増加に対する作用は、血圧低下作用に伴う間接的な心肥大抑制に加え、心臓における直接的な心肥大抑制作用に基づくものと考えられる（Figure 24）。

SM-368229 はアルドステロン/食塩誘発の腎機能障害マーカーの上昇も抑制した。SM-368229 の MR 拮抗作用による腎保護作用も、血圧低下作用と腎臓における直接的な MR 拮抗作用によるものと考えられる（Figure 24）。すなわち、アルドステロン/食塩負荷で誘発される尿タンパクが、エプレレノンと同程度に血圧をコントロールした血管拡張薬（ヒドララジン）投与では抑制されなかったことや[14]、アルドステロンが炎症や酸化ストレスを惹起し[86, 87, 95]、それらは MR 拮抗薬で抑制されることが報告されており、我々の結果や考えを支持するものである。また、アルドステロンは、尿タンパクを惹起する因子として考えられており[96-99]、スピロノラクトン治療によって、慢性腎臓病患者や糖尿病性腎症患者の尿タンパクが減少することが報告されている[35, 100-102]。これらの知見を総合すると、SM-368229 の有する MR 拮抗作用が、抗高血圧作用だけでなく、腎臓における炎症、繊維化および酸化ストレスを抑制し、タンパク尿減少に反映される腎保護作用に寄与したと考えられる。

SM-368229（10 mg/kg）は、スピロノラクトン（100 mg/kg）と同等の降圧作用や、心臓・腎臓の臓器保護作用を示し、質的な違いはほとんど認められなかった。しかしながら、血清電解質濃度に対する作用は SM-368229 の方がスピロノラクトンよりも優れていた。両化合物の血清電解質に対する作用の違いの原因は不明であるが、腎臓への組織移行性が関与している可能性もある。また、SM-368229 は、第１節、第２節共に、アルドステロン処置により誘発された血清カリウム濃度低下を有意に抑制したが、これらの作用は高カリウム血症を惹起したというよりは、原発性アルドステロン症患者でみられるような低カリウム血症を改善したものと考えている[103, 104]。

第３章の結果をまとめると、適度のパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬は、アルドステロン/食塩で惹起される血圧上昇や臓器障害に対して抑制的に働き、アルドステロンがない状

態においても、アゴニスト作用により病態を惹起することはないと考えられた。

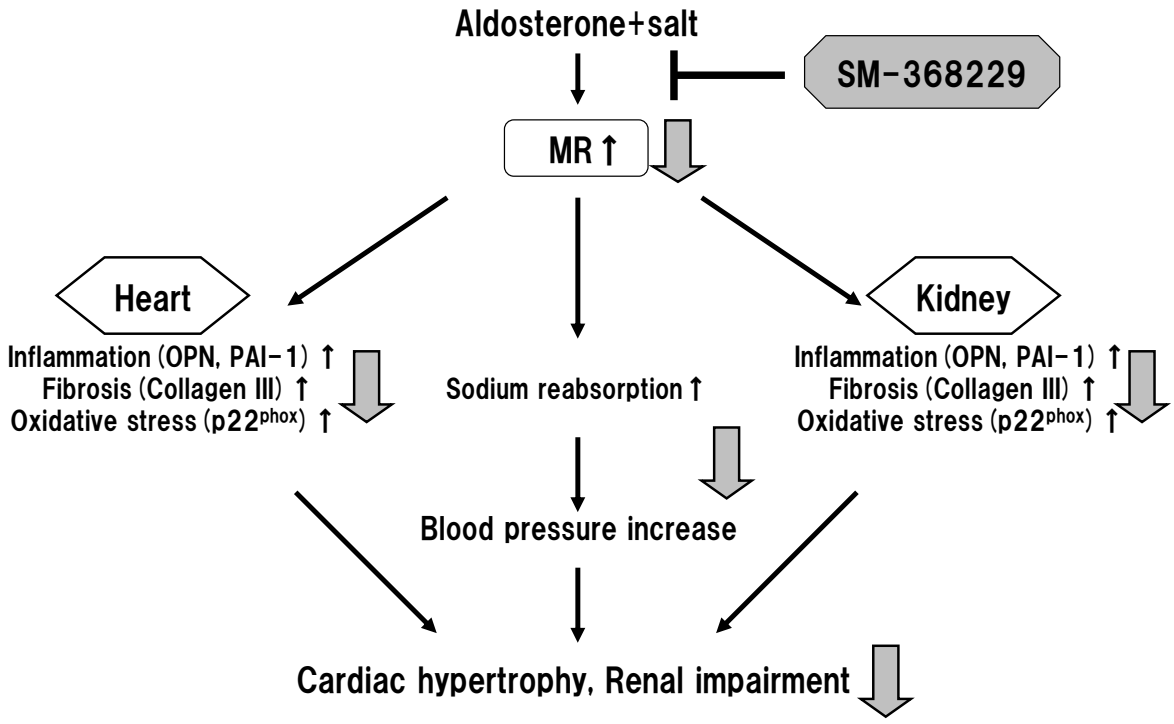

Figure 24 A schematic diagram of antihypertensive and cardiorenal protective effects of SM-368229 in aldosterone/salt-treated rats

Aldosterone/salt hypertensive rats showed sodium reabsorption, followed by blood pressure increase. Moreover, aldosterone/salt increased cardiac hypertrophy marker and and urinary protein excretion, as an index for renal impairment, and induced gene expression levels for inflammation, fibrosis and oxidative stress markers in hearts and kidneys. These aldosterone/salt-induced blood pressure increase, cardiac hypertrophy, and renal impairment were inhibited by SM-368229 treatments.

第４章 新規 MR 拮抗薬の MR 選択性

第１節　新規 MR 拮抗薬の他の核内受容体に対する作用

・背景と目的

第１章および第２章にて、新規 MR 拮抗薬の中でも、SM-368229 が MR 拮抗作用および抗高血圧作用を保持しつつ、高カリウム血症リスクを低減化させたプロフィールを有していることが示されている。しかし、SM-368229 の優れた薬理作用が、MR に対する適度のパーシャルアゴニスト作用および拮抗作用のみで引き起こされているか否かは明らかでない。そこで、SM-368229 が MR 以外の標的分子に作用するか否かについて検討することとした。

MR は核内受容体サブファミリー3C に属し、同属の核内受容体である AR、PR および GR に対して相同性が高いことが知られている [105, 106]。また、スピロノラクトンは、MR 以外に AR や PR への結合親和性を示すことより [66, 67]、SM-368229 の MR 以外の核内受容体に対する作用を確認することが重要である。そこで、SM-368229 の MR と相同性の高い他の核内受容体（AR、PR および GR）に対する作用を、スピロノラクトンおよびエプレレノンと比較検討することとした。

・実験方法

被験物質

被験物質の入手および調製は、第１章、第１節に記載の方法に準じた。

実験動物

実験動物の入手および飼育に関しては、第１章、第２節に記載の方法に準じた。

COS-7 細胞を用いた他の核内受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用評価

スピロノラクトン、エプレレノンおよび SM-368229 の他の核内受容体（AR、PR および GR）に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用は、Hu らの方法を参考に [66]、第１章、第１節の方法を改変して評価した。すなわち、Human MR 発現プラスミドの代わりに、human AR、human PR 発現プラスミド（OriGene Technologies）および human GR 発現プラスミド（大日本住友製薬株式会社ゲノム科学研究所作製）を用い、アルドステロンの代わりに以下のリガンドを用いた。AR、PR および GR のリガンドとして、それぞれ 0.1 nmol/L Methyltrienolone (PerkinElmer)、1 nmol/L Progesterone (Sigma-Aldrich) および 1 nmol/L Dexamethasone (Sigma-Aldrich)を使用した。

各被験物質の IC_{50} は、被験物質未添加の細胞と比較して、各リガンド添加細胞のルシフェラー

ゼ活性を 50%抑制する濃度として算出した。各被験物質のパーシャルアゴニスト活性は、各リガンド添加細胞と比較した被験物質 10 μmol/L 添加細胞のルシフェラーゼ活性から算出した。被験物質の IC_{50} およびパーシャルアゴニスト活性は、3-4 回の実験結果を平均値で示した。

In vivo AR 拮抗作用評価

被験物質の in vivo AR に対する作用は、精嚢の重量を指標に、ハーシュバーガーアッセイを改変して評価した[107, 108]。4 週齢の雄性 SD ラットに AR アゴニストとしてメチルテストステロン（MT、東京化成工業株式会社）を 1 mg/kg の用量で 5 日間皮下投与すると同時に、被験物質も 5 日間反復経口投与した。MT はコーン油に溶解させた。最終投与 24 時間後に、エーテル麻酔下において精嚢を摘出しその重量を測定した。Control（0.5% MC + コーン油投与）群と比較して、MT で増加する精嚢重量を 30%抑制する各被験物質の用量を SVW ID_{30} として算出した。

各被験物質投与群の用量および例数は以下の通りとした。SM-368229 とスピロノラクトンの用量は、30、100 および 300 mg/kg に設定した。エプレレノンの用量は、100、300 および 1000 mg/kg に設定した。各実験群は、すべて 5 例で実施した。

In vivo PR 作用評価

被験物質の in vivo PR に対する作用は、性周期と卵の数を指標に、Zhang らの方法を改変して評価した[109]。8-10 週齢の雌性 SD ラット（日本エスエルシー株式会社）の性周期を揃えるため、LH-RH（Sigma-Aldrich）を 2 μg/rat で AM9:00 と PM4:00 に皮下投与した。LH-RH 投与 9 日後に膣スメア法にて性周期が排卵期であることを確認できた個体を実験に使用した。その後、被験物質を 4 日間反復経口投与し、最終投与 24 時間後に膣スメア法にて性周期の確認を行い、性周期が排卵期である個体を正常性周期の割合として測定した。そして、炭酸ガス麻酔下において卵巣を摘出し、卵管上に存在する卵の数を測定した。Control（0.5% MC 投与）群と比較して、卵の数を 50%抑制する各被験物質の用量を OVA ID_{50} として算出した。

各被験物質投与群の用量および例数は以下の通りとした。SM-368229 の用量は、100 および 300 mg/kg に、スピロノラクトンの用量は 30 および 100 mg/kg に、エプレレノンの用量は、1000 mg/kg に設定した。各実験群は、7～8 例で実施した。

統計解析

統計解析は、第 1 章、第 2 節に記載の方法に準じた。

・結果

COS-7 細胞を用いた他の核内受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用評価

SM-368229 の AR 、PR および GR に対する IC_{50} は、それぞれ 5.0、2.3 および 30 μmol/L となり、MR の IC_{50} と比較して、それぞれ 38、18 および 231 倍の MR 選択性を示した。また、PR に対しては 10 μmol/L で 22%のパーシャルアゴニスト活性を示した。

スピロノラクトンの AR 、PR および GR に対する IC_{50} は、それぞれ 0.011、0.35 および 2.2 μmol/L となり、MR の IC_{50} と比較して、それぞれ 0.9、29 および 183 倍の MR 選択性を示した。また、PR と AR に対しては共に 36%のパーシャルアゴニスト活性を示した。

エプレレノンの AR 、PR および GR に対する IC_{50} は、それぞれ 4.5、24 および 100 μmol/L 以上となり、MR の IC_{50} と比較して、それぞれ 11、57 および 238 倍以上の MR 選択性を示した。また、エプレレノンは、AR、PR および GR に対してパーシャルアゴニスト活性を示さなかった（Table 2）。

In vivo AR 拮抗作用評価

SM-368229 評価

Control 群と比較して、MT は精嚢重量を有意に増加させた（27 vs. 76 mg）。SM-368229（30、100 および 300 mg/kg）は、MT で増加した精嚢重量の増加抑制傾向を示したが（それぞれ 69、63 および 61 mg）、統計学的に有意な作用ではなかった（Figure 25A）。SM-368229 の SVW ID_{30} は 228 mg/kg となり、MR 拮抗作用の指標であるナトリウムバランスの ED_{50} と比較して 95 倍の MR 選択性を示した（Table 3）。

スピロノラクトン評価

Control 群と比較して、MT は精嚢重量を有意に増加させた（25 vs. 60 mg）。スピロノラクトン（30、100 および 300 mg/kg）は、MT で増加した精嚢重量を用量依存的に、かつ 100 および 300 mg/kg 群において有意に抑制した（それぞれ 58、42 および 35 mg）（Figure 25B）。スピロノラクトンの SVW ID_{30} は 58 mg/kg となり、ナトリウムバランスの ED_{50} と比較して 0.6 倍の MR 選択性を示した（Table 3）。

エプレレノン評価

Control 群と比較して、MT は精嚢重量を有意に増加させた（27 vs. 76 mg）。エプレレノン（100、300 および 1000 mg/kg）は、MT で増加した精嚢重量を用量依存的に、かつ 1000 mg/kg 群においては有意に抑制した（それぞれ 73、72 および 60 mg）（Figure 25C）。エプレレノンの SVW ID_{30} は 896 mg/kg となり、ナトリウムバランスの ED_{50} と比較して 4.3 倍の MR 選択性を示した（Table 3）。

In vivo PR 作用評価

SM-368229 評価

Control 群では、全ての個体が正常の性周期を示し（100%）、多数の卵がみられた（11.5 個）（Figure 26A）。SM-368229（100 および 300 mg/kg）は、卵の数に影響を及ぼさなかった（それぞれ 10.4 および 12.0 個）。SM-368229 の OVA ID_{50} は、300 mg/kg 以上となり、ナトリウムバランスの ED_{50} と比較して 125 倍以上の MR 選択性を示した（Table 3）。

スピロノラクトン評価

Control 群では、ほとんどの個体が正常の性周期を示し（87.5%）、多数の卵がみられた（10.9 個）（Figure 26B）。スピロノラクトン 30 mg/kg は、卵の数に影響を及ぼさなかったが（12.9 個）、100 mg/kg は卵の数を有意に減少させた（3.3 個）。スピロノラクトンの OVA ID_{50} は、76 mg/kg となり、ナトリウムバランスの ED_{50} と比較して 0.8 倍の MR 選択性を示した（Table 3）。

エプレレノン評価

Control 群では、ほとんどの個体が正常の性周期を示し（75%）、多数の卵がみられた（8.3 個）（Figure 26C）。エプレレノン（1000 mg/kg）は、Control 群と同程度の卵の数を示した（8.3 個）。エプレレノンの OVA ID_{50} は、1000 mg/kg 以上となり、ナトリウムバランスの ED_{50} と比較して 4.8 倍以上の MR 選択性を示した（Table 3）。

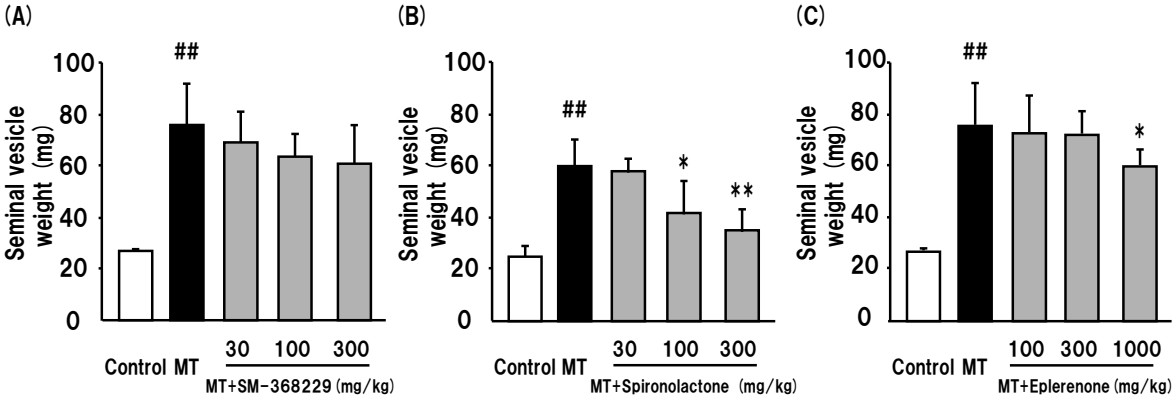

Figure 25 Effects of SM-368229, spironolactone, and eplerenone on seminal vesicle weights in MT-treated rats
Male SD rats were subcutaneously administrated 1 mg/kg MT and orally administrated (A) SM-368229 (30, 100, and 300 mg/kg), (B) spironolactone (30, 100, and 300 mg/kg), or (C) eplerenone (100, 300, and 1000 mg/kg) once a day for 5 days. The weights of seminal vesicle were measured 24 hours after the last treatment. Data are shown as means ± S.D. (n = 5). ## $P < 0.01$ vs. Control by Student's *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. MT by Dunnett's multiple comparison test

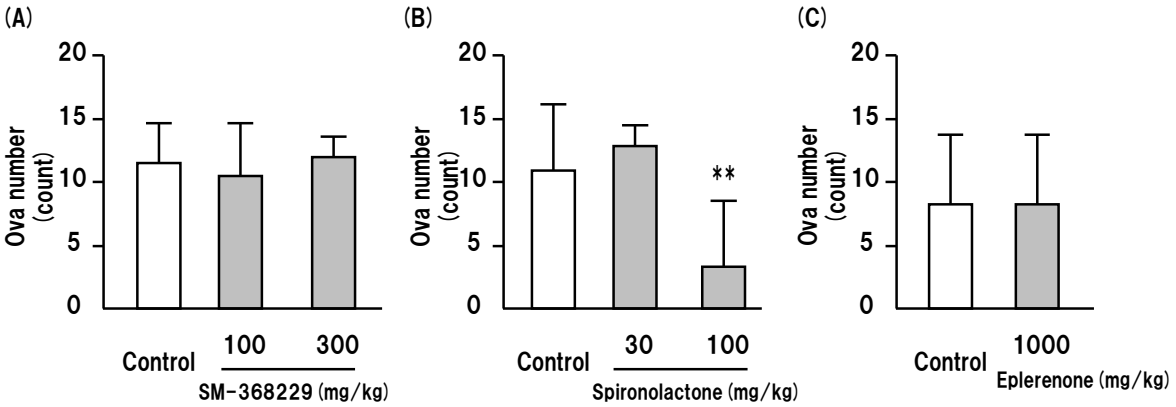

Figure 26 Effects of SM-368229, spironolactone, and eplerenone on ova number in female rats
Estrus-synchronized female SD rats were treated with (A) SM-368229 (100 and 300 mg/kg), (B) spironolactone (30 and 100 mg/kg), or eplerenone (1000 mg/kg) once a day for 4 days. The ova number was counted 24 hours after the last treatment. Data are shown as means ± S.D. (n = 7-8). ** $P < 0.01$ vs. Control by Dunnett's multiple comparison test

Table 2 In vitro selectivities of SM-368229, spironolactone, and eplerenone for MR and other steroid receptors

	IC_{50} (μmol/L)				Selectivity for MR		
	MR	AR	PR	GR	AR/MR	PR/MR	GR/MR
SM-368229	0.13 †12%	5.0	2.3 †22%	30	38	18	231
Spironolactone	0.012	0.011 †36%	0.35 †36%	2.2	0.9	29	183
Eplerenone	0.42	4.5	24	>100	11	57	>238

COS-7 cells were transiently transfected with one of the MR, AR, PR, and GR expression vectors, pGL3-MMTV, and phRLTK. Following incubation for 6 hours, test compounds and a ligand were added. On the next day, luciferase activity was measured. Final ligand concentration for each steroid receptor was as follows; MR: 1 nmol/L Aldosterone, AR: 0.1 nmol/L Methyltrienolone, PR: 1 nmol/L Progesterone, and GR: 1 nmol/L Dexamethasone. † indicates agonistic activity of test compounds at 10 μmol/L. Data are shown as means of 3-4 independent experiments.

Table 3 In vivo selectivities of SM-368229, spironolactone, and eplerenone for MR and other steroid receptors

	Sodium Balance ED_{50}	SVW ID_{30}	OVA ID_{50}	Selectivity for MR	
	MR	AR	PR	AR/MR	PR/MR
SM-368229	2.4	228	>300	95	>125
Spironolactone	91	58	76	0.6	0.8
Eplerenone	208	896	>1000	4.3	>4.8

Sodium balance ED_{50} values were calculated as doses of test compounds that decreased sodium balance by 50% compared to DOCA-treated rats (n = 4-5). SVW ID_{30} values were calculated as doses of test compounds that decreased SVW by 30% compared to MT-treated rats (n = 5). OVA ID_{50} values were calculated as doses of test compounds that decreased ova number by 50% compared to vehicle-treated rats (n = 7-8).

第２節　新規 MR 拮抗薬の受容体およびイオンチャネルに対する作用

・背景と目的

第１節にて、SM-368229 の MR 以外の核内受容体（AR、PR および GR）に対する選択性は良好であることが確認できた。しかしながら、その他の受容体やイオンチャネルに作用して薬効や高カリウム血症リスク低減化に関与しているか否かは明らかでない。そこで、SM-368229 の AR、PR および GR 以外の抗高血圧作用や血中電解質制御に関連する標的分子への寄与の有無について網羅的に解析した。

・実験方法

SM-368229 の各種受容体およびイオンチャネルに対する結合親和性を検討するため、Ricerca Biosciences 社（旧 MDS Pharma Services）が提供する Lead Profiling Screen®を用いて、放射性リガンドを用いたバインディングアッセイ（合計 66 分子）を実施した。結果は SM-368229 10 μmol/L における抑制率（%）で示した（n = 2）。50%以上の抑制率を示す標的分子を結合親和性があると判断した。

被験物質

SM-368229 は第１章、第１節に記載の方法に準じて入手し、10 mmol/L の DMSO 溶液を Ricerca Biosciences 社に提供した。

・結果

66の標的分子について検討した結果、いずれの標的分子に対してもSM-368229は10 μmol/Lという高濃度において、50%以上の結合親和性を示さなかった。今回評価した中で、循環器疾患に関連すると考えられる代表的な22の標的分子についての結果をTable 4に示す。残りの44の標的分子は、下記に記した。Dopamine D_1; Dopamine D_{2S}; Dopamine D_3; Dopamine $D_{4.2}$; G Protein-Coupled Receptor103; $GABA_A$, Flunitrazepam, Central; $GABA_{A,}$ Muscimol, Central; $GABA_{B1A}$; Glutamate, Kainate; Glutamate, NMDA, Agonism; Glutamate, NMDA, Glycine; Glutamate, NMDA, Phencyclidine; Histamine H_1; Histamine H_2; Histamine H_3; Imidazoline I_2, Central; Interleukin IL-1; Leukotriene, Cysteinyl $CysLT_1$; Melatonin MT_1; Muscarinic M_1; Muscarinic M2; Muscarinic M3; Neuropeptide Y Y_1; Neuropeptide Y Y_2; Nicotinic Acetylcholine; Nicotinic Acetylcholine α_1, Bungarotoxin; Opiate μ; Opiate

κ; Opiate δ; Phorbol Ester; Platelet Activating Factor; Prostanoid EP_4; Purinergic P_{2X}; Purinergic P_{2Y}; Rolipram; 5-HT_{1A}; 5-HT_3; Sigma σ1; Sigma σ2; Tachykinin NK_1; Dopamine Transporter (DAT); GABA Transporter; Norepinephrine Transporter (NET); Serotonin Transporter (SERT)

Table 4 Effects of SM-368229 on various receptors and ion channels

Target molecules	Sources	% Inhibition
Adenosine A_1	Human recombinant CHO cells	-6
Adenosine A_{2A}	Human recombinant HEK-293 cells	6
Adenosine A_3	Human recombinant CHO-K1 cells	20
Adrenergic α_{1A}	Wistar Rat submaxillary gland	5
Adrenergic α_{1B}	Wistar Rat liver	-3
Adrenergic α_{1D}	Human recombinant HEK-293 cells	12
Adrenergic α_{2A}	Human recombinant insect Sf9 cells	49
Adrenergic β_1	Human recombinant CHO-K1 cells	5
Adrenergic β_2	Human recombinant CHO cells	-2
Bradykinin B_1	Human IMR-90 cells	17
Bradykinin B_2	Human recombinant CHO-K1 cells	1
Calcium Channel L-Type, Benzothiazepine	Wistar Rat brain	-1
Calcium Channel L-Type, Dihydropyridine	Wistar Rat cerebral cortex	-5
Calcium Channel N-Type	Wistar Rat brain frontal lobe	-3
Endothelin ET_A	Human recombinant CHO cells	-5
Endothelin ET_B	Human recombinant CHO-K1 cells	1
Estrogen ERα	Human recombinant insect Sf9 cells	4
Epidermal Growth Factor	Human A431 cells	5
Potassium Channel K_{ATP}	Hamster pancreatic HIT-T15 beta cells	32
Potassium Channel HERG	Human recombinant HEK-293 cells	16
Sodium Channel, Site 2	Wistar Rat brain	22
Thyroid Hormone	SD Rat liver	21

The effects of SM-368229 on various receptors and ion channels were evaluated using radioligand binding assays. Data are shown as mean % inhibition of SM-368229 at 10 μmol/L (n = 2).

第３節　考察および小括

本章では、適度のパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬 SM-368229 の薬効と高カリウム血症リスク低減化のメカニズム検討の一環として、MR 以外の標的分子に対する作用を検討した。

第 1 節では、MR と相同性の高い他の核内受容体に対する選択性を評価した。スピロノラクトンは、臨床において AR 拮抗作用に基づくと考えられる女性化乳房、胸痛および性欲減少などの性ホルモン関連副作用を示すことが治療上問題となっているが [19, 110]、SM-368229 は、in vitro AR に対してパーシャルアゴニスト作用を示さず、in vitro および in vivo での AR 拮抗作用と MR 拮抗作用の選択性比はそれぞれ 38 倍および 95 倍となり、スピロノラクトン（それぞれ 0.9 倍および 0.6 倍）やエプレレノン（それぞれ 11 倍および 4.3 倍）と比較しても MR への選択性が充分あることが明らかとなった。EPHESUS 試験において、エプレレノン投与患者における性ホルモン関連副作用はプラセボ群と同程度であったことより [20]、SM-368229 が臨床においても AR 関連副作用を示す可能性は低く、忍容性に優れた医薬品になりうると考えられる。

PR のアゴニスト/アンタゴニスト作用を示す化合物は性周期に影響を及ぼすことが知られており [111, 112]、PR への結合親和性を有するスピロノラクトンも、月経不順を引き起こす [113-116]。スピロノラクトンの in vitro PR/MR の選択性比（29 倍）は、SM-368229 の選択性比（18 倍）よりも高いことより、本検討でみられたスピロノラクトン投与による性周期異常は、PR アンタゴニスト作用というよりはむしろ PR アゴニスト作用によるものと考えられる。SM-368229 も PR アゴニスト作用のポテンシャルを有しているにも関わらず、100 および 300 mg/kg の高用量を投与しても、性周期や卵の数へ異常を示さなかった。この原因は不明であるが、PR パーシャルアゴニスト活性の違いによるものが一因として考えられる。

本検討では、SM-368229 の GR に対する詳細な検討はしていないが、SM-368229 が臨床および非臨床において GR に関連する作用を示す可能性は低いと考えられる。なぜなら、SM-368229 の in vitro における GR 拮抗作用と MR 拮抗作用の選択性比は 231 倍で、スピロノラクトンの 183 倍よりも高く、スピロノラクトン投与による GR 関連の副作用がほとんど報告されていないからである [19]。さらに、GR のアゴニストであるデキサメタゾンは、ラットの胸腺重量を減少させるが [117]、SM-368229 (100、300 および 1000 mg/kg）は、2 週間反復経口投与試験において、ラットの胸腺重量に影響を及ぼさない（Data not shown）。これらの結果を総合すると、SM-368229 の MR 選択性は、スピロノラクトンよりも優れていることを示している。

第 2 節では、SM-368229 の AR、PR および GR 以外の抗高血圧作用や血中電解質制御に関連す

る標的分子に対する作用を評価した。SM-368229 は、今回評価した 66 の標的分子に関しては明確な結合親和性示さなかったことより、MR への選択性が高い化合物であると考えられた。また、Angiotensin AT_1、Vasopressin V_{1A}、Calcium Channel L-Type, Phenylalkylamine、Na^+/K^+ ATPase については、SM-368229 の類似化合物（同骨格であるベンズオキサジン誘導体および類似骨格であるベンズオキサゼピン誘導体）が明確な作用を示さないことを確認している（それぞれ 10 μmol/L において 1、-2、0、16%抑制）。

第４章の結果をまとめると、SM-368229 の薬効や高カリウム血症リスク低減化のメカニズムに、MR 以外の受容体やイオンチャネルが関与する可能性は低いと考えられた。

総括

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の最終産物であるアルドステロンは、MR に作用して血圧を上昇させるだけでなく、心臓、腎臓、血管および脳への障害を惹起する心血管リスクホルモンと考えられていることより、MR 拮抗薬により高血圧および心血管系疾患を予防もしくは治療することは、非常に重要である。しかしながら、MR 拮抗薬はメカニズムベースの副作用である高カリウム血症リスクを有しており、薬効のポテンシャルを充分に発揮できておらず治療満足度は高くない。そこで、本研究では、MR 拮抗薬の有する高カリウム血症リスクを低減化させる治療戦略に着目し、MR 拮抗作用にアゴニスト活性を付与することで、高カリウム血症リスクが低減化できるという作業仮説を立て、異なるパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬を用いて検証することとした。そして、本研究により得られた知見をまとめると、下記のようになる（Figure 27）。

１）DSR-11861、スピロノラクトンに代表されるパーシャルアゴニスト活性を有していない MR 拮抗薬は、副腎摘出ラットにおける in vivo MR 拮抗作用を示す用量と、経口カリウム負荷ラットにおける血清カリウム濃度上昇作用を示す用量がほぼ同じであった（Figure 9）。そして、SHRs においても、スピロノラクトンは抗高血圧作用を示す用量から血清カリウム濃度を上昇させた。しかし、血清カリウム濃度を上昇させないような低用量では、明確な抗高血圧作用を示さなかったことも併せて考えると、スピロノラクトンが SHRs において抗高血圧作用を示すには、充分な MR 拮抗作用を示す必要があると考えられる。これらの知見より、パーシャルアゴニスト活性を有していない MR 拮抗薬は、薬効の指標である in vivo MR 拮抗作用および降圧作用と、高カリウム血症の指標である血清カリウム濃度がパラレルに変動することより、高カリウム血症のリスクを有していることが示された。

２）DSR-14397 のような比較的強いパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬は、経口カリウム負荷ラットや SHRs で血清カリウム濃度を上昇させなかったことより、高カリウム血症リスクは低いと考えられる。しかしながら、DSR-14397 は、主作用である副腎摘出ラットにおける in vivo MR 拮抗作用および SHRs における抗高血圧作用を示すことができなかったことより、比較的強いパーシャルアゴニスト活性は、本来の MR 拮抗作用に基づく薬効を減弱させると考えられる。

３）SM-368229 のような適度のパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬は、副腎摘出ラッ

トにおいて十分な in vivo MR 拮抗作用を示した。そして、経口カリウム負荷モデルにおいて、in vivo MR 拮抗作用を示した用量より高い用量を用いても、明確な血清カリウム濃度の上昇作用を示さなかった。さらに、SHRs においても、SM-368229 は十分な抗高血圧作用を示しつつ、血清カリウム濃度はほとんど上昇させなかった。これらのことより、適度のパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬は、in vivo MR 拮抗作用および降圧作用と血清カリウム濃度上昇作用が乖離しており、高カリウム血症リスクを低減したプロフィールを有していることが明らかとなった。

4）SM-368229 は、アルドステロン/食塩負荷高血圧ラットにおいて、抗高血圧作用や心臓および腎臓の臓器保護作用を示し、食塩負荷ラットでは、血圧上昇や心臓および腎臓の臓器重量の増加、腎機能障害マーカーの上昇を示さなかったことより、適度のパーシャルアゴニスト活性を有している MR 拮抗薬は、病態で上昇した MR の活性化を抑制し、内在性リガンド濃度が低い状況下ではパーシャルアゴニスト活性自身による MR の活性化を介して病態を惹起する可能性は低いと考えられた。

今回得られた知見から、MR 拮抗薬が有しているパーシャルアゴニスト活性が、薬効と高カリウム血症のバランスを決定する重要な因子になると考えられた。そして、SM-368229 が有している 12%という適度のパーシャルアゴニスト活性が、薬効を保持しつつ高カリウム血症リスク低減化に重要であることが明らかになった。しかし、12%程度のパーシャルアゴニスト活性では、in vivo で薬理作用を発揮するには弱すぎるのではないかと思われるが、実際に SM-3689229 を副腎摘出ラットに投与すると、尿中ナトリウム/カリウム比を低下させ MR アゴニスト作用を示すと考えられる（Figure 6A）。また、本研究では MR のパーシャルアゴニスト活性を、ルシフェラーゼアッセイの系において、1 nmol/L のアルドステロン刺激を 100%とした時の割合で算出している。しかし、ヒトやラットの高血圧および心不全病態における血中のアルドステロン濃度は、1 nmol/L よりも低く、約 0.15-0.3 nmol/L である [118-121]。そのような病態生理的なアルドステロン濃度条件下で SM-368229 のパーシャルアゴニスト活性を補正すると（0.15-0.3 nmol/L のアルドステロン刺激を 100%とした時の割合で算出すると）、14-18%となる。従って、今回の SHRs において認められた結果の考察として、SM-368229 が有している適度のパーシャルアゴニスト活性が、過度の MR アンタゴニスト作用にブレーキをかけるのに十分な薬理作用を発揮したために、血清カリウム濃度を上昇させなかったと推察している。DSR-14937 も同様の条件でパーシャルアゴニスト活性を算出すると、55-62%となり、内因性リガンド濃度が低いあるいは高くない場合は、MR アンタゴニストというよりも、むしろ MR アゴニストとして薬理作用を発揮するポテンシャルを有していると考えられた。実際、DSR-14397 は、SHRs においては、血清カリウム濃度を低下させている（Figure

12D)。一方、ヒト健常人や正常ラットにおける血中のアルドステロンは、約 0.1 nmol/L である[122-124]。ルシフェラーゼアッセイの系において、0.1 nmol/L のアルドステロン刺激では、アルドステロン 1 nmol/L 刺激条件下と比較して、ルシフェラーゼ活性は約 50%となることより、SM-368229 が有する適度なパーシャルアゴニスト活性（10 μmol/L で 12%）であれば、生理的濃度のアルドステロンよりも強く MR を活性化する可能性は低く、SM-368229 を長期的に投与したとしても心肥大などの臓器障害を惹起する懸念点は低いと考えられる。3 週間の反復経口投与試験ではあるが、SM-368229 は食塩負荷ラットにおいて、心臓重量を全く増加させていない（Figure 14A）。

MR 拮抗薬の高血圧治療薬や収縮機能低下型心不全治療薬以外の有用性として、治療抵抗性高血圧や腎疾患治療薬としても期待できることが報告されている[27, 125-127]。また、MR 拮抗薬の新たな適応の可能性として、アンメットメディカルニーズの高い収縮機能保持型心不全患者を対象にした TOPCAT[128]や、アルブミン尿を有する高血圧患者における腎保護を検討する EVALUATE が進行中であり[129]、その臨床試験結果が注目されている。さらに、MR 拮抗薬の有用性が注目される中、2010 年に入り、非ステロイド骨格の MR 拮抗薬の創薬研究が活発化し[130-133]、臨床移行した化合物も出てきたが[134, 135]、高カリウム血症リスク低減化に着目しているものは見当たらない。MR 拮抗薬ではないものの、既存 MR 拮抗薬との併用剤として使用する経口カリウム吸着剤（RLY5016）が、開発後期段階にあるに過ぎない[135, 136]。しかしながら、RLY5016 は、消化器関連の副作用を有しており、課題も残されている。また、緒論に記載したように、複数の研究グループによって、MR 拮抗薬の薬効と副作用（高カリウム血症リスク）を乖離させる創薬戦略が提示され研究開発が行われるようになったが[49-52]、未だにコンセプトの証明には至っていないのが現状である。

核内受容体の創薬研究においては、薬効と副作用を乖離したモジュレーターという概念が提唱されており、ER[137, 138]、AR[139 140]、GR[141]や PR[142]に関しては、非臨床試験あるいは臨床試験にてそのことが証明されているが、MR に関しては未だ証明されていない。今回我々が見出した知見は、適度のパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬が、MR 拮抗作用と血清カリウム濃度上昇作用を乖離させた Selective Mineralocorticoid Receptor Modulator（SMRM）に成り得る可能性を初めて示したとも言えよう。今後の検討課題として、パーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬が SMRM として機能する詳細な分子メカニズムを明らかにすることが重要だと考えている。すなわち、リクルートされるコファクターの解析や[143-145]、化合物とコファクターを用いた X 線結晶構造解析および化合物の組織選択性などを検討することが、薬効を保持しつつ高カリウム血症リスクを低減化させた新規の MR 拮抗薬の創製を加速させるには不可欠と考えている。

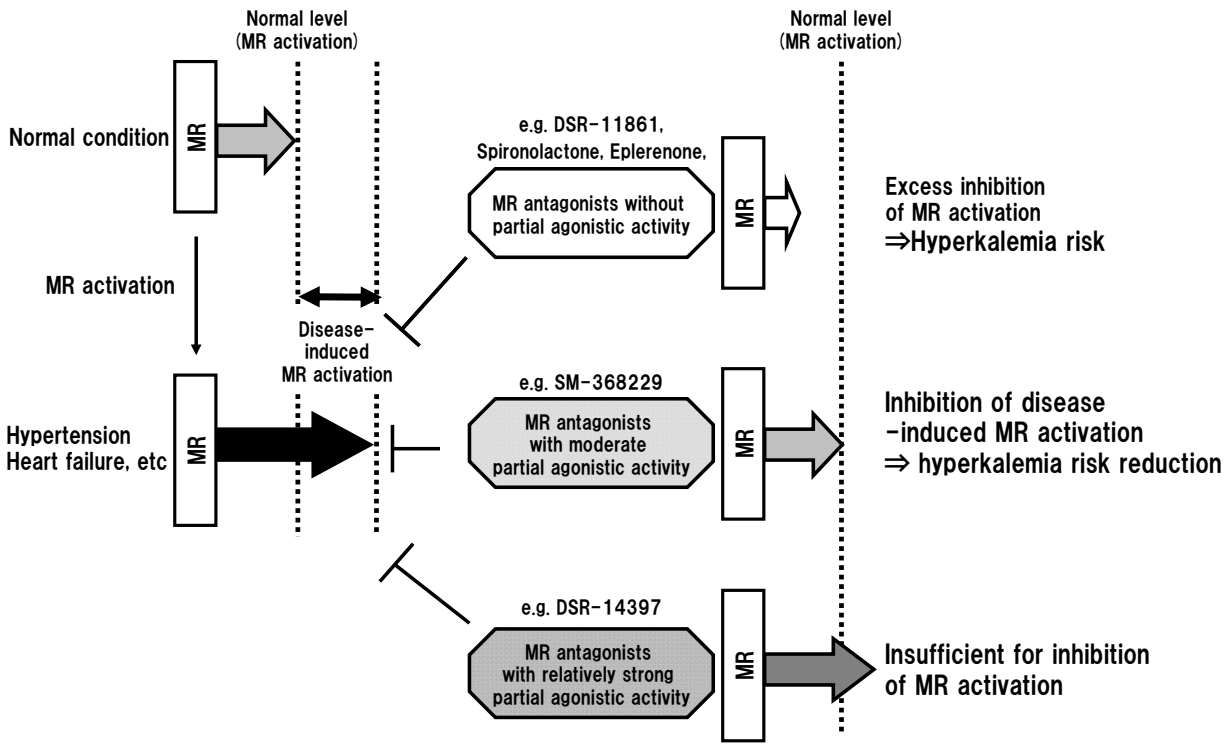

Figure 27 MR antagonists with partial agonistic activities on anti-mineralocorticoid action and hyperkalemia risk
MR antagonists without partial agonistic activity (e.g. DSR-11861, spironolactone, and eplerenone) showed an anti-mineralocorticoid action with serum potassium elevation, indicating that these drugs have hyperkalemia risk. A MR antagonist with moderate partial agonistic activity (e.g. SM-368229) exerted an antihypertensive effect without serum potassium elevation, suggesting that this compound has the potential for risk reduction of hyperkalemia. A MR antagonist with relatively strong partial agonistic activity (e.g. DSR-14397) did not increase serum potassium levels, however, it failed to show anti-mineralocorticoid action or antihypertensive effects.

結論

本研究では、MR 拮抗薬の高カリウム血症リスク低減化を目的に、新規 MR 拮抗薬の MR に対するパーシャルアゴニスト活性を評価し、その活性別に以下に示す結論を得た。

1　パーシャルアゴニスト活性を有していない MR 拮抗薬は、MR 拮抗作用を示す用量付近において血清カリウム濃度を上昇させ、高カリウム血症リスクを有していることが示された。

2　適度のパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬は、血清カリウム濃度を上昇させずに、MR 拮抗作用、抗高血圧作用、心臓・腎臓の臓器保護作用を発揮し、高カリウム血症リスクを低減化できることが示された。

3　比較的強いパーシャルアゴニスト活性を有する MR 拮抗薬は、血清カリウム濃度を上昇させず、高カリウム血症リスクは低減化していたが、MR 拮抗作用、抗高血圧作用を示せず、MR 拮抗薬としての薬効が充分発揮できないことが示された。

MR 拮抗作用に適度のパーシャルアゴニスト活性を付与することで、抗高血圧作用および臓器保護作用を保持しつつ、高カリウム血症リスクを低減させることが可能になると考えられた。本知見を活かし、薬効と安全性のバランスに優れた新規の MR 拮抗薬の創製につながることが期待される。

謝辞

本博士論文は、大日本住友製薬株式会社研究本部薬理研究所にて行った研究成果をまとめたものである。

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大日本住友製薬株式会社研究本部薬理研究所（現京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター悪性制御研究ラボ特任教授）の松井和貴様に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、長年に渡り多大なる御助言、御指導を賜りました大日本住友製薬株式会社研究本部薬理研究所（現大日本住友製薬株式会社研究本部研究企画推進部）の藤田克哉様に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、直接御指導を賜りました大日本住友製薬株式会社研究本部薬理研究所の森雅哉様、山口信幸様、山名祐香様に心より御礼申し上げます。

本稿をまとめるにあたり、終始適切な御助言および激励を賜りました大日本住友製薬株式会社研究本部薬理研究所の山田一登様（現大日本住友製薬株式会社研究本部研究企画推進部）、山本節子様、加藤浩様に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、新規 MR 拮抗薬の創製に御協力いただいました大日本住友製薬株式会社研究本部化学研究所の片山精司様（現大日本住友製薬株式会社知的財産部）、堀誠治様、須田仁志様、岩田昌門様、薬物動態プロフィールの解析に御協力いただきました大日本住友製薬株式会社研究本部薬物動態研究所の只野純様に心より感謝申し上げます。

最後に、本稿をまとめるにあたり、多大な御協力と終始支援をして下さりました家族に感謝し、厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. The CONSENSUS trial study group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N. Engl. J. Med.* Jun 4 1987;316(23):1429-1435.

2. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.* Sep 20 2001;345(12):861-869.

3. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* Sep 20 2001;345(12):851-860.

4. Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, et al. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet.* Sep 6 2003;362(9386):759-766.

5. Fujita T, Teramoto T. 高血圧および高脂血症の薬物療法の現状と課題. *PROGRESS IN MEDICINE.* 2006;26(9):2297-2306.

6. Egan BM, Zhao Y, Axon RN. US trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension, 1988-2008. *JAMA.* May 26 2010;303(20):2043-2050.

7. World Health Organization. Cardiovascular disease factsheet. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html.

8. 厚生労働省. 人口動態調査統計. http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/81-1a2.pdf. 2010.

9. Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Reichstein T. [Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism.]. *Experientia.* Sep 1953;9(9):333-335.

10. Williams JS, Williams GH. 50th anniversary of aldosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Jun 2003;88(6):2364-2372.

11. Garthwaite SM, McMahon EG. The evolution of aldosterone antagonists. *Mol. Cell. Endocrinol.* Mar 31 2004;217(1-2):27-31.

12. Rossi GP, Bernini G, Desideri G, et al. Renal damage in primary aldosteronism: results of the PAPY Study. *Hypertension.* Aug 2006;48(2):232-238.

13. Schiffrin EL. Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension.* Mar 2006;47(3):312-318.

14. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, Fujita T. Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension.* Feb 2007;49(2):355-364.

15. Struthers A, Krum H, Williams GH. A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clin. Cardiol.* Apr 2008;31(4):153-158.

16. Albert NM, Yancy CW, Liang L, et al. Use of aldosterone antagonists in heart failure. *JAMA.* Oct

21 2009;302(15):1658-1665.

17. Nishiyama A, Hitomi H, Rahman A, Kiyomoto H. Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): pharmacological effects of mineralocorticoid-receptor blockers. *J Pharmacol Sci.* Jan 2009;109(1):1-6.

18. Maron BA, Leopold JA. Aldosterone receptor antagonists: effective but often forgotten. *Circulation.* Feb 23 2010;121(7):934-939.

19. 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.* Sep 2 1999;341(10):709-717.

20. 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.* Apr 3 2003;348(14):1309-1321.

21. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N. Engl. J. Med.* Jan 6 2011;364(1):11-21.

22. Flack JM, Oparil S, Pratt JH, et al. Efficacy and tolerability of eplerenone and losartan in hypertensive black and white patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* Apr 2 2003;41(7):1148-1155.

23. Weinberger MH, White WB, Ruilope LM, et al. Effects of eplerenone versus losartan in patients with low-renin hypertension. *Am. Heart J.* Sep 2005;150(3):426-433.

24. White WB, Duprez D, St Hillaire R, et al. Effects of the selective aldosterone blocker eplerenone versus the calcium antagonist amlodipine in systolic hypertension. *Hypertension.* May 2003;41(5):1021-1026.

25. Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, et al. Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study. *Circulation.* Oct 14 2003;108(15):1831-1838.

26. Epstein MB, V. Martinez, F. Altamirano, J. Roniker, B. Kleiman, J. Krause, S. Antiproteinuric efficacy of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril combination therapy in diabetic hypertensives with microalbuminuria. *Am. J. Hypertens.* 2002;15(4):24A.

27. 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.* Jun 24 2008;117(25):e510-526.

28. Nishizaka MK, Zaman MA, Calhoun DA. Efficacy of low-dose spironolactone in subjects with resistant hypertension. *Am. J. Hypertens.* Nov 2003;16(11 Pt 1):925-930.

29. Mahmud A, Mahgoub M, Hall M, Feely J. Does aldosterone-to-renin ratio predict the antihypertensive effect of the aldosterone antagonist spironolactone? *Am. J. Hypertens.* Dec 2005;18(12 Pt 1):1631-1635.

30. Chapman N, Dobson J, Wilson S, et al. Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension. *Hypertension.* Apr 2007;49(4):839-845.

31. de Souza F, Muxfeldt E, Fiszman R, Salles G. Efficacy of spironolactone therapy in patients with true resistant hypertension. *Hypertension.* Jan 2010;55(1):147-152.

32. Alvarez-Alvarez B, Abad-Cardiel M, Fernandez-Cruz A, Martell-Claros N. Management of resistant arterial hypertension: role of spironolactone versus double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J. Hypertens.* Nov 2010;28(11):2329-2335.

33. Bomback AS, Klemmer PJ. The incidence and implications of aldosterone breakthrough. *Nat Clin Pract Nephrol.* Sep 2007;3(9):486-492.

34. Yoneda T, Takeda Y, Usukura M, et al. Aldosterone breakthrough during angiotensin II receptor blockade in hypertensive patients with diabetes mellitus. *Am. J. Hypertens.* Dec 2007;20(12):1329-1333.

35. Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T. Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension.* Jan 2003;41(1):64-68.

36. Sato A, Saruta T. Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in essential hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *J. Int. Med. Res.* Jan-Feb 2001;29(1):13-21.

37. Juurlink DN, Mamdani MM, Lee DS, et al. Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N. Engl. J. Med.* Aug 5 2004;351(6):543-551.

38. Masoudi FA, Gross CP, Wang Y, et al. Adoption of spironolactone therapy for older patients with heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the United States, 1998-2001. *Circulation.* Jul 5 2005;112(1):39-47.

39. Ko DT, Juurlink DN, Mamdani MM, et al. Appropriateness of spironolactone prescribing in heart failure patients: a population-based study. *J. Card. Fail.* Apr 2006;12(3):205-210.

40. Einhorn LM, Zhan M, Hsu VD, et al. The frequency of hyperkalemia and its significance in chronic kidney disease. *Arch. Intern. Med.* Jun 22 2009;169(12):1156-1162.

41. Goyal A, Spertus JA, Gosch K, et al. Serum potassium levels and mortality in acute myocardial infarction. *JAMA.* Jan 11 2012;307(2):157-164.

42. Samuel JL, Delcayre C. Heart failure: aldosterone antagonists are underused by clinicians. *Nat Rev Cardiol.* Mar 2010;7(3):125-127.

43. Khosla N, Kalaitzidis R, Bakris GL. Predictors of hyperkalemia risk following hypertension control with aldosterone blockade. *Am. J. Nephrol.* 2009;30(5):418-424.

44. Cruz CS, Cruz AA, Marcilio de Souza CA. Hyperkalaemia in congestive heart failure patients using ACE inhibitors and spironolactone. *Nephrol. Dial. Transplant.* Sep 2003;18(9):1814-1819.

45. ファイザー株式会社. セララ錠 申請資料概要、新薬の承認に関する情報. 2007.

46. Bell MG, Gernert DL, Grese TA, et al. (S)-N-{3-[1-cyclopropyl-1-(2,4-difluoro-phenyl)-ethyl]-1H-indol-7-yl}-methanesulfonamide: a potent, nonsteroidal, functional antagonist of the mineralocorticoid receptor. *J. Med. Chem.* Dec 27 2007;50(26):6443-6445.

47. Brandish PE, Chen H, Szczerba P, Hershey JC. Development of a simplified assay for determination of the antimineralocorticoid activity of compounds dosed in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* Mar-Apr 2008;57(2):155-160.

48. Meyers MJH, X. Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonists. *Expert Opin. Ther. Pat.*

2007;17(1):17-23.

49. Brandish PE, Fraley ME, Hershey JC, Steen JT. Mineralocorticoid receptor modulators. *WO/2009/078934* 2009.

50. Kolkhof P, Borden SA. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. *Mol. Cell. Endocrinol.* Mar 24 2012;350(2):310-317.

51. Yang J, Chang CY, Safi R, et al. Identification of ligand-selective peptide antagonists of the mineralocorticoid receptor using phage display. *Mol. Endocrinol.* Jan 2011;25(1):32-43.

52. Fuller PJ, Yao Y, Yang J, Young MJ. Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor. *J Endocrinology.* Apr 2012;213(1):15-24.

53. Berger S, Bleich M, Schmid W, et al. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na+ metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Aug 4 1998;95(16):9424-9429.

54. Adam WR, Goland GJ, Wellard RM. Renal potassium adaptation in the rat: role of glucocorticoids and aldosterone. *Am. J. Physiol.* Mar 1984;246(3 Pt 2):F300-308.

55. Gonzales D, Rennard SI, Nides M, et al. Varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA.* Jul 5 2006;296(1):47-55.

56. Jorenby DE, Hays JT, Rigotti NA, et al. Efficacy of varenicline, an alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, vs placebo or sustained-release bupropion for smoking cessation: a randomized controlled trial. *JAMA.* Jul 5 2006;296(1):56-63.

57. Kane JM, Carson WH, Saha AR, et al. Efficacy and safety of aripiprazole and haloperidol versus placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *J. Clin. Psychiatry.* Sep 2002;63(9):763-771.

58. Rollema H, Hajos M, Seymour PA, et al. Preclinical pharmacology of the alpha4beta2 nAChR partial agonist varenicline related to effects on reward, mood and cognition. *Biochem. Pharmacol.* Oct 1 2009;78(7):813-824.

59. Shapiro DA, Renock S, Arrington E, et al. Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacology.* Aug 2003;28(8):1400-1411.

60. Shibata S, Saito I. β遮断薬の適応と禁忌. *Pharma Medica.* 1998.;16(7):77-83.

61. Kim MK, Chae YN, Kim HS, et al. PAR-1622 is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma partial activator with preserved antidiabetic efficacy and broader safety profile for fluid retention. *Arch. Pharm. Res.* May 2009;32(5):721-727.

62. Kintscher U, Goebel M. INT-131, a PPARgamma agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs.* Apr 2009;10(4):381-387.

63. Dunn FL, Higgins LS, Fredrickson J, DePaoli AM. Selective modulation of PPARgamma activity can lower plasma glucose without typical thiazolidinedione side-effects in patients with Type 2 diabetes. *J. Diabetes Complications.* May-Jun 2011;25(3):151-158.

64. Murase H, Yasuda K, Mercado-Asis LB, et al. 19-hydroxyandrostenedione does not modulate [3H]aldosterone binding to human mononuclear leucocytes and rat renal cytosol. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* Mar 1991;38(3):331-337.

65. Grekin RJ, Sider RS. Aldosterone receptor assay in rat kidney cytosol. *J. Steroid Biochem.* Jul 1980;13(7):835-837.

66. Hu X, Li S, McMahon EG, Lala DS, Rudolph AE. Molecular mechanisms of mineralocorticoid receptor antagonism by eplerenone. *Mini Rev Med Chem.* Aug 2005;5(8):709-718.

67. de Gasparo M, Joss U, Ramjoue HP, et al. Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Feb 1987;240(2):650-656.

68. Kagawa CM. Blocking the renal electrolyte effects of mineralocorticoids with an orally active steroidal spirolactone. *Endocrinology.* Jul 1960;67:125-132.

69. Kagawa CM, Jacobs RS, Jr. Mineralocorticoid effects of 9 alpha-fluorodeoxycorticosterone in adrenalectomized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* May 1960;104:60-62.

70. Adam WR, Campbell DJ. Plasma aldosterone levels after KCl loading in rats adapted to a high potassium diet. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* Sep-Oct 1984;11(5):513-520.

71. Cook CS, Berry LM, Bible RH, Hribar JD, Hajdu E, Liu NW. Pharmacokinetics and metabolism of [14C]eplerenone after oral administration to humans. *Drug Metab. Dispos.* Nov 2003;31(11):1448-1455.

72. Cook CS, Zhang L, Ames GB, Fischer J, Zhang J, Levin S. Single- and repeated-dose pharmacokinetics of eplerenone, a selective aldosterone receptor blocker, in rats. *Xenobiotica.* Mar 2003;33(3):305-321.

73. Weinberger MH, Roniker B, Krause SL, Weiss RJ. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension. *Am. J. Hypertens.* Aug 2002;15(8):709-716.

74. Parthasarathy HK, Menard J, White WB, et al. A double-blind, randomized study comparing the antihypertensive effect of eplerenone and spironolactone in patients with hypertension and evidence of primary aldosteronism. *J. Hypertens.* May 2011;29(5):980-990.

75. Kaukonen AM, Vuorela P, Vuorela H, Mannermaa JP. High-performance liquid chromatography methods for the separation and quantitation of spironolactone and its degradation products in aqueous formulations and of its metabolites in rat serum. *J. Chromatogr. A.* Feb 27 1998;797(1-2):271-281.

76. Tokumura T, Muraoka A, Masutomi T, Machida Y. Stability of spironolactone in rat plasma: strict temperature control of blood and plasma samples is required in rat pharmacokinetic studies. *Biol. Pharm. Bull.* Jun 2005;28(6):1126-1128.

77. Davidson C, McLachlan MS, Burkinshaw L, Morgan DB. Effect of long-term diuretic treatment on body-potassium in heart-disease. *Lancet.* Nov 13 1976;2(7994):1044-1047.

78. Poggio R, Grancelli HO, Miriuka SG. Understanding the risk of hyperkalaemia in heart failure: role of aldosterone antagonism. *Postgrad. Med. J.* Mar 2010;86(1013):136-142.

79. Pitt B, Bakris G, Ruilope LM, DiCarlo L, Mukherjee R. Serum potassium and clinical outcomes in the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS). *Circulation.* Oct 14 2008;118(16):1643-1650.

80. Michea L, Villagran A, Urzua A, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and prevents oxidative stress in uremic rats. *Hypertension.* Aug 2008;52(2):295-300.

81. Piecha G, Koleganova N, Gross ML, Geldyyev A, Adamczak M, Ritz E. Regression of glomerulosclerosis in subtotally nephrectomized rats: effects of monotherapy with losartan, spironolactone, and their combination. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jul 2008;295(1):F137-144.

82. Rodrigues SF, Dossantos RA, de Oliveira MA, et al. Amlodipine reduces the antimigratory effect of diclofenac in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* May 2008;51(5):492-504.

83. Wang JM, Wang Y, Zhu ZS, et al. Diverse effects of long-term treatment with imidapril and irbesartan on cell growth signal, apoptosis and collagen type I expression in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* Jun 11 2004;75(4):407-420.

84. Brandish PE, Forest TW, Chen H, et al. Eplerenone decreases inflammatory foci in spontaneously hypertensive rat hearts with minimal effects on blood pressure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* Jan 2009;53(1):44-51.

85. Shibata S, Mu S, Kawarazaki H, et al. Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* Aug 2011;121(8):3233-3243.

86. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int.* May 2003;63(5):1791-1800.

87. 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.* Apr 2004;43(4):841-848.

88. Park YM, Lim BH, Touyz RM, Park JB. Expression of NAD(P)H oxidase subunits and their contribution to cardiovascular damage in aldosterone/salt-induced hypertensive rat. *J. Korean Med. Sci.* Dec 2008;23(6):1039-1045.

89. Rocha R, Rudolph AE, Frierdich GE, et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Nov 2002;283(5):H1802-1810.

90. Karmazyn M, Liu Q, Gan XT, Brix BJ, Fliegel L. Aldosterone increases NHE-1 expression and induces NHE-1-dependent hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension.* Dec 2003;42(6):1171-1176.

91. Kliche K, Kuhn M, Hillebrand U, Ludwig Y, Stock C, Oberleithner H. Direct aldosterone action on mouse cardiomyocytes detected with atomic force microscopy. *Cell. Physiol. Biochem.* 2006;18(4-5):265-274.

92. Yamamuro M, Yoshimura M, Nakayama M, et al. Direct effects of aldosterone on cardiomyocytes in the presence of normal and elevated extracellular sodium. *Endocrinology.* Mar 2006;147(3):1314-1321.

93. Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T, Matsuoka H. Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens. Res.* Nov 2005;28(11):925-936.

94. Pu Q, Neves MF, Virdis A, Touyz RM, Schiffrin EL. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension.* Jul 2003;42(1):49-55.

95. Nagai Y, Miyata K, Sun GP, et al. Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension.* Oct 2005;46(4):1039-1045.

96. Kiyomoto H, Rafiq K, Mostofa M, Nishiyama A. Possible underlying mechanisms responsible for aldosterone and mineralocorticoid receptor-dependent renal injury. *J Pharmacol Sci.* Dec 2008;108(4):399-405.

97. Nagase M, Fujita T. Aldosterone and glomerular podocyte injury. *Clin Exp Nephrol.* Aug 2008;12(4):233-242.

98. Nishiyama A, Abe Y. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: renoprotective effects of aldosterone blockade. *J Pharmacol Sci.* Jan 2006;100(1):9-16.

99. Rafiq K, Hitomi H, Nakano D, Nishiyama A. Pathophysiological roles of aldosterone and mineralocorticoid receptor in the kidney. *J Pharmacol Sci.* Jan 18 2011;115(1):1-7.

100. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study. *Am. J. Kidney Dis.* Jul 2005;46(1):45-51.

101. Schjoedt KJ, Rossing K, Juhl TR, et al. Beneficial impact of spironolactone in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* Dec 2005;68(6):2829-2836.

102. Sengul E, Sahin T, Sevin E, Yilmaz A. Effect of spironolactone on urinary protein excretion in patients with chronic kidney disease. *Ren. Fail.* 2009;31(10):928-932.

103. Funder JW, Carey RM, Fardella C, et al. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Sep 2008;93(9):3266-3281.

104. Omura M, Saito J, Yamaguchi K, Kakuta Y, Nishikawa T. Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan. *Hypertens. Res.* Mar 2004;27(3):193-202.

105. Fagart J, Wurtz JM, Souque A, Hellal-Levy C, Moras D, Rafestin-Oblin ME. Antagonism in the human mineralocorticoid receptor. *EMBO J.* Jun 15 1998;17(12):3317-3325.

106. Li Y, Suino K, Daugherty J, Xu HE. Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell.* Aug 5 2005;19(3):367-380.

107. Sunami O, Kunimatsu T, Yamada T, et al. Evaluation of a 5-day Hershberger assay using young mature male rats: methyltestosterone and p,p'-DDE, but not fenitrothion, exhibited androgenic or antiandrogenic activity in vivo. *J. Toxicol. Sci.* Dec 2000;25(5):403-415.

108. Yamada T, Kunimatsu T, Sako H, et al. Comparative evaluation of a 5-day Hershberger assay utilizing mature male rats and a pubertal male assay for detection of flutamide's antiandrogenic activity. *Toxicol. Sci.* Feb 2000;53(2):289-296.

109. Zhang Z, Olland AM, Zhu Y, et al. Molecular and pharmacological properties of a potent and selective novel nonsteroidal progesterone receptor agonist tanaproget. *J. Biol. Chem.* Aug 5 2005;280(31):28468-28475.

110. Jeunemaitre X, Chatellier G, Kreft-Jais C, et al. Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. *Am. J. Cardiol.* Oct 1 1987;60(10):820-825.

111. Heikinheimo O, Gordon K, Williams RF, Hodgen GD. Inhibition of ovulation by progestin analogs (agonists vs antagonists): preliminary evidence for different sites and mechanisms of actions. *Contraception.* Jan 1996;53(1):55-64.

112. Tamura T, Yokoi R, Okuhara Y, et al. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 2) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of mifepristone in female rats. *J. Toxicol. Sci.* 2009;34 Suppl 1:SP31-42.

113. Kelestimur F, Everest H, Unluhizarci K, Bayram F, Sahin Y. A comparison between spironolactone and spironolactone plus finasteride in the treatment of hirsutism. *Eur. J. Endocrinol.* Mar 2004;150(3):351-354.

114. Moghetti P, Tosi F, Tosti A, et al. Comparison of spironolactone, flutamide, and finasteride efficacy in the treatment of hirsutism: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Jan 2000;85(1):89-94.

115. Muhlemann MF, Carter GD, Cream JJ, Wise P. Oral spironolactone: an effective treatment for acne vulgaris in women. *Br. J. Dermatol.* Aug 1986;115(2):227-232.

116. Spritzer PM, Lisboa KO, Mattiello S, Lhullier F. Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* May 2000;52(5):587-594.

117. Zhang Y, Croft KD, Mori TA, Schyvens CG, McKenzie KU, Whitworth JA. The antioxidant tempol prevents and partially reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. *Am. J. Hypertens.* Mar 2004;17(3):260-265.

118. Eudy R, Sahasrabudhe V, Sweeney K, et al. The use of plasma aldosterone and urinary sodium to potassium ratio as translatable quantitative biomarkers of mineralocorticoid receptor antagonism. *J Translational Medicine.* 2011;9(1):180.

119. Nagase M, Yoshida S, Shibata S, et al. Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic syndrome: possible contribution of fat-derived factors. *J. Am. Coll. Cardiol.* Dec 2006;17(12):3438-3446.

120. Pappa T, Papanastasiou L, Kaltsas G, et al. Pattern of adrenal hormonal secretion in patients with adrenal adenomas: the relevance of aldosterone in arterial hypertension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Apr 2012;97(4):E537-545.

121. Rousseau MF, Gurne O, Duprez D, et al. Beneficial neurohormonal profile of spironolactone in severe congestive heart failure: results from the RALES neurohormonal substudy. *J. Am. Coll. Cardiol.* Nov 6 2002;40(9):1596-1601.

122. Yamaguchi T, Baba K, Doi Y, Yano K, Kitamura K, Eto T. Inhibition of aldosterone production by adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the rat. *Hypertension.* Aug 1996;28(2):308-314.

123. Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology.* Dec 2002;143(12):4828-4836.

124. Hannemann A, Wallaschofski H, Ludemann J, et al. Plasma aldosterone levels and

aldosterone-to-renin ratios are associated with endothelial dysfunction in young to middle-aged subjects. *Atherosclerosis.* Dec 2011;219(2):875-879.

125. Pimenta E, Calhoun DA. Resistant hypertension and aldosteronism. *Curr Hypertens Rep.* Nov 2007;9(5):353-359.

126. Volk MJ, Bomback AS, Klemmer PJ. Mineralocorticoid receptor blockade in chronic kidney disease. *Curr Hypertens Rep.* Aug 2011;13(4):282-288.

127. Shavit L, Lifschitz MD, Epstein M. Aldosterone blockade and the mineralocorticoid receptor in the management of chronic kidney disease: current concepts and emerging treatment paradigms. *Kidney Int.* May 2012;81(10):955-968.

128. Desai AS, Lewis EF, Li R, et al. Rationale and design of the treatment of preserved cardiac function heart failure with an aldosterone antagonist trial: a randomized, controlled study of spironolactone in patients with symptomatic heart failure and preserved ejection fraction. *Am. Heart J.* Dec 2011;162(6):966-972 e910.

129. Ando K, Ohtsu H, Arakawa Y, et al. Rationale and design of the Eplerenone combination Versus conventional Agents to Lower blood pressure on Urinary Antialbuminuric Treatment Effect (EVALUATE) trial: a double-blinded randomized placebo-controlled trial to evaluate the antialbuminuric effects of an aldosterone blocker in hypertensive patients with albuminuria. *Hypertens. Res.* Jun 2010;33(6):616-621.

130. Hasui T, Matsunaga N, Ora T, et al. Identification of benzoxazin-3-one derivatives as novel, potent, and selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonists. *J. Med. Chem.* Dec 22 2011;54(24):8616-8631.

131. Arhancet GB, Woodard SS, Iyanar K, et al. Discovery of novel cyanodihydropyridines as potent mineralocorticoid receptor antagonists. *J. Med. Chem.* Aug 26 2010;53(16):5970-5978.

132. Fagart J, Hillisch A, Huyet J, et al. A new mode of mineralocorticoid receptor antagonism by a potent and selective nonsteroidal molecule. *J. Biol. Chem.* Sep 24 2010;285(39):29932-29940.

133. Arhancet GB, Woodard SS, Dietz JD, et al. Stereochemical requirements for the mineralocorticoid receptor antagonist activity of dihydropyridines. *J. Med. Chem.* May 27 2010;53(10):4300-4304.

134. Meyers MJ, Arhancet GB, Hockerman SL, et al. Discovery of (3S,3aR)-2-(3-chloro-4-cyanophenyl)-3-cyclopentyl-3,3a,4,5-tetrahydro-2H-b enzo[g]indazole-7-carboxylic acid (PF-3882845), an orally efficacious mineralocorticoid receptor (MR) antagonist for hypertension and nephropathy. *J. Med. Chem.* Aug 26 2010;53(16):5979-6002.

135. Buysse JM, Huang IZ, Pitt B. PEARL-HF: prevention of hyperkalemia in patients with heart failure using a novel polymeric potassium binder, RLY5016. *Future Cardiol.* Jan 2012;8(1):17-28.

136. Pitt B, Anker SD, Bushinsky DA, Kitzman DW, Zannad F, Huang IZ. Evaluation of the efficacy and safety of RLY5016, a polymeric potassium binder, in a double-blind, placebo-controlled study in patients with chronic heart failure (the PEARL-HF) trial. *Eur. Heart J.* Apr 2011;32(7):820-828.

137. Black LJ, Sato M, Rowley ER, et al. Raloxifene (LY139481 HCI) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* Jan

1994;93(1):63-69.

138. Clemett D, Spencer CM. Raloxifene: a review of its use in postmenopausal osteoporosis. *Drugs.* Aug 2000;60(2):379-411.

139. Vajda EG, Lopez FJ, Rix P, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of LGD-3303 [9-chloro-2-ethyl-1-methyl-3-(2,2,2-trifluoroethyl)-3H-pyrrolo-[3,2-f]quinolin-7(6H)-one], an orally available nonsteroidal-selective androgen receptor modulator. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Feb 2009;328(2):663-670.

140. Bhasin S, Jasuja R. Selective androgen receptor modulators as function promoting therapies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* May 2009;12(3):232-240.

141. De Bosscher K, Haegeman G, Elewaut D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Curr Opin Pharmacol.* Aug 2010;10(4):497-504.

142. Chwalisz K, Perez MC, Demanno D, Winkel C, Schubert G, Elger W. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocr. Rev.* May 2005;26(3):423-438.

143. Hultman ML, Krasnoperova NV, Li S, et al. The ligand-dependent interaction of mineralocorticoid receptor with coactivator and corepressor peptides suggests multiple activation mechanisms. *Mol. Endocrinol.* Jun 2005;19(6):1460-1473.

144. Yang J, Young MJ. The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *J. Mol. Endocrinol.* Aug 2009;43(2):53-64.

145. Yang J, Fuller PJ. Interactions of the mineralocorticoid receptor--within and without. *Mol. Cell. Endocrinol.* Mar 24 2012;350(2):196-205.