

Title	食塩感受性Dahl ratにおけるグアニレートシクラーゼの心および腎保護効果に関する研究
Author(s)	大石, 昇平
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/69515">https://doi.org/10.18910/69515</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

博 士 論 文

食塩感受性Dahl ratにおけるグアニレートシクラーゼの  
心および腎保護効果に関する研究

大石 昇平

## 目次

序論 .....	1
第1章 NP 誘導体 TDT の基本薬理プロファイルの検証 .....	3
【目的】 .....	3
【方法】 .....	4
【結果】 .....	6
【考察】 .....	9
第2章 食塩感受性 Dahl ラットにおける Long-acting GC-A activator TDT の心・腎保護効果 の検討 .....	11
【目的】 .....	11
【方法】 .....	13
【結果】 .....	19
【考察】 .....	30
第3章 TDT の podocyte 保護メカニズムの解明 .....	32
【目的】 .....	32
【方法】 .....	33
【結果】 .....	35
【考察】 .....	39
総括 .....	41
参考文献 .....	42
謝辞 .....	45

## 序論

心不全は、心臓のポンプ機能が低下し、末梢主要臓器の酸素需要量に見合うだけの血液量を絶対的また相対的に拍出できない状態である。人口の2%が罹患し、人口の高齢化や食生活の欧米化などに伴い年々増加している。β遮断薬やアンギオテンシン変換酵素 (Angiotensin converting enzyme, ACE)阻害薬、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬 (Angiotensin receptor blocker, ARB)の登場により予後は改善したものの、5年生存率は未だ50%以下と極めて重篤でアンメットニーズの高い疾患であり、さらなる治療法の開発が望まれている<sup>1</sup>。また、心不全患者の40-50%程度は腎不全も患っており<sup>2</sup>、腎機能は心不全の独立した予後規定因子であることから、心・腎の両方を保護する治療法の確立が望まれている。

心房型ナトリウム利尿ペプチド (Atrial natriuretic peptide, ANP)およびB型ナトリウム利尿ペプチド (B-type natriuretic peptide, BNP)を含むNPは細胞膜上に存在するレセプターであるグアニレートシクラーゼA (Guanylate cyclase-A, GC-A)に結合し、細胞内においてGTP (Guanosine triphosphate)からセカンドメッセンジャーであるcGMP (cyclic guanosine monophosphate)を生成する。さらにcGMPはcGMP依存性プロテインキナーゼ (Protein kinase G, PKG)を活性化し、様々な標的タンパクのリン酸化を介して多様な生理作用を発揮する。すなわち、ナトリウム利尿作用、動脈および静脈血管弛緩作用、交感神経活性抑制作用、レニン・アンギオテンシン・アルドステロン系 (Renin-Angiotensin-Aldosterone system, RAAS)抑制作用、細胞増殖および肥大抑制作用など、心臓への負荷を軽減する効果が発現する。加えて、ANPが心房への圧・容量負荷の増加に応じて放出されること、BNPが左心室の過伸展に伴い発現上昇することからも、主に心不全病態に応じて保護的に働く経路として存在することがわかる<sup>3</sup>。実際に、日本においてhuman ANP (hANP)製剤であるカルペリチドは急性心不全治療における第一選択薬として広く用いられている。

慢性心不全病態における心・腎機能の相互悪化促進機序として、交感神経系とRAASの活性化が大きく寄与しているが、NP - GC-A - cGMP経路はこれらを負に制御する<sup>5</sup>。さらに、

RAAS 非依存的なナトリウム利尿作用や直接的な細胞保護作用を有することから、既存薬に上乗せして心臓および腎臓の両者を保護することのできる治療標的となり得る。最近、NEP (neutral endo peptidase) inhibitor と ARB の合剤である Entresto が ACE inhibitor の単剤と比較して慢性心不全の予後を改善し<sup>6</sup>、10年ぶりの新薬として承認された。NEP inhibitor によるベネフィットは、NEP の基質である内因性の ANP や BNP の分解抑制に伴い循環 NP 量の増加を促進することによると考えられている<sup>7</sup>。しかし、NP のクリアランスに関わる経路は他にも存在し<sup>8</sup>、NEP 阻害による内因性 NP 量の増加は限られる。よって、直接的に GC-A - cGMP 系を活性化する薬剤が次世代の心不全治療薬として有望である。しかし、ANP や BNP は半減期が短く<sup>3</sup>、持続 infusion 以外の方法で十分な暴露を長時間かけることが困難であり、さらにはメカニズムに沿った一過性の血圧低下に伴う低血圧を避けるために投与量も限られると考えられる。よって、血中滞留性の良い Long-acting GC-A activator が理想的な治療薬となり得る。最近になって、in vitro において NEP に対して分解耐性を有し、native NP と比して活性も劣らない GC-A activator がいくつか報告されているが<sup>9</sup>、in vivo における薬理プロファイリングおよび治療的慢性投与時の心・腎保護作用については未知のままである。そこで著者は、Long-acting GC-A activator の慢性投与による心・腎不全に対する治療ポテンシャルを明らかにし、さらにそのメカニズムを見出す目的で、研究を行った。

## 第 1 章 NP 誘導体 TDT の基本薬理プロファイルの検証

### 【目的】

ナイリクタイパン (*Oxyuranus microlepidotus*)が分泌するへビ毒から抽出された TNP-c (taipan natriuretic peptide-c)は ANP と同等の GC-A 活性化作用を有し<sup>10</sup>、TNP-c 誘導体である TDT は NEP に対し耐性を持つことが報告された<sup>11</sup>。しかし、NEP 耐性獲得による薬理プロファイルの変化までは詳細に解析されていない。そこで、TDT の Long-acting GC-A activator としての基本薬理プロファイルを明らかにするため、in vitro および in vivo において cGMP 産生活性および NEP の関与について hANP と比較検証した。

## 【方法】

### 被験物質

TDT は Scrum, Inc.にて合成し、高速液体クロマトグラフ解析により 95%以上の純度であることを確認したものを使用した。TDT のアミノ酸配列<sup>11</sup>を以下に示す。

[SDSKIGNGCFGHKIDRINHVSNLGCNRIMQNPPKKFSGE, disulfide bond between C9-C25]

hANP は第一三共株式会社で生成されたものを用いた。

### Human GC-A に対するアゴニスト作用の評価

Human GC-A (hGC-A)のオープンリーディングフレームを組み込んだ pCMV6-Entry ベクターを OriGene Technologies, Inc.より購入した (Cat. No. RC209267)。このプラスミド DNA を、Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific)を用いて Chinese hamster ovary (CHO)-K1 細胞にトランスフェクトし、G418 (Thermo Fisher Scientific)を用いた限界希釈法により単一クローン群を得た。hANP に対する cGMP 産生活性測定により、最も鋭敏に反応するクローンを選抜し、アッセイに用いた。

hGC-A 発現 CHO 細胞、もしくは遺伝子導入していない親株 CHO 細胞を  $4 \times 10^3$  cells/well の濃度で播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$  条件下、オーバーナイトでインキュベートした。培養液を除去後、ホスホジエステラーゼ阻害剤として 1.6 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (Merck Millipore) を含むバッファー中で室温にて 10 分間静置し、予め  $10 \mu\text{g/ml}$  の NEP (R&D Systems)もしくはバッファーと共に  $37^\circ\text{C}$  30 分間処理した hANP もしくは TDT を添加して  $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$  条件下で 15 分間インキュベートした。細胞を Lysis buffer により溶解し、cGMP assay kit (Cisbio) を用いて溶液中 cGMP 濃度を算出した。

### ラット in vivo における血漿中 cGMP 濃度上昇活性の評価

7 週齢の雄性 SD ラットを日本エスエルシー株式会社から購入して使用した。動物は、設定温度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$ 、12 時間明暗サイクルの環境下で、標準食 (FR-2、株式会社フナバ

シファーム)及び水道水を自由に摂取させた。全ての実験操作は、第一三共株式会社動物実験委員会のガイドラインに従って適切に実施した。

8週齢となった雄性SDラットを2%のイソフルランで吸入麻酔した。NEPを十分に阻害するため、Hashimotoらの報告<sup>12</sup>に従って、生理食塩水もしくはNEP inhibitorである phosphoramidon (Santa Cruz Biotechnology)を825 nmol/kg/minで2分間持続静注後、165 nmol/kg/minの投与速度に切り替え、最終採血終了時まで維持した。投与速度切り替え直後に、hANPもしくはTDTを100 nmol/kgの用量で頸静脈より急速静脈内投与し、経時的に頸静脈より採血し、EDTA血漿を得た。血漿中cGMP濃度はAmersham cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System (GE Healthcare)を用いて測定した。

#### 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。多重比較にはTukey's testを使用し、有意水準は0.05未満とした。解析にはSAS System Release 9.2 (SAS Institute)を使用した。



## 【結果】

### TDT は human GC-A に対するフルアゴニスト作用および NEP 耐性を有する

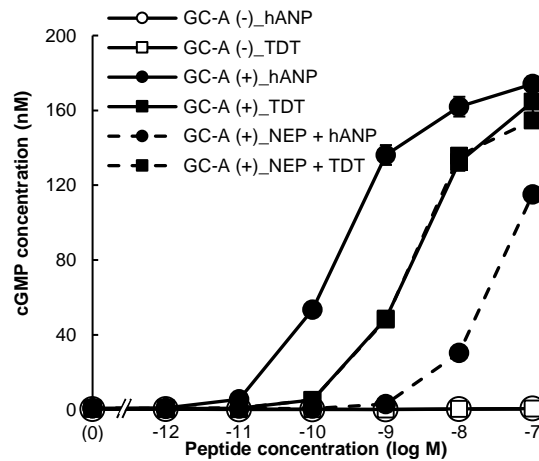
結果を Figure 1 に示した。TDT は hANP と同様、hGC-A を未導入の CHO 細胞においては cGMP 産生活性を示さなかったが、hGC-A 発現 CHO 細胞においては濃度依存的に cGMP を産生させた。TDT の最大反応強度は hANP と同様であり、EC<sub>50</sub> 値は hANP と比べて高値を示した (TDT, 195 pM; hANP, 19 pM)。

hANP は NEP 処置により用量反応カーブが大きく右にシフトしたことから大幅な活性低下が示唆された。一方、TDT の cGMP 産生活性は NEP の影響を受けなかった。

### TDT は NEP 耐性獲得により長期作用型となった GC-A 活性化剤である

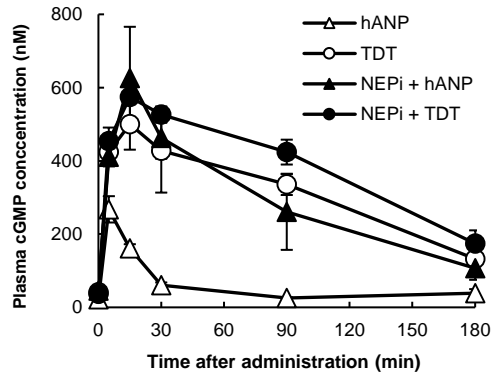
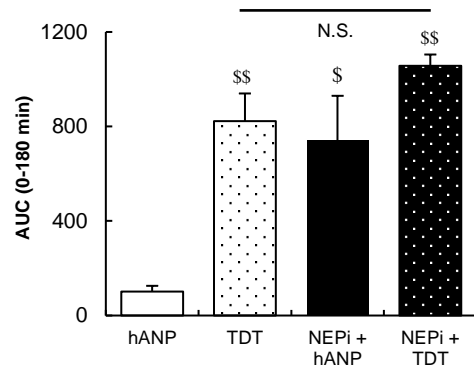
hANP は血漿中 cGMP 濃度を上昇させ、投与 5 分後の  $268 \pm 36$  nM をピークに 30-90 分の間に投与前のレベルまで低下した。一方、TDT による cGMP 濃度上昇のピークは投与 15 分後に示し、 $424 \pm 11$  nM と hANP よりも高く、180 分後にかけて徐々に低下した (Figure 2A)。

NEP inhibitor 投与下において、hANP による血漿中 cGMP 濃度上昇活性は AUC として有意に上昇し、TDT とほぼ同等の cGMP 濃度推移を示した (Figure 2A and 2B)。一方、TDT は NEP inhibitor の影響を受けなかった。



**Fig. 1. TDT induces cGMP production via GC-A in an NEP-resistant manner.**

CHO cells stably expressing human GC-A were incubated with the indicated concentrations of peptides for 15 min after pre-incubation with or without NEP for 30 min. cGMP concentrations were measured with an HTRF-based assay. Representative data are shown from three independent experiments that were performed in quadruplicate. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. Error bars not shown are smaller than symbols.

**A****B**

**Fig. 2. TDT administration enhances plasma cGMP concentration independently of NEP activity in rats.**

(A) After bolus injection of TDT or hANP at 100 nmol/kg in the presence or absence of phosphoramidon, an NEP inhibitor (NEPi), plasma concentrations of cGMP were measured. (B) The change in AUC of plasma cGMP concentration from baseline is shown. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M (n = 3, each).  $^{\$} P < 0.05$ ,  $^{\$\$} P < 0.01$  vs. hANP-treated group.

## 【考察】

本検討では、まず TDT は GC-A を介して濃度依存的に cGMP を産生することを示した。その活性は EC<sub>50</sub> においては hANP に比してやや弱かったものの、E<sub>max</sub> は同等であり、GC-A に対するフルアゴニストであることが明らかとなった。さらに、TDT は NEP 存在下でも GC-A アゴニスト活性が減弱しなかったことから、NEP に対し耐性を獲得した GC-A アゴニストであることが示された。

次に、in vivo での検討により、同用量の投与において TDT は hANP と比べ血漿中 cGMP 上昇活性が高く、より持続的であることを示した。in vitro において、同一濃度における GC-A 活性化能は hANP よりも TDT が弱かったが、in vivo において同用量の投与では TDT の方が強い活性を示した。これは、TDT 投与により hANP との活性差を補うほどに血中濃度が上昇し、さらに消失が遅延していることに因ると推察できる。ANP の血中からの消失は NEP による分解が主要な機構と考えられている<sup>8</sup>が、IDE (insulin degrading enzyme)<sup>13</sup> など他のペプチダーゼや NPR-C (natriuretic peptide receptor-C) を介した細胞内インターナライゼーションによる分解経路<sup>12</sup>、および腎排泄経路などが血中からの消失機構として報告されている。本検討において、NEP inhibitor の存在下でも TDT の血漿中 cGMP 上昇活性は変化せず、またその上昇曲線は NEP inhibitor 存在下における hANP のそれと同様であったことから、TDT による cGMP 上昇活性増幅効果は NEP 耐性獲得に起因すると考えられる。今後、心不全治療薬として NEP inhibitor を含有する Entresto の普及が予想されるが、NEP inhibitor による内因性の NP の上昇および cGMP の上昇は限定的であるため、NP を外因性に補充することでさらなる薬効増強が期待できる。NEP 耐性を有する Long-acting GC-A activator は Entresto との薬物相互作用の懸念が少なく、併用の可能性を高めるだろう。

これまでに、半減期を延長する目的で作製された NP 誘導体がいくつか報告されている。嵩高い polyethyleneglycol<sup>14</sup> や Fc<sup>15</sup> を hANP に conjugate した試みにおいては、in vitro 活性は EC<sub>50</sub> ベースで数十 nM と、hANP と比べ大きく低下している。一方、TDT は EC<sub>50</sub> ベースで 195 pM という強活性を保持しており、半減期延長効果と活性のバランスが良好である。ま

た、TDT はアミノ酸のみで構成されているため、細胞もしくは大腸菌等を用いた発現-精製による簡素な方法による大量調整が可能であると考えられる。合成によるペプチド修飾を必要とする NP 誘導体と比べると、コスト/ベネフィットの点でも優れているであろう。

以上より、TDT は薬理プロファイルにおいては臨床应用到に適した有望な Long-acting GC-A activator であると考えられた。

## 第2章 食塩感受性 Dahl ラットにおける Long-acting GC-A activator TDT の心・腎保護効果の検討

### 【目的】

第1章において、TDT は native NP と比べ長時間に亘り作用を発揮する Long-acting GC-A activator であることが明らかとなった。これまでに、GC-A activator の慢性投与による薬効は報告されていない。そこで、病態モデル動物を用いて、Long-acting GC-A activator として TDT を慢性投与した際の薬効について検証することとした。

序論で述べたように、NP は多岐に亘る薬理作用を発揮するが総じて循環器系の保護に働くものであり、Long-acting GC-A activator の慢性投与により強力な心・腎保護効果が得られると期待できる。そこで、進行性の心・腎障害モデルとして汎用されている Dahl 食塩感受性高血圧ラット (以下 DS ラット) を本検討に用いた。DS ラットは高食塩負荷により高血圧を発症し、続いて徐々に心・腎障害が惹起される。この病態進行過程はヒト心不全・腎不全病態における心・腎連関を模倣していると考えられ、DS ラットに対する薬効はヒトにおける心および腎保護効果を予測するのに適していると考えられる。本モデルにおいて、Long-acting GC-A activator が提供できるベネフィットを明確にする目的で、hANP と TDT の薬効比較を行った。

また、本試験はトランスレーショナルリサーチの位置付けで行った。即ち、ヒトでの現実的な用法・用量を反映させるため、以下に示す2点に留意して試験をデザインした。

#### ① 病態発症・診断後の治療的投与

正常状態から将来の心不全・腎不全病態の発症を予測して予防的に薬剤投与を開始することは困難であるため、病態発症後に治療的投与による病態の進行抑制が Long-acting GC-A activator の Target product profile として適している。よって、本試験においては血圧上昇・心肥大・腎機能悪化を呈した状態から投与を開始した。

② 血圧低下作用が緩徐な用量での投与

大動脈圧は心臓に対しては後負荷として働くため、適度な降圧は後負荷軽減により心機能の改善が期待できる。しかし、過度な降圧は灌流圧の低下により逆に心機能を悪化させる可能性があり、実臨床においては好ましくない。よって、本試験においても過度な降圧を惹起しない用量を設定した。

また、薬効を裏付ける分子メカニズムを解明するため、薬効から得られた知見をベースに Long-acting GC-A activator の標的細胞の探索を行った。

## 【方法】

### 被験物質

hANP および TDT の入手は第 1 章に記載の方法に準じた。5% ブドウ糖液 (大塚製薬工場) に溶解し、1 mL/kg の用量で投与した。

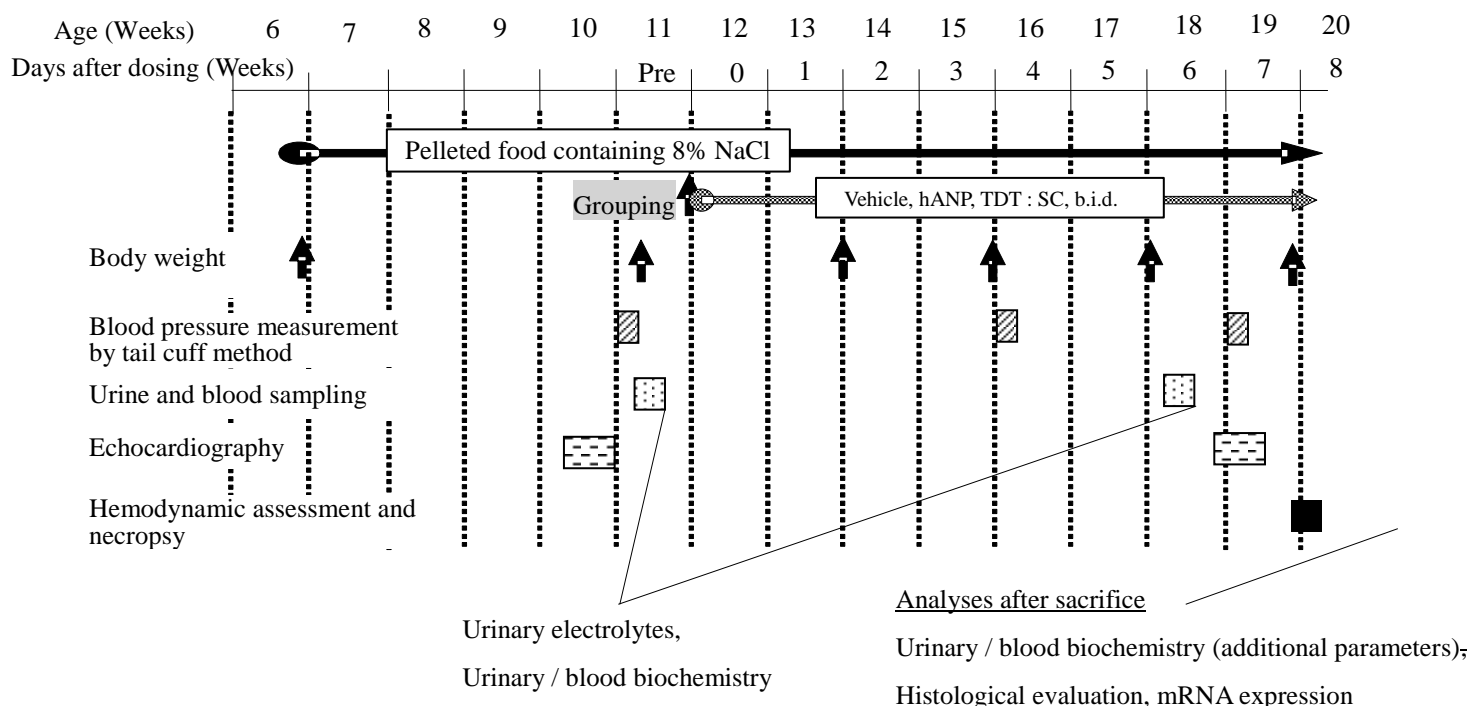
### 供試動物

6 週齢の雄性 Dahl 食塩感受性高血圧ラット (DIS/Eis [Dahl-Iwai S]) を、日本エスエルシー株式会社より購入して使用した。動物は、設定温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$ 、12 時間明暗サイクルの環境下で、標準食 (FR-2、フナバシファーム) もしくは 8% 食塩含有食 (8%FR-2、フナバシファーム) 及び水道水を自由に摂取させた。全ての実験操作は、第一三共株式会社動物実験委員会のガイドラインに従って適切に実施した。



## 実験プロトコール

プロトコールの概要図を以下に示す。



雄性 DS ラットに、7 週齢より 8%食塩含有食を摂取させた。12 週齢時に心エコーパラメーター、尿中タンパク量、および体重のデータを基に群分けし、次ページに示す群構成で投与を開始した。被験物質は 1 日 2 回、8 週間皮下投与した。

Group information in the chronic study

Group		Food	Dose	Number of Animals
1	Control	Normal	0 (treated Vehicle)	6
2	Vehicle	8% NaCl	0 (treated Vehicle)	14
3	hANP	8% NaCl	40 nmol/kg, SC, b.i.d.	14
4	TDT Low (TDT_L)	8% NaCl	8 nmol/kg, SC, b.i.d.	13
5	TDT High (TDT_H)	8% NaCl	40 nmol/kg, SC, b.i.d.	13

#### 収縮期血圧および心拍数の測定

11、16 及び 19 週齢時に、非観血式自動血圧装置 (BP-98A、ソフトロン)を用いて、tail cuff 法にて収縮期血圧および心拍数を測定した。個体毎に 4-5 回測定し、最大値および最小値を除く 2-3 回の測定の平均値を算出した。

#### 尿中および血中パラメータの測定

11 及び 18 週齢時に、ラットをメタボリックケージに収容し、24 時間蓄尿を実施した。尿量を測定し、遠心後 (1,820×g, 15 min) 上清を回収した。メタボリックケージからラットを回収し、静脈血を採血し、EDTA 血漿とした。多機能小型自動分析装置 (BiOLiS 24i premium、東京貿易メディシス)を用いて尿中タンパクおよびクレアチニン濃度、血中クレアチニン濃度を測定した。尿中電解質濃度は STAX-2 (テクノメディカ)を用いて測定した。尿中 podocalyxin (Exocell)および KIM-1 (R&D systems)は市販の ELISA キットを用いて測定した。

### 心エコー検査

10 及び 19 週齢時に、Vevo<sup>®</sup> 2100 (FUJIFILM VisualSonics)を用いてイソフルラン吸入麻酔下 (1.5-3%)で測定した。被験物質の投与は測定 12 時間前より測定終了までの間は中断した。心拍数を麻酔濃度により調整し、個体間のバラつきを抑えた上で M-mode より各種パラメータを得た。Diastolic wall strain (DWS)は竹田らの報告<sup>16</sup>に従って、下記の式より算出した。

$$DWS = 1 - LV \text{ posterior wall thickness in systole (LVPWs)} / LV \text{ posterior wall thickness in diastole (LVPWd)}$$

### 循環動態測定

20 週齢時、解剖の直前に実施した。イソフルラン吸入麻酔下 (2%) で右頸動脈より圧トランスデューサーに接続した 1.4Fr カテーテル (Millar Instruments)を挿入し大動脈圧を測定した後、左心室内まで挿入し各種パラメータを得た。測定・解析は PowerLab / LabChart システム (ADInstruments) 上で行った。左室圧下降脚の時定数 (tau) は Glantz 法<sup>17</sup>で算出した。

## Quantitative PCR

解剖後速やかに摘出、凍結した腎臓サンプル中の mRNA レベルでの遺伝子発現量を、TaqMan Gene Expression Assays および TaqMan universal PCR master mix (Thermo Fisher Scientific)を用いた定量 PCR 法によって測定した。使用した TaqMan Gene Expression Assays の一覧を以下の表に示す。PCR 反応は 7900 HT Fast Real Time PCR system (Thermo Fisher Scientific)を用いて実施した。GAPDH を内部標準として、各遺伝子について GAPDH に対する相対的 mRNA 発現量として算出した。

Parameters	Gene name	Gene symbol	Assay ID
Internal control	GAPDH	<i>Gapdh</i>	Rn99999916_s1
Fibrotic marker	Collagen 1a1	<i>Colla1</i>	Rn01463848_m1
Inflammatory marker	IL-1 $\beta$	<i>Il1b</i>	Rn00580432_m1
Apoptosis marker	Bcl2	<i>Bcl2</i>	Rn99999125_m1
Tubular injury markers	KIM-1	<i>Haver1</i>	Rn00597703_m1
	NGAL	<i>Lcn2</i>	Rn00590612_m1
Podocyte injury markers	Nephrin	<i>Nphs1</i>	Rn00674268_m1
	Podocin	<i>Nphs2</i>	Rn00709834_m1

## 病理組織評価

摘出した心臓の一部を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋して、薄切標本スライドを作製した。標本についてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、ランダムに選択した乳頭筋付近の視野における 100 個の心筋細胞面積の平均値を、盲検下で画像解析システム (AnalySIS; Soft Imaging System) を用いて算出した。

## 免疫組織化学染色

摘出した心臓の一部を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋して、薄切標本スライドを作製した。得られた切片について、Envision+ Kit (Agilent) を用いて添付のプロトコールに従って免疫組織化学染色を施した。1 次抗体として、同様の実験で既に検証されているマウス抗ラット Desmin 抗体<sup>18</sup> (400 倍希釈、D33; Abcam) を使用した。1 つの腎臓に対し 20 個の糸球体をランダムに選抜し、Desmin の糸球体中発現量を下記の判断基準でスコア化し平均値を算出することで半定量的に求めた。評価は 2 人の研究者が盲検下で行った。

スコア	判断基準
0	陽性領域が 1% 未満
1	1-20% の領域で弱い強度の染色所見
2	‘1-20% の領域で強い強度の染色所見 もしくは 21-40% の領域で弱い強度の染色所見
3	‘21-40% の領域で強い強度の染色所見 もしくは 41-60% の領域で弱い強度の染色所見
4	‘41-60% の領域で強い強度の染色所見 もしくは 81-100% の領域で弱い強度の染色所見
5	‘61-100% の領域で強い強度の染色所見

## 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。累積生存率の算出には Kaplan-Meier 法を、検定には log-rank 法を用いた。その他の試験においては、二群間の比較には Student's *t*-test もしくは Aspin-Welch's *t*-test を、多重比較には Dunnett's test を使用し、有意水準は 0.05 未満とした。解析には SAS System Release 9.2 (SAS Institute) を使用した。

## 【結果】

### TDT は食塩負荷により惹起される基本パラメータの悪化を改善する

通常食を与えた Control 群においては実験期間中の生存率は 100%であったのに対し、8%食塩食を負荷した Vehicle 群においては投与開始 8 週後の生存率は 57.1% (8/14)と有意に低下した。TDT 投与により用量依存的に生存率を改善し、TDT\_L 群では 92.3% (12/13)、TDT\_H 群では全例生存した (Fig. 3A)。この結果と一致して、Vehicle 群では投与開始 2 週後以降の経時的体重増加が抑制されたが、TDT により改善し、投与後 6 週時では TDT\_L、H 群共にその差は有意であった (Fig. 3B)。収縮期血圧は、8%食塩負荷群において薬剤投与開始時には既に有意に上昇していたが、Vehicle 投与群ではその後も上昇した。hANP、TDT\_L 群では血圧上昇を抑制しなかったが、TDT\_H 群では投与 4 週目においては有意に抑制した (Fig. 3C)。一方、8%食塩食による心拍数の経時的上昇は TDT により用量依存的に有意に抑制した (Fig. 3D)。

### TDT は心肥大を抑制する

薬剤投与開始 8 週後、解剖時の左心室重量 (LVW)を体重 (BW)で補正した LVW / BW を Fig. 4A に示す。8%食塩食負荷により顕著に増大したが、TDT は用量依存的に有意に抑制した。次に、左心室組織切片の HE 染色により心筋細胞サイズを定量したところ、hANP および TDT\_L、H の全ての群において心筋細胞面積の増大を有意に抑制していた (Fig. 3B and 3C)。

### TDT は血圧非依存的に心機能を改善する

薬剤投与開始前の心エコー評価において、Control 群と比較して 8%食塩食負荷群では拡張期の左室壁厚、すなわち心室中隔厚 (IVSd)および左室後壁厚 (LVPWd)が有意に肥厚し、壁厚により算出される心筋スティフネスの指標である DWS は低下、すなわちスティフネスは増大していた。一方、拡張期左室内径 (LVDd)、および左室内径短縮率 (FS)を含む収縮能パラメータに差は見られなかった (Data not shown)。すなわち、心肥大所見が見られるが収縮能低

下には至っていないフェーズから治療的投与を開始した。薬剤投与開始7週後の心エコーパラメータを Table 1 に示した。8%食塩食により壁厚はさらに肥厚し、DWS は低下し、左室内径は変化しなかったものの収縮パラメータは低下した。TDT は用量依存的にこれらを改善し、DWS および収縮パラメータに関しては低用量から有意に改善した。

より詳細に心機能を評価する目的で、投与8週後に左室内圧を測定し収縮・弛緩パラメータを得た (Table 2)。心エコーの結果と一貫して、TDT は用量依存的に収縮パラメータ ( $dP/dt_{max}/P$ ) および弛緩パラメータ ( $dP/dt_{min}/P$  および  $\tau$ ) を改善し、 $dP/dt_{max}/P$  と  $dP/dt_{min}/P$  に関しては低用量から有意に改善した。また、Fig. 3A に示した結果と一貫して、hANP および TDT\_L 群の血圧は Vehicle 群と差は見られなかった。

### **TDT はナトリウム排泄非依存的に腎機能を改善する**

薬剤投与開始前に、8%食塩食負荷群において尿中タンパク量は増加していた (Data not shown)。薬剤投与開始6週後の腎機能パラメータを Table 3 に示す。尿量 (UV) および飲水量は8%食塩負荷により顕著に増加したが、hANP および TDT 投与により変化は見られなかった。ナトリウムの摂取量を尿中に排泄されたナトリウム量で除したナトリウム尿中排泄率は、Control 群に比べ8%食塩食負荷群において低下していたが、hANP および TDT 投与により変動しなかった。一方、クレアチニンクリアランス (CCr) は hANP および TDT 投与群において上昇しており、糸球体濾過量の増加が示唆された。尿中タンパク量は Vehicle 群で増加したが、TDT\_H 群はそれを有意に抑制した。

### **TDT は炎症・線維化・アポトーシスを抑制する**

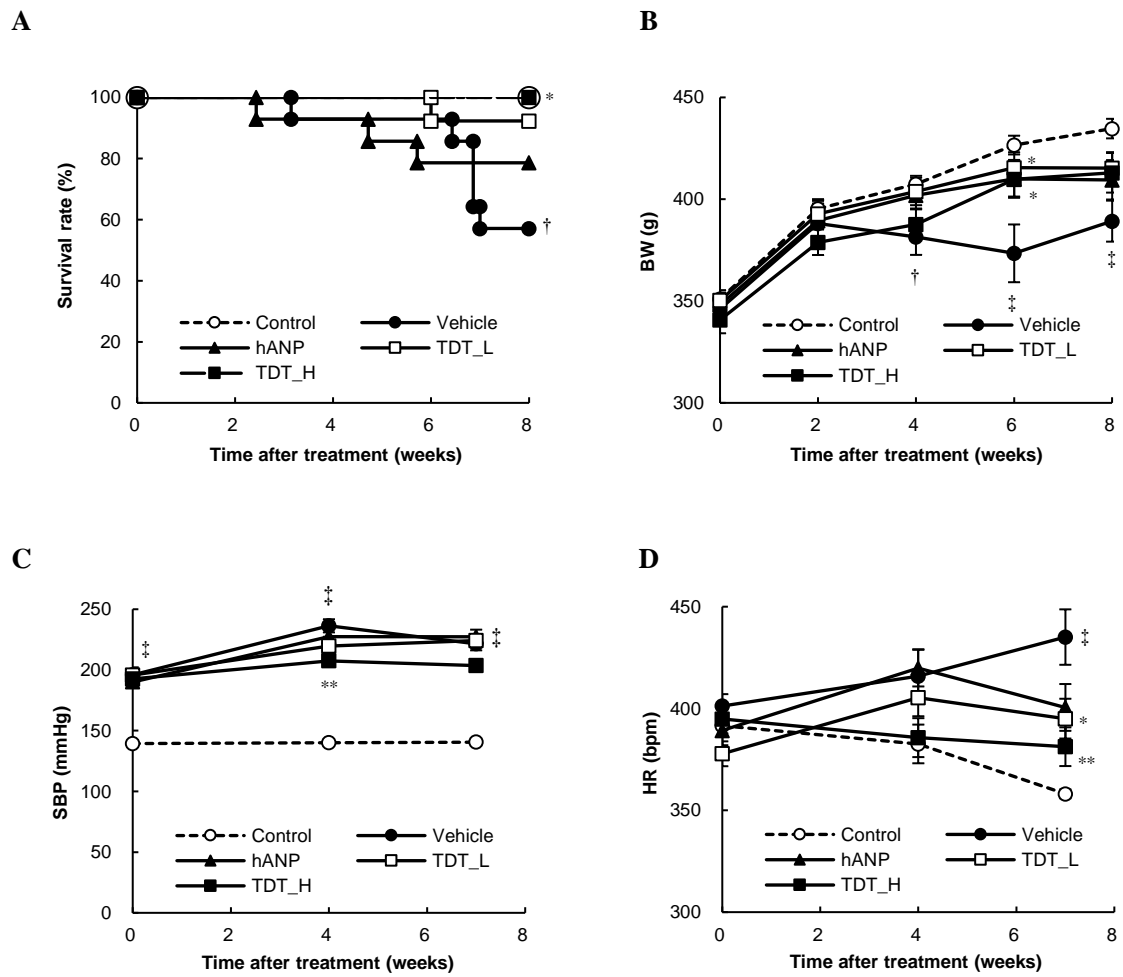
炎症、線維化・アポトーシスは腎障害に伴って惹起され、さらなる障害の原因にもなり得る。そこで GC-A 活性化による腎保護効果を裏付けるため、薬剤投与8週後の腎臓について、これらに関連する遺伝子の mRNA 発現量を定量した (Fig. 5)。炎症マーカー IL-1 $\beta$ 、線維化マーカー Collagen 1a1 の発現量は Control 群に比べ Vehicle 群で上昇し、hANP および TDT

投与により有意に抑制された。抗アポトーシスタンパクである Bcl-2 の発現量は Vehicle 群で減少したが、hANP 投与により Vehicle 群と比較して軽度に増加し、TDT 投与によりさらに強力かつ用量依存的に増加した。

### **TDT は尿細管障害および podocyte 障害を抑制する**

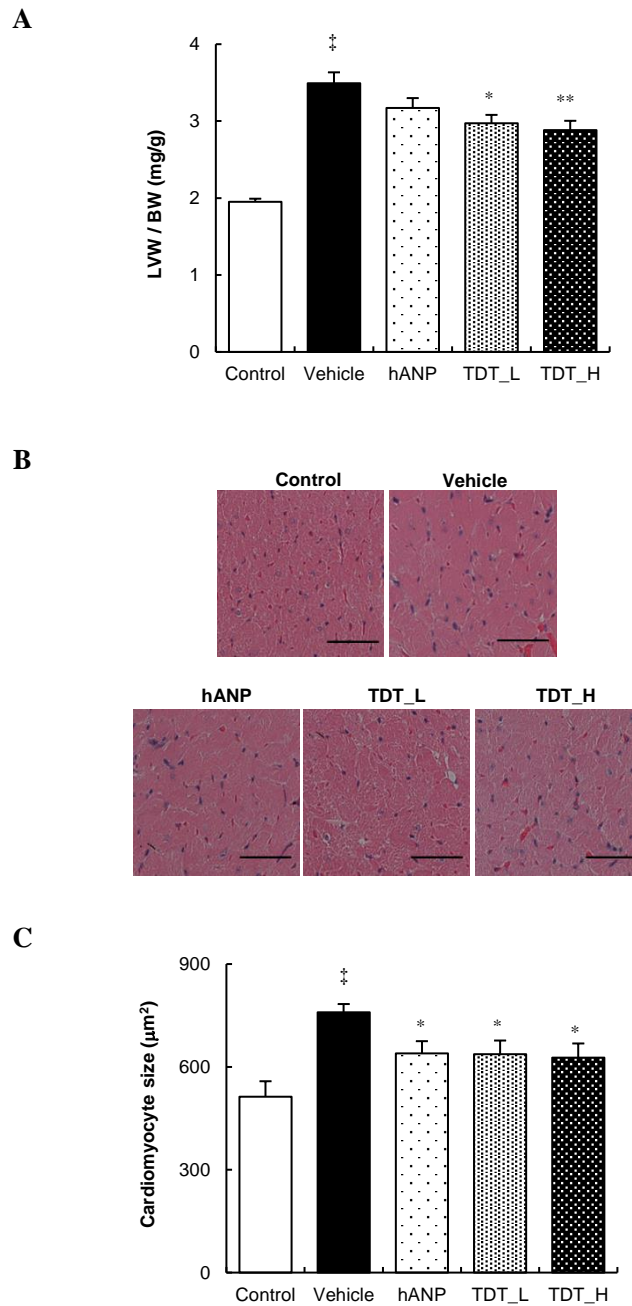
尿タンパク量の増加は糸球体での濾過機能の低下もしくは尿細管での再吸収能の低下が原因と考えられる。腎細胞 TDT の腎保護効果の標的細胞を明らかにする目的で、糸球体において最終濾過障壁を形成する podocyte と尿細管細胞それぞれについて障害を評価した。尿細管障害により尿細管上皮細胞より発現誘導される KIM-1 の尿中排泄量は Control 群に比べ Vehicle 群で大きく増加したが、TDT は用量依存的に有意差をもって改善した (Fig. 6A)。この結果に一致して、同じく尿細管障害マーカーである NGAL の腎臓中 mRNA 発現量の増加を TDT は抑制した (Fig. 6B)。podocyte に局在する Podocalyxin の尿中排泄量は Control 群に比べ Vehicle 群で大きく増加したが、TDT は用量依存的に有意差をもって改善した (Fig. 6C)。同様に、podocyte のスリット膜の構成成分である Nephritin の mRNA 発現量は TDT 投与群で有意に高かった (Fig. 6D)。hANP はこれら podocyte 障害マーカーを改善しておらず、Nephritin 発現量について TDT\_L 群は hANP 群に比べ有意に高値を示した。この所見を裏付けるため、別の podocyte 障害マーカーである Desmin について、糸球体中タンパク発現強度を評価した (Fig. 6E)。TDT は Desmin 発現上昇を有意に抑制し、TDT\_L 群は hANP 群に比べ有意に低値を示した (Fig. 6F)。





**Fig. 3. Effects of chronic TDT therapy on survival, body weight, systolic blood pressure, and heart rate in DS rats.**

DS rats were fed a high-salt diet (8% NaCl) from 7 weeks of age. hANP or TDT was twice-daily subcutaneously dosed from 12 weeks of age for 8 weeks. Control: normal diet (0.3% NaCl)-fed group (n = 6). Vehicle: vehicle-treated group (n = 14). hANP: hANP (40 nmol/kg)-treated group (n = 14). TDT\_L: TDT (8 nmol/kg)-treated group (n = 13). TDT\_H: TDT (40 nmol/kg)-treated group (n = 13). (A) Survival rate. (B) Body weight. (C) SBP. (D) HR. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. Error bars not shown are smaller than symbols. <sup>†</sup>  $P < 0.05$ , <sup>‡</sup>  $P < 0.01$  vs. Control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. Vehicle.



**Fig. 4. Chronic TDT therapy inhibited cardiac hypertrophy in DS rats.**

Rats were fed a high-salt diet, concomitant with treatment of hANP or TDT. (A) The left ventricular weight (LVW)/body weight (BW) ratio was measured ( $n = 6$  for Control,  $n = 13-14$  for the other groups). (B) Representative images of hematoxylin-eosin-stained sections of the left ventricle are shown (scale bar =  $50 \mu\text{m}$ ). (C) Cross-sectional areas of cardiomyocytes were measured ( $n = 4$  for Control,  $n = 8$  for the other groups). Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M.  $\ddagger P < 0.01$  vs. Control,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$  vs. Vehicle.

**Table 1. TDT preserved cardiac systolic and diastolic function in DS rats.**

	Control	Vehicle	hANP	TDT_L	TDT_H
LVDd (mm)	7.50 ± 0.24	7.73 ± 0.31	7.88 ± 0.16	7.69 ± 0.21	7.84 ± 0.20
IVSd (mm)	2.16 ± 0.13	2.84 ± 0.08 ‡	2.59 ± 0.08 *	2.61 ± 0.08	2.35 ± 0.10 **
LVPWd (mm)	2.07 ± 0.09	2.62 ± 0.10 ‡	2.45 ± 0.05	2.55 ± 0.07	2.32 ± 0.05 *
FS (%)	41.0 ± 1.2	29.2 ± 3.3 †	34.9 ± 2.0	40.4 ± 2.5 **	44.8 ± 1.7 **
EF (%)	70.1 ± 1.5	53.0 ± 4.6 †	61.9 ± 2.9	68.6 ± 3.0 **	74.0 ± 1.9 **
SV (μl)	210 ± 14	161 ± 6 ‡	204 ± 8 **	214 ± 10 **	244 ± 13 **
CO (ml/min)	84.9 ± 5.3	62.4 ± 3.0 ‡	78.7 ± 3.1 **	81.6 ± 4.2 **	93.2 ± 4.9 **
DWS	0.328 ± 0.032	0.191 ± 0.021 ‡	0.262 ± 0.018	0.272 ± 0.017 **	0.348 ± 0.011 **

Cardiac systolic/diastolic functional parameters were measured by echocardiography at 19 weeks of age (n = 6 for Control, n = 11 for Vehicle and hANP, n = 12 for TDT\_L, and n = 13 for TDT\_H). Data are presented as the mean ± S.E.M. †  $P < 0.05$ , ‡  $P < 0.01$  vs. Control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. Vehicle-treated group.

LVDd, left ventricular diameter in diastole; IVSd, intraventricular septum in diastole; LVPWd, left ventricular posterior wall in diastole; FS, fractional shortening; EF, ejection fraction; SV, stroke volume; CO, cardiac output; DWS, diastolic wall strain.

**Table 2. TDT improved hemodynamics in DS rats.**

	Control	Vehicle	hANP	TDT_L	TDT_H
SBP (mmHg)	138 ± 4	236 ± 3 ‡	226 ± 5	227 ± 7	206 ± 6 **
DBP (mmHg)	97 ± 4	172 ± 2 ‡	164 ± 4	165 ± 5	149 ± 5 **
dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/sec)	8099 ± 402	10519 ± 767	9987 ± 451	12195 ± 714	11144 ± 625
dP/dt <sub>max</sub> /P (/sec)	98.7 ± 3.0	78.2 ± 5.2 †	82.5 ± 2.5	92.9 ± 4.1 *	93.9 ± 1.9 *
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/sec)	-9706 ± 652	-9073 ± 582	-8971 ± 702	-10917 ± 511 *	-11594 ± 346 **
dP/dt <sub>min</sub> /P (/sec)	-101.1 ± 4.4	-51.7 ± 4.1 ‡	-59.6 ± 4.2	-68.5 ± 5.4 *	-76.9 ± 3.6 **
LVEDP (mmHg)	9.5 ± 1.1	13.1 ± 2.6	11.3 ± 1.5	10.0 ± 1.6	9.3 ± 1.5
Tau (msec)	12.0 ± 0.6	24.8 ± 3.8 †	20.2 ± 1.4	18.5 ± 1.4	16.3 ± 0.9 *

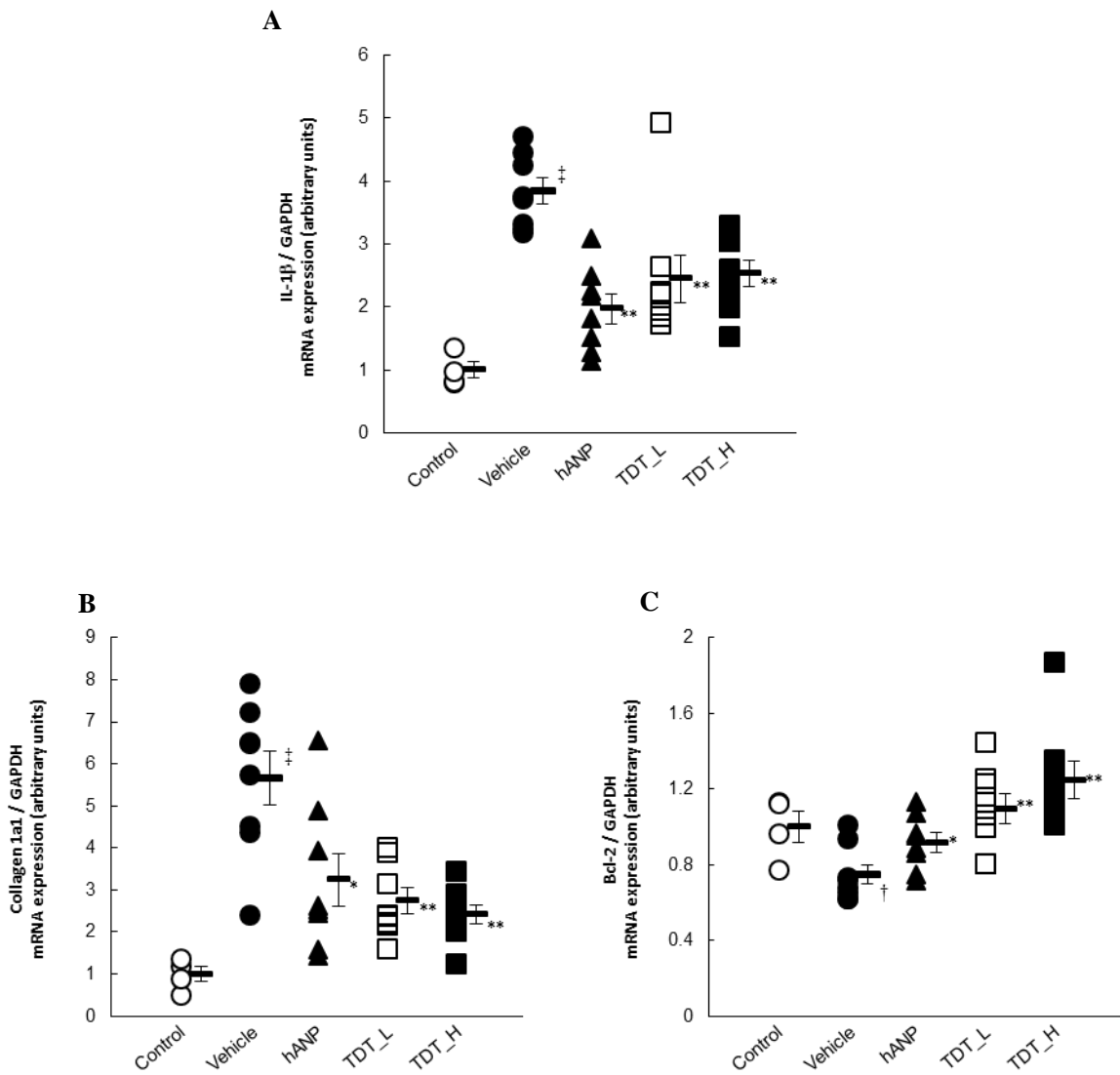
Hemodynamic parameters were measured by catheter with a pressure transducer at 20 weeks of age (n = 5 for Control, n = 7 for Vehicle, n = 6 for hANP, n = 9 for TDT\_L, n = 9 for TDT\_H). Data are presented as the mean ± S.E.M. †  $P < 0.05$ , ‡  $P < 0.01$  vs. Control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. Vehicle-treated group. SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; LVEDP, left ventricular end diastolic pressure.

**Table 3. TDT improved renal function in DS rats.**

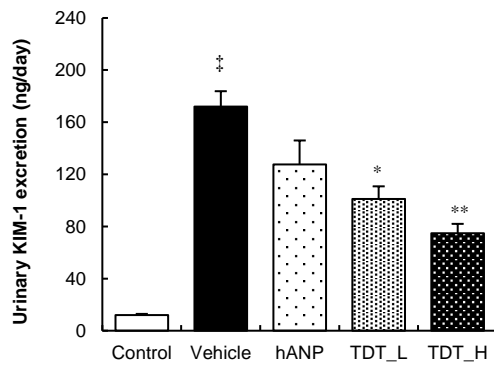
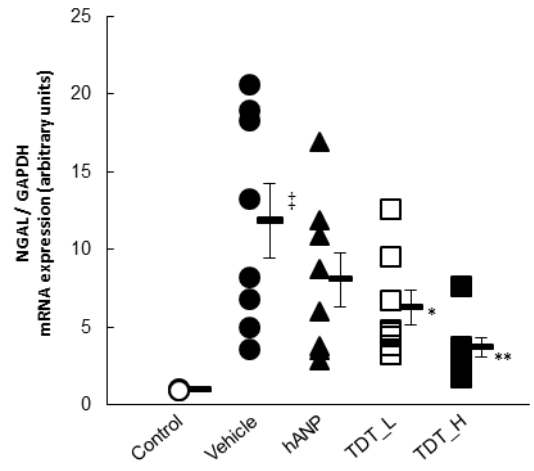
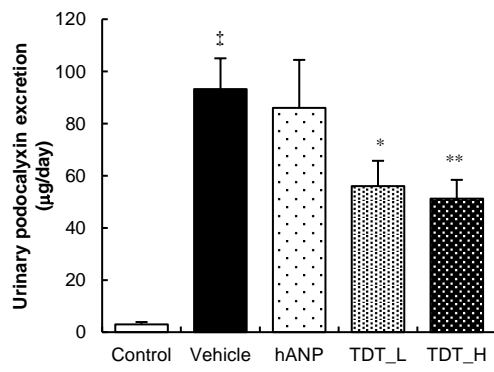
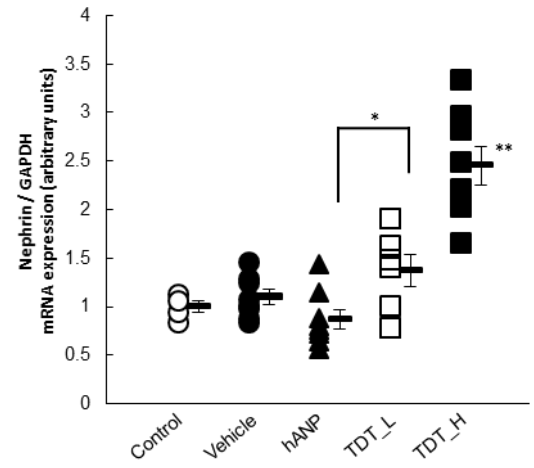
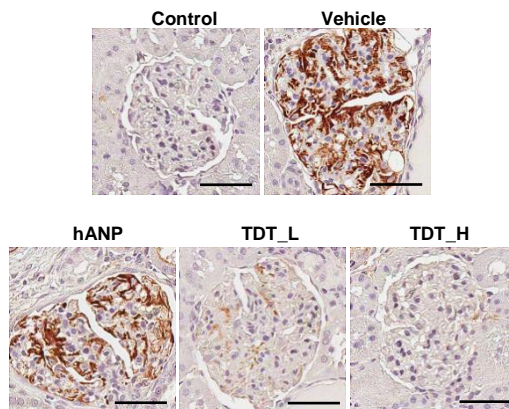
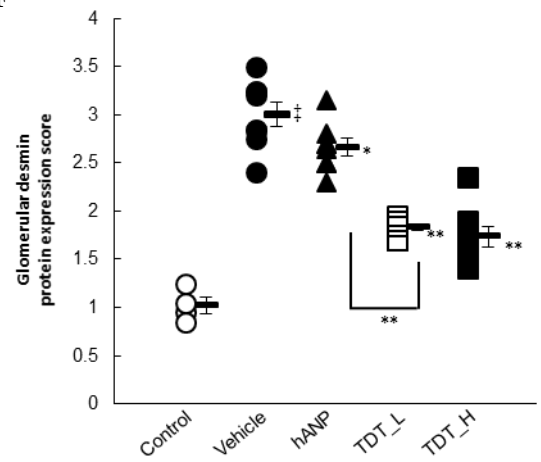
	Control (n = 6)	Vehicle (n = 10)	hANP (n = 11)	TDT_L (n = 12)	TDT_H (n = 13)
UV (mL/day)	13.1 ± 3.0	95.9 ± 9.2 ‡	88.5 ± 8.6	76.5 ± 5.4	78.5 ± 5.7
Water intake (g/day)	35 ± 3	110 ± 9 ‡	105 ± 8	94 ± 6	96 ± 6
Na <sup>+</sup> excretion / intake (g/g)	0.58 ± 0.09	0.31 ± 0.01 †	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01
CCr (mL/min)	2.0 ± 0.4	2.4 ± 0.3	3.5 ± 0.4 *	3.6 ± 0.3*	4.2 ± 0.3 **
UP / day (mg/day)	27 ± 3	308 ± 32 ‡	277 ± 45	236 ± 32	190 ± 32 *

Urine collection for 24 hours was performed at 18 weeks of age. Data are presented as the mean ± S.E.M. †  $P < 0.05$ , ‡  $P < 0.01$  vs. Control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. Vehicle-treated group.

UV, urine volume; CCr, creatinine clearance; UP, urinary protein.



**Fig. 5. TDT and hANP modulated mRNA expression of IL-1 $\beta$ , collagen 1a1, and bcl-2 in kidney.** mRNA expression of IL-1 $\beta$ , collagen 1a1, and bcl-2 was determined by real-time quantitative PCR in DS rat kidneys at 20 weeks of age and normalized to that of GAPDH mRNA level (n = 4 for Control, n = 8 for the other groups). Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. † P < 0.05, ‡ P < 0.01 vs. Control, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. Vehicle.

**A****B****C****D****E****F**

**Fig. 6. TDT, but not hANP, protected tubules and podocytes from high salt-induced injury in DS rats.**

(A-B) Tubular injury markers and (C-F) podocyte injury markers were investigated. (A) Urinary excretion of KIM-1, an injury marker of proximal tubules, and (C) that of podocalyxin, an indicator of podocyte detachment and fragmentation, were measured at 18 weeks of age (n = 5 for Control, n = 10 for Vehicle, n = 11 for hANP, n = 12 for TDT\_L, and n = 13 for TDT\_H). (B) mRNA expression of NGAL, another indicator of tubular injury, and (D) that of nephrin, a component of podocytes, were determined by real-time quantitative PCR in the DS rat kidneys at 20 weeks of age and normalized to the GAPDH mRNA level (n = 4 for Control, n = 8 for the other groups). (E-F) Glomerular protein expression of the podocyte injury marker desmin was evaluated by immunohistochemical analysis. (E) Representative images are shown (scale bar = 50  $\mu$ m). (F) Desmin protein expression was semi-quantitatively shown (n = 4 for Control, n = 8 for the other groups). Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. ‡  $P < 0.01$  vs. Control, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. Vehicle or indicated group.



## 【考察】

本章では、Dahl 食塩感受性高血圧ラット (DS ラット) に Long-acting GC-A activator として TDT を長期連投した際の心・腎障害を含む病態進行に対する薬効を評価し、これを作用時間の短い hANP と比較した。

本検討においては、臨床での使用法を模倣するため、高血圧、心肥大、タンパク尿が顕在化した後に薬剤の治療的投与を開始した。DS ラットを用いた評価においては、食塩負荷開始と同時に薬剤投与を開始する予防的投与のデザインが多く見られるが、本検討においては投与開始時点で収縮期血圧の平均は 200 mmHg 付近であり、薬効を評価するにはシビアな条件である。この条件においても、TDT は生存率を大幅に改善し、心および腎保護を示した。すなわち、Long-acting GC-A activator は病態が進行した状態からの治療的介入でも強力な臓器保護効果を発揮することを示唆している。本モデルは高血圧が原因となって臓器障害は加速する。よって、薬剤が降圧作用を有する場合、降圧に依存した臓器保護効果が確認できるはずである。例えば、カルシウム拮抗薬は DS ラットにおいて強力的に昇圧を抑制し、臓器保護効果を発揮する<sup>19</sup>。一方、本検討において、TDT の高用量連投群における定常状態の収縮期血圧は、Vehicle 群と比較すると低かったものの 200 mmHg を超えており、他の同様の実験を行っている報告<sup>20</sup>と比較しても、TDT の劇的な生存率改善や心・腎保護効果は降圧作用のみに依存しないと推察できる。これは、TDT 低用量投与群では収縮期血圧は Vehicle 群と同等であったものの、心肥大・心機能悪化の抑制とクレアチニンクリアランスの増大が確認できたことから裏付けられる。臨床での心不全・腎不全治療には、安全性の観点から、より降圧効果の少なく臓器保護効果が大きい治療薬が望ましい。Long-acting GC-A activator は降圧効果に依存しない臓器保護効果が期待できる新たな心不全・腎不全治療薬となり得ることが本研究によって初めて示唆された。

序論で述べたように、慢性的な GC-A 活性化による心保護効果については、Entresto をはじめとしてエビデンスが豊富である。一方、腎保護効果およびそのメカニズムについては、十分に解明されていない。そこで、本検討において TDT の腎保護効果について詳細に解析した。

DS ラットにおいて、高食塩食によるナトリウムの体内貯留が病態発症の起点であるためナトリウム利尿効果の有無は薬効に直結すると考えられるが、hANP および TDT は尿量とナトリウム排泄率を増加させなかった。これは、高食塩食負荷により尿量は最大限に増加しており、生理的にさらなる増加の余地が無いことが一因であると推察する。いずれにせよ、TDT のクレアチニンクリアランス増加および尿タンパク排泄抑制といった腎保護効果はナトリウム利尿以外のメカニズムを介していることが示唆され、既存の利尿薬ともメカニズムにおいて差別化される。

TDT は尿細管と podocyte の障害を軽減したが、podocyte に対する効果は低用量群においても hANP よりも強力であった。この差は降圧・ナトリウム利尿に非依存的であることから、TDT は podocyte に対し直接的に、かつ hANP と比べ長時間作用することで顕在化したものと考えられる。Staffel らは podocyte 特異的 GC-A KO マウスが腎障害に対する感受性が増大していることを報告しており<sup>21</sup>、本試験における結果と矛盾しない。Podocyte は高分子タンパク透過の最終障壁という重要な役割を果たすが、高度に分化した非増殖性の細胞であるため、如何にこの障害を軽減するかが腎保護の鍵となる。これまでに podocyte の直接的保護を目的とした治療薬は開発されておらず、Long-acting GC-A activator は新たな治療コンセプトを有する薬剤として期待できる。加えて、hANP と TDT の差が顕著ではなかったものの、GC-A の活性化により尿細管障害は抑制された。全身性 GC-A KO マウスは podocyte 特異的 GC-A KO マウスよりも腎障害を受けやすい<sup>22</sup> ことから、podocyte のみならず尿細管保護も腎保護効果に寄与すると考えられる。

以上より、Long-acting GC-A activator の慢性投与により、降圧や利尿に依存しない心・腎保護を介して病態を改善することが初めて示された。さらに、腎保護については特に podocyte 保護の寄与が示唆された。新規心不全治療薬のプロファイルとして腎保護効果を有することは大きなアドバンテージとなる。今後の臨床応用に向け、薬効薬理面だけでなく薬物動態・物性・毒性を含めた創薬研究の発展が待たれる。

### 第3章 TDT の podocyte 保護メカニズムの解明

#### 【目的】

第2章において、TDTの慢性投与により podocyte の障害は軽減され、その効果は降圧・ナトリウム利尿作用に非依存적であり hANP と比べて保護効果が大きいことを示した。これらの結果から、TDTは hANP と比べ長時間に亘り直接的に podocyte に作用することで、強力な保護効果を示したと考えられた。そこで、TDT の podocyte の直接的な作用を明確にし、そのメカニズムを探索する目的で、podocyte 恒常性維持に重要な TRPC6 (Transient receptor potential 6) に着目して検討を行った。

## 【方法】

### 免疫組織化学染色

第2章で得たDSラットの腎組織切片に対し、1次抗体にウサギ抗ラットTRPC6抗体<sup>23</sup> (100倍希釈、ACC-120; Alomone Laboratories)を用いて、第2章に記載した方法で免疫組織化学染色を施し、TRPC6の発現量をスコア化した。

### Podocyte 初代培養

第2章と同様の手順で8%食塩を負荷した18-21週齢のDSラットを用いた。糸球体の単離およびpodocyteの初代培養は汎用されるシービング法を用いた<sup>24</sup>。単離した腎臓より切り出した皮質部分を250 μmの小孔を持つスチール製のふるいに押し付け、通過したサンプルを150 μm、75 μmのふるいに順に滴下し、75 μmふるい上に残存した糸球体を5% ウシ胎児血清、0.5% insulin–transferrin–selenium-A、および100 IU/ml penicillin–streptomycin含有Dulbecco’s modified Eagle’s medium/F-12に懸濁し、collagen Iをコートしたディッシュに播種して37°C・5% CO<sub>2</sub>条件下で4日間インキュベートした。PBSにて洗浄後、トリプシンによりディッシュに接着した細胞を剥離し、40 μmナイロン製細胞濾過フィルターに通すことで糸球体および尿細管を除去した。フィルターを通過したpodocyteを3×10<sup>4</sup> cells/wellの濃度で播種collagen Iコートディッシュにて37°C・5%CO<sub>2</sub>で1日培養した。大半の細胞が樹状もしくは敷石状のpodocyteに特徴的な形態を示していることを光学顕微鏡下で確認した後に、アッセイに用いた。

### cGMP アッセイ

第1章と同様の方法で、cGMP assay kit (Cisbio)を用いてTDT添加25 min後の溶液中cGMP濃度を測定し、BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)で測定したタンパク量で除した値をcGMP産生量とした。

### 細胞内カルシウム流入測定

Podocyte を PBS で 2 度洗浄した後に、1  $\mu$ M KT5823 (PKG inhibitor, Merck Millipore) もしくは 10  $\mu$ M SKF-96365 (TRPC inhibitor, Merck Millipore) を溶解した RPMI 1640 を添加し、90 分間 インキュベートした。10  $\mu$ M Fura 2-AM (Thermo Fischer Scientific) を添加し、30 分後に 100 nM TDT および 1.5 mM CaCl<sub>2</sub> を溶解した Krebs-Ringer phosphate buffer を処置した。倒立顕微鏡のステージ上に培養プレートを置き、蛍光顕微鏡システム (IonOptix) を用いて Fura 2-AM の 340 nm および 380 nm の 2 波長励起の蛍光強度比を測定することで細胞内カルシウム動態を測定した。樹状の podocyte を選抜し、10 mM ATP (Merck Millipore) を添加することで細胞内へのカルシウム流入を惹起した。

### 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。免疫組織化学染色評価においては二群間の比較には Student's *t*-test を、多重比較には Dunnett's test を使用し、in vitro カルシウム流入アッセイでは多重比較に Tukey's test を使用した。有意水準は 0.05 未満とした。解析には SAS System Release 9.2 (SAS Institute) を使用した。

## 【結果】

### TDT は糸球体中 TRPC6 のタンパク発現量増加を抑制する

TDT および hANP を DS ラットに 8 週間投与した際の免疫組織化学染色による TRPC6 のタンパク発現量評価結果を Fig. 7 に示した。TRPC6 の発現量は Vehicle 群において有意に上昇し、TDT は用量依存的にその上昇を抑制した。また、TDT\_L 群では hANP 群に比べ有意に TRPC6 発現量は低かった。

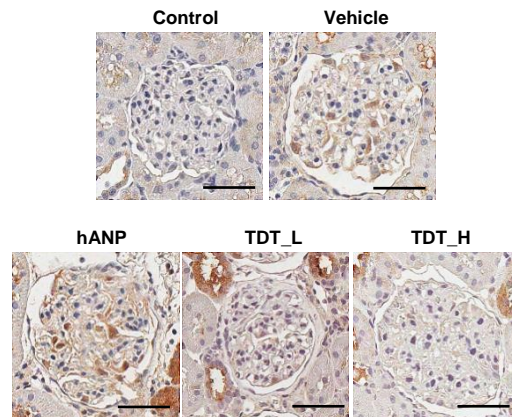
### TDT は podocyte に直接作用し、cGMP を上昇させる

TDT の podocyte に対する直接的作用を確認する目的で、DS ラットより単離・培養した podocyte において cGMP 活性化能を検討した (Fig. 8)。TDT は 10 nM の濃度付近から、濃度依存的に podocyte の cGMP 産生を促進した。

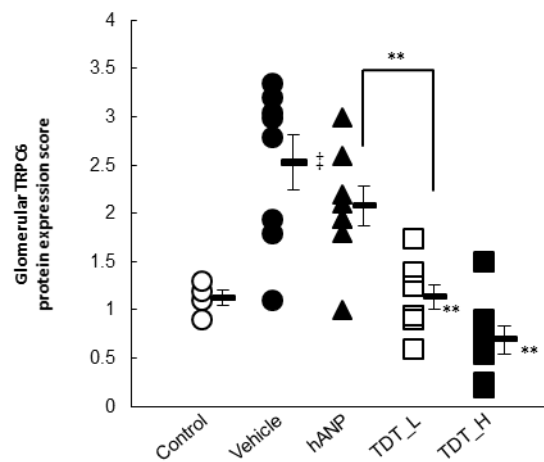
### TDT は PKG 経路の活性化により TRPC を介した細胞内へのカルシウム流入を抑制する

TDT の podocyte 保護メカニズムを探索するため、DS ラットより単離・培養した podocyte において TRPC を介したカルシウム流入量への影響を検討した (Fig. 9)。ATP は P2Y receptor を介して TRPC6 チャンネルを活性化させることが報告されている<sup>25</sup>。本検討においても、ATP による podocyte へのカルシウム流入は増大したが、TRPC inhibitor である SKF96365 で有意に抑制された。TDT は SKF96365 と同等にカルシウム流入を抑制した。加えて、SKF96365 の存在下においても TDT による抑制効果は増強されなかった。PKG inhibitor である KT5823 は ATP 誘導性カルシウム流入を増大させた。KT5823 との共添加条件下において、TDT のカルシウム流入抑制効果はキャンセルされた。以上より、TDT は PKG の活性化を介して TRPC6 のチャンネル活性を抑制することにより、podocyte におけるカルシウム流入を抑制することが明らかとなった。

A

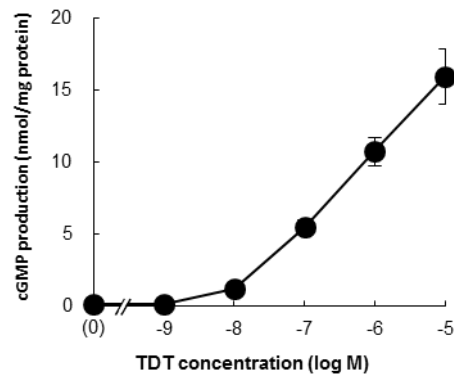


B



**Fig. 7. TDT reduced glomerular expression of TRPC6 protein in DS rats.**

Glomerular expression of TRPC6 protein in DS rats at 20 weeks of age was semi-quantitatively determined by immunohistochemical analysis. (A) Representative images are shown (scale bar = 50  $\mu$ m). (B) Glomerular expression of TRPC6 protein was semi-quantitatively shown (n = 4 for Control, n = 8 for the other groups). Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. ‡  $P < 0.01$  vs. Control, \*\*  $P < 0.01$  vs. Vehicle or indicated group.

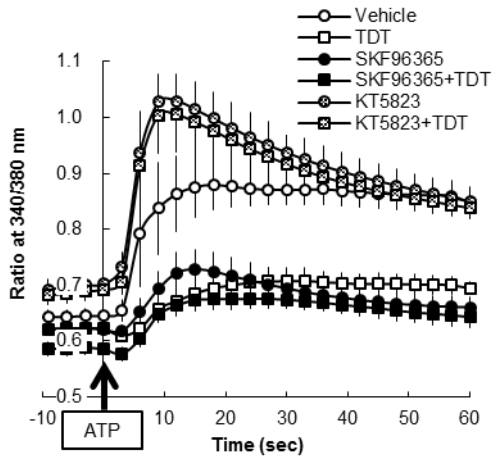


**Fig. 8. TDT directly acted podocytes to increase cGMP.**

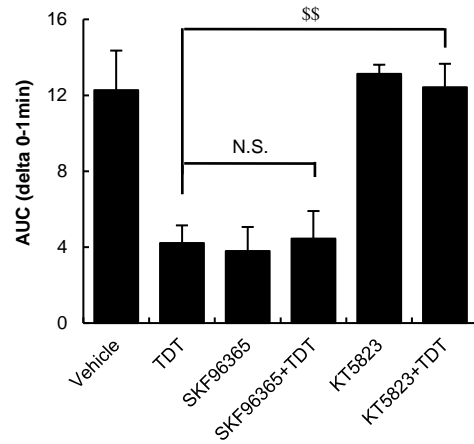
Primary cultured podocytes from DS rats were incubated with the indicated concentrations of TDT for 25 min. cGMP concentrations were then measured and normalized by protein amounts. Data are from four independent experiments performed in duplicate.



A



B



**Fig. 9. TDT inhibited TRPC-mediated calcium influx through PKG in primary cultured rat podocytes.**

(A-B) Cultured rat podocytes were pretreated with 100 nM TDT with or without TRPC inhibitor SKF96365 (10  $\mu$ M) or PKG inhibitor KT5823 (1  $\mu$ M) for 30 min, followed by exposure to 10  $\mu$ M ATP to evoke  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was determined by fura-2 ratiometry ( $n = 4-5$ ). (A)  $\text{Ca}^{2+}$  influx was measured at the indicated time points. (B) AUC of the change in calcium influx from the baseline was calculated. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. Error bars not shown are smaller than symbols. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. Vehicle group, \$\$  $P < 0.01$  vs indicated group.

## 【考察】

TRPC6は podocyte の構成タンパクであり、スリット構造に重要な足突起の形成に寄与している。TRPC6 のカルシウム流入活性における gain-of-function mutation は家族性巣状糸球体硬化症 (FSGS)の原因となる<sup>26</sup>。ANP は糸球体では podocyte に主に結合し<sup>27</sup>、podocyte 特異的 GC-A KO マウスでは TRPC6 の活性増大に依存して腎障害が悪化することから、NP - GC-A - PKG 系は podocyte において TRPC6 の抑制を介して保護的に働くと考えられた。

本検討において、TDT は糸球体における TRPC6 のタンパク発現量増加を抑制した。げっ歯類において、podocyte における TRPC6 の発現増加は腎障害を誘発することが報告されている<sup>28</sup>ことから、TDT による TRPC6 の発現低下は第2章で示したタンパク尿減少などの腎保護効果に寄与していると考えられる。この発現量調節の分子機構の解明にはさらなる検討が必要であるが、PDE5 (Phosphodiesterase 5) inhibitor である sildenafil が細胞内 cGMP 上昇・PKG の活性化を介し PPAR- $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ )の TRPC6 プロモーターへの結合を促進することでその発現量を低下させることが近年報告された<sup>29</sup>。Long-acting GC-A activator の作用も同様の経路を介すると推察できる。

さらに TDT は直接的に podocyte に作用することで PKG の活性化を介し TRPC のカルシウム流入活性を抑制することが示された。PKG は TRPC6 の Thr69 のリン酸化を介してチャンネル活性を抑制する<sup>30,31</sup>。すなわち、TDT は発現量だけでなく活性を直接的に抑制することで TRPC6 のカルシウム流入活性を調節していると考えられる。In vivo での Long-acting GC-A activator の podocyte 保護効果における TRPC6 活性抑制の寄与度については、TRPC6 ノックアウトマウスなどを用いた詳細な検討が必要である。

これらの TRPC6 の発現および活性抑制作用は他の cGMP 活性化薬も有すると考えられる。しかし、PDE5 inhibitor や NEP inhibitor による内因性の cGMP もしくは ANP の増加は限定的であると考えられ、薬効強度の点で外因性 NP の投与の方が優るであろう。さらに、soluble GC は podocyte での発現量が少ない<sup>32</sup>のに対し GC-A は podocyte に多く発現している<sup>27</sup>ことから sGC activator と比べて GC-A activator は podocyte において強力に cGMP - PKG 系を活性

化できるだろう。加えて long-acting となったことにより薬効増幅も期待される。今後、これらの薬剤との詳細な比較検討が必要である。

理論上、選択的 TRPC6 inhibitor が podocyte 保護に有望であるように思える。しかし、いくつかの低分子阻害剤が報告されている<sup>33</sup>ものの、未だ臨床応用には至っていない。選択性を上げることのハードルの他にも、TRPC6 は創傷治癒促進効果<sup>34</sup>を有するなど生理的にも重要な分子であることから、チャネル活性を強力に阻害することによる毒性が創薬の障壁となるかもしれない。一方、hANP は臨床で広く使われており、血圧低下などを除けば毒性の懸念は少ない。慢性投与を行った本検討においても一般症状や血液・尿パラメータ等で毒性所見は見られなかった。よって、Long-acting GC-A activator は TRPC6 抑制をメカニズムとして有する初の腎保護薬となり得る。

## 総括

本研究で、Long-acting GC-A activator の慢性投与により心・腎保護効果が発現することが初めて示された。特に、血圧や利尿に依存しない臓器保護効果が全身投与により発揮されることは、遺伝子改変動物を用いた検討等では示せない。よって、本研究成果は実臨床を意識したトランスレーショナルリサーチとして意義が大きい。hANP、Entresto などヒトでのエビデンスも豊富であり、本研究成果と併せて Long-acting GC-A activator は非常に実現可能性の高い有望なコンセプトであることが示された。また、TRPC6 を介したユニークな腎保護メカニズムの解明は、心不全だけでなく腎疾患をターゲットとした研究開発の促進に貢献するだろう。

本検討においては1日2回皮下投与での薬効を確認したが、臨床でのコスト面およびコンプライアンスの観点で改善の余地は残されている。すなわち、より半減期の長い Long-acting GC-A activator の開発により投与頻度を減らすこと、貼付製剤化や経口投与可能な低分子 GC-A activator の開発によりセルフメディケーションのハードルを低くすること、等によりさらに望ましいプロファイルとなるだろう。

本研究成果により、Long-acting GC-A activator の創薬研究開発が発展し、新規心・腎不全治療薬として臨床応用されることを期待したい。

## 参考文献

1. V. L. Roger, *Circulation research*, 2013, **113**, 646-659.
2. J. C. Schefold, G. Filippatos, G. Hasenfuss, S. D. Anker and S. von Haehling, *Nature reviews. Nephrology*, 2016, **12**, 610-623.
3. T. Nishikimi, N. Maeda and H. Matsuoka, *Cardiovascular research*, 2006, **69**, 318-328.
4. 急性心不全治療ガイドライン (2011年改訂版)
5. M. Volpe, *International journal of cardiology*, 2014, **176**, 630-639.
6. J. J. McMurray, M. Packer, A. S. Desai, J. Gong, M. P. Lefkowitz, A. R. Rizkala, J. L. Rouleau, V. C. Shi, S. D. Solomon, K. Swedberg and M. R. Zile, *The New England journal of medicine*, 2014, **371**, 993-1004.
7. S. D. Solomon, M. Zile, B. Pieske, A. Voors, A. Shah, E. Kraigher-Krainer, V. Shi, T. Bransford, M. Takeuchi, J. Gong, M. Lefkowitz, M. Packer and J. J. McMurray, *Lancet (London, England)*, 2012, **380**, 1387-1395.
8. L. R. Potter, *The FEBS journal*, 2011, **278**, 1808-1817.
9. L. M. G. Meems and J. C. Burnett, Jr., *JACC. Basic to translational science*, 2016, **1**, 557-567.
10. B. G. Fry, J. C. Wickramaratana, S. Lemme, A. Beuve, D. Garbers, W. C. Hodgson and P. Alewood, *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, **327**, 1011-1015.
11. P. Alewood, G. A. Head and B. G. Fry, US patent US20,080,153,747. 2008.
12. Y. Hashimoto, K. Nakao, N. Hama, H. Imura, S. Mori, M. Yamaguchi, M. Yasuhara and R. Hori, *Pharmaceutical research*, 1994, **11**, 60-64.
13. L. A. Ralat, Q. Guo, M. Ren, T. Funke, D. M. Dickey, L. R. Potter and W. J. Tang, *The Journal of biological chemistry*, 2011, **286**, 4670-4679.
14. M. Neshar, Y. Vachutinsky, G. Fridkin, Y. Schwarz, K. Sasson, M. Fridkin, Y. Shechter and D. Lichtstein, *Bioconjugate chemistry*, 2008, **19**, 342-348.

15. A. R. Mezo, K. A. McDonnell, S. C. Low, J. Song, T. J. Reidy, Q. Lu, J. V. Amari, T. Hoehn, R. T. Peters, J. Dumont and A. J. Bitonti, *Bioconjugate chemistry*, 2012, **23**, 518-526.
16. Y. Takeda, Y. Sakata, M. Higashimori, T. Mano, M. Nishio, T. Ohtani, M. Hori, T. Masuyama, M. Kaneko and K. Yamamoto, *Journal of cardiac failure*, 2009, **15**, 68-77.
17. G. L. Raff and S. A. Glantz, *Circulation research*, 1981, **48**, 813-824.
18. T. Nijenhuis, A. J. Sloan, J. G. Hoenderop, J. Flesche, H. van Goor, A. D. Kistler, M. Bakker, R. J. Bindels, R. A. de Boer, C. C. Moller, I. Hamming, G. Navis, J. F. Wetzels, J. H. Berden, J. Reiser, C. Faul and J. van der Vlag, *The American journal of pathology*, 2011, **179**, 1719-1732.
19. H. Tinel, *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2007, **50**, 75-82.
20. M. Namba, S. Kim, Y. Zhan, T. Nakao and H. Iwao, *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 2002, **25**, 461-466.
21. J. Staffel, D. Valletta, A. Federlein, K. Ehm, R. Volkmann, A. M. Fuchsl, R. Witzgall, M. Kuhn and F. Schweda, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 2017, **28**, 260-277.
22. Y. Kato, K. Mori, M. Kasahara, K. Osaki, A. Ishii, K. P. Mori, N. Toda, S. Ohno, T. Kuwabara, T. Tokudome, I. Kishimoto, M. A. Saleem, T. Matsusaka, K. Nakao, M. Mukoyama, M. Yanagita and H. Yokoi, *Scientific reports*, 2017, **7**, 46624.
23. D. V. Ilatovskaya, V. Levchenko, A. Lowing, L. S. Shuyskiy, O. Palygin and A. Staruschenko, *Scientific reports*, 2015, **5**, 17637.
24. C. A. Chen, J. C. Hwang, J. Y. Guh, J. C. Tsai and H. C. Chen, *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 2006, **148**, 134-141.
25. H. Roshanravan and S. E. Dryer, *American journal of physiology. Renal physiology*, 2014, **306**, F1088-1097.
26. M. P. Winn, P. J. Conlon, K. L. Lynn, M. K. Farrington, T. Creazzo, A. F. Hawkins, N. Daskalakis, S. Y. Kwan, S. Ebersviller, J. L. Burchette, M. A. Pericak-Vance, D. N. Howell, J. M. Vance and P. B. Rosenberg, *Science (New York, N.Y.)*, 2005, **308**, 1801-1804.

27. C. Koseki, Y. Kanai, Y. Hayashi, N. Ohnuma and M. Imai, *Japanese journal of pharmacology*, 1986, **42**, 27-33.
28. P. Krall, C. P. Canales, P. Kairath, P. Carmona-Mora, J. Molina, J. D. Carpio, P. Ruiz, S. A. Mezzano, J. Li, C. Wei, J. Reiser, J. I. Young and K. Walz, *PloS one*, 2010, **5**, e12859.
29. R. Sonneveld, J. G. Hoenderop, A. M. Isidori, C. Henique, H. B. Dijkman, J. H. Berden, P. L. Tharaux, J. van der Vlag and T. Nijenhuis, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 2017, **28**, 1491-1505.
30. S. Takahashi, H. Lin, N. Geshi, Y. Mori, Y. Kawarabayashi, N. Takami, M. X. Mori, A. Honda and R. Inoue, *The Journal of physiology*, 2008, **586**, 4209-4223.
31. H. Kinoshita, K. Kuwahara, M. Nishida, Z. Jian, X. Rong, S. Kiyonaka, Y. Kuwabara, H. Kurose, R. Inoue, Y. Mori, Y. Li, Y. Nakagawa, S. Usami, M. Fujiwara, Y. Yamada, T. Minami, K. Ueshima and K. Nakao, *Circulation research*, 2010, **106**, 1849-1860.
32. F. Theilig, M. Bostanjoglo, H. Pavenstadt, C. Grupp, G. Holland, I. Slosarek, A. M. Gressner, M. Russwurm, D. Koesling and S. Bachmann, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 2001, **12**, 2209-2220.
33. C. Harteneck and M. Gollasch, *Current pharmaceutical biotechnology*, 2011, **12**, 35-41.
34. H. Takada, K. Furuya and M. Sokabe, *Journal of cell science*, 2014, **127**, 4159-4171.

## 謝辞

本論文作成の機会を与えて頂き、多大な有益な御助言と温かい御指導を賜りました、大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 藤尾慈教授に、心より厚く御礼申し上げます。

本論文の執筆全般を通じて、多大なる建設的な御助言と温かい御指導を賜りました、大阪大学大学院 薬学研究科 臨床薬効解析学分野 尾花理徳助教に、深く感謝申し上げます。

本論文作成の機会を得るにあたり多大な便宜を賜り、日頃より研究全般を通じて長年に亘り御指導頂いた、第一三共株式会社 希少疾患・LCM ラボラトリー 永山貴弘グループ長に深く感謝いたします。また、本稿の執筆にあたり温かく御助言を賜りました、第一三共株式会社 臓器保護ラボラトリー 本間剛研究員に深く感謝いたします。加えて、研究の遂行を通じて多大なご協力を賜りました、第一三共株式会社 研究統括部 鈴木尚子様および元 第一三共株式会社 臓器保護ラボラトリー 蓮井ゆり様をはじめ、関与いただいた多くの皆様に深く感謝いたします。

最後に、本稿の執筆にあたり、多大なご協力、支援をして下さりました家族に深く感謝いたします。