

EP4 receptor antagonist である ASP7657 の薬理学的作用の検証と  
各種腎疾患モデルにおける薬効評価

2020 年 1 月

水上 和彦

EP4 receptor antagonist である ASP7657 の薬理学的作用の検証と  
各種腎疾患モデルにおける薬効評価

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生命産業科学専攻

博士（生物科学）学位論文

水上 和彦

## 目次

目次 .....	i
略語 .....	ii
序論 .....	1
本論	
第一章 EP4 receptor antagonist である ASP7657 の薬理学的作用の検証 .....	11
第一節 背景 .....	12
第二節 実験項 .....	15
第三節 結果 .....	21
第四節 考察 .....	23
第二章 各種 CKD モデルにおける薬効評価と奏功機序の検討 .....	32
第一節 背景 .....	33
第二節 実験項 .....	36
第三節 結果 .....	42
第四節 考察 .....	45
総括 .....	69
参考文献 .....	79
謝辞 .....	87
発表論文目録 .....	88

## 略語

AC	Adenylate cyclase
ACEi	Angiotensin converting enzyme inhibitor
ANP	Atrial natriuretic peptide
ARB	Angiotensin type II receptor blocker
AUC	Area under the curve
BSA	Bovine serum albumin
BUN	Blood urea nitrogen
BW	Body weight
CCr	Creatinine clearance
CHO	Chinese hamster ovary
CKD	Chronic kidney disease
COX	Cyclooxygenase
DBP	Diastolic blood pressure
DMEM	Dulbecco's modified ragle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECM	Extra cellular matrix
eGFR	Estimated GFR
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent sssay
ESRD	End stage renal disease
FBS	Fetal bovine serum
FLIPR	Fluorometric imaging plate reader
GFR	Glomerular filtration rate
HBSS	Hank's balanced salt solution
HE	Hematoxylin-eosin

HEK	Human embryonic kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
KDIGO	Kidney disease improving global outcomes
KO	Knock out
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LPS	Lipopolysaccharide
MBP	Mean blood pressure
MC	Methylcellulose
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MEM	Minimum essential medium
Nx	Nephrectomy
PAS	Periodic acid-schiff
PD-1	Programmed cell death-1
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PK	Pharmacokinetics
PLC	Phospholipase C
PRA	Plasma renin activity
RAAS	Renin-angiotensin-aldosterone system
RBF	Renal blood flow
RPMI	Roswell park memorial institute
RVR	Renal vascular resistance
SBP	Systolic blood pressure
SD	Sprague-Dawley
SD	Standard deviation

SEM	Standard error of the mean
STZ	Streptozotocin
TAM	Tumor-associated macrophage

## 序論

腎臓の構成は糸球体とそれに続く尿細管から成るネフロン集合体である。ヒトにおいて、ネフロンは左右腎にそれぞれ約 100 万個存在するとされている。腎臓の主な機能は、糸球体における血液の濾過（原尿の生成）、それに続く尿細管における原尿からの水や電解質、グルコース、アミノ酸などの生体に必要な成分の再吸収、または不必要な成分の原尿中への分泌が挙げられる。さらに、腎臓ではレニン、エリスロポエチン、1,25-dihydroxyvitamin D3 などのホルモン産生も行われている。腎臓は体液量の維持、イオンバランスの保持、血圧調節、老廃物または毒性物質の体外への排出、ホルモン分泌による生体内機能調節などを担っており、生体の恒常性維持において重要な役割を果たしていると考えられている（黒川, 1996）。

一方で、主に高血圧や糖尿病などの背景疾患に起因して、腎臓の主機能である糸球体濾過機能（糸球体濾過率、GFR）が持続的に低下する慢性腎臓病（CKD）が発症、進展することが知られている。糸球体における持続的な障害は糸球体硬化を発症、進展させ、また、持続的な尿細管障害は尿細管間質の線維化を進展させる。尿細管間質線維化は尿細管周囲毛細血管動態の障害、さらには糸球体周辺の血行動態障害を引き起こし、糸球体濾過機能のさらなる低下を招く。この一連の病態変化は腎機能廃絶へ至る **final common pathway** として認知されている（Nangaku, 2006）。糸球体濾過率が低下すると血液中のクレアチニン濃度が上昇、または血液中クレアチニン濃度から概算される **estimated GFR (eGFR)** 値が低下する。さらに、糸球体バリア機能の障害は分子量の大きい成分の原尿中への漏出を招き、尿中タンパク排泄量の増加としても検出される。以上の特性から、健康診断や生化学検査などの検査項目には、血液中クレアチニン濃度および尿中タンパク排泄量が腎臓における糸球体機能の指標として組み込まれている。欧米（KDIGO, 2013. Fig. 1）さらには日本（日本腎臓学会, 2018. Table 1, Fig. 2）における CKD の定義とグレーディング法に関



しても、血液クレアチニン濃度から算出される eGFR 値と尿中タンパク、アルブミン排泄量で規定されている。eGFR 値が低下するほど、さらには尿中タンパクまたはアルブミン排泄量が増加するほど高度な CKD グレードとして診断とされる。

先進国において、成人人口の 10%以上が CKD を発症していると推定する報告がある (Lopez-Novoa et al., 2010)。一般集団では、腎機能の低下、つまり CKD グレードの進行は心血管疾患と全死亡率、さらには透析移行への独立した危険因子であると考えられている。よって、CKD のグレード進展を抑制することは、患者の予後を改善する上でも、さらに透析導入による QOL の低下を防ぐ上でも非常に有用であると考えられる。また、透析に関しては、各国の医療費圧迫の要因の一つとなっており、特に透析患者数の多い日本においては人工透析の年間医療費総額が約 1.6 兆円に達すると報告されている (厚生労働省, 2019)。日本透析学会からの報告によると、透析治療を受けている CKD 患者数は 2017 年末の段階で 334,505 人であった。近年患者数の伸びは鈍化しているものの、人口 100 万人あたりの透析患者数 (有病率を示す) は年々増加傾向であり、2017 年は人口 100 万人あたり 2,640 人で、国民約 380 人に 1 人が透析患者であることが報告されている (日本透析学会, 2018. Fig. 3)。よって、CKD グレード進展抑制による透析への移行率抑制は、患者の健康寿命の延伸とともに医療費適正化の観点においても喫緊の課題であると考えられている。

CKD 発症や進展のリスクとなる背景疾患には、高血糖、高血圧、高脂血症および肥満が含まれる (Hall, 2006)。特に糖尿病に関しては有病率が急速に上昇しており、現在の予測では、2030 年までに糖尿病患者の数は世界で 4 億 3,900 万人に増加すると予測されている (Shaw et al., 2010)。糖尿病の主な合併症は、脳卒中や心血管疾患などの大血管合併症、または腎症、網膜症、神経障害などの微小血管合併症に関連する傾向がある。その中で糖尿病性腎症、つまり高血

糖に起因した CKD は、糖尿病の最も一般的な合併症の 1 つであり、糖尿病患者の 3 分の 1 が糖尿病性腎症を罹患している推定されている (Akmal, 2001)。また、糖尿病は透析が必要となる末期慢性腎臓病の主な原因疾患であることが知られている (Gilbertson et al., 2005)。日本においても、日本透析学会が 2018 年に報告した慢性透析患者の原疾患割合の推移によると、2010 年以降から 2017 年まで透析へ移行する原因疾患の第 1 位が糖尿病となっている (日本透析学会, 2018. Fig. 4)。よって、CKD 患者数は主に糖尿病の罹患率の上昇により、さらに増加すると予想される (Hill and Fogarty, 2012; van Dieren et al., 2010, Coresh et al., 2007)。以上のことから、糖尿病性腎症に関連する CKD の病態進展を抑制することは医療ニーズの高いアプローチと捉えることができる。

CKD 領域において、糖尿病性腎症の進展を抑制する現在の標準療法は、病態進展における危険因子と考えられている血糖値および血圧値の制御に基づいている。血糖値を制御するための現在の血糖降下療法および血圧値を制御するためのアンギオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEi)、アンギオテンシン II 受容体遮断薬 (ARB) の投与により糖尿病性腎症の進行をある程度遅らせることができるが、その効果は十分ではなく、CKD 患者の心血管疾患の罹患率と死亡率の絶対リスクは未だ高いままとされている (Lambers Heerspink and de Zeeuw., 2013)。したがって、糖尿病性腎症の進行を防ぐための現行治療に対する代替療法または追加療法の開発が強く求められている。そのため、本研究では新規糖尿病性腎症治療薬候補を提案すべく創薬研究を開始した。学会情報や論文情報などからの多岐に渡った情報収集の結果、糖尿病性腎症進行抑制薬として、PGE<sub>2</sub>-EP4 receptor axis に着目し、選択的 EP4 receptor antagonist の探索を実施した。さらに、見い出された EP4 receptor antagonist を用いて各種 *in vitro* 試験、PK 試験による基礎薬理学的作用のキャラクタライズ、さらには各種腎疾患モデルにおける *in vivo* 薬効評価と一連の研究を行った。最後に新規

EP4 receptor antagonist の糖尿病性腎症治療薬としての有用性、さらには病態進展に対する奏功機序の検証を行った。

**Table 1.** Current CKD diagnostic criteria in Japan (日本腎臓学会, 2018).

以下のいずれかが3カ月を超えて存在	
腎障害の指標	アルブミン尿 (AER $\geq$ 30 mg/24時間；ACR $\geq$ 30 mg/gCr) 尿沈渣の異常 尿細管障害による電解質異常やその他の異常 病理組織検査による異常，画像検査による形態異常 腎移植
GFR低下	GFR $<$ 60 mL/分/1.73 m <sup>2</sup>
AER：尿中アルブミン排泄率，ACR：尿アルブミン/Cr 比	

### Prognosis of CKD by GFR and albuminuria category

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased  <30 mg/g <3 mg/mmol	Moderately increased  30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	Severely increased  >300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/ 1.73 m <sup>2</sup> ) Description and range	G1	Normal or high	≥90	Green	Yellow	Orange
	G2	Mildly decreased	60-89	Green	Yellow	Orange
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59	Yellow	Orange	Red
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44	Orange	Red	Red
	G4	Severely decreased	15-29	Red	Red	Red
	G5	Kidney failure	<15	Red	Red	Red

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

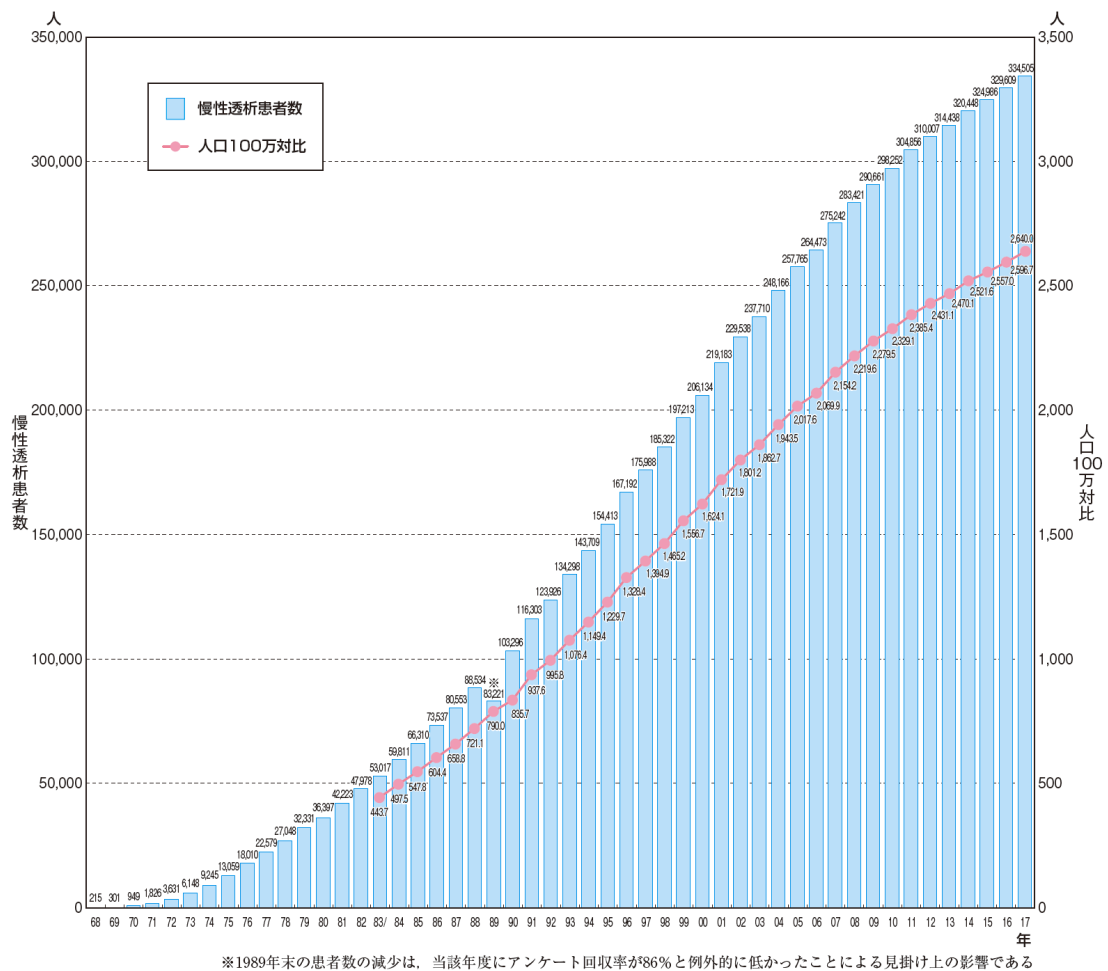
**Figure 1.** Current chronic kidney disease (CKD) nomenclature used by KDIGO (KDIGO, 2013). CDK is defined as abnormalities of kidney structure or function, present for > 3 months, with implications for health and classified based on cause, GFR category, and albuminuria category (CGA).

CKDの重症度分類(CKD診療ガイド2012) <sup>a</sup>						
原疾患		蛋白尿区分		A1	A2	A3
糖尿病		尿アルブミン定量 (mg/日) 尿アルブミン/Cr比 (mg/gCr)		正常	微量アルブミン尿	顕性アルブミン尿
				30未満	30～299	300以上
高血圧 腎炎 多発性嚢胞腎 移植腎 不明 その他		尿蛋白定量 (g/日) 尿蛋白/Cr比 (g/gCr)		正常	軽度蛋白尿	高度蛋白尿
				0.15未満	0.15～0.49	0.50以上
GFR区分 (mL/分 /1.73 m <sup>2</sup> )	G1	正常または高値	≥90			
	G2	正常または軽度低下	60～89			
	G3a	軽度～中等度低下	45～59			
	G3b	中等度～高度低下	30～44			
	G4	高度低下	15～29			
	G5	末期腎不全(ESKD)	<15			

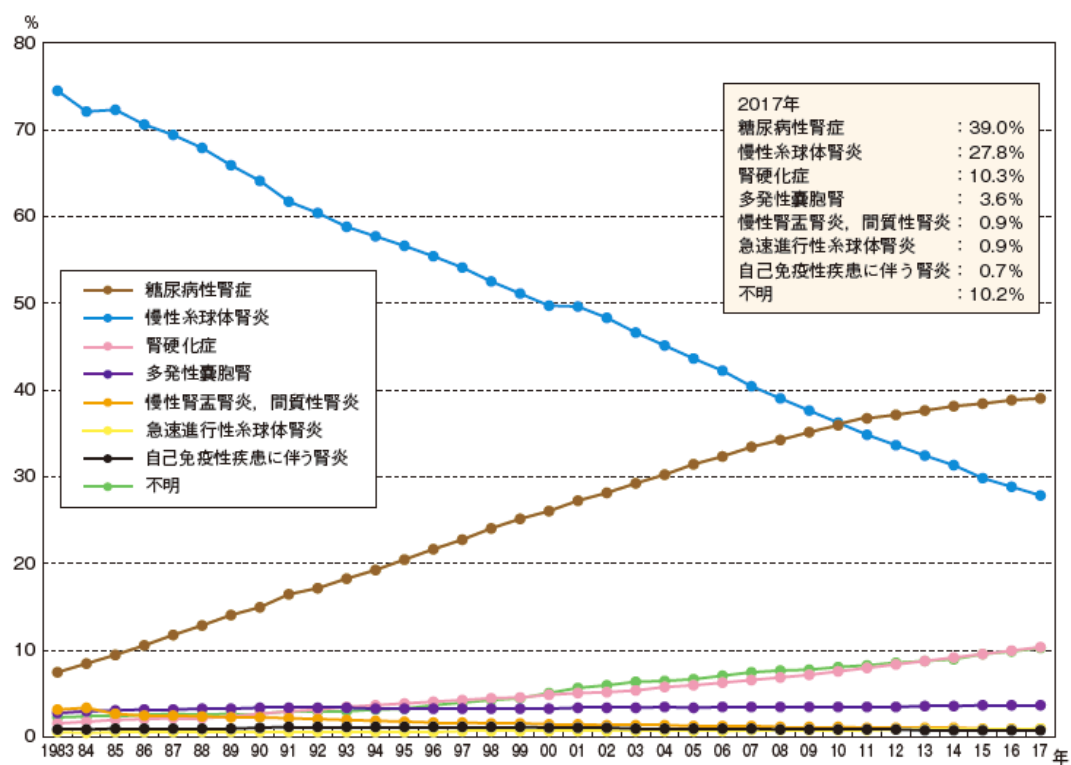
重症度は原疾患・GFR区分・蛋白尿区分を合わせたステージにより評価する。CKDの重症度は死亡、末期腎不全、心血管死発症のリスクを緑■のステージを基準に、黄■，オレンジ■，赤■の順にステージが上昇するほどリスクは上昇する。  
(KDIGO CKD guideline 2012 を日本人用に改変)

注：わが国の保険診療では、アルブミン尿の定量測定は、糖尿病または糖尿病性早期腎症であって微量アルブミン尿を疑う患者に対し、3カ月に1回に限り認められている。糖尿病において、尿定性で1+以上の明らかな尿蛋白を認める場合は尿アルブミン測定は保険で認められていないため、治療効果を評価するために定量検査を行う場合は尿蛋白定量を検討する。

**Figure 2.** CKD classification based on cause, GFR category, and proteinuria and albuminuria category (CGA) in Japan (日本腎臓学会, 2018).



**Figure 3.** Changes in the number of chronic dialysis patients in Japan (1968-2017) and prevalence (compared to 1 million population, 1983-2017) (日本透析学会, 2018).



**Figure 4.** Changes in the primary disease ratio of chronic dialysis patients in Japan (1983 - 2017) (日本透析学会, 2018).



## 本論

### 第一章 EP4 receptor antagonist である ASP7657 の薬理学的作用 の検証

## 第一節 背景

プロスタグランジンは、シクロオキシゲナーゼ (COX) により産生されるアラキドン酸代謝物の 1 つである。その主要代謝物である PGE<sub>2</sub> は、ほとんどの臓器および組織で生成され (Narumiya et al., 1999)、また特定の標的組織に複数の機能的効果をもたらす (Breyer et al., 2001)。PGE<sub>2</sub> 受容体作動性の薬剤開発は、過去 30 年間の製薬業界において、喘息、炎症、痛み、潰瘍、癌、骨粗鬆症などの多様な症状の治療に agonist と antagonist の双方で治療効果が期待されると予想されてきた (Hattori et al., 2005; Regan, 2003)。

腎臓においてもプロスタグランジンは多くの生理学および病態生理学のプロセスの重要な脂質メディエーターである。その中でも、腎臓において最も豊富に存在するプロスタグランジンである PGE<sub>2</sub> は、炎症、体液恒常性、salt-water balance、腎血流量、糸球体周辺血行動態、レニン分泌を含む腎生理学のプロセスにおいて重要な役割を果たしている (Breyer et al., 1996)。さらに、PGE<sub>2</sub> の産生阻害剤である COX 阻害剤が CKD 患者の尿中タンパク排泄量を低下させる (Vogt et al., 2009) との報告があることから、CKD の病態進展にも PGE<sub>2</sub> の作用が関与していると推察される。一方で、COX 阻害剤投与によって腎血流量の低下、さらには GFR の低下が誘発されることも報告されている (Clive and Stoff, 1984)。よって、腎臓において PGE<sub>2</sub> のシグナルすべてを阻害することは総合的には腎機能に対し不利益をもたらすものと考えられた。

PGE<sub>2</sub> は、G タンパク質共役型の 4 つの E 型プロスタグランジン (EP) 受容体 (EP1、EP2、EP3 および EP4) を介してシグナルを伝達する (Fig. 5)。EP1 および EP3 は一般に血管収縮性であるとされているが、Gs タンパクと共役する EP2 および EP4 は、通常血管弛緩に関連した作用を発現する (Narumiya et al., 1999)。遺伝子 KO および過剰発現研究により、これらの EP 受容体サブタイプは腎臓において異なる生理学および病態生理学的效果を有することが

明らかになっていることから、特定の EP 受容体サブタイプのみを刺激または阻害することで、CKD 病態において有益な作用のみを引き出すことができる可能性がある」と推察された。多くの研究結果は、腎臓で最も広く発現している EP4 受容体が、さまざまな腎障害の病態生理学において重要な役割を果たすことを強く示唆している。EP4 受容体 mRNA は正常な腎臓では主に糸球体に局在し、一方で糖尿病条件下では尿細管上皮細胞、間質細胞および podocyte に高度に発現が誘導される (Stitt-Cavanagh et al., 2010)。Podocyte での EP4 受容体の過剰発現は、CKD ラットモデルの糸球体障害およびタンパク尿を悪化させることが報告されている (Stitt-Cavanagh et al., 2010)。さらに、EP4 受容体選択的 agonist の慢性投与は、糖尿病マウスのアルブミン尿と腎線維化を悪化させるとも報告されている (Mohamed et al., 2013)。これらの発見は、PGE<sub>2</sub> が EP4 受容体を介して糖尿病性腎症を含むさまざまな腎疾患の発症と進行に重要な役割を果たしていることを示唆している。したがって、選択的 EP4 受容体 antagonist は糖尿病性腎症の進展抑制に有益である可能性が高いと仮定できた。以上のことをもって、高血糖に起因した CKD である糖尿病性腎症の新規治療薬候補としての EP4 受容体選択的な低分子 antagonist 創製を目指し、本研究を開始した。

まずは過去にアステラス製薬株式会社 (Astellas pharma Inc., 東京、日本) で合成された、PGE<sub>2</sub> と同様にプロスタノイドに分類される PGI<sub>2</sub> の受容体に対する agonist 化合物群に対し、各種 EP 受容体発現細胞膜を用いた結合実験系でスクリーニングを実施し、EP4 受容体に選択性を持つ化合物の母核を探索した。母核の選定後に各種 EP 受容体に対する選択性試験、EP4 受容体阻害活性試験、薬物動態試験および *in vivo* 試験 (PD 試験、腎疾患モデル評価) における評価結果に基づいた低分子化合物最適化合成を試行した結果、最終的に強力かつ選択的な EP4 受容体 antagonist である ASP7657 を見い出すに至った

(Fig. 6)。

本章では、ASP7657 の各種 *in vitro* 薬理試験、体内動態試験および *ex vivo* 試験を実施することで、ASP7657 の薬学的プロファイルの特徴付けを実施した。

## 第二節 実験項

### 試薬

ASP7657, *trans*-4-[(1-(quinolin-2-ylmethyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-indol-7-yl)carbonyl] amino) methyl] cyclohexanecarboxylic acid methanesulfonate (1:1)はアステラス製薬株式会社(茨城、日本)にて合成された。*in vitro* 試験では、ASP7657を最初に DMSO にて溶解し、アッセイバッファーで目的の濃度に希釈した。アッセイバッファー中の DMSO の最終濃度は 1%を超えなかった。薬物動態試験において、ASP7657 は経口および静脈内投与用に 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液に溶解させた。*ex vivo* 試験における薬効評価においては、ASP7657 は経口投与用に 0.5% MC 溶液にて懸濁した。 [<sup>3</sup>H] PGE<sub>2</sub> は PerkinElmer Inc. (Waltham, MA, USA) から購入し、組換えヒト EP4 受容体を発現する膜画分は Chemicon International Inc. (Billerica, MA, USA) から購入した。LPS および PGE<sub>2</sub> は、それぞれ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) および Funakoshi (東京、日本) から購入した。

### 動物

雄性 SD ラットは、Charles River Laboratories Japan (神奈川、日本) から購入した。すべての動物は、温度、湿度、明度(12 時間の明暗サイクル)が制御された条件下で、また標準的な市販の食餌と水を自由に摂取できる条件下で飼育した。動物実験は the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International から認定を受けているアステラス製薬筑波研究センターの施設内動物管理使用委員会から承認を受け、実施した。

## Binding assay

### 1. ヒト EP4 受容体への放射性リガンド結合実験

本実験は、積水メディカル株式会社が指定する標準的なアッセイ手順に従って実施した。 $[^3\text{H}]$  PGE<sub>2</sub> (3 nM) をヒト EP4 受容体の細胞膜調製物に添加し、その後さまざまな濃度の ASP7657 を添加したアッセイバッファー (50 mM HEPES-NaOH、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.5% BSA) とともにインキュベーションした。室温で 1 時間のインキュベーション期間の後、洗浄バッファー (500 mM NaCl と 0.1% BSA を含む 50 mM HEPES-NaOH、pH 7.4) を添加して反応を停止し、Cell Harvester (PerkinElmer Inc., MA, USA) を使用して 96 ウェル GF / B UniFilter プレートによる迅速なろ過を実施した。フィルターをすすぎ、フィルターに保持された放射性リガンドを、TopCount Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer Inc., MA, USA) を使用してカウントした。Nonspecific binding は 10  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub> を使用して決定した。 $[^3\text{H}]$  PGE<sub>2</sub> の特異的結合の 50% 阻害を引き起こした薬物の濃度 (IC<sub>50</sub>) は、変位曲線の回帰分析を使用して決定した。阻害定数 (K<sub>i</sub>) は、次の式を使用して計算した。

$$K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [\text{L}] / K_d)$$

ここで、[L] は放射性リガンドの濃度、K<sub>d</sub> は Scatchard plot から得られた放射性リガンドの解離定数である。

### 2. ラット EP4 受容体の放射性リガンド結合実験

ラット EP4 受容体を一時的に発現する HEK 293 細胞からの細胞膜調製物に  $[^3\text{H}]$  PGE<sub>2</sub> (0.3 nM) を添加し、その後さまざまな濃度の ASP7657 が添加されたアッセイバッファー (50 mM HEPES、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5% BSA) とともにインキュベーションした。Nonspecific binding は 1  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub> を使用して決定した。その他のパラメーター測定は、上記のヒト EP4 受容体結合実験と同様の方法

で実施した。

### 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の測定

ラット EP1 または EP3 受容体を発現する HEK293 細胞を、10% FBS、50 単位/mL ペニシリン、50  $\mu\text{g/mL}$  ストレプトマイシン、0.2 mg/mL G418 を含む DMEM を用いて 37°C、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で培養した。これらの細胞を、1 ウェルあたり 10,000 個で clear-base 96-well poly-D-lysine coated plate black-walled に播種し、一晩培養した。測定当日に、細胞を 20 mM HEPES (pH 7.5)、0.5% BSA および 2.5 mM プロベネシドと Calcium 3 reagent (Molecular Devices Corporation Japan、東京、日本) を含む HBSS バッファーにて室温、暗所で 3 時間インキュベートした。次に、プレートを蛍光イメージングプレートリーダー FLIPR TETRA (Molecular Devices Corporation Japan、東京、日本) に格納した。まず細胞をさまざまな濃度の ASP7657 溶液と 5 分間インキュベートし、次に 100 nM  $\text{PGE}_2$  と 3 分間インキュベートした。これらの 8 分間の間、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の指標である細胞内蛍光の総変化量をモニターした。 $\text{PGE}_2$  を追加した後の最大蛍光シグナルから、各ウェルに  $\text{PGE}_2$  を追加する前の蛍光シグナルを差し引いて解析に使用した。 $\text{IC}_{50}$  値は、Sigmoid-Emax 非線形回帰分析を用いて算出した。

### cAMP レベルの測定

ラット EP2 または EP4 受容体を発現する CHO 細胞を、10% FBS、50 単位/mL ペニシリン、50  $\mu\text{g/mL}$  ストレプトマイシン、および 0.5 mg/mL G418 を含む  $\alpha$ -MEM 培地を用いて 37°C、5%  $\text{CO}_2$  条結下で培養した。これらの細胞を 1 ウェルあたり 50,000 個で 96 well plate に播種し、一晩培養した。測定当日に、培地を最初に 2  $\mu\text{M}$  のインドメタシンと 0.5% BSA を含む  $\alpha$ -MEM に交換し、次に  $\alpha$ -MEM-IBMX バッファー (2  $\mu\text{M}$  のインドメタシン、1 mM 3-イソブチル

-1-メチルキサンチン、0.5% BSA を含む  $\alpha$ -MEM) に交換した。細胞を、ASP7657 の存在下または非存在下の  $\alpha$ -MEM-IBMX 緩衝液中で、100 nM PGE<sub>2</sub> とともに 37°C で 30 分間インキュベートした。培地を除去し、細胞を 0.2% TritonX-100 in PBS で溶解させた。溶解液中の cAMP レベルを、homogeneous time resolved fluorescence-based assay kit (Cisbio Bioassays, Bagnols, France) を使用して測定した。IC<sub>50</sub> 値は、Sigmoid-Emax 非線形回帰分析を使用して算出した。

### **Jurkat 細胞を用いた PGE<sub>2</sub> 誘発 cAMP 産生への効果の検討**

ヒト Jurkat T 細胞 (クローン E6-1; 大日本住友製薬、大阪、日本) は、10% FBS、50 units/mL ペニシリン、50  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを含む RPMI-1640 で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。実験は 384 well plate (5,000 細胞/well) で、20 mM HEPES、pH 7.5、0.5 mM IBMX、0.02% CHAPS、2  $\mu$ M インドメタシン、0.5% BSA を含む HBSS バッファーで ASP7657 および PGE<sub>2</sub> (100 nM) とともに細胞をインキュベートし実施した。上記と同様の方法で細胞内 cAMP 濃度を 30 分間測定した。IC<sub>50</sub> 値は、Sigmoid-Emax 非線形回帰分析を使用して算出した。

### **Specificity assay**

積水メディカル株式会社が指定する標準的なアッセイ手順に従って、1  $\mu$ M ASP7657 を用いて、さまざまな受容体、イオンチャネル、およびトランスポーターに対する薬理的スクリーニングアッセイを実施した。

### **Pharmacokinetics**

ASP7657 (0.1 mg/kg) を覚醒下 SD ラットに静脈内および経口投与した。イソフルラン麻酔下で、投与後 0.1 時間 (静脈内投与のみ)、0.25、0.5、1、2、



4、6、8、および 10 時間で血液サンプルを腹部大動脈から採取した。血漿中薬物濃度は、LC-MS/MS を使用して測定した。Phoenix WinNonlin version 6.1 software (Pharsight Co., St. Louis, MO, USA) の非コンパートメント分析モデルを使用して、ASP7657 平均血漿濃度から各薬物動態パラメーターを計算した。

#### 培養ラット血液における PGE<sub>2</sub> による LPS 誘発 TNF- $\alpha$ 放出抑制作用に対する ASP7657 の効果の検討

ASP7657 (0.003-0.1 mg/kg) をラットに経口投与し、投与 1 時間後にイソフルラン麻酔下で採血した。血液サンプルを RPMI1640 培地で 2 倍に希釈し、48 well plate にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 10 分間インキュベートした。さらに LPS (1  $\mu$ g/mL) および PGE<sub>2</sub> (100 nM) を添加し、サンプルを 4 時間インキュベートした。アッセイ混合溶液を遠心分離 (3,000 rpm、10 分) し、上清を回収した。上清中の TNF- $\alpha$  の濃度を ELISA キット (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。

#### 統計解析

IC<sub>50</sub> 値および Ki 値を計算するためのデータ解析は、SAS 9.1.3 ソフトウェアパッケージ (SAS Institute Japan, Ltd.、東京、日本) を使用したが、ヒト EP4 受容体結合実験のみ、EXSUS 7.7 (CAC Croit Corporation、東京、日本) を使用して解析した。IC<sub>50</sub> 値および Ki 値に関しては geometric mean with 95% confidence limits で表記し、その他実験結果に関しては mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) または standard deviation (SD) で表記した。Student's t-test を使用して、2 つのグループ間の差を解析した。Dunnett の多重比較テストは、複数のグループ間の比較に使用された。有意差検定は p < 0.05 の値を有意差有りとみなした。統計およびデータ解析は、SAS 9.1.3 ソフトウェアパッケージ (SAS Institute

Japan、Ltd., Tokyo, Japan) または GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を使用して実施した。

### 第三節 結果

#### ASP7657 の *in vitro* 薬理学的特性評価

ASP7657 は、 $[^3\text{H}]$ PGE<sub>2</sub> のラットおよびヒト EP4 受容体への特異的結合を強力に阻害し、K<sub>i</sub> 値はそれぞれ 6.02 nM および 2.21 nM であった (Table 2)。ASP7657 は、ラット EP4 受容体発現 CHO 細胞およびヒト EP4 受容体を発現した Jurkat 細胞における PGE<sub>2</sub> 誘発 cAMP 上昇を強力に抑制し、IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.86 (0.24-3.08) nM および 0.29 (0.03-2.46) nM であった (Table 3)。対照的に ASP7657 はラット EP2 受容体発現 CHO 細胞の PGE<sub>2</sub> 誘発 cAMP 上昇、またはラット EP1 および EP3 受容体発現 HEK293 細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増加を抑制しなかった (IC<sub>50</sub> > 1000 nM)。ASP7657 (1 μM) は、ヒト PG CRTH2、DP、EP2 および EP3 受容体サブタイプを含む他の調査対象受容体と相互作用を示さなかった (Table 4)。さらに、ASP7657 はその他様々なイオンチャネル、トランスポーターおよび酵素を阻害しなかった (data not shown)。

#### Pharmacokinetics

ラットへの ASP7657 (0.1 mg/kg) の経口投与後、血漿中の未変化体薬物濃度は 0.25 時間で急速に最大値に達し、t<sub>1/2</sub> 値が 1.38 時間で減少した (Fig. 7)。対応する C<sub>max</sub> は 22.4 ng/mL で、AUC<sub>0-10 h</sub> は 22.3 ng·h/mL であった。経口、静脈内投与後の各血中濃度推移の結果から計算されたバイオアベイラビリティは 46.2% であった。

#### 培養ラット血液における PGE<sub>2</sub> による LPS 誘発 TNF-α 放出抑制作用に対する ASP7657 の効果

LPS (1 μg/mL) 添加はラット全血からの TNF-α 放出を有意に増加させ、PGE<sub>2</sub> (100 nM) 追加添加により LPS 誘発 TNF-α 放出は有意に阻害された (Fig. 8)。

ASP7657 (0.003-0.1 mg/kg) 投与後の全血培養においては、ラット全血からの LPS 誘発 TNF- $\alpha$  放出に対する PGE<sub>2</sub> を介した阻害作用は ASP7657 投与用量依存的に拮抗された (Fig. 8)。

#### 第四節 考察

本章の一連の研究は、新規に見い出した EP4 受容体 antagonist である ASP7657 の薬理学的プロファイルの特徴づけを目的として実施した。受容体結合試験では、ASP7657 はラットおよびヒト EP4 受容体に対して高い親和性を示し、IC<sub>50</sub> 値は nM オーダーと非常に強いものであった。さらに、ASP7657 はラットおよびヒト EP4 受容体発現細胞における PGE<sub>2</sub> 誘発 cAMP の増加を強力に抑制した。対照的に、ASP7657 は EP1、EP2 または EP3 受容体発現細胞における PGE<sub>2</sub> 誘発受容体下流シグナル伝達に対しては阻害作用を示さなかった。さらに、ASP7657 は網羅的親和性試験において、ヒト EP2 および EP3 受容体サブタイプを含む他の受容体、イオンチャネル、トランスポーター、酵素などと相互作用を示さないことが明らかとなった。これらの結果は、ASP7657 が EP4 受容体に対して強力な親和性と選択性を持つ EP4 受容体 antagonist であることを示唆している。

ラットにおける pharmacokinetics 試験において、ASP7657 は良好な経口吸収活性（バイオアベイラビリティ）を示した。よって、ASP7647 は経口投与によって生体内で十分な EP4 受容体 antagonist 活性を発揮する血中暴露量を確保できる可能性が高いことが示唆された。

PGE<sub>2</sub> は、EP4 受容体を介した LPS 誘発 TNF- $\alpha$  放出を抑制することが報告されている（Wall et al., 2009）。そこで、生体内における ASP7657 経口投与後の PGE<sub>2</sub> に対する阻害活性を推定するために、*ex vivo* 評価系でこの生理学的反応に対する ASP7657 の効果を調べた。ASP7657 経口投与後のラット全血において、LPS 誘発 TNF- $\alpha$  放出に対する PGE<sub>2</sub> を介した抑制作用は ASP6757 用量依存的に、かつ有意に拮抗された。このことは、ラット生体内において PGE<sub>2</sub> により誘発される生理反応に対し、ASP7657 が EP4 受容体 antagonist 作用を介して抑制し得る血中濃度を経口投与により獲得できることを示唆する結果で

あり、ASP7657 の薬物体内動態結果と一致していた。また、本結果からは、*in vivo* モデルにおいて ASP7657 は経口投与によって有効性を示すことができる可能性が高いと期待された。

本章における *in vitro*、pharmacokinetics および *ex vivo* 実験における検討結果から、ASP7657 は高い親和性で強力かつ選択的に EP4 受容体を拮抗することができ、また経口投与によって生体内で EP4 antagonist 活性を発揮する可能性が高い有望な EP4 antagonist であることを提示することができたと考えている。

**Table 2.** Affinity of ASP7657 for rat and human EP4 receptors.

	$K_i$ (nM)	
	Rat	Human
ASP7657	6.02 (4.72 – 7.68)	2.21 (1.38 – 3.55)
PGE <sub>2</sub>	not tested	3.47 (2.98 – 4.04)

Values are geometric mean with 95% confidence limits of three independent experiments.

PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E2.

**Table 3.** Effect of ASP7657 on rat and human EP receptor subtype-induced  $[Ca^{2+}]_i$  and cAMP activity.

IC <sub>50</sub> (nM)				
Rat			Human	
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>		cAMP		
EP1	EP3	EP2	EP4	
>2500	>2500	>1000	0.86 (0.24 – 3.08)	
			0.29 (0.03 – 2.46)	

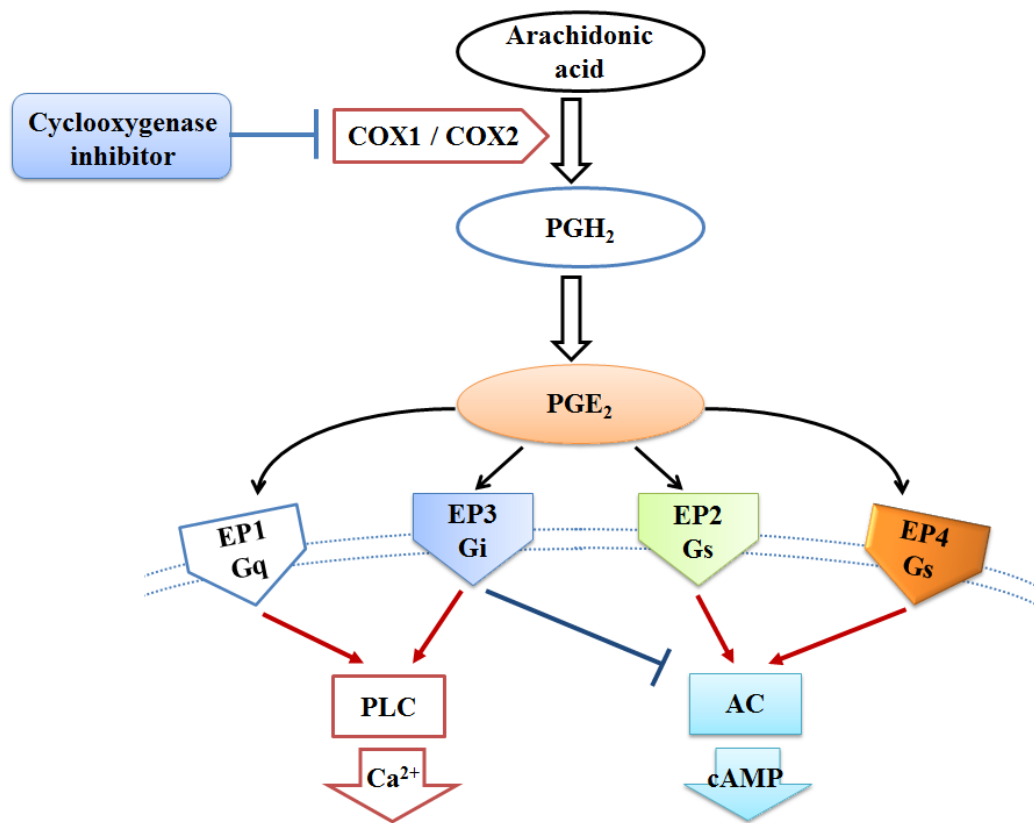
Values are geometric mean with 95% confidence limits of three independent experiments.



**Table 4.** Receptor selectivity profile of ASP7657.

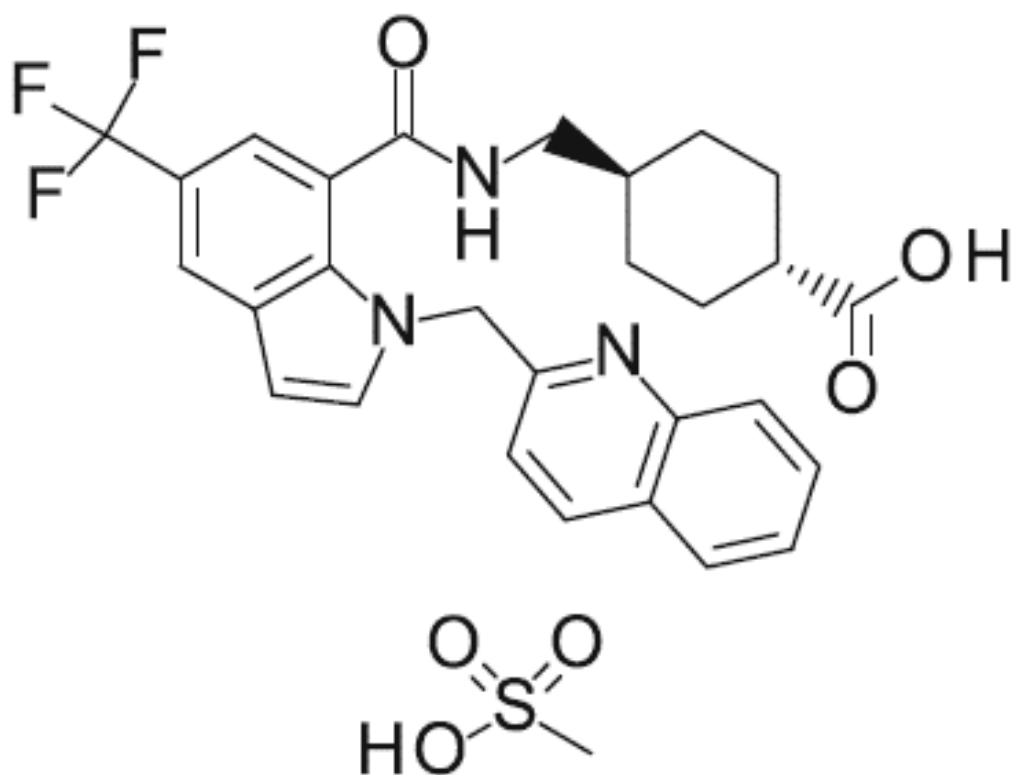
Receptor	Subtype (species)	IC <sub>50</sub> (nM)	Receptor	Subtype (species)	IC <sub>50</sub> (nM)
Adenosine	A1 (Rat)	>1,000	Leukotriene	B4 (Guinea pig)	>1,000
Adrenergic	$\alpha$ 1 (Rat)	>1,000		D4 (Guinea pig)	>1,000
	$\alpha$ 2 (Rat)	>1,000	Melatonin	MT1 (Human)	>1,000
	$\beta$ (Rat)	>1,000	Muscarinic	M1 (Human)	>1,000
CCK	A (Human)	>1,000		M2 (Human)	>1,000
	B (Human)	>1,000	Neurokinin	NK1 (Human)	>1,000
CRF	1 (Human)	>1,000		NK2 (Human)	>1,000
Dopamine	D1 (Rat)	>1,000		NK3 (Human)	>1,000
	D2 (Human)	>1,000	Nicotinic	(Rat)	>1,000
Estrogen	(Rat)	>1,000	Opiate	$\mu$ (Human)	>1,000
Endothelin	ETA (Human)	>1,000	Oxytocin	(Rat)	>1,000
	ETB (Human)	>1,000	PAF	(Rabbit)	>1,000
GABA	A (Rat)	>1,000	Prostanoid	CRTH2 (Human)	>1,000
	B (Rat)	>1,000		DP (Human)	>1,000
Glutamate	AMPA (Rat)	>1,000		EP2 (Human)	>1,000
	Kainate (Rat)	>1,000		EP3 (Human)	>1,000
	NMDA (Rat)	>1,000	Serotonin	(Human)	>1,000
Glycine	(Rat)	>1,000	Sigma	(Guinea pig)	>1,000
Histamine	H1 (Guinea pig)	>1,000	Testosterone	(Human)	>1,000
	H2 (Rat)	>1,000	Vasopressin	V1 (Rat)	>1,000
	H3 (Rat)	>1,000	VIP	1 (Human)	>1,000

Values are expressed as the mean value of duplicate assays.

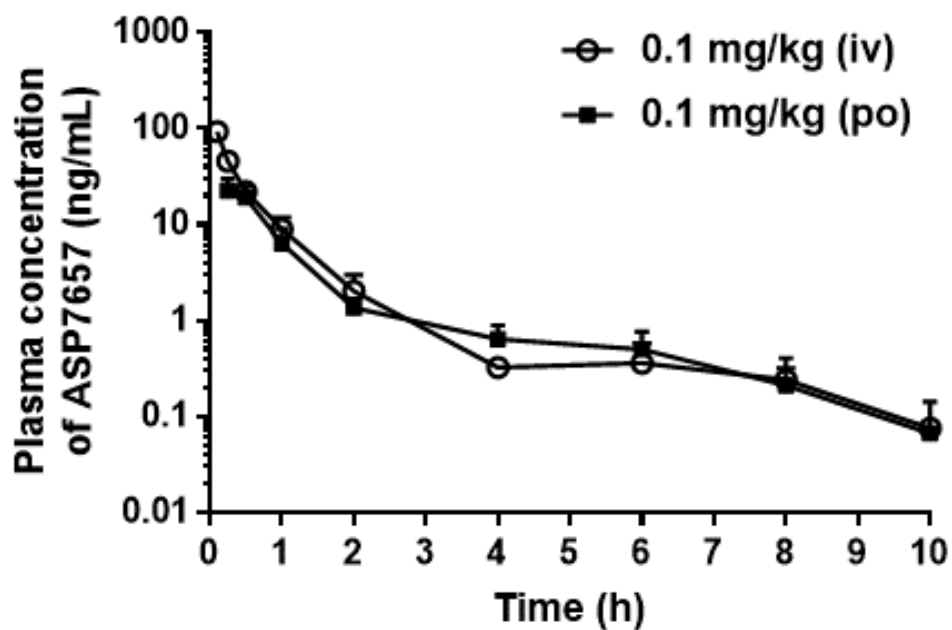


**Figure 5.** PGE<sub>2</sub> synthesis pathway and signaling cascade of each EP receptor.

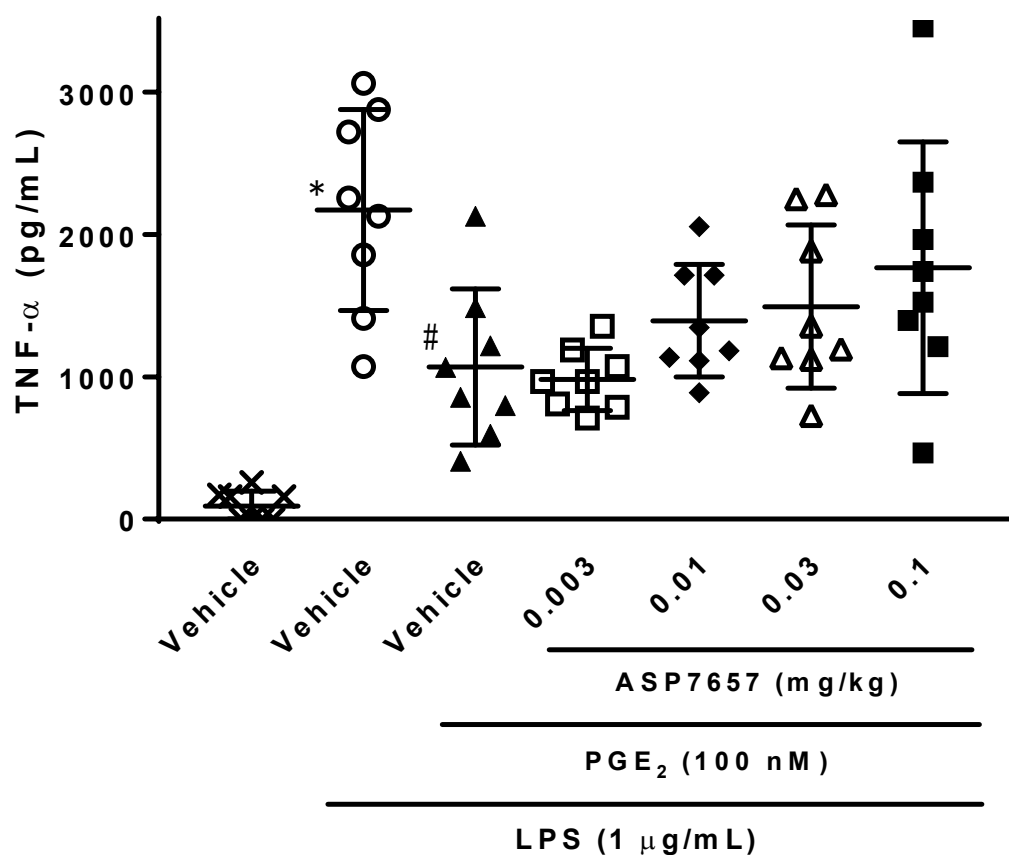
COX: Cyclooxygenase, PLC: Phospholipase C, AC: Adenylate cyclase.



**Figure 6.** Chemical structure of ASP7657, *trans*-4-[(1-((5-(trifluoromethyl)-1H-indol-7-yl)methyl)amino)-2-quinolin-2-ylmethyl]cyclohexanecarboxylic acid methanesulfonate (1:1).



**Figure 7.** Pharmacokinetics of ASP7657 in SD rats. ASP7657 (0.1 mg/kg) was intravenously (iv) or orally (po) administered to rats, and the time course of changes in ASP7657 plasma concentrations was measured. Each data point is expressed as the mean  $\pm$  SD for three animals.



**Figure 8.** Effect of single administration of ASP7657 on PGE<sub>2</sub>-mediated inhibition of LPS-induced TNF- $\alpha$  release from whole blood culture. ASP7657 was orally administered to rats, and blood was withdrawn 1 h after dosing. LPS (1  $\mu$ g/mL) and PGE<sub>2</sub> (100 nM) were added to cultured whole blood and TNF- $\alpha$  release was measured. The values are the mean  $\pm$  SD for eight animals in each group. \* $p < 0.05$  vs. normal group, # $p < 0.05$  vs. LPS group.

## 第二章 各種 CKD モデルにおける薬効評価と奏功機序の検討

## 第一節 背景

現在の臨床における高血圧を伴った糖尿病性腎症関連の CKD 患者に対する標準治療は ACE 阻害薬や ARB などのレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系阻害薬の処方となっている。一方で、ACE 阻害薬や ARB は糖尿病性腎症に関連した CKD のグレード進行の遅延に貢献はしているものの、その効果は十分なものではなく (Fioretto et al., 2010)、心血管疾患の罹患率と死亡率の絶対リスクは未だ高いままとなっている (Lambers Heerspink and de Zeeuw, 2013)。したがって、糖尿病を伴う CKD の進行を防ぐための代替療法を開発する強いニーズが未だに存在すると考えられる。

糸球体障害が発生する主なメカニズムの 1 つは、糸球体過剰濾過による糸球体負荷の増大によるものとの報告がある (Pistrosch et al., 2005)。現在までに、多くの研究が糖尿病性腎症を含む CKD 病態に対する ACE 阻害薬と ARB の腎保護効果は、少なくとも一部は糸球体内圧上昇を伴った糸球体過剰濾過の是正が寄与している可能性を報告している (Parving et al., 2001)。PGE<sub>2</sub> が EP4 受容体を介して糸球体過剰濾過にも関与することを示す報告がある。PGE<sub>2</sub> は、EP4 受容体を介して輸入細動脈の血管拡張を引き起こす (Purdy and Arendshorst, 2000)。さらに、PGE<sub>2</sub> は傍糸球体装置からのレニン分泌を引き起こし、アンジオテンシン II 産生量の増加をもたらす (Jensen et al., 1996)。アンジオテンシン II 産生量の増加は次いで腎輸出細動脈の収縮を誘導する。これらのメカニズムに基づいて、PGE<sub>2</sub> は EP4 受容体を介して糸球体内圧上昇を引き起こすことで糸球体過剰濾過の誘発に関与している可能性がある。よって、EP4 antagonist 投与により糸球体過剰濾過が是正されることが期待される。

糸球体のバリア機能を担う podocyte における EP4 受容体選択的 KO は、CKD モデルラットにおける podocyte 障害を軽減することが報告されている (Stitt-Cavanagh et al., 2010)。Podocyte 障害は CKD の診断基準ともなっている

尿中へのタンパク漏出を引き起こすことから、EP4 antagonist は CKD における尿中タンパク排泄に対し抑制作用を発揮することが期待される。また、EP4 受容体 agonist の慢性投与は、糖尿病性腎症における糸球体硬化と間質性線維化に強く相関する線維化促進サイトカインである TGF- $\beta$ 1 の発現を増強する (Mohamed et al., 2013)。さらに、EP4 受容体 antagonist は TGF- $\beta$ 1 によって誘導される podocyte の分化を抑制することも報告されている (Thieme et al., 2017)。EP4 受容体を過剰発現するマウスメサンギウム細胞において、TGF- $\beta$ 1 誘導性の細胞外マトリックス (ECM)、I 型コラーゲンおよびフィブロネクチンの蓄積が増加すること、さらに EP4 受容体ヘテロ KO マウスにおける腎臓部分摘出による腎不全モデルでは腎機能低下および線維化を含む病理学的変化に対する改善効果が観察されたことから、PGE<sub>2</sub> は EP4 受容体を介して糸球体メサンギウム細胞における ECM の蓄積、さらには腎臓の線維化に寄与する可能性があることが示唆されている (Yang et al., 2014)。以上の報告から、EP4 受容体選択的 antagonist は、上記のメカニズムを通じて糖尿病性腎症に関連した CKD の進展を抑制できる可能性が高いと推察される (Fig. 9)。

本章においては、第一章の研究で見い出した新規 EP4 選択的 antagonist である ASP7657 の CKD 進展抑制薬としての可能性を各種腎疾患モデル動物において評価することにより検証することとした。まずは、高血糖、インスリン抵抗性、高脂血症、炎症、肥満などの典型的な糖尿病症状だけでなく、糸球体過濾過とアルブミン尿を伴う初期糖尿病性腎症を呈する 2 型糖尿病 db/db マウス (Park et al, 2006; Sharma et al., 2003, Fig. 10) において、ASP7657 の薬効評価を実施した。一方で db/db マウスは初期の糖尿病性腎症モデルであり、糸球体過濾過機能の低下は観察されない腎疾患モデルとなっている。CKD 治療薬としての適応取得を目指した臨床試験において治療ターゲットとなるのは、CDK グレードが G3 以上に進展し、糸球体過濾過機能の低下が観察される患者



となる可能性が高いことから、EP4 antagonist の CKD グレードが進展した患者に対する治療効果を検証する上で、より腎機能の低下が進展した動物モデルでの薬効検証が必要であると考えられた (Brenner et al., 2001; Lewis et al., 2001)。そこで、重度に腎機能が低下する後期 CKD モデルである 5/6 腎摘 (Nx) ラットモデル (Fig. 10) における ASP7657 の薬効評価も実施した。

最後に、ASP7657 の CKD 病態に対する奏功機序解明を目的として、現在想定している EP4 antagonist の腎臓における機序 (Fig. 9) のうち、レニン分泌に対する効果および腎血行動態に対する効果の検討も併せて実施した。

## 第二節 実験項

### 試薬

ASP7657、*trans*-4-[(1-(quinolin-2-ylmethyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-indol-7-yl) carbonyl] amino) methyl] cyclohexanecarboxylic acid methanesulfonate (1:1) および EP4 受容体選択的アゴニストである ONO-4819 (Fig. 11) (Kasai et al., 2001) は、アステラス製薬株式会社（茨城、日本）にて合成された。ASP7657 は、経口投与用に 0.5% MC 溶液にて懸濁、または静脈注射用に 2 mM NaOH を含む生理食塩水で溶解させ実験に供した。ONO-4819 は生理食塩水にて溶解させ使用した。ストレプトゾトシン (STZ) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。ロサルタンカリウム (Fig. 12) は、LKT Laboratories, Inc. (St. Paul, MN, USA) から購入し、0.5% MC 溶液にて溶解後に実験に供した。

### 動物

雄性 db/db 2 型糖尿病マウスおよび雄性 db/+m 正常対照マウスは、7 週齢で CLEA Japan Inc. (東京、日本) から購入した。db/db マウスは、ASP7657 投与開始前に各グループが同様の血中グルコース濃度となるようにグループ分けされた。雄性 Wistar ラットは、チャールズリバーラボラトリーズジャパン（神奈川、日本）またはジャパン SLC Inc. (静岡、日本) から 7~8 週齢で購入した。雄性 SD ラットは 6 週齢で Japan SLC Inc. (静岡、日本) から購入した。すべての動物は、温度、湿度、明度（12 時間の明暗サイクル）が制御された条件下で、また標準的な市販の食餌と水を自由に摂取できる条件下で飼育した。動物実験は the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International から認定を受けているアステラス製薬筑波研究センターの施設内動物管理使用委員会から承認を受け、実施した。

## 2 型糖尿病マウス (db/db マウス) におけるアルブミン尿に対する ASP7657 の反復投与の効果

ASP7657 (0.001-0.1 mg/kg) を db/db マウスに 1 日に 1 回、4 週間経口投与した。グループの構成は以下の通りであった。

- (1) db/+m with vehicle (Normal, n = 5)
- (2) db/db with vehicle (Control, n = 11)
- (3) db/db with ASP7657 at 0.001 mg/kg (n = 11)
- (4) db/db with ASP7657 at 0.01 mg/kg (n = 11)
- (5) db/db with ASP7657 at 0.1 mg/kg (n = 11)

2 週目と 4 週目の時点で、マウスを採尿ケージ内に格納し、尿を 24 時間採取した。4 週目の時点で採血を実施し、血液サンプルを取得した。血糖値は Glucose CII test reagent (Wako Pure Chemical Industries, 大阪, 日本) を使用し測定した。血漿および尿のクレアチニン濃度は、自動分析装置 (Hitachi 7180, Hitachi High-Technologies Corporation, 東京, 日本) を使用して測定した。また、尿中アルブミン濃度は ELISA キット (Shibayagi, 群馬, 日本) を使用して測定した。

## 5/6 腎摘出 (Nx) ラットにおける ASP7657 の腎保護効果の検討

7 週齢の雄性 Wistar ラットを実験に使用した。ペントバルビタール麻酔下において、左腎臓の 3 分の 2 を切除後止血、その 1 週間後に対側の右腎を全摘出し、5/6 Nx ラットを作成した (Fig. 13)。5/6 Nx を完成させた最終手術の 2 週間後、ラットを代謝ケージ内に格納し、24 時間尿を採取し、その後採血により血液サンプルを取得した。実験開始前 pre 値として、タンパク分析試薬 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を使用して尿中タンパク濃度を、また血漿および尿クレアチニン、血中尿素窒素 (BUN) 濃度を Hitachi 7180 自

動分析装置 (Hitachi High-Technologies Corporation、東京、日本) を使用して測定した。5/6 Nx ラットは、尿中タンパク排泄率、血漿クレアチニンおよび BUN 濃度、尿量、体重がグループ間で均一になるようにグループ分けされた。グループの構成は以下の通りであった。

- (1) sham with vehicle (Sham, n = 7)
- (2) 5/6Nx with vehicle (Control, n = 15)
- (3) 5/6Nx with ASP7657 at 0.001 mg/kg (n = 15)
- (4) 5/6Nx with ASP7657 at 0.01 mg/kg (n = 15)
- (5) 5/6Nx with ASP7657 at 0.1 mg/kg (n = 15)
- (6) 5/6Nx with losartan potassium at 10 mg/kg (n = 15)

ASP7657 およびロサルタンを 5/6 Nx ラットに 1 日 1 回 8 週間経口投与した。体重は毎週測定した。2、4、6 および 8 週目に、ラットを代謝ケージに格納し、24 時間尿タンパク排泄および尿中クレアチニン濃度を測定した。6 週目と 8 週目に採血を実施し、血漿クレアチニンと BUN 濃度を測定した。7 週目にテールカフ法 (BP-98AL; Softron Inc., 東京、日本) により収縮期血圧 (SBP) を測定した。8 週目の最終薬物投与の約 24 時間後にイソフルラン麻酔下で腹部大静脈から血液サンプルを採取した。その後、左腎臓を摘出し重量を測定した。左腎臓は重量測定後に病理組織学的評価のために 10% 中性緩衝ホルマリン溶液中で固定した。標本の作製と組織病理学的検査は、アステラス製薬株式会社の安全性研究所 (茨城、日本) で実施した。10% の中性緩衝ホルマリンで固定された腎組織のスライスをパラフィン包埋し、厚さ 2  $\mu$ m の切片を作製した。これらの切片を、ヘマトキシリン・エオシン (HE) および PAS で染色した。各標本のすべての糸球体および顕微鏡領域全体を調べた。糸球体硬化度の程度を決定するために、PAS 染色切片においてメサンギウム領域拡張、ボウマン嚢拡張および分節性または全体的硬化に関しグレードを掛けることにより、

半定量的スコアを得た（グレード 0：障害なし、1：25% の障害、2：50% の障害、3：75% の障害、4：視野内の糸球体の全領域の障害）。尿細管間質の障害度を決定するために、HE 染色切片において尿細管肥厚および拡張、管腔内 cast 形成、尿細管上皮の好塩基性変化、硝子滴沈着、間質性線維化、そして炎症性細胞浸潤に関しグレードを掛けることにより、半定量的スコアを得た（グレード 0：障害なし、1：25% の障害、2：50% の障害、3：75% の障害、4：視野における腎皮質の全領域の障害）。

#### 正常ラットにおける血漿レニン活性に対する ASP7657 の効果の検討

本実験には、6 週齢の雄性 SD ラットを使用した。ASP7657 (0.003, 0.01, 0.03 mg/kg) をラットに経口投与し、薬物投与の 1 時間後に EP4 受容体選択的 agonist である ONO-4819 (0.01 mg/kg) を皮下注射した。ONO-4819 皮下投与の 10 分後に断頭により血液サンプルを採取した。アンギオテンシン I の血漿中濃度をアステラス製薬株式会社（茨城、日本）で作成された ELISA キットを使用して測定し、1 時間当たりのアンギオテンシン I の産生量を血漿レニン活性 (PRA) として算出し、レニン分泌量の指標とした (Fig. 14)。

#### STZ 投与 1 型糖尿病ラットの腎血行動態に対する ASP7657 の効果の検討

本実験には、8 週齢の雄性 Wistar ラットを使用した。本実験のタイムテーブルを Fig. 15 に示す。STZ は、1.5 mM クエン酸バッファーにて溶解後に、50 mg/kg で尾静脈内投与した。STZ 投与の 2、3 週間後、ラットに inactin (100 mg/kg) を腹腔内投与することにより麻酔を施し、左大腿動脈に採血用または血圧測定用のカテーテルを挿入した。血圧は血圧センサー (AP-612G、日本光電、東京、日本) を用いてモニターした。薬物投与のために、別のカテーテルを左大腿静脈に挿入した。その後、クレアチニン (100 mg/kg) を静脈内注射し、

その後、試験期間の残りの期間中、1% クレアチニン、2.5% グルコース、0.45% NaCl 溶液を持続注入 (1.2 mL/h/100 gBW) した。脇腹の皮膚および筋層を切開し、左腎動脈を周囲の組織から分離後に、除神経を目的として 5% フェノール溶液を左腎動脈周囲に塗布した。電磁血流計プローブを左腎動脈に取り付けて、磁気血流計 (MVF-3100、日本光電、東京、日本) を使用して腎血流 (RBF) を経時的に測定した。最後に尿を採取する目的で左尿管にカテーテルを挿入した。1 時間の安定化期間の後、尿を 20 分間 (-20 分から 0 分まで) 収集した。薬物投与の 10 分前に血液サンプルを採取した。これらの尿および血液のデータは、ベースライン値として使用した。ASP7657 (0.1 mg/kg) または溶媒を静脈内投与 (0 分) した後、20 分間連続 2 セット (0~20 分および 20~40 分) の尿採取を行った。薬物投与の 10 分後と 30 分後に血液サンプルを採取した。RBF、収縮期血圧 (SBP) および拡張期血圧 (DBP) は、本実験中経時的に測定された。平均血圧 (MBP) は、SBP および DBP 値を使用して計算した。腎血管抵抗 (RVR) は、MBP を RBF で除すことで計算した。グループ構成は次のとおりであった。

(1) Normal: STZ-untreated rats injected with vehicle (n=7)

(2) Vehicle: STZ-treated rats injected with vehicle (n=8)

(3) ASP7657: STZ-treated rats injected with ASP7657 (n=7)

血漿および尿中のクレアチニン濃度は、CRE-ENKAINOS<sup>®</sup> (KAINOS Laboratories Inc.、東京、日本) を使用して測定した。曲線下面積 (AUC) は、クレアチニークリアランス (CCr)、RBF、MBP および RVR の経時的な変化率から計算した。

## 統計解析

実験結果は、mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) または standard deviation

(SD) で表記した。Student's t-test を使用して 2 つのグループ間の差を解析した。Dunnett の多重比較テストは、複数のグループ間の比較に使用した。病理組織学的スコアは、2 つのグループ間の差異を分析するために Mann-Whitney テストを使用して比較した。有意差検定は  $p < 0.05$  の値を有意差有りとみなした。統計およびデータ分析は、SAS 9.1.3 ソフトウェアパッケージ (SAS Institute Japan, Ltd., Tokyo, Japan) または GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を使用して実施した

### 第三節 結果

#### 2 型糖尿病マウス (db/db マウス) におけるアルブミン尿に対する ASP7657 の反復投与の効果

正常対照 db/+m マウスと比較して、2 型糖尿病 db/db マウスは、高血糖値 (糖尿病) および体重増加 (肥満) を呈することが確認された。また db/db マウスにおいて、CCr 値の増加が観察されたことから、本マウスは糸球体過剰濾過を呈することが示唆された (Table 5)。ASP7657 (0.001-0.1 mg/kg) を 4 週間繰り返し経口投与した結果、上述の各パラメーター変動に影響を与えることはなかった。対照的に、ASP7657 は投与用量依存的に尿中アルブミン排泄を抑制した。これらの効果は、0.01 mg/kg 以上の用量で顕著であった (Fig. 16)。試験期間中に死亡または重篤な有害事象は観察されなかった。また、ASP7657 は、運動性、活動性などの一般的なパラメーターに影響を与えなかった。

#### 5/6 Nx ラットにおける ASP7657 の腎保護効果の検討

正常ラットと比較して、5/6 Nx ラットにおいては尿中タンパク排泄率の経時的な増加が観察された (Fig. 17)。ASP7657 (0.01-0.1 mg/kg) の 1 日 1 回反復経口投与により、尿中タンパク排泄率の上昇が用量依存的に抑制され、またその効果は投与開始 8 週目において 0.01 mg/kg 以上の用量で有意であった。

ロサルタン (10 mg/kg) においても、高用量の ASP7657 とほぼ同等の強度で尿中タンパク排泄率の増加を有意に抑制した。5/6 Nx ラットは、クレアチニンと BUN の血漿濃度の有意な増加と CCr 値の有意な減少を示し、経時的な糸球体濾過能の低下が観察された (Fig. 18)。ロサルタンは、これら糸球体濾過機能に関するパラメーター変動に対し有意な改善作用を示し、ASP7657 は改善傾向を示した。さらに、5/6 Nx ラットは正常ラットと比して体重の有意な減少と、尿量および腎重量体重比の有意な増加、SBP の有意な上昇を示した (Table



6)。本モデルにおける腎重量の増加は腎臓の肥大を反映している。ロサルタンは、腎重量の増加を有意に抑制し、また高血圧も有意に改善した。ASP7657は腎重量の増大を有意に抑制したが、一方で血圧に対する降圧効果は有意ではなく、ロサルタンよりもはるかに弱かった。どちらの薬物も体重または尿量に対しては有意な影響を与えなかった (Table 6)。

5/6 Nx ラットは、顕著な糸球体硬化と尿細管周囲病変を呈した (Fig. 19 A – C)。5/6 Nx ラットの糸球体周囲の尿細管は重度に変性しており、尿細管内腔は拡張していた。さらに 5/6 Nx ラットの尿細管間質で炎症細胞の顕著な浸潤が観察され、重度の線維化病変も確認された。ASP7657 投与群において、組織病理学的糸球体硬化スコアおよび線維化、炎症性細胞浸潤を含む尿細管間質病変スコアが用量依存的かつ 0.1 mg/kg 投与群では有意に改善された (Fig. 19 D, E)。ロサルタン投与群に関しても、これらの病理組織学的病変に対する有意な改善作用が観察された (Fig. 19 D, E)。

#### 正常ラットにおける血漿レニン活性に対する ASP7657 の効果の検討

EP4 受容体選択的 agonist である ONO-4819 の皮下投与により、アンギオテンシン I の 1 時間あたりの産生量として算出された PRA が有意に上昇した (Fig. 20)。一方で ASP7657 (0.003-0.03 mg/kg) の併用投与により、PRA の上昇は用量依存的に抑制され、その効果は ASP7657 0.01 mg/kg 以上の用量で有意であった。

#### STZ 投与糖尿病ラットの腎血行動態に対する ASP7657 の効果の検討

STZ の投与は、膵臓機能障害に起因したインスリン分泌不全による高血糖や糖尿病性腎症によるアルブミン尿などの合併症を含む、さまざまな典型的な糖尿病の異常を引き起こす (Tahara et al., 2014)。本実験において、STZ 投与

ラット (vehicle および ASP7657 投与群) のベースラインの CCr は正常ラットのベースライン値と比べて有意に上昇しており、糸球体過剰濾過が起きていることが示唆された (Table 7)。また、STZ ラットは RBF の増加傾向を示し、RVR および MBP においては有意な減少が観察された (Table 7)。STZ ラットに vehicle、または ASP7657 (0.1 mg/kg) を静脈内投与した後の CCr、RBF、MBP、RVR のベースライン値からの変化量を Fig. 21 に、また各パラメーターのベースライン値からの変化率を Fig. 22 に示す。STZ 投与ラットの CCr は、ASP7657 投与後 20 分および 40 分でそれぞれベースライン値から 11% および 8% 減少したが、vehicle 投与群においては変化率の減少は観察されなかった (20 分後、40 分後でそれぞれ 4% および 6% 増加、Fig. 22)。ASP7657 投与群の CCr 変化率の  $AUC_{0-40 \text{ min}}$  は、vehicle 群の値に比して有意に減少していた (ASP7657 群 :  $-302.0 \pm 63.6\% \cdot \text{min}$ , vehicle 群 :  $142.5 \pm 131.0\% \cdot \text{min}$ , Fig. 22)。一方、ASP7657 は本実験期間を通して RBF、MBP および RVR に顕著な影響を及ぼさなかった (Fig. 21, 22)。RBF、MBP、RVR のベースライン値からの変化率における  $AUC_{0-40 \text{ min}}$  に関しては ASP7657 投与群および vehicle 投与群との間で有意な差はなかった (data not shown)。以上の結果から、STZ 投与ラットにおいて、ASP7657 は RBF、MBP または RVR に顕著な影響を与えることなく、CCr の上昇抑制、つまり糸球体過剰濾過に対する是正作用を示したと考えられた。

#### 第四節 考察

現在、CKD の発症率は着実に増加しており、心血管疾患合併のリスク、死亡率上昇の観点から臨床において大きな問題となっている (Hill et al., 2012; van Dieren et al., 2010, Coresh et al., 2007)。一方で実験的および臨床的な側面からの研究結果が ACE 阻害薬と ARB が CKD の進展を抑制するのに効果的であることを示している (Macconi et al., 2010; Berl et al., 2009)。したがって、これらのレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS) 阻害薬は、現在、高血圧を伴った糖尿病性腎症治療の gold standard として受け入れられている。しかしながら、CKD の進展を防ぐには現在の治療戦略では不十分であることも認識されている (Lambers Heerspink and de Zeeuw, 2013)。したがって、標準の RAAS 阻害薬治療に代わる新しい単独療法または RAAS 阻害薬療法に対する追加療法を見出すことは、依然として大きな課題となっている。近年、PGE<sub>2</sub> が EP4 受容体を介した糸球体血行動態およびレニン放出を含む腎機能の調節において多様かつ重要な役割を果たすことを多くの実験的証拠が示唆している。よって、PGE<sub>2</sub>-EP4 受容体経路は、糖尿病性腎症および CKD を含む腎疾患に対する有望な治療標的となり得ると考えられた。本研究では、早期糖尿病性腎症モデルである db/db マウスおよび後期 CKD モデルである 5/6 Nx ラットに対する EP4 受容体選択的 antagonist である ASP7657 の腎保護効果を検証し、その腎保護効果に関与する可能性が考えられる奏功機序の解明を目的として実施した。

早期糖尿病性腎症モデルである db/db マウスにおいて、ASP7657 を 1 日 1 回 4 週間連続経口投与すると、血糖値に影響を与えることなく、アルブミン尿が ASP7657 投与用量依存的に有意に減少した。これは、ASP7657 が本モデルにおける腎障害の主要因である高血糖には直接影響することなくアルブミンの尿中への漏出を抑制する、つまり、ASP7657 は高血糖により誘導される糸球

体障害を是正し得ることが示唆されたと考えている。

db/db マウスは早期糖尿病性腎症モデルであり、糸球体濾過率の低下は伴わないことが報告されており (Betz B and Conway BR, 2014)、本研究においても同様の結果が観察された。一方で、5/6 Nx モデルは後期 CKD の病態進展メカニズム、つまり有効機能ネフロン数の減少を伴った進行性の糸球体濾過機能低下を防ぐための治療アプローチ研究に汎用されるモデルである。5/6Nx モデルにおいて、全身性高血圧および尿中タンパク排泄の増加は、糸球体硬化や尿細管間質線維化などの腎組織障害ならびに腎臓における炎症性および線維性因子の発現増加に寄与していることが報告されている (Helal et al., 2012)。本研究においても、5/6 Nx ラットにおいてタンパク尿の増加およびクレアチニンと BUN の血漿濃度の上昇と CCr の低下が確認されことから、糸球体バリア機能さらには糸球体濾過機能が進行性に悪化することが確認できた。本研究において、5/6Nx ラットの進行性の腎機能低下には、高血圧、腎肥大、糸球体メサングウム細胞の増殖、メサングウム領域におけるマトリックスの蓄積、巣状分節性糸球体硬化、尿細管上皮細胞変性、萎縮、尿細管間質線維化などの CKD における典型的な病理学的変化が伴っていた。今回の研究における 5/6Nx ラットで観察されたこれらの病理学的変化は、既に報告されている 5/6Nx モデルの研究結果と一致しており (Kondo et al., 2014)、また CKD 患者で観察される病態とも類似している (Kliem et al., 1996)。本 5/6Nx ラットモデルにおいて、ASP7657 はタンパク尿の増加を有意に抑制し、また血漿クレアチニンおよび BUN 濃度の上昇に対し改善傾向を示したことから、腎機能低下を改善することが示唆された。さらに、ASP7657 は本モデルにおける腎肥大、糸球体硬化、尿細管間質線維化を含む尿細管障害に対しても改善作用を示した。今回 ASP7657 が改善作用を示した腎病理学的所見は、CKD の進行と高度に相関しており、末期腎臓病 (ESRD) への最終的な final common pathway と見なされ

ている (Hodgkins and Schnaper, 2012; Fine and Normal, 2008)。したがって、ASP7657 の腎機能低下抑制作用は、病理組織学的変化の改善と関連している可能性があり、ASP7657 は ESRD への CKD グレード進展を抑制できる可能性があることが期待される。臨床において、高血圧を伴った糖尿病性腎症に対する適応を既に取得しているロサルタンは、本モデルにおいて有意な腎保護効果を示し、タンパク尿、腎機能低下および組織病理学的所見に対して、高用量の ASP7657 と同等の有効性を示した。本研究で観察されたロサルタンのこれらの腎保護効果は、以前報告された研究結果と一致している (Jian et al., 2013)。本研究における ASP7657 とロサルタンの有効性比較から、ASP7657 がロサルタンに匹敵する有効性で CKD の進行を抑制する可能性があることが期待される。またはロサルタンに上乗せ投与することで、さらなる腎保護効果を獲得できる可能性も考えられる。

5/6Nx ラットモデルにおける腎臓部分摘出術により、または CKD 患者における有効機能ネフロン数の減少により、残存ネフロンの糸球体においては代償性過剰濾過が誘導され、残存腎臓全体での濾過機能を維持しようとする機構が働く。この糸球体過剰濾過の持続は、糸球体内圧上昇とそれに続く糸球体硬化を伴う糸球体濾過機能のさらなる低下を引き起こす一因となる (Fogo, 2007)。したがって、糸球体過剰濾過をもたらす糸球体周辺行動態異常は、CKD の発症と進展に重要な役割を果たす可能性がある。CKD 病態における残存ネフロンの糸球体過剰濾過のメカニズムは十分に確立されていないが、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、一酸化窒素および PGE<sub>2</sub> などの因子による輸入細動脈の血管拡張 (Kikkawa et al., 1993; Sugimoto et al., 1998; Nasrallah et al., 2016) および RAAS による輸出細動脈の血管収縮 (Nangaku and Fujita, 2008) が進展に関与していると考えられている。実際、ANP 受容体拮抗薬と RAAS 阻害薬の投与により、糸球体過剰濾過が軽減されることが報告されている

(Kikkawa et al., 1993; Helal et al., 2012)。特に、糸球体過剰濾過に関連する腎障害は RAAS の活性化と強く相関していることが知られており、これは CKD および CKD 関連合併症の発症、進展の一因である腎臓または全身の血行動態異常に繋がる (Fogo, 2007)。多くの動物実験結果は、ACE 阻害薬または ARB が糸球体過剰濾過を改善することにより腎障害の進行を抑制し得ることを示唆している。これは同時に、CKD 病態に対し効果的な介入の一つが糸球体過剰濾過と RAAS を標的にしていることを示唆している。さらに、報告によれば、PGE<sub>2</sub> は EP4 受容体を介して輸入細動脈の血管拡張作用を誘発し、糸球体過剰濾過の誘発に関与するとされている (Purdy and Arendshorst., 2000; Tang et al., 2000)。糸球体過剰濾過が起きていると考えられる STZ ラットにおいて、腎血行動態に対する ASP7657 の効果を検討した本研究では、ASP7657 は高血糖で誘発された糸球体過剰濾過を抑制することが明らかとなった。この結果より、有効機能ネフロン数が減少した 5/6Nx などの後期 CKD モデルラットにおける ASP7657 の腎保護効果は、残存ネフロンの糸球体過剰濾過の是正が一因である可能性があることを示唆している。さらに、これまでの研究では、PGE<sub>2</sub>-EP4 受容体経路が傍糸球体装置からのレニン分泌 (Friis et al., 2013)、および腎臓における RAAS の活性化 (Pöschke et al., 2012) に寄与していることが報告されている。実際、本研究において、ASP7657 は EP4 受容体アゴニストが誘発する PRA の上昇を抑制することが示唆された。これは、以前の研究の結果と一致する発見であった (Schweda et al., 2004)。したがって、本研究の 5/6Nx モデルで観察された ASP7657 の腎保護効果は、少なくとも部分的に腎臓の RAAS 活性化の阻害によって媒介されている可能性があると考えられる。しかしながら、本研究内で観察した ASP7657 のレニン分泌抑制作用は正常ラットにおける検討、また腎血行動態に対する ASP7657 の是正作用は早期糖尿病性腎症モデルである STZ ラットにおける検討で観察されたものであり、かつ双方の

作用とも投与後急性期での観察結果によるものであった。よって、臨床での治療対象と考えられる後期CKD病態におけるASP7657慢性投与時の腎臓RAAS活性、腎血行動態に対する薬理学的作用を正確に検証するためには、後期CKDモデルにおけるASP7657慢性投与時の腎臓RAAS活性や糸球体過剰濾過に対する作用を追加で検討する必要があると考えられる。また、5/6Nxモデルラットにおいて、ロサルタンは高血圧を有意に低下させ、一方でASP7657も血圧をわずかに低下させる傾向が観察されたが、ロサルタンに比較すると程度は小さかった。高血圧はCKD発症、進展の重要な独立した危険因子である観点からもRAAS阻害薬を含む降圧薬を使用した血圧の制御は、CKDの治療に効果的である(Ravera et al., 2006)。したがって、ロサルタンの腎保護効果は、少なくとも降圧作用によって媒介されている可能性が考えられる。対照的に、ASP7657は、全身血圧を大幅に低下させることなく腎保護効果を発揮することが提示されたことから、CKDにおいて腎局所的にRAASを抑制する可能性が示唆され、腎臓選択的な薬理作用を有する可能性も考えられる。ただし、5/6Nxラットモデルにおける今回の血圧測定は8週間の反復投与期間中の投与7週目の1つのポイントでのみでの測定実施であったことから、CKDモデルの全身血圧に対するASP7657のより正確な薬理効果を確認するには、今後、複数のタイムポイントでの血圧測定が必要であるとも考えている。

最近の研究により、5/6NxモデルにおけるEP4受容体のpodocyte特異的KO、またはEP4受容体antagonistの投与が、podocyte障害を軽減し、腎機能低下と病理学的組織変化を改善することが報告されている(Stitt-Cavanagh et al., 2010; Thieme et al., 2017)。さらに、EP4受容体agonistが、TNF- $\alpha$ およびMCP-1を含む炎症性サイトカイン、および糸球体硬化症や間質性線維症を含む腎障害の病因の変化に重要な役割を果たすTGF- $\beta$ 1の産生を増加させることが報告されている(Mohamed et al., 2013)。したがって、EP4受容体選択的antagonistは、

これら EP4 受容体を介した生理作用を遮断することにより腎障害を軽減する可能性もある。

結論として、本研究結果から PGE<sub>2</sub> が EP4 受容体を介して CKD の病態進展に対し重要な役割を果たすこと、および EP4 受容体選択的 antagonist である ASP7657 はレニン放出抑制を一因として糸球体周辺血行動態を改善することにより糸球体過剰濾過を是正し、糸球体障害の進展さらには CKD の進行を抑制する可能性が示唆された (Fig. 23)。したがって、ASP7657 は CKD 患者の治療において新たな有用な治療選択肢の一つとなる可能性があると期待される。



**Table 5.** Effects of repeated administration of ASP7657 on body weight, blood glucose, and renal function in type 2 diabetic mice.

	Normal	Diabetic	ASP7657		
	Vehicle	Vehicle	0.001 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg
Body weight (g)	28.1 ± 0.4	45.6 ± 0.7*	45.0 ± 0.5	45.7 ± 0.4	46.0 ± 0.7
Blood glucose (mg/dL)	209.3 ± 7.2	539.5 ± 8.8*	531.1 ± 9.3	529.4 ± 12.6	528.8 ± 10.5
Urine volume (mL/day)	1.37 ± 0.11	11.63 ± 0.69*	10.26 ± 0.99	10.86 ± 1.86	8.39 ± 1.04
Plasma creatinine (mg/dL)	0.068 ± 0.004	0.051 ± 0.003*	0.047 ± 0.003	0.048 ± 0.004	0.045 ± 0.002
Creatinine clearance (L/day)	0.665 ± 0.068	1.212 ± 0.071*	1.323 ± 0.096	1.443 ± 0.303	1.213 ± 0.122

ASP7657 was orally administered to diabetic mice once daily for 4 weeks. Data are expressed as the mean ± SEM for 5–11 animals in each group. \*p<0.05 vs. normal group.

**Table 6.** Effects of repeated administration of ASP7657 on body weight, urine volume, kidney weight, and systolic blood pressure in 5/6 nephrectomized (Nx) rats.

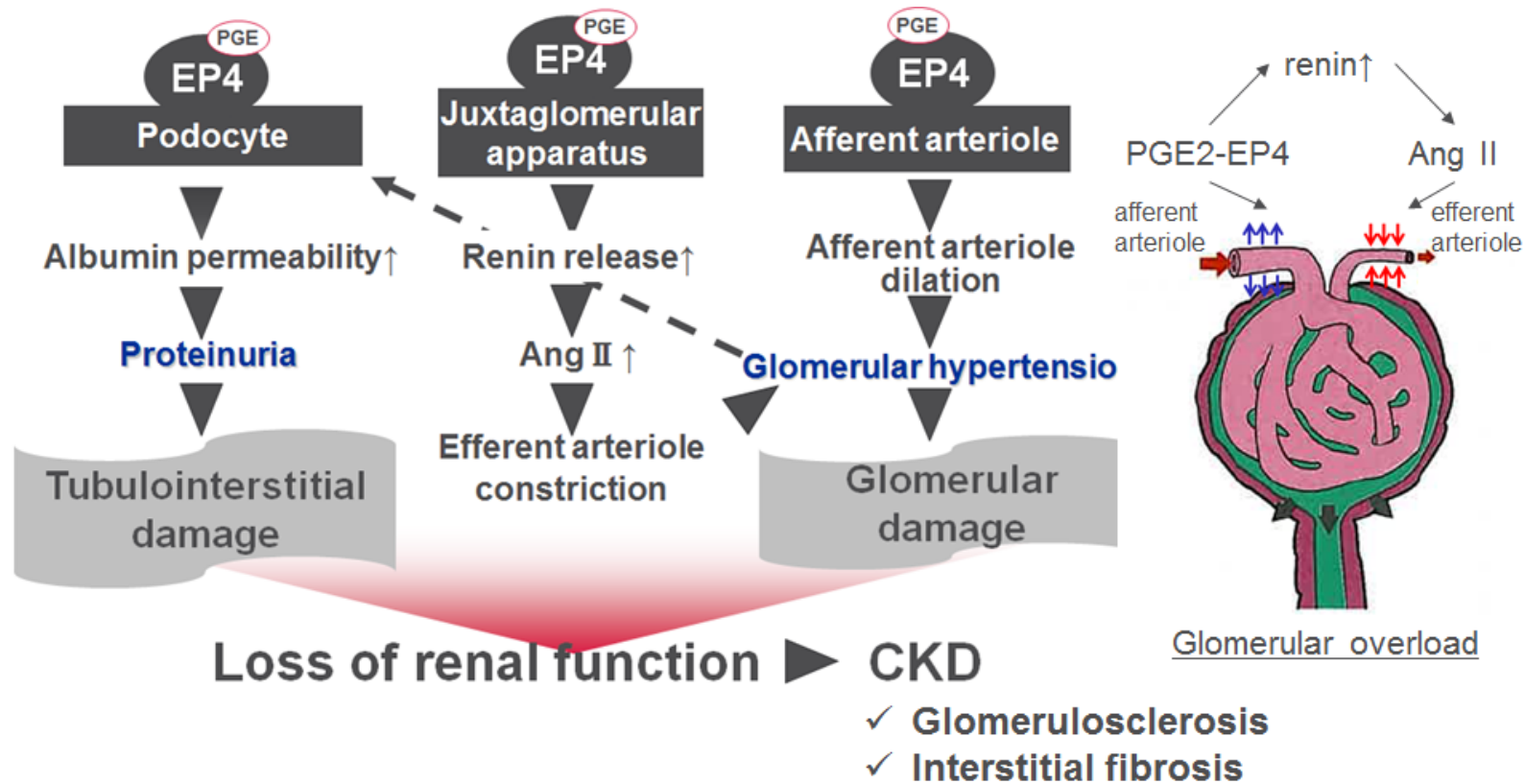
Parameter	Normal	5/6 Nx					
	Vehicle	Vehicle	ASP7657			Losartan	
			0.001 mg/kg	0kg		0.1 mg/kg	10 mg/kg
<i>n</i>	7	15	14	15		15	14
Week 8							
Body weight (g)	342 ± 5	291 ± 5*	290 ± 5	298 ± 4		298 ± 6	304 ± 5
Urine volume (mL/day)	10.1 ± 0.8	35.7 ± 1.2*	35.4 ± 1.2	37.0 ± 1.2		34.9 ± 1.9	36.7 ± 1.7
Left kidney weight (mg/g body weight)	3.39 ± 0.06	5.30 ± 0.13*	5.01 ± 0.08	4.97 ± 0.13		4.66 ± 0.13 <sup>#</sup>	4.72 ± 0.13 <sup>\$</sup>
Week 7							
Systolic blood pressure (mmHg)	133 ± 5	171 ± 6*	171 ± 4	168 ± 3		161 ± 5	149 ± 5 <sup>\$</sup>

Data indicate values obtained at week 7 or 8. ASP7657 and losartan were orally administered to 5/6 Nx rats once daily for 8 weeks. Values are mean ± SEM for 7–15 animals per group. \*P < 0.05 vs. normal group, # P < 0.05 vs. vehicle group, \$ P < 0.05 vs. vehicle group.

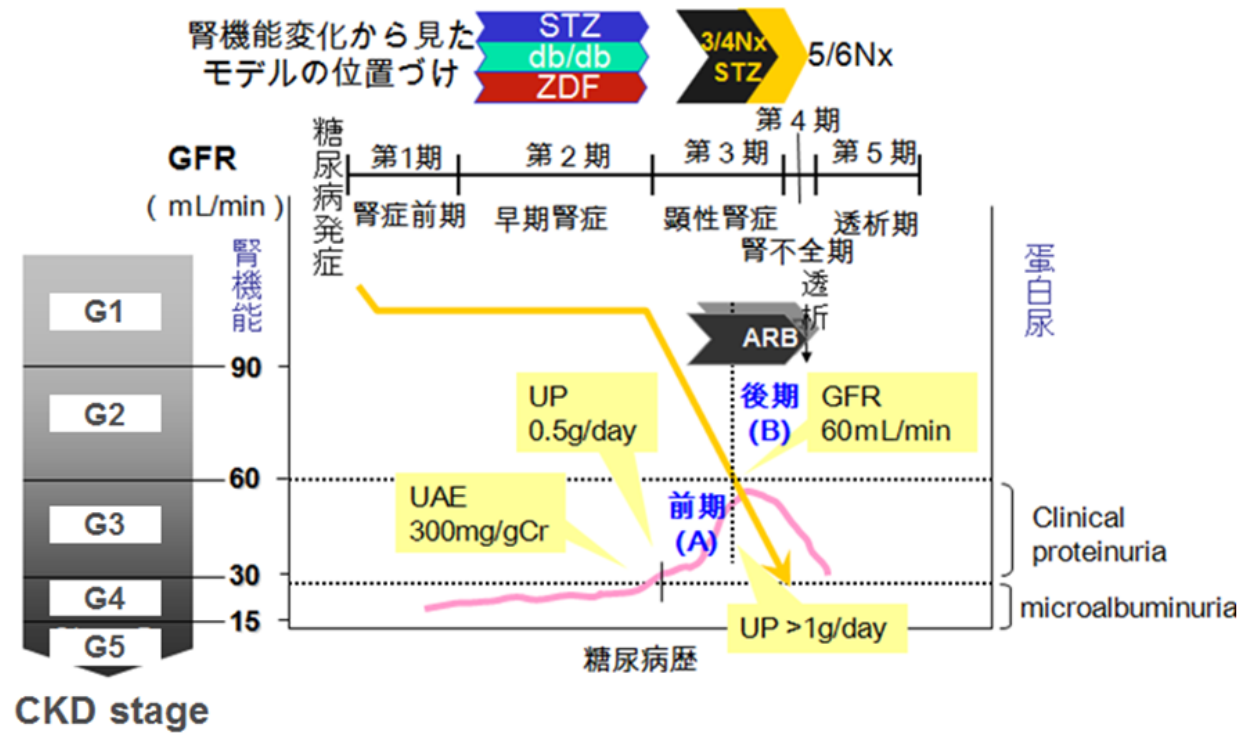
**Table 7.** Baseline creatinine clearance, renal blood flow, mean blood pressure, and renal vascular resistance in diabetic rats.

Parameter	Normal	Diabetic	
	Vehicle	Vehicle	ASP7657
Creatinine clearance (mL/min/100 g body weight)	0.46 ± 0.03	0.75 ± 0.06*	0.78 ± 0.05*
Renal blood flow (mL/min/100 g body weight)	2.04 ± 0.14	2.50 ± 0.14	2.60 ± 0.21
Mean blood pressure (mmHg)	98.7 ± 2.9	83.1 ± 2.7*	84.7 ± 4.5*
Renal vascular resistance (mmHg/mL/min)	12.53 ± 0.96	9.96 ± 0.58*	9.31 ± 0.40*

Values are mean ± SEM for 7–8 animals per group. \*P < 0.05 vs. normal group.

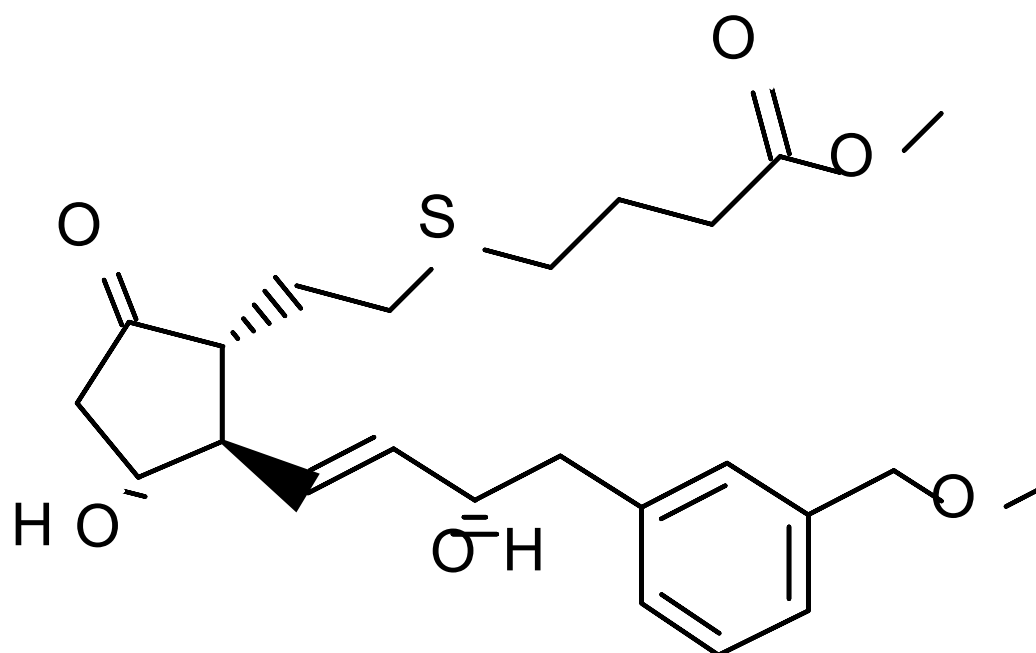


**Figure 9.** The involvement of PGE<sub>2</sub>-EP4 axis in the mechanism of CKD development.

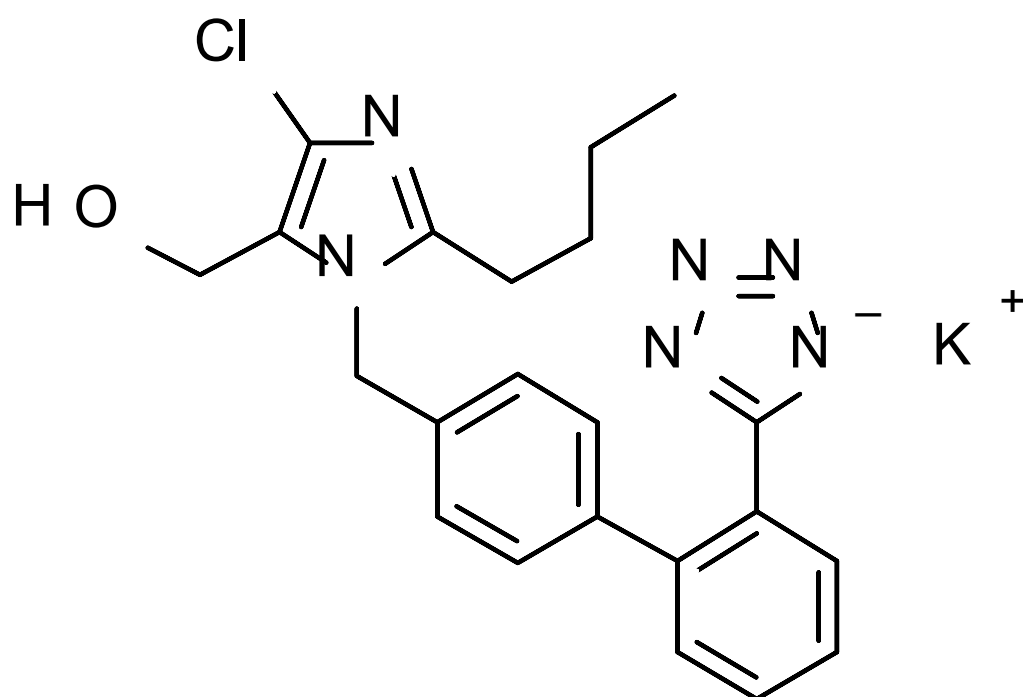


**Figure 10.** Positioning of various renal disease models in accordance with the clinical CKD grade (榎野, 2000. 改変).

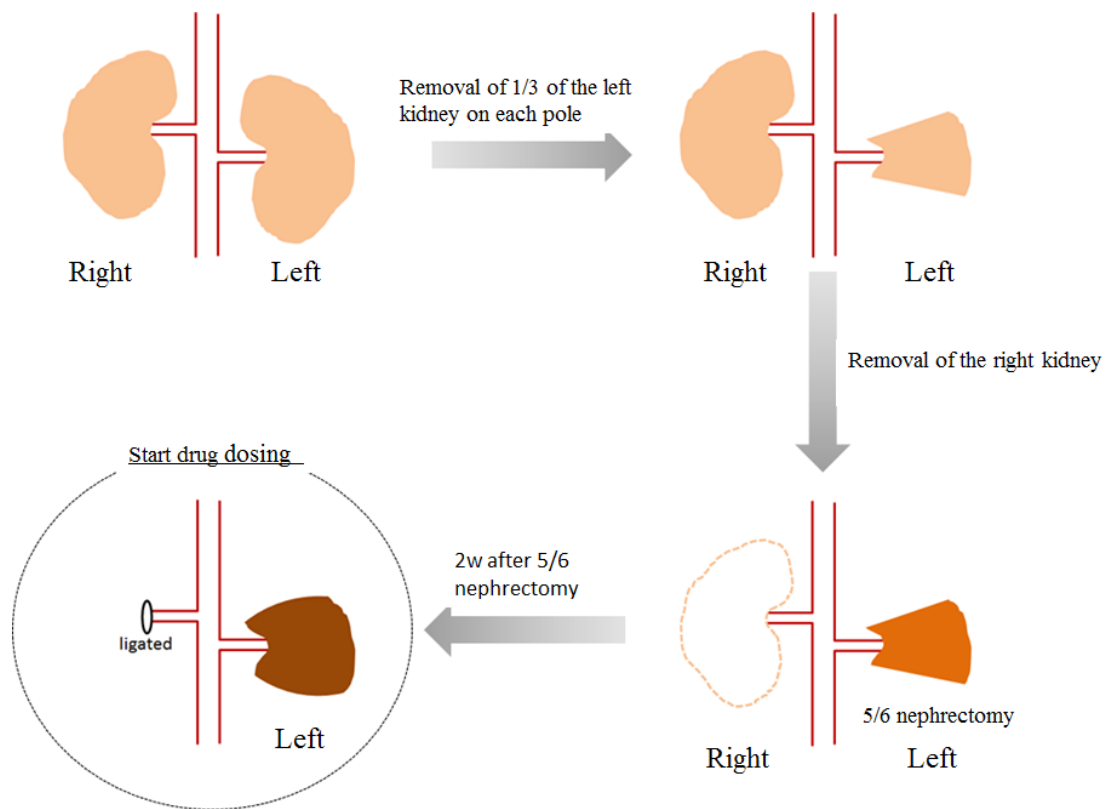
STZ: Streptozotocin, ZDF: Zucker diabetic fatty rat, Nx: Nephrectomy, UP: Urinary protein, UAE: Urinary albumin excretion.



**Figure 11.** Chemical structure of ONO-4819.

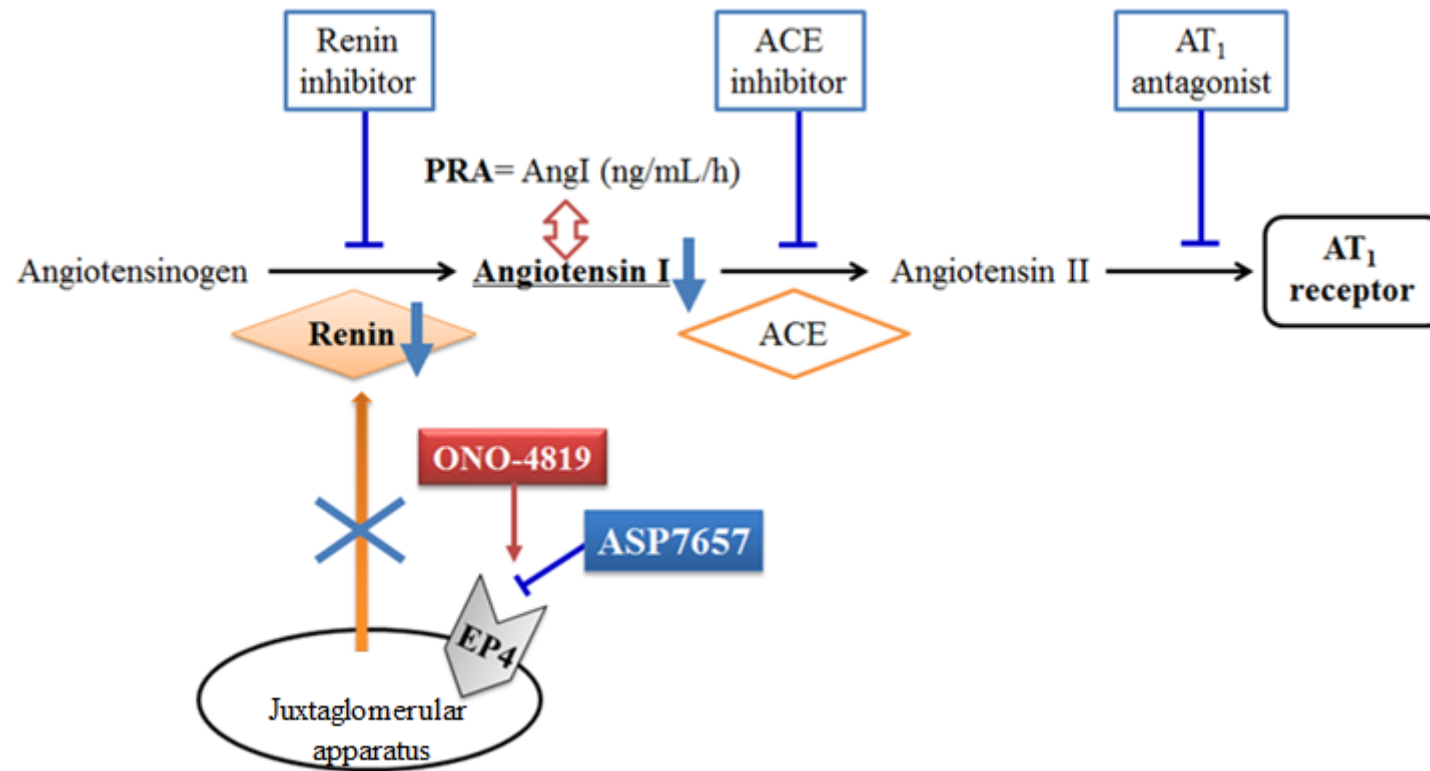


**Figure 12.** Chemical structure of losartan potassium.

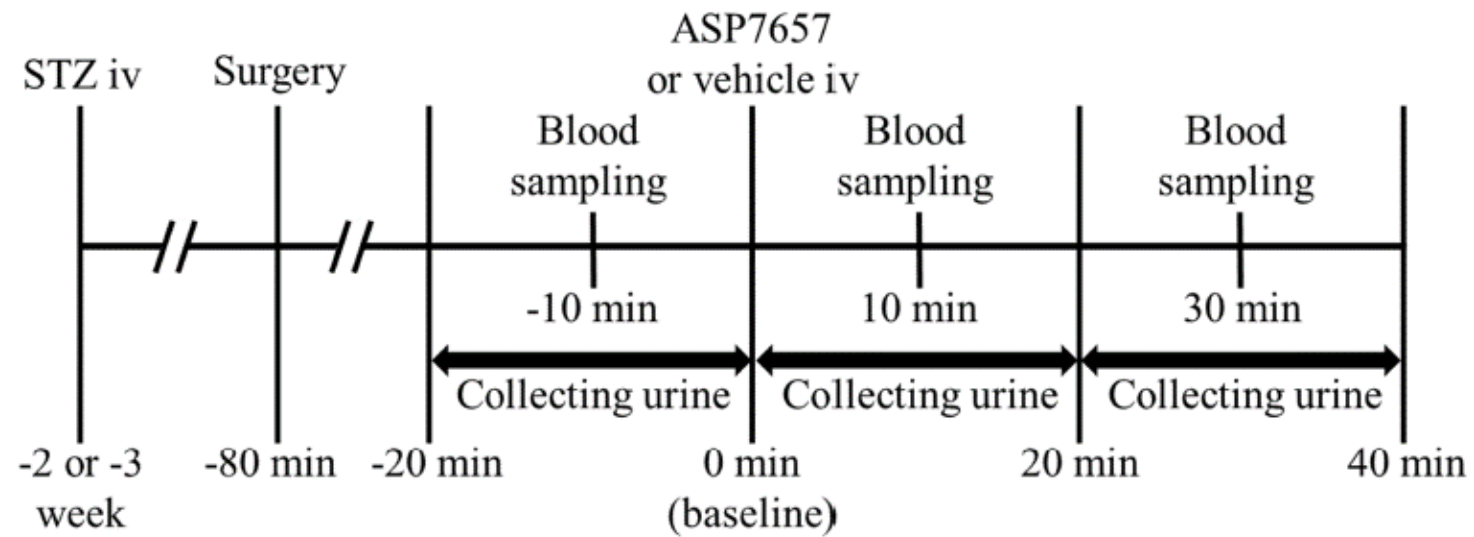


**Figure 13.** The flow of the rat 5/6Nx model establishment.

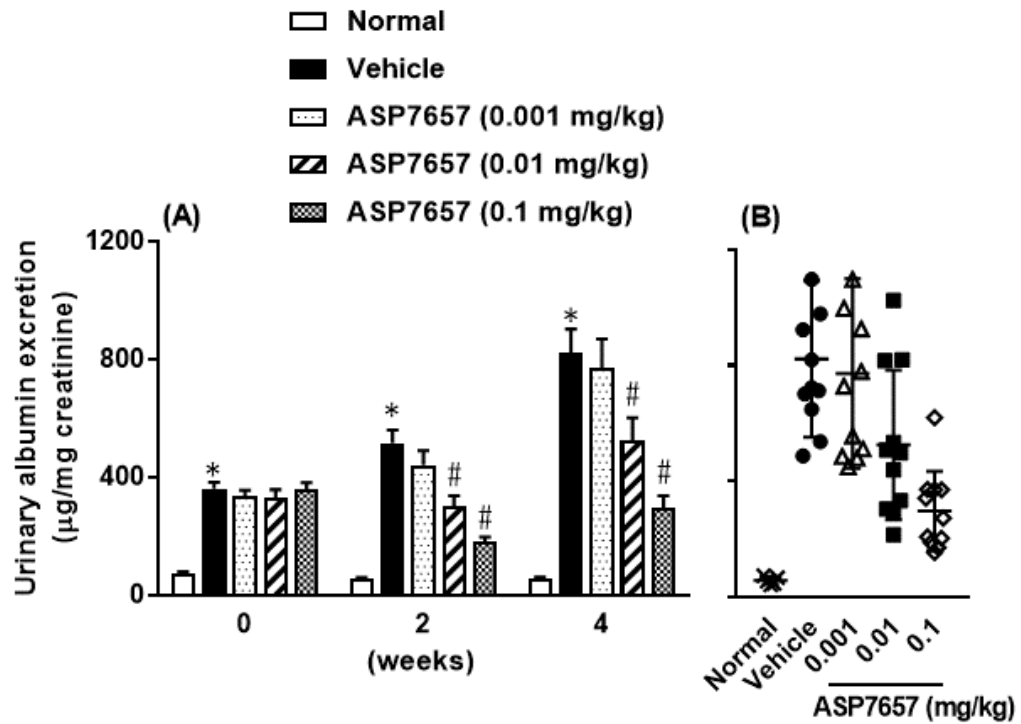




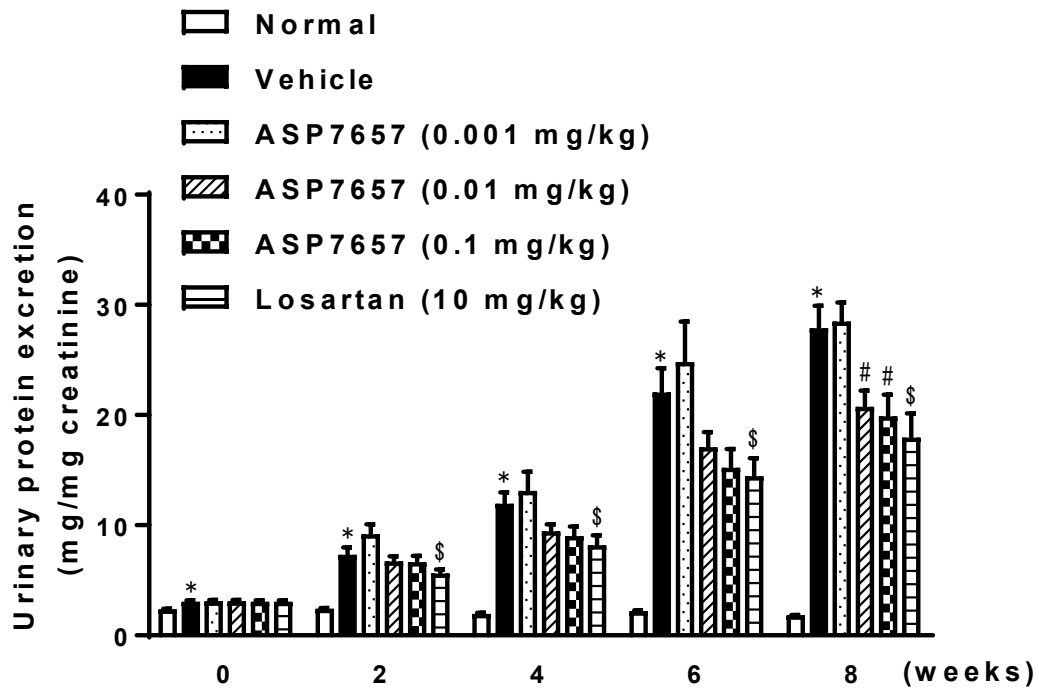
**Figure 14.** The concept for detecting renin secretion as a plasma renin activity. Plasma renin activity (PRA) was calculated as an indicator of EP4 agonist-induced renin secretion from macula densa.



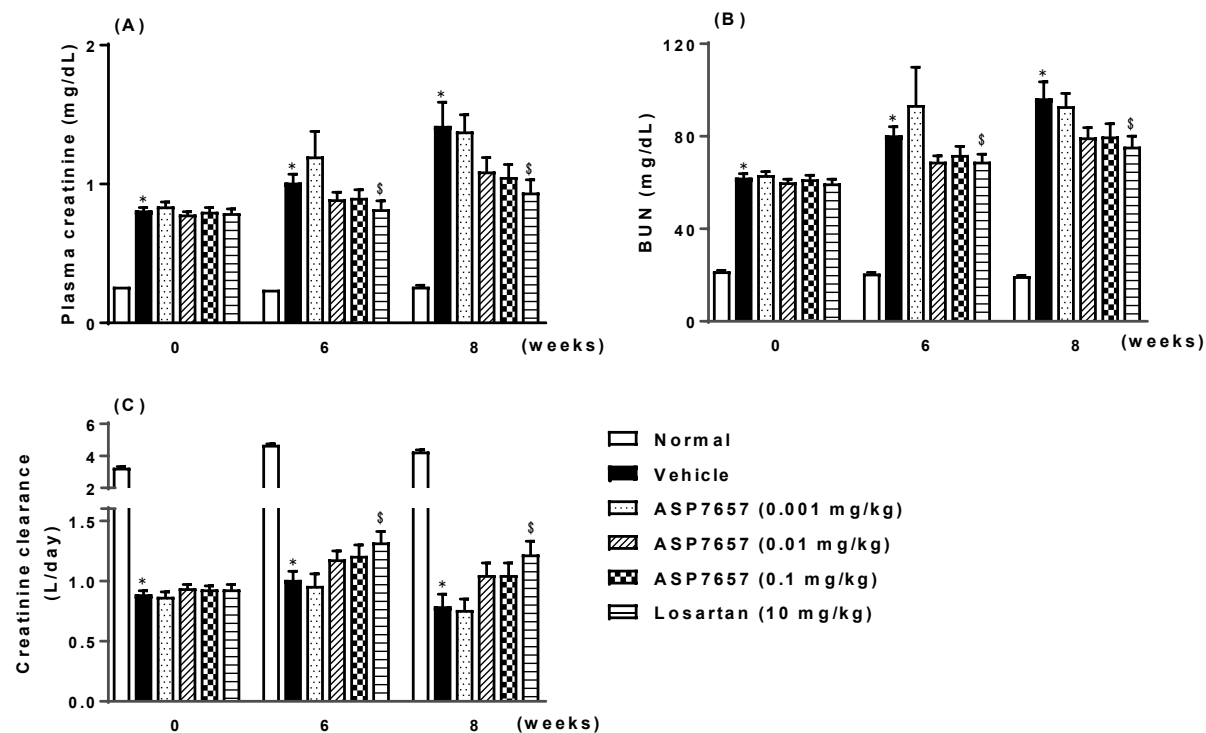
**Figure 15.** Timetable of renal hemodynamics study.



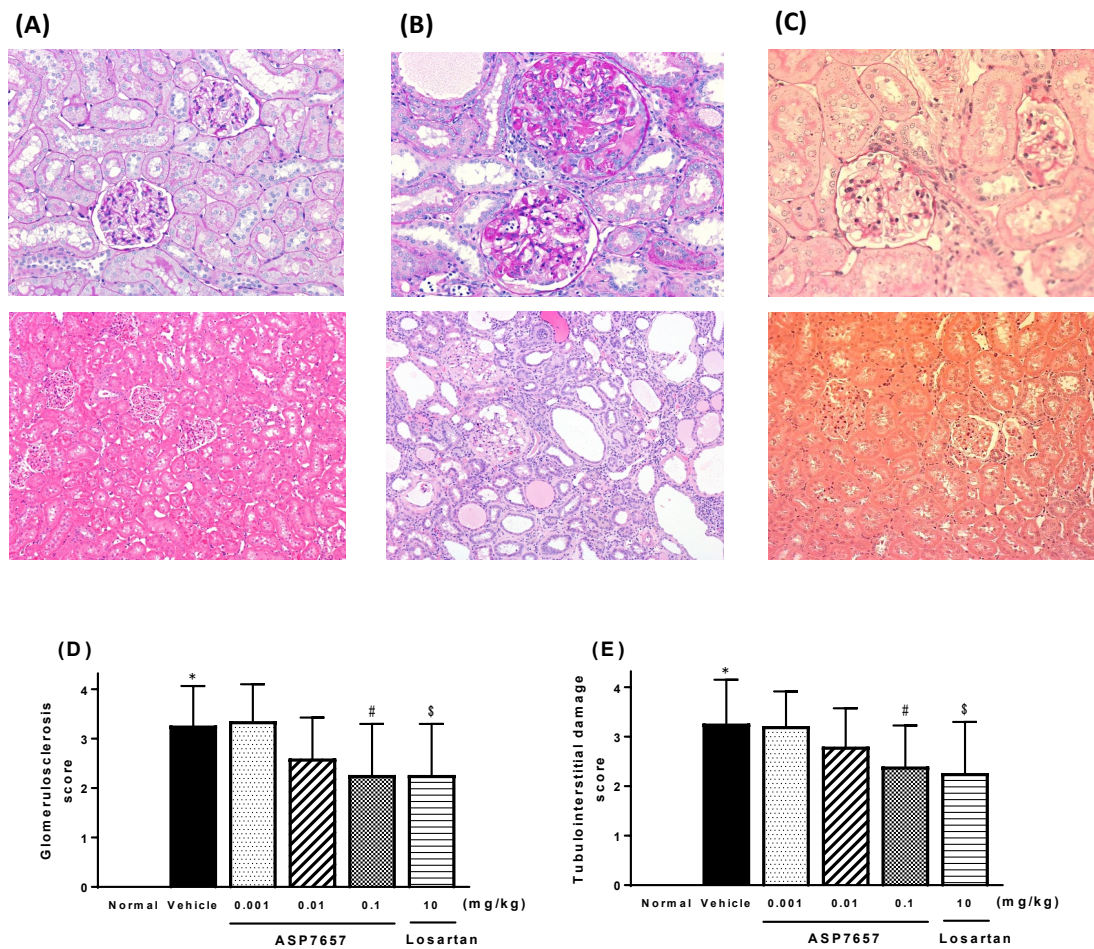
**Figure 16.** Effect of repeated administration of ASP7657 on albuminuria in type 2 diabetic db/db mice. ASP7657 was orally administered to diabetic mice for 4 weeks. (A) Time course of changes in urinary albumin excretion and (B) scatter plot of urinary albumin excretion at week 4. The values are the mean  $\pm$  (A) SEM or (B) SD for five animals in the normal group and eleven animals in all other groups. \* $p < 0.05$  vs. normal group, # $p < 0.05$  vs. vehicle group.



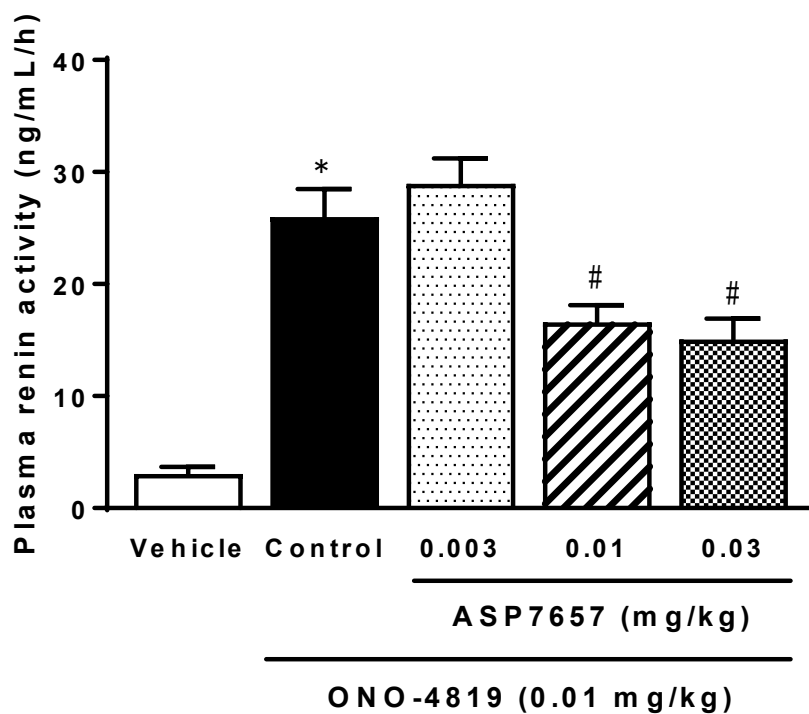
**Figure 17.** Effects of repeated administration of ASP7657 on urinary protein excretion in 5/6 nephrectomized (Nx) rats. ASP7657 and losartan were orally administered to 5/6 Nx rats once daily for 8 weeks. Values are mean  $\pm$  SEM for 7–15 animals per group. \*P < 0.05 vs. normal group, #P < 0.05 vs. vehicle group, \$P < 0.05 vs. vehicle group.



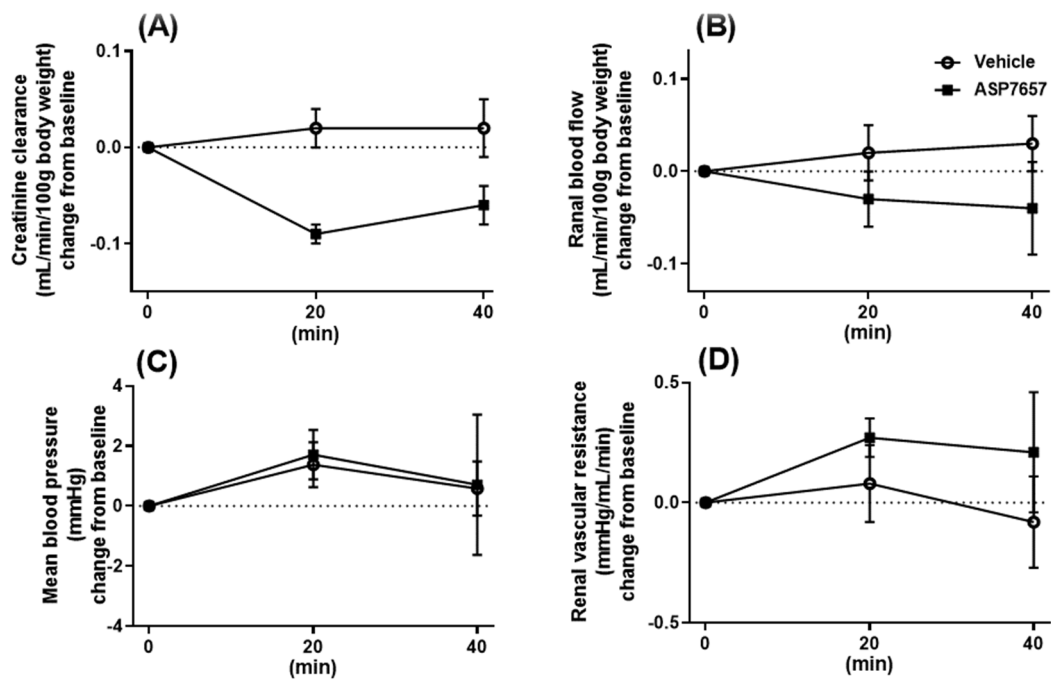
**Figure 18.** Effects of repeated administration of ASP7657 on (A) plasma creatinine, (B) blood urea nitrogen (BUN), and (C) creatinine clearance in 5/6 nephrectomized (Nx) rats. ASP7657 and losartan were orally administered to 5/6 Nx rats once daily for 8 weeks. Values are mean  $\pm$  SEM for 7–15 animals per group. \* $P < 0.05$  vs. normal group, \$ $P < 0.05$  vs. vehicle group.



**Figure 19.** Improvement in renal injury by repeated administration of ASP7657 in 5/6 nephrectomized (Nx) rats. Representative light micrographs of renal tissues obtained from (A) normal, (B) vehicle-treated 5/6 Nx rats, and (C) ASP7657 (0.1 mg/kg)-treated 5/6 Nx rats. Top panels: periodic acid-Schiff (PAS) stain (magnification:  $\times 200$ ), bottom panels: hematoxylin and eosin (HE) stain (magnification:  $\times 100$ ). Effects of ASP7657 on histopathological scores for (D) glomerulosclerosis and (E) tubulointerstitial damage. Values are mean  $\pm$  SD for 7–15 animals per group. \* $P < 0.05$  vs. normal group, # $P < 0.05$  vs. vehicle group, \$ $P < 0.05$  vs. vehicle group.

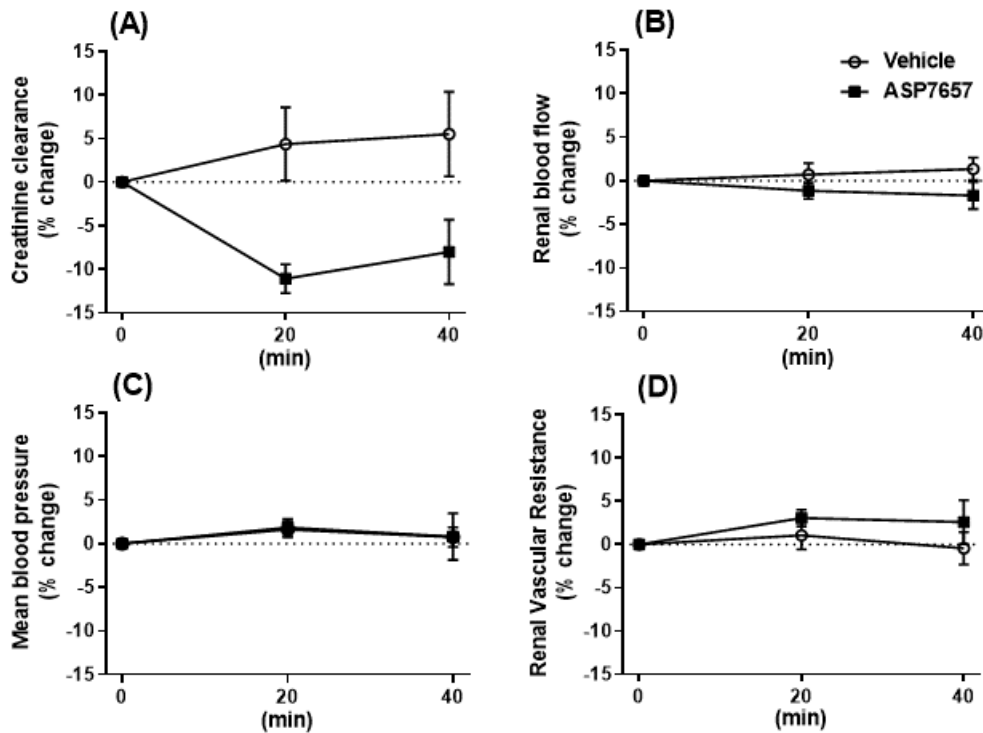


**Figure 20.** Effect of ASP7657 on the EP4 receptor agonist-induced increase in plasma renin activity (PRA) in normal rats. ASP7657 (0.003-0.03 mg/kg) was orally administered to rats, and the EP4 receptor selective agonist ONO-4819 (0.01 mg/kg) was subcutaneously injected 1h post-dose. Blood samples were collected 10 min after the ONO-4819 injection. PRA was assessed by angiotensin I release. Values are mean  $\pm$  SEM for 8 animals per group. \* $P < 0.05$  vs. vehicle group, # $P < 0.05$  vs. ONO-4819-treated group.

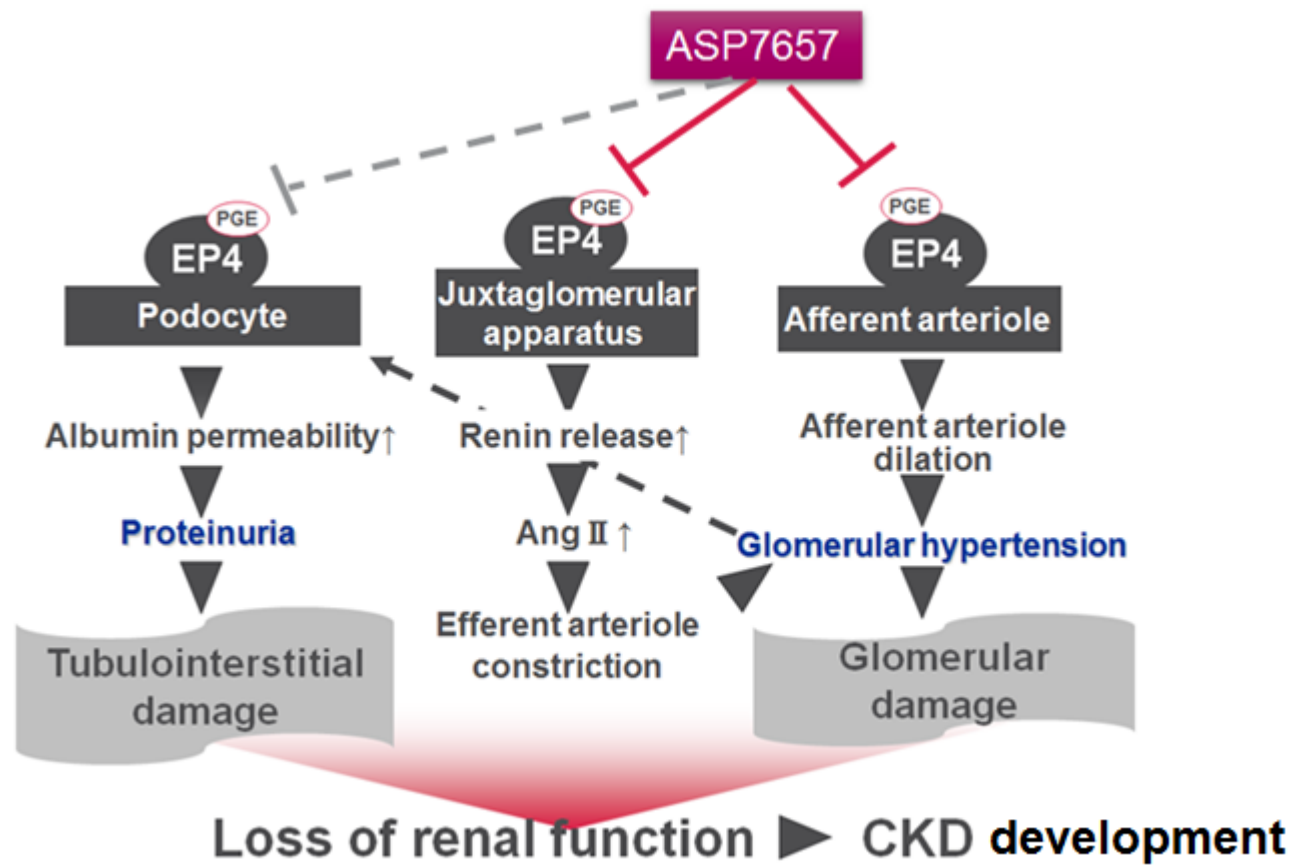


**Figure 21.** The change from baseline of (A) Creatinine clearance, (B) Renal blood flow, (C) Mean blood pressure, and (D) Renal vascular resistance after ASP7657 injection in streptozotocin-treated rats. Streptozotocin-treated rats were intravenously administered with vehicle or ASP7657 at 0.1 mg/kg. Values are mean  $\pm$  SEM for 7–8 animals per group.





**Figure 22.** The percent change from baseline of (A) Creatinine clearance, (B) Renal blood flow, (C) Mean blood pressure, and (D) Renal vascular resistance after ASP7657 injection in streptozotocin-treated rats. Streptozotocin-treated rats were intravenously administered with vehicle or ASP7657 at 0.1 mg/kg. Values are mean  $\pm$  SEM for 7–8 animals per group. AUC<sub>0-40 min</sub> of each parameter was calculated using the trapezoidal rule. Statistical significance of AUC<sub>0-40 min</sub> was detected between the vehicle ( $142.5 \pm 131.0\% \cdot \text{min}$ ) and the ASP7657 groups ( $-302.0 \pm 63.6\% \cdot \text{min}$ ) only in creatinine clearance using Student's t-test ( $P < 0.05$ ).



**Figure 23.** The mechanism of renoprotective effect of ASP7657 in the CKD development.

## 総括

本研究は、糖尿病性腎症やCKDに対する新規治療薬創製を目的としている。学会情報や論文情報などからの多岐に渡る情報収集の結果、糖尿病性腎症ならびにCKD進行抑制薬としてPGE<sub>2</sub>-EP4 receptor axisに着目し、さらにEP4受容体選択的 antagonist がCKD進展抑制薬と成り得るとの仮説に至り、新規EP4選択的 antagonist の創製を目指した研究を開始した。

新規EP4 antagonist の創製を開始する際に母核候補となったのは、過去にアステラス製薬株式会社 (Astellas pharma Inc., 東京、日本) で合成された PGI<sub>2</sub> 受容体に対する agonist 化合物群であった。PGI<sub>2</sub> 受容体 agonist 化合物に対し各種 EP 受容体発現細胞膜を用いた結合実験系でスクリーニングを実施し、EP4 受容体を選択性を持つ化合物母核を探索し、最終的に ASP7657 の母核と成り得る化合物の発見に至った経緯がある。EP4 選択的 antagonist 候補母核化合物に対し、基礎薬理学的検討と修飾合成、最適化合成を組み合わせた研究を実施した結果、新規EP4 antagonist として ASP7657 の創製に至った。

まずは、EP4 antagonist として新規合成された ASP7657 の *in vitro* および *ex vivo* 試験による薬理学的作用の特徴付けを行った。ASP7657 は、ラットおよびヒト EP4 受容体に対して高い親和性を示し、K<sub>i</sub> 値はそれぞれ 6.02 nM および 2.21 nM であった。さらに、ASP7657 はラット EP4 受容体を発現する CHO 細胞およびヒト EP4 受容体を発現するヒト T 細胞において、PGE<sub>2</sub> 誘発 cAMP の増加をそれぞれ IC<sub>50</sub> 値 0.86 nM および 0.29 nM で阻害した。対照的に、ASP7657 は、ラット EP1 および EP3 受容体を発現する HEK293 細胞の PGE<sub>2</sub> 誘導細胞内カルシウム増加、またはラット EP2 受容体を発現する CHO 細胞の cAMP 増加に対し阻害作用を示すことはなかった。よって ASP7657 はラットおよびヒト EP4 受容体に対し選択的かつ強力に遮断作用を示すことが明らかとなった。現在までに、EP4 receptor に対する antagonist としていくつかの化合物の報告があるが (Murase et al., 2008)、その化合物群と比較した場合、ASP7657 の EP4

に対する選択性は非常に高く、EP4 antagonist 活性も比較的強力であることが明らかとなっている。PGE<sub>2</sub> の受容体として EP1、EP2、EP3 および EP4 の 4 つのサブタイプの存在が報告されており (Fig. 5)、各受容体に対する選択的 agonist または antagonist の存在は各サブタイプの細胞レベルでの機能、または生体全体における生理作用を明らかにする上で非常に重要なツールと成り得る。ASP7657 は EP4 受容体に対する選択性、さらには阻害活性が最も高い化合物の一つであることが明らかとなったことから、今後は EP4 に対する基礎薬理学的研究分野における非常に有用な検証ツールと成り得るものとなると考えられる。

ASP7657 の薬物動態学的特性評価の結果、約 1 時間の半減期で血液中から急速に消失する薬物動態であることが明らかとなった。一方で、早期糖尿病腎症モデル db/db マウスと後期 CKD モデル 5/6Nx ラットにおいて、ASP7657 は 1 日 1 回経口投与の用法で有意な腎保護効果を示した。その理由として、ASP7657 が強力な EP4 受容体阻害活性を持っていることが挙げられる。一連の *in vitro* 検討結果により、ASP7657 がラット EP4 受容体に対して高い親和性 ( $K_i = 0.86 \text{ nM}$ 、 $3.1 \text{ ng/mL}$  に相当) を持ち、PGE<sub>2</sub> 刺激による cAMP の増加に対して強力な阻害効果 ( $IC_{50} = 0.86 \text{ nM}$ 、 $0.44 \text{ ng/mL}$  に相当) を有することが明らかとなっている。経口投与後、ASP7657 の血漿濃度は急速に消失するが、投与後 8 時間まで約  $0.5 \text{ ng/mL}$  の血中濃度を維持していた。さらに、ラット経口投与後の腎臓の ASP7657 濃度が血漿中よりも約 3 倍高くなり (data not shown)、ASP7657 は標的臓器である腎臓に集積している可能性も示唆されている。これらの特性は、1 日 1 回投与によって ASP7657 が薬理効果を示しうる理由の一つである可能性があると考えられる。しかしながら、1 日複数回投与での ASP7657 の薬理効果を検討していないことから、本研究で示された ASP7657 の 1 日 1 回投与による腎保護効果は、ASP7657 の最大効果を反映していない

可能性がある。臨床試験を実施する際の ASP7657 の最大薬理効果を発揮し得る最適な投与用法に関しては、今後の追加研究が必要と考えられる。

ASP7657 は、CKD に分類される糖尿病性腎症に対する臨床における新規治療薬候補として研究されてきた経緯がある。高血圧を伴った糖尿病性腎症に対する治療薬として既に ACE 阻害薬、ARB が適応を取得しているが、その適応取得を目的とした第 3 相臨床試験における対象は CKD グレードが G3-G4 相当の後期 CKD 患者であった (Brenner et al., 2001)。よって、前例の適応取得承認要件にならい、臨床における糖尿病性腎症治療薬としての可能性を判断する上では CKD グレード G3-G4 に相当する動物モデルでの有効性を検証する必要がある。しかしながら、糖尿病を併発し、かつ GFR が高度に低下し、汎用性のある糖尿病性腎症モデルは現時点では多くはない。本研究で使用した糖尿病性腎症モデルである db/db マウス、STZ 投与ラットはアルブミン尿の上昇が観察されることから糸球体バリア機能障害が起きていると考えられるが、GFR の低下は観察されず、CKD グレードとしては早期糖尿病性腎症の G1 に相当すると考えられる (Fig. 10)。これに対して、5/6Nx ラットモデルはタンパク尿の増加と高度な GFR の低下が観察され、CKD グレード G3 相当と考えられる (Fig. 10) が、病態背景に高血糖を伴っていない。一方で、CKD グレード G3 以降の高度に GFR が低下した腎臓においては、CKD 発症、進展の要因となった原疾患に関係なく、糸球体の持続的な障害による糸球体硬化の増悪、または尿細管間質線維化による尿細管周囲毛細血管動態の障害に起因した糸球体周辺の血行動態障害により、糸球体濾過機能のさらなる低下が引き起こされ、腎機能廃絶へ至ると考えられており、本概念は **final common pathway** (Fig. 24) として認識されている (Nangaku et al., 2006)。本研究で実施したラット 5/6Nx モデルにおいても、上記 **final common pathway** に該当する病変が観察されたことから、本モデルで有効性を示すことは臨床における糖尿病性腎症

CKD グレード G3 以降の患者においても有効性を示す可能性が高いと考えられた。よって本研究においては早期糖尿病性である db/db マウスにおける評価で、高血糖に起因した糸球体障害によるアルブミン漏出に対する抑制作用、さらに高度に GFR が低下した CKD 患者における final common pathway を反映した病態と考えられるラット 5/6Nx モデルにおける腎保護作用の有無を評価し、2 つのモデルにおける評価結果を総合的に考察し、臨床での G3-4 相当糖尿病性腎症患者における ASP7657 の有効性検証を行った。

早期糖尿病性腎症モデルである db/db マウスにおいて、ASP7657 は血糖値に影響を与えることなく、アルブミン尿を投与用量依存的に有意に減少させた。これは、ASP7657 が持続的な高血糖により引き起こされる糸球体バリア機能障害に対し、その病因である血糖値には直接影響することなく、組織障害を直接的に抑制する、つまり早期糖尿病性腎症の進行を抑制する可能性があることを示唆する結果であった。また、後期 CKD モデルであるラット 5/6Nx モデルにおいて、8 週間の ASP7657 の反復投与は、全身血圧に顕著な影響を与えることなく、用量依存的に尿中タンパク排泄を有意に減少させ、炎症性細胞浸潤を含む尿細管障害、尿細管間質の線維化および糸球体硬化の CKD 進展における final common pathway と考えられる組織病変を有意に軽減した。さらに、血漿クレアチニンおよび血中尿素窒素濃度の減少傾向と CCr 値低下の改善傾向によって示されるように、ASP7657 は糸球体濾過機能低下に対し有益な効果をもたらす可能性があることが示唆された。既に臨床において CKD グレード G3 以降の糖尿病性腎症患者で有効性を示している ARB のロサルタンは、本モデルにおいて有意な全身血圧の低下作用を伴って ASP7657 と同等の腎保護効果を示した。高血圧は CKD 病態進展の重要な独立した危険因子であり、RAAS 阻害薬を含む降圧薬を使用した血圧の制御は、CKD の治療に効果的であることが報告されている (Ravera et al., 2006)。よって、ロサルタンの腎保護

効果に対し降圧作用が寄与している可能性が考えられる。対照的に、ASP7657は全身血圧を有意に低下させることなく腎保護効果を示したことから、CKDに対する腎局所 RAAS 阻害などの腎臓選択的に薬理効果を発揮する可能性があることを示唆している。以上の早期糖尿病性腎症モデルである db/db マウス、さらに後期 CKD モデルである 5/6Nx ラットにおける評価結果から、ASP7657は G3 以降の糖尿病性腎症患者において腎保護作用を示す可能性が高いと判断した。

さらに、本研究においては EP4 antagonist の CKD 病態における奏功機序解明も試みた。奏功機序の一端として、CKD 病態で起きていると考えられる残存糸球体における糸球体内圧上昇ならびに糸球体過剰濾過に対する EP4 受容体の関与に着目した。EP4 受容体刺激による傍糸球体装置からのレニン分泌増加、引き続き起こるアンギオテンシン II 産生量増加による輸出細動脈の収縮、または輸入細動脈の直接弛緩により、糸球体内圧が上昇し、過剰濾過が促進されている可能性が考えられた (Fig. 9)。よって、EP4 antagonist である ASP7657 投与によりレニン分泌が抑制、さらには輸入細動脈の過剰な弛緩を含む糸球体周囲血行動態異常を改善することにより糸球体過負荷状態が軽減され、CKD 病態進行が抑制されると仮定し、検証実験を実施した。まずは正常ラットにおける試験において、EP4 受容体選択的 agonist によって誘発される PRA の上昇を ASP7657 が用量依存的に抑制することが観察できた。よって、ASP7657 が EP4 受容体を介したレニン分泌を抑制することを確認することができ、アンギオテンシン II 産生量も低下していることが期待された。次に、STZ 誘発糖尿病ラットの腎血行動態に対する ASP7657 の急性効果を検討した。STZ ラットにおいては、輸入細動脈と輸出細動脈の直径比が増加し、それが糸球体過剰濾過を引き起こすことが報告されており (Satoh et al., 2010)、本検討においても STZ ラットのベースライン CCr は正常ラットよりも高く、糸球体過

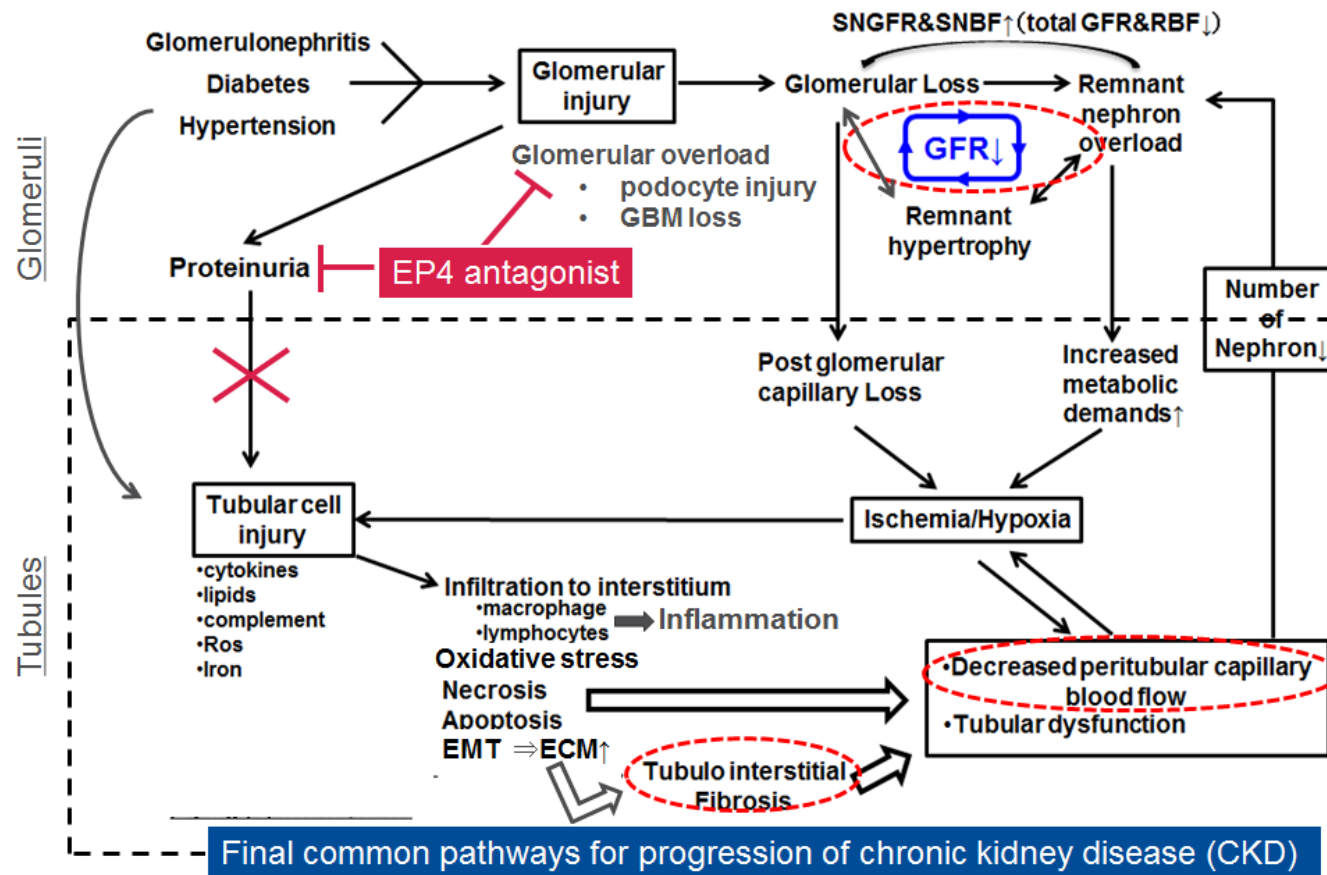


濾過を発症していることを確認できた。ASP7657 の単回静脈内注射は、STZ ラットの CCr 値の増加を投与後 40 分までにおいて急性的に正常方向へ改善させたことから、ASP7657 が STZ ラットの糸球体過濾過を改善できることが示唆された。この ASP7657 投与による糸球体過剰濾過改善効果は、輸入細動脈の過度な弛緩の改善とレニン分泌の阻害による輸出細動脈過剰収縮の改善による糸球体周囲血行動態の是正作用が関与している可能性があると考えられた。一方で、糸球体内圧上昇抑制による糸球体過剰濾過の改善作用は、有効糸球体数が減少した CKD 病態においては、GFR の低下を引き起こす懸念が考えられる。同様に糸球体内圧の上昇抑制作用があるロサルタンを糖尿病性腎症患者に投与することで、投与開始 3 か月間においては placebo 群と比較すると GFR の低下度が有意に大きいとの報告がある (Holtkamp et al., 2011)。一方で、同じ研究の中で 3 か月以降の長期的な期間を観察すると、ロサルタン投与群で placebo 群に比して GFR 低下速度が有意に遅くなることも報告されている。よって、糸球体過剰濾過の改善は長期的には糸球体過負荷を是正することに繋がり、糸球体濾過機能のさらなる低下を抑制すると考えられる。以上の観点からも、同様の糸球体過剰濾過是正の奏功機序を有する EP4 antagonist である ASP7657 が臨床において糖尿病性腎症患者に対し腎保護作用を示す可能性は高いと考えられる。一方で、今回の EP4 antagonist による糸球体過剰濾過改善作用は早期糖尿病性腎症モデルである STZ ラットにおける投与後急性期評価での確認に留まっていることから、今後は CKD 後期モデルである 5/6Nx ラットでの慢性投与時における同様の評価を行うことで、糸球体周辺血行動態に対する EP4 antagonist の薬理作用を見極めていく必要があると考えている。

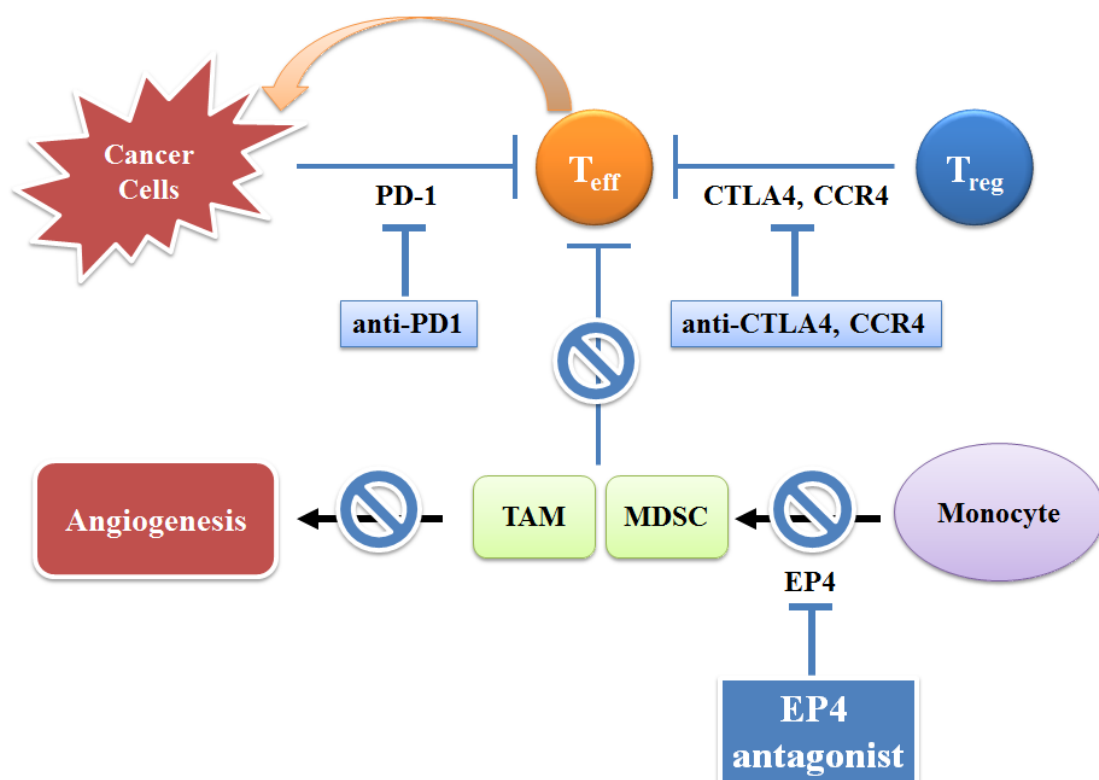
一連の研究により、EP4 antagonist である ASP7657 の臨床における糖尿病性腎症患者に対する新規治療薬としての有望性を提示できたと考えている。一方で、EP4 antagonist の治療薬としての可能性は糖尿病性腎症にとどまらない

可能性が報告されている。EP4 受容体は 1 次痛覚神経に発現していることが報告されており、また、末梢における炎症反応が dorsal root ganglion における EP4 受容体の発現を上昇させることが報告されている (Nakao et al., 2007)。さらに、EP 受容体 KO マウスにおいて痛覚過敏モデルを作製し検討した結果、痛覚に対する反応が抑制されたとの報告もある (Lin et al., 2006)。よって、痛覚過敏は EP4 受容体 antagonist の新たな適応疾患となる可能性があると考えられる。また、がん免疫領域における EP4 受容体 antagonist の anti-cancer agent としての有望性も近年報告されている (Albu et al., 2017)。がん細胞は effector T cell の活性化を抑制する PD-1 を分泌し effector T cell からの攻撃を減弱させていることが良く知られており、PD-1 抗体が既にがん免疫治療薬として上市されている (Fig. 25)。一方で effector T cell に対する他の活性化抑制経路も報告されており、その一つとして TAM や MDSC による抑制経路がある。EP4 受容体 antagonist は monocyte から TAM、MDSC への分化を抑制することが報告されている (Albu et al., 2017)。よって、EP4 受容体 antagonist は既に上市されている免疫チェックポイント阻害剤とは別機序でがん免疫を増強できる可能性が考えられ、単独投与さらには既存免疫チェックポイント阻害剤への上乗せ投与により、強力な抗がん作用を発揮することが期待される (Fig. 25)。

以上より、EP4 受容体 antagonist は CKD 治療薬以外の治療薬としての可能性も持っており、今後の研究の進展が期待されるところであり、本可能性を検証する上で ASP7657 は有用なツールと成り得ると考えられる。



**Figure 24.** Final common pathways for CKD progression.



**Figure 25.** The candidate mechanism of anti-cancer effect of ASP7657 in immunology.

## 参考文献

- Akmal M. 2001. Hemodialysis in diabetic patients. *American Journal of Kidney Diseases* 38: S195-199.
- Albu DI, Wang Z, Huang KC, Wu J, Twine N, Leacu S, Ingersoll C, Parent L, Lee W, Liu D, Wright-Michaud R, Kumar N, Kuznetsov G, Chen Q, Zheng W, Nomoto K, Woodall-Jappe M, Bao X. 2017. EP4 Antagonism by E7046 diminishes Myeloid immunosuppression and synergizes with Treg-reducing IL-2-Diphtheria toxin fusion protein in restoring anti-tumor immunity. *Oncoimmunology* 2017 6: e1338239.
- Berl T. 2009. Review: renal protection by inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 10: 1-8.
- Betz B, Conway BR. 2014. Recent advances in animal models of diabetic nephropathy. *Nephron. Experimental nephrology* 126: 191–195.
- Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S. 2001. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 345: 861-869.
- Breyer MD, Jacobson HR, Breyer RM. 1996. Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *Journal of the American Society of Nephrology* 7: 8-17.
- Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. 2001. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annual Review of Pharmacology* 41: 661-690.
- Clive DM, Stoff JS. 1984. Renal syndromes associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *The New England Journal of Medicine* 310: 563–572.
- Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Levey AS. 2007. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *The Journal of the*

- American Medical Association 298: 2038-2047.
- Fine LG, Norman JT. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. 2008. *Kidney International* 74: 867-872.
- Fioretto P, Dodson PM, Ziegler D, Rosenson RS. 2010. Residual microvascular risk in diabetes: unmet needs and future directions. *Nature Reviews. Endocrinology* 6:19-25.
- Fogo AB. Mechanisms of progression of chronic kidney disease. 2007. *Pediatric Nephrology* 22: 2011-2022.
- Friis UG, Madsen K, Stubbe J, Hansen PB, Svenningsen P, Bie P, Skøtt O, Jensen BL. 2013. Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Pflügers Archiv* 465: 25-37.
- Gilbertson DT, Liu J, Xue JL, Louis TA, Solid CA, Ebben JP, Collins AJ. 2005. Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *Journal of the American Society of Nephrology* 16: 3736-3741.
- Hall PM. 2006. Prevention of progression in diabetic nephropathy. *Diabetes Spectrum* 19: 18-24.
- Hattori K, Tanaka A, Fujii N, Takasugi H, Tenda Y, Tomita M, Nakazato S, Nakano K, Kato Y, Kono Y, Murai H, and Sakane K. 2005. Discovery of diphenyloxazole and N $\alpha$ -z-ornithine derivatives as highly potent and selective human prostaglandin EP4 receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 3103-3106.
- Helal I, Fick-Brosnahan GM, Reed-Gitomer B, Schrier RW. 2012. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Nephrology* 21: 293-300.

- Hill CJ, Fogarty DG. 2012. Changing trends in end-stage renal disease due to diabetes in the United Kingdom. *Journal of Renal Care* 38: 12-22.
- Hodgkins KS, Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. 2012. *Pediatric Nephrology* 27: 901-909.
- Holtkamp FA, de Zeeuw D, Thomas MC, Cooper ME, de Graeff PA, Hillege H, Parving HH, Brenner BM, Shahinfar S, Heerspink HL. 2011. An acute fall in estimated glomerular filtration rate during treatment with losartan predicts a slower decrease in long-term renal function. *Kidney International* 80: 282–287.
- Jensen BL, Schmid C, Kurtz A 1996. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology* 271: F659-669.
- Jian DY, Chao YW, Ting CH, Huang SW, Chang CF, Juan CC, Chen JY. Losartan ameliorates renal injury, hypertension, and adipocytokine imbalance in 5/6 nephrectomized rats. 2013. *European Journal of Pharmacology* 709: 85-92.
- Kasai K, Sato S, Suzuki K. 2001. A novel prostaglandin E receptor subtype agonist, ONO-4819, attenuates acute experimental liver injury in rats. *Hepatology research* 21: 252-260.
- KDIGO Board Members 2013. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements* 3: 19–62
- Kikkawa R, Haneda M, Sakamoto K, Koya D, Shikano T, Nakanishi S, Matsuda Y, Shigeta, Y. 1993. Antagonist for atrial natriuretic peptide receptors ameliorates glomerular hyperfiltration in diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193: 700-705.
- Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, Floege J. 1996.

- Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney International* 49: 666-678.
- Kondo M, Tahara A, Hayashi K, Abe M, Inami H, Ishikawa T, Ito H, Tomura Y. 2014. Renoprotective effects of novel interleukin-1 receptor-associated kinase 4 inhibitor AS2444697 through anti-inflammatory action in 5/6 nephrectomized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 387: 909-919.
- Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D. 2013. Novel drugs and intervention strategies for the treatment of chronic kidney disease. *British Journal of Clinical Pharmacology* 76: 536-550.
- Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I. 2001. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 345: 851-860.
- Lin CR, Amaya F, Barrett L, Wang H, Takada J, Samad TA, Woolf CJ. 2006. Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319: 1096-1103.
- Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Pena AB, Lopez-Hernandez FJ. 2010. Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: therapeutic perspectives. *Pharmacology and Therapeutics* 128: 61–81.
- Macconi D. 2010. Targeting the renin angiotensin system for remission/regression of chronic kidney disease. *Histology and Histopathology* 25: 655-668.
- Mohamed R, Jayakumar C, Ramesh G. 2013. Chronic administration of EP4-selective agonist exacerbates albuminuria and fibrosis of the kidney in streptozotocin-induced diabetic mice through IL-6. *Laboratory Investigation* 93: 933-945.
- Murase A, Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Nakao K, Takeda J. 2008. *In vitro*



- pharmacological characterization of CF-042794, a novel, potent, and selective prostaglandin EP4 receptor antagonist. *Life Science* 82: 226-232.
- Nakao K, Murase A, Ohshiro H, Okumura T, Taniguchi K, Murata Y, Masuda M, Kato T, Okumura Y, Takada J. 2007. CJ-023,423, a novel, potent and selective prostaglandin EP4 receptor antagonist with antihyperalgesic properties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322: 686-694.
- Nangaku M. 2006. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: A final common pathway to end-stage renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 17: 17-25.
- Nangaku M, Fujita T. 2008. Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertension Research* 31: 175-184.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiological Reviews* 79: 1193-226.
- Nasrallah R, Hassouneh R, Hébert RL. 2016. PGE2, Kidney Disease, and Cardiovascular Risk: Beyond Hypertension and Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 27: 666-676.
- Park CW, Zhang Y, Zhang X, Wu J, Chen L, Cha DR, Su D, Hwang MT, Fan X, Davis L, Striker G, Zheng F, Breyer M, Guan Y. 2006. PPARalpha agonist fenofibrate improves diabetic nephropathy in db/db mice. *Kidney International* 69: 1511-1517.
- Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. 2001. Irbesartan in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria study group. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 345: 870-878.
- Pistrosch F, Herbrig K, Kindel B, Passauer J, Fischer S, Gross P. 2005. Rosiglitazone improves glomerular hyperfiltration, renal endothelial dysfunction, and

- microalbuminuria of incipient diabetic nephropathy in patients. *Diabetes* 54: 2206-2211.
- Pöschke A, Kern N, Maruyama T, Pavenstädt H, Narumiya S, Jensen BL, Nüsing RM. 2012. The PGE2-EP4 receptor is necessary for stimulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in response to low dietary salt intake *in vivo*. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 503: F1435-1442.
- Purdy KE, Arendshorst WJ. 2000. EP1 and EP4 receptors mediate prostaglandin E2 actions in the microcirculation of rat kidney. *American Journal of Physiology* 279: F755-764.
- Regan, JW. 2003. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Science* 74: 143-153.
- Ravera M, Re M, Deferrari L, Vettoretti S, Deferrari G. 2006. Importance of blood pressure control in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 17: S98-103.
- Satoh M, Kobayashi S, Kuwabara A, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N. 2010. *In vivo* visualization of glomerular microcirculation and hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Microcirculation* 17: 103-112.
- Schweda F, Klar J, Narumiya S, Nüsing RM, Kurtz A. 2004. Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 287: F427-433.
- Sharma K, McCue P, Dunn SR. 2003. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *American Journal of Physiology* 284: F1138-1144.
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 87: 4-14.
- Stitt-Cavanagh EM, Faour WH, Takami K, Carter A, Vanderhyden B, Guan Y,

- Schneider A, Breyer MD, Kennedy CR. 2010. A maladaptive role for EP4 receptors in podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology* 21:1678-1690.
- Sugimoto H, Shikata K, Matsuda M, Kushiro M, Hayashi Y, Hiragushi K, Wada J, Makino H. 1998. Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (ecNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 41: 1426-1434.
- Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y, Takasu T, Imamura M, Li Q, Tomiyama H, Kobayashi Y, Noda A, Sasamata M, Shibasaki M. 2014. Effects of sodium-glucose cotransporter 2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycaemia, oxidative stress, inflammation and liver injury in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 66: 975-987.
- Tang L, Loutzenhiser K, Loutzenhiser R. 2000. Biphasic actions of prostaglandin E2 on the renal afferent arteriole: role of EP3 and EP4 receptors. *Circulation Research* 86: 663-670.
- Thieme K, Majumder S, Brijmohan AS, Batchu SN, Bowskill BB, Alghamdi TA, Advani SL, Kabir MG, Liu Y, Advani A. 2017. EP4 inhibition attenuates the development of diabetic and non-diabetic experimental kidney disease. *Scientific Reports* 7: 1-11.
- van Dieren S, Beulens JW, van der Schouw YT, Grobbee DE, Neal B. 2010. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *The European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 17: S3-8.
- Vogt L, de Zeeuw D, Woittiez AJ, Navis G. 2009. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces proteinuria in renal patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 24: 1182-1189.

- Wall EA, Zavzavadjian JR, ChangMS, Randhawa B, Zhu X, Hsueh RC, Liu J, DriverA, Bao XR, Sternweis PC, SimonMI, Fraser ID. 2009. Suppression of LPS-induced TNF-alpha production in macrophages by cAMP is mediated by PKA-AKAP95-p105. *Science Signaling* 2: ra28 1-16.
- Yang GX, Xu YY, Fan YP, Wang J, Chen XL, Zhang YD, Wu JH. 2014. A maladaptive role for EP4 receptors in mouse mesangial cells. *PLoS One* 9: e104091 1-13.
- 黒川 清. 1996. 体液異常と腎臓の病態生理. *メディカル・サイエンス・インターナショナル*: 1-19.
- 厚生労働省. 2019. 糖尿病性腎症重症化予防プログラム  
[https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000121935\\_00001.html](https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000121935_00001.html)
- 日本腎臓学会. 2018. エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン  
<https://cdn.jsn.or.jp/data/CKD2018.pdf>
- 日本透析学会. 2018. わが国の慢性透析療法の現況. *透析会誌* 51: 699-766.
- 槇野 博史 2000 糖尿病性腎症 診断と治療社

## 謝辞

本論文の作成にあたり、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系 繁森 英幸 教授、臼井 健郎 教授、内海 真生 准教授、山田 小須弥 准教授に心より厚く御礼申し上げます。

アステラス製薬入社時より創薬研究に関し多大なご指導とご助言をいただきました、アステラス製薬研究本部 鵜川 徹 博士、和田 浩一 博士、吉田 啓之 博士、アステラス製薬ファーマコヴィジランス部 野澤 栄典氏、アステラス製薬イノベーション知財室 鎌田 啓明氏、株式会社トライアングル 石井 育子氏に心より感謝致します。

本論文の作成の機会をお与えいただきましたアステラス製薬研究本部長 岩井 晃彦 博士、キャンディデートディスカバリー研究所所長 戸村 裕一 博士、キャンディデートディスカバリー研究所 第3研究室室長 棚橋 正幸 博士、キャンディデートディスカバリー研究所 第3研究室 田原 敦生 博士に心より深謝致します。

本研究を行うにあたり、アステラス製薬キャンディデートディスカバリー研究所第3研究室の諸氏を含む多くの方々にお世話になりました。ここに深く御礼申し上げます。

## 発表論文目録

1. Mizukami K. Kamada H. Yoshida H. Ishii I. Nozawa E. Wada K. Ugawa T. 2018. Pharmacological properties of ASP7657, a novel, potent, and selective prostaglandin EP4 receptor antagonist. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 391: 1319-1326.
2. Mizukami K. Yoshida H. Nozawa E. Wada K. Ugawa T. 2019. Renoprotective effects of the novel prostaglandin EP4 receptor-selective antagonist ASP7657 in 5/6 nephrectomized chronic kidney disease rats. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 392: 451–459.