

新規レニン阻害薬 TAK-272 の抗心不全効果の検討および
ヒトレニン阻害薬に最適化したマウス心不全モデルの開発

2022 年 1 月

原 智也

新規レニン阻害薬 TAK-272 の抗心不全効果の検討および
ヒトレニン阻害薬に最適化したマウス心不全モデルの開発

筑波大学大学院

理工情報生命学術院

生命地球科学研究群

生命農学学位プログラム

博士（生命農学）学位論文

原 智也

略語集

ACE: アンジオテンシン変換酵素

ACTB: β -actin

ARNI: Angiotensin receptor neprilysin inhibitor

ANP: Atrial natriuretic peptide

ARB: アンジオテンシン II 受容体拮抗剤

ARDS: 急性呼吸促迫症候群

AT1 受容体: I型アンジオテンシン受容体

BA: バイオアベイラビリティ

CI: 信頼区間

Col1 α 1: Collagen type I α 1

COVID-19: Coronavirus disease 2019

CSQ: カルセクエストリン

cTnI: 心筋トロポニン I

dP/dt max: 心室内圧の上昇率

dP/dt min: 心室内圧の下降率

DRI: 直接レニン阻害薬

EDD: 拡張末期径

EDP: 拡張末期圧

EF: 駆出率

eGFR: 推定糸球体濾過量

ELISA: 酵素結合免疫吸着測定

HFpEF: Heart Failure preserved Ejection Fraction

HFrEF: Heart Failure reduced Ejection Fraction

LV: 左心室

MRGD: Mas-related G protein-coupled receptor member D

Nos3: Nitric oxide synthase 3

Nox4: NADPH oxidase 4

NT-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide

NYHA: New York Heart Association

PRA: 血漿中レニン活性

RAS: レニン・アンジオテンシン系

RA-tg: ヒトレニン、ヒトアンジオテンシノーゲンダブルトランスジェニック

rhsACE2: リコンビナントヒト sACE2

RT-PCR: リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応

sACE2: soluble アンジオテンシン変換酵素 2

SARS: Severe acute respiratory syndrome

SARS-CoV: SARS coronavirus

SBP: 収縮期血圧

SGLT2: Sodium/glucose cotransporter 2

SHHF: 自然発症高血圧心不全ラット

SHR: 自然発症高血圧ラット

TGF- β 1: Transforming growth factor- β 1

Triple-tg: イヌカルセクエストリン、ヒトレニン、ヒトアンジオテンシノーゲン

トリプルトランスジェニック

WT: 野生型

目次

第一章 研究背景	3
1. 心不全とレニン.....	4
2. 心不全モデル動物.....	9
第二章 新規レニン阻害薬 TAK-272 (imarikiren) によるマウス心不全モデルの 心臓リモデリングおよび死亡率改善	13
1. 要旨.....	14
2. 背景および目的.....	16
3. 材料および方法.....	18
4. 結果.....	26
5. 考察.....	31
6. 図表.....	39
第三章 ヒトレニンおよびアンジオテンシノーゲンを過剰発現させた、新規マ ウス心不全モデルの開発	50
1. 要旨.....	51

2. 背景および目的.....	52
3. 材料および方法.....	55
4. 結果.....	62
5. 考察.....	65
6. 図表.....	69
第四章 レニン・アンジオテンシン系の最新知見と心不全治療薬の展開	76
1. レニン・アンジオテンシン系の研究開発状況と最新の知見.....	77
2. 心不全治療薬の研究開発状況と最新の知見.....	91
参考文献	101

第一章

研究背景

1. 心不全とレニン

心不全は、心機能障害、リモデリングを特徴とし、世界的に最も大きな死亡原因の一つとなっている (1-3)。2017 年の罹患者数は世界で 6,400 万人、5 年生存率は 57%と推定されている (4,5)。心不全の有病率は年齢と共に上昇し、アメリカの 2015 年から 2018 年の統計では、全人口における有病率が 2.4%であるのに対し、80 歳以上では男性で 9.5%、女性で 11.0%となっている (6)。日本では正確な統計データがないものの、有病率はアメリカの半分以下と推定されている (7)。年齢などを標準化した場合の心不全の発生率自体は緩やかに低下しているが、これは心筋梗塞の重症度が低下したことや、心筋梗塞後の治療管理が改善したためと考えられる。一方で、新規発症数自体は増加しており、これは主に人口の増加、高齢化、診断後の生存期間の改善が寄与している (8)。また、心不全の中で、収縮能が正常であるサブタイプ、Heart Failure preserved Ejection Fraction (HFpEF) の認識が、近年進んできたことも影響していると考えられる (9)。心不全のリスクファクターとなる、冠動脈疾患、高血圧、糖尿病、肥満及び喫煙を有する割合についても、喫煙を除き、増加傾向であることが報告されており (10)、日本でも高齢化が進行していることから、患者数は今後も増加していくことが予想される。

レニン・アンジオテンシン系（RAS）は細胞外液量及び動脈圧を調節することにより血管緊張を維持し、循環器の恒常性維持に寄与している。逆に RAS の異常な活性化は、血圧を上昇させ、種々の慢性または急性疾患を発症させる。レニンは、前駆体であるプロレニンのプロセッシングにより産生され、腎臓の顆粒細胞によって分泌される、340 個のアミノ酸からなる分子量 4.2 万の蛋白質であり (11,12)、腎動脈圧の低下、塩化ナトリウムの低下、交感神経の興奮がその分泌につながる (13)。レニンは肝から分泌されるアンジオテンシノーゲンをアンジオテンシン I に加水分解する (14)。デカペプチドであるアンジオテンシン I は、さらに肺で産生されるアンジオテンシン変換酵素（ACE）によってオクタペプチドであるアンジオテンシン II に変換される (15,16)。アンジオテンシン II は I 型アンジオテンシン受容体（AT1 受容体）に結合し、下流シグナルの活性化を介した血管平滑筋収縮、および副腎皮質からのアルドステロンの分泌促進などを介したナトリウムと水の貯留、さらには組織線維化、炎症惹起、活性酸素の産生など、様々な疾患に重要な役割を果たしている (Fig 1) (17)。

RAS は、心肥大、アポトーシス、心室拡張を伴う心不全の病態進行にも必須の役割を果たしている (18,19)。心不全患者では RAS が活性化されていることが知られており (20,21)、ACE 阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (ARB) など、RAS の阻害を伴う様々な治療法が、過去数十年にわたって開発さ

れてきた。これらの薬剤は、無作為化比較試験において、心不全の発症率および死亡率の低下に有効性を示し、心不全治療の中心的薬剤として使用されてきた(22-25)。一方、レニン産生の上昇といった代償機構やその他の逃避機構が存在し、これが ACE 阻害薬や ARB の効果に影響を及ぼす可能性があるため、RAS を効率的に阻害できていない場合がある(26)。アンジオテンシノーゲンからアンジオテンシン I の生成を触媒し、RAS 経路の第一段階かつ律速段階を制御するレニンを直接阻害すれば、血漿または組織のレニン濃度が上昇する場合でも、RAS カスケードを効率的に遮断できることが期待される(27,28)。

レニン阻害薬の研究の始まりは半世紀前に遡る。1972 年に初めてのレニン阻害ペプチドが報告され、1989 年にレニンの X 線結晶構造が報告されると、レニン阻害薬の本格的な探索が始まった(29,30)。レニン阻害ペプチドは強力なレニン阻害活性を有するものの、ペプチドゆえに経口薬剤としての致命的な欠点を有していた。それは、腸管からの低い吸収性、および肝での初回通過効果による代謝であり、結果として経口バイオアベイラビリティが非常に低かった。その後、研究者たちは、分子モデリング、X 線結晶構造解析、structure-based drug design など、新しいドラッグデザインツールの技術を基に、レニンのリガンド結合に重要な、S1-S3 ポケットと呼ばれる領域を特定し、さらにハイスループットスクリーニングから見いだされた化合物の最適化を進めることで、ペプチド

からの脱却を図った (31)。その結果、経口投与可能により強力なレニン阻害作用と降圧作用を発揮する、アリスキレン (Novartis 社) が創製された。2007 年に発売された最初の直接レニン阻害薬 (DRI) であるアリスキレンは、経口投与可能なものの、ヒトでの経口バイオアベイラビリティ (BA) は 2.6% と依然として高いものではなかった (32)。そこで、このアリスキレンの創製と承認を受け、世界中の製薬企業で経口吸収性を改善した次世代 DRI の開発競争が始まった。

我々は、強力な BA が良好な新規 DRI である、TAK-272 (SCO-272/imarikiren) を創製した (33)。TAK-272 はベンズイミダゾール誘導体であり、初期の健常人を対象とした臨床試験において、BA が 13-17% と、アリスキレンに比して大幅に改善するとともに、血漿中レニン活性 (PRA) を強力かつ持続的に阻害することが確認されている (34)。また、2 型糖尿病患者で微小アルブミン尿を呈する患者を対象とした臨床第 2 相試験では、TAK-272 が用量依存的に尿中アルブミン/クレアチニン比を改善し、降圧作用を発揮するとともに、良好な忍容性を示した (35)。前述のように、RAS は心不全の病態進行に大きな役割を果たし、レニンは RAS の律速酵素であることから、TAK-272 の抗心不全効果は興味深い。本研究では TAK-272 の抗心不全効果を、前臨床モデル動物を用いて評価する。

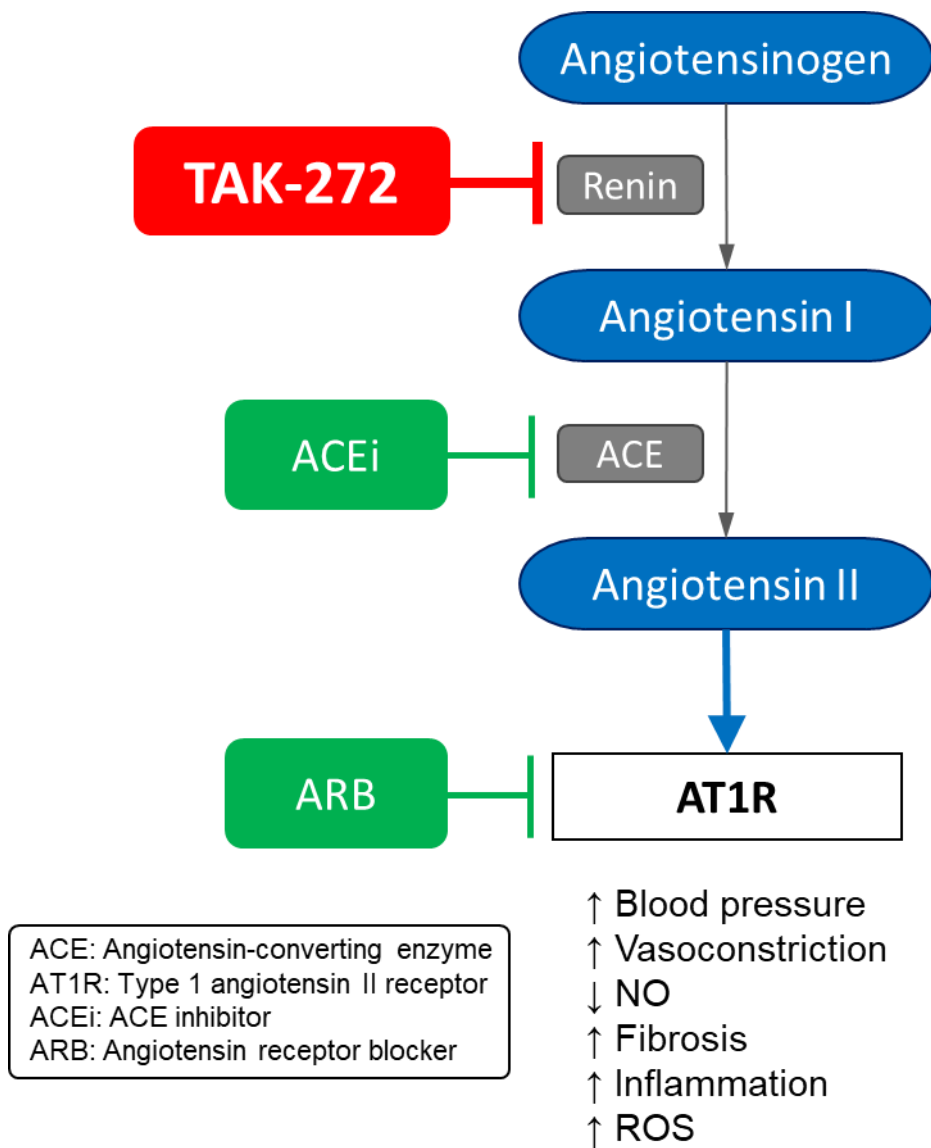


Fig 1: 古典的レニン・アンジオテンシン系とその阻害薬

2. 心不全モデル動物

これまでに様々な心不全モデル動物が各種薬剤の薬効評価に使用されてきたが、各モデルごとに長所と短所がある。まず動物種について考えると、マウス、ラットなどのげっ歯類から、イヌ、ブタなどの大動物まで、様々な動物で心不全モデルの開発が行われてきた (36-38)。一般的に、大動物のほうが左心室壁の張力、心拍数、血管の壁と内腔の比率など、心筋の仕事量とエネルギー消費に関わる要因がヒトに近く、臨床への翻訳可能性はげっ歯類に比べ高いといえる。一方で、コストや処理能力、また倫理的な問題から、大動物を使った試験を頻繁に実施することは現実的でない。典型的な実施例としては、臨床試験に比較的近いステージまで辿り着いた場合に、前臨床における最終的なコンセプトの確認として小規模な試験を実施する、というものであろう。一方で、げっ歯類は、そのサイズ、コストや処理能力、動物の入手し易さが利点となる。特に化合物評価を行う場合には、体重もしくは体表面積あたりで投与量を設定するのが一般的であり、評価に要する化合物を大量合成する点を考えると、げっ歯類のサイズは大きな利点となる。したがって、その目的に応じて動物種を使い分けるべきであろう。本研究ではマウスモデルを使用した検討に注目する。様々な心不全モデルマウスが開発されてきた中で、製薬企業における薬効評価を行うモデル選択を想定

した場合、1. 病態の再現性および均一性、2. 作出にかかるリソース、3. 臨床への翻訳可能性が、重要なファクターと筆者は考える。

冠動脈のうち左前下行枝を結紮する心筋梗塞モデル、および胸部もしくは腹部大動脈縮窄による圧負荷モデルは、最も一般的に使用される心不全モデルである。心筋梗塞モデルでは、その虚血部位が機能不全となり線維性組織を形成することで、心臓の構造的変化を伴うとともに、残存する心筋組織への負荷が相対的に増大することで心リモデリングを誘発する。また、左室拡張末期圧の上昇など、うっ血症状を呈するのも特徴の一つである (39,40)。このように、心筋梗塞から心不全に至るといふ、ヒトと類似した病態経過を辿る一方、いくつかの欠点もある。1. うっ血を呈する梗塞巣サイズにおける閾値の存在、2. 個体間の血管走行の違いを要因とする梗塞サイズのコントロールの難しさ、3. 最大70%と報告されるような、高い術後死亡率、などである (39,41)。またマウスモデルの場合は、心室壁の肥厚や線維化がラットに比べて軽度であることも報告されている (42)。大動脈縮窄による圧負荷モデルは、心拍出時に負荷がかかることにより、術後数か月をかけて同心性心肥大とともに収縮・拡張不全を呈する。このモデルでは術後死亡率が低い、逆に心肥大から心不全にまで進行する動物は必ずしも十分に得られない場合がある (38)。このように、両モデルとも個体間の症状に均一性が乏しく、また胸腔を開ける手術によってモデル動物の作出に

多大な労力を要する。さらに、手術に繊細な技術を要し、術者の変更により結果が変わってしまうというリスクもある。

抗がん剤であるドキソルビシンの投与によって心毒性が引き起こされることが知られており、これを利用した心不全モデルもよく使用される。ドキソルビシンを 1-2 週間に渡って投与すると、心臓での活性酸素の産生が増加し、その結果、ミトコンドリアの機能不全、Ca²⁺ハンドリングの異常、および心筋細胞死などを誘発する (43)。形態的には心室壁の菲薄化と心室容積の拡大を特徴とし、心拍出量が低下する。このモデルは、非侵襲的かつ簡便な手技でモデル動物の作製が可能であることが利点である。一方で、左心室機能不全に関する個体差、致死性不整脈の出現、ドキソルビシンの骨髄や消化管に対する毒性、さらに用量によっては投与初期に 30% を超える死亡例が出るということが報告されている (38,43)。

自然発症高血圧ラット (SHR) および自然発症高血圧心不全ラット (SHHF) は、非常に高い血圧を有し、それに伴う心臓の線維化、酸化ストレス、アポトーシス等から心機能の低下が認められる (44,45)。これはヒトの高血圧を要因とした心不全の発症と類似した過程を経ると考えられ、さらに SHHF では心臓の構造的・機能的変化や神経ホルモン分泌においてもヒト心不全と類似した表現型が認められる。このモデルの大きな問題はその発症にかかる期間であり、SHR では 21 か月ほど、SHHF でも 15 か月ほどと、作出における柔軟性が

非常に低く、製薬企業における薬効評価に適しているとは言い難い。また、マウスの高血圧モデルを考えた場合、SHRのような200 mmHgを超えるような高血圧には至ることはなく、それだけで心不全発症を誘発するのは難しいと考えられる(46)。

カルセクエストリントランスジェニック (CSQ-tg) 心不全モデルマウスは、心臓のCa²⁺恒常性に重要なタンパク質であるCSQを過剰発現させることで、筋細胞における細胞内Ca²⁺ハンドリングに異常をきたす。そのため、CSQ-tgマウスは、心肥大、線維化、およびポンプ不全など様々な有害な心不全様の表現型を示す心不全モデルである(47,48)。このモデルは遺伝子改変動物であるため、ジェノタイプング等の手間が必要なものの、交配によって作製ができる。我々が使用するCSQ-tgマウスの病態進行は早く、早期に死亡するが、その経過や生存期間に関する個体差は小さく、臨床のような生存期間の評価も比較的短期間で可能である(49)。また、臨床での標準薬であるβ-blockerやARBが薬効を示し、臨床翻訳可能性も高いと考えられる(49,50)。このような経緯から、本研究ではCSQ-tgマウスを用いてレニン阻害薬TAK-272の抗心不全作用を検討することとし、次章以降に詳細を述べる。

第二章

新規レニン阻害薬 **TAK-272 (imarikiren)** によるマウス心不全モデルの心臓リモデリングおよび死亡率改善

1. 要旨

心不全の進行に重要な役割を果たしているレニン・アンジオテンシン系 (RAS) は、RAS カスケードの律速酵素であるレニンを阻害することで効率的に遮断される。本研究では、経口投与可能な新規の直接レニン阻害薬 (DRI) である TAK-272 (SCO-272、imarikiren) の心保護作用を検討し、既に市販されている先行品のアリスキレンと比較した。TAK-272 は、重篤な症状と高い死亡率を示す CSQ-tg マウスに投与した。その結果、TAK-272 300 mg/kg を投与した CSQ-tg マウスでは、PRA、心肥大、肺うっ血が有意に抑制された。さらに、TAK-272 は、NADPH oxidase 4 および nitric oxide synthase 3 の発現量を調節することで、心筋細胞の傷害を軽減した。また、TAK-272 は用量依存的に CSQ-tg マウスの生存期間を延長した。さらに、同じ用量レベル (300 mg/kg) で比較すると、TAK-272 は強い持続的な PRA 阻害作用を示し、心臓重量および心不全バイオマーカーである血漿中 N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) 濃度を低下させたのに対し、アリスキレンは PRA 阻害作用が弱く、心保護作用も示さなかった。以上の結果から、TAK-272 は経口投与可能で持続性のあるレニン阻害薬であり、CSQ-tg マウスの死亡率を低下させ、心肥大や心不全を予防する効果があることが明らかとなった。したがって、TAK-272 の投与は、心不

全の新たな治療法となる可能性がある。

2. 背景および目的

RAS は AT1 受容体シグナルを介した血圧上昇、線維化、炎症惹起、活性酸素の産生など引き起こし、心肥大や心筋細胞死などの心不全病態形成に大きく関与する (17-19)。これまでも ACE 阻害薬や ARB などの RAS 阻害薬が開発され、それらが抗心不全作用を発揮することが臨床で証明されているため、RAS の律速酵素であるレニン阻害による抗心不全効果は興味深い。

唯一の上市済み DRI であるアリスキレンの心臓保護作用は、心筋梗塞、圧負荷、あるいはドキソルビシン誘発性心不全のいくつかの動物モデルで認められている (51-53)。臨床においても、アリスキレンの抗心不全作用が評価されている。2008 年に報告された ALOFT 試験では、ACE 阻害薬または ARB、および β -blocker による治療歴のある、New York Heart Association (NYHA) class II-IV の心不全患者にアリスキレン 150 mg/day を追加し、心不全バイオマーカー、血漿中 NT-proBNP に与える影響を検討した (placebo: 146 例、アリスキレン: 156 例)。その結果、placebo 群に比べて、アリスキレン群では NT-proBNP レベルが有意に低下した (54)。この結果を受けて、駆出率の低下した心不全患者 7,000 例以上を対象に、アリスキレンの心臓保護効果を評価する最大の臨床試験である、ATMOSPHERE 試験が実施され、2016 年にその結果が発表された (55)。

この試験においては、アリスキレンと ACE 阻害薬であるエナラプリルの抗心不全作用が比較されたが、残念ながらアリスキレンはエナラプリルに対する非劣性を証明できなかった。

我々が創製した TAK-272 は、強力なレニン阻害活性を有し、アリスキレンの懸念である経口吸収性を大幅に改善している [33]。そこで本研究では、同じく DRI である TAK-272 の抗心不全作用を評価するとともに、アリスキレンの有効性との比較を目的とする。

本章では、CSQ-tg マウスを用いて、TAK-272 の心筋保護作用を検討した。前章に記載したように、CSQ-tg マウスは、若週齢から心肥大、線維化、心機能低下などを有し、病態の再現性および均一性、作出にかかるリソース、臨床への翻訳可能性の面から、抗心不全効果の評価に適した遺伝子改変動物である。そこで、この CSQ-tg マウスの心臓リモデリングと死亡率に対する TAK-272 の効果を評価し、さらにアリスキレンとの比較を行うこととした。TAK-272 およびアリスキレンは臨床で経口薬として使用されていることから、本研究でもその薬効を継続的な経口投与により評価した。

3. 材料および方法

3-1. 薬剤

TAK-272 は武田薬品工業株式会社（日本）で合成され、アリスキレンは KNC ラボラトリーズ（日本）から購入した。これらの化合物は 0.5% (w/v) メチルセルロース溶液に溶解し、すべての試験において 1 日 1 回、メチルセルロースとして 10 mL/kg を経口投与した。薬剤の投与用量は各項目に記載する。

3-2. 動物

イヌ CSQ を心臓特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスは、もともとインディアナ大学医学部の施設で開発され (48)、その後、武田ラビックス（日本）で繁殖させたものである。過剰発現系統は (C57BL/6J×DBA/2N) F1 背景で作製した。本検討では CSQ-tg の雌マウスを使用し、すべての実験において、体重に基づいて無作為に割り付けた。すべての動物実験は、武田薬品工業株式会社湘南研究所の Institutional Animal Care and Use Committee によって承認されている。

3-3. 血漿中レニン活性および血圧

PRA に対する TAK-272 の影響は、CSQ-tg マウスに vehicle (n = 10) または TAK-272 (300 mg/kg、 n = 10) を 5 週齢から投与し、薬物投与開始 7 日目の最終投与 24 時間後に EDTA を用いて尾静脈から血液を採取して測定した。PRA は、市販のラジオイムノアッセイキット (富士レビオ株式会社、日本) を用いて測定した。別の実験として、CSQ-tg マウスに vehicle (n = 8) または TAK-272 (300 mg/kg、 n = 8) を 5 週齢から投与し、血圧を測定した。収縮期血圧 (SBP) は、血圧計 BP-98A (株式会社ソフトロン、日本) を用いて、ブラインド条件でテールカフ法により、薬剤投与開始 7 日目の最終投与 24 時間後に測定した。なお、各試験には、vehicle を投与した WT マウス (n=5) も正常対照として使用した。

3-4. 血漿中および心臓中アンギオテンシン II (AII) 濃度

WT マウス (n = 8) および CSQ-tg マウスに vehicle (n = 8) または TAK-272 (100 mg/kg、 n = 7) を 5 週齢から 2 週間投与した後に、2-3% イソフルラン (Mylan、 UK) による麻酔下で、抗凝固剤として EDTA を用いて腹腔静脈から血液を採取した。動物を安楽死後に心臓を摘出した。血漿中および心臓の AII 濃度は、市販の EIA キット (Bertin Pharma、 フランス) を用いて測定した。

3-5. TAK-272 の心筋保護作用

TAK-272 の心臓保護作用を評価するため、CSQ-tg マウスに 5 週齢から vehicle (n = 10) または TAK-272 (30、100、300 mg/kg、各投与群 n = 10) を投与した。薬剤投与開始 19 日後、2-3%イソフルラン (Mylan、UK) による麻酔下で、抗凝固剤として EDTA (最終濃度 3 mM、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、日本) を用いて腹腔静脈から血液を採取した。放血による安楽死後、心臓と肺を摘出し、重量を測定した。血漿中の NT-proBNP 濃度は、わずかに改変した完全長のマウス NT-proBNP ペプチド (株式会社スクラム、日本) を標準として、市販の酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) キット (カタログ#: SEA489Mu、Cloud-Clone、USA) を用いて測定した。別の実験では、CSQ-tg マウスに 5 週齢から vehicle (n = 18) または TAK-272 (300 mg/kg、n = 18) を投与し、イソフルラン麻酔下で薬剤投与開始 16 日後または 17 日後に血液を採取した。動物を安楽死後に心臓を摘出した。血漿中の心筋トロポニン I (cTnI) 濃度は、市販の ELISA キット (カタログ#: CTNI-1-US、Life Diagnostics、USA) を用いて測定した。左心室は RNeasy[®] (カタログ#: AM7021、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、日本) 溶液に入れ、RNA 抽出まで 4°C で保存した。別組の動物を用いて、Vevo 2100 超音波システム (VisualSonics、Canada) により心エコー検査を行った。CSQ-tg マウスは、5 週齢時の体重、左

心室 (LV) の拡張末期径 (EDD)、および駆出率 (EF) に基づいて無作為に割り付けた。そして、5 週齢から vehicle (n=12) または TAK-272 (300 mg/kg、n=12) を投与した。投与開始 12 日後または 13 日後に、乳頭筋レベルでの LV 短軸 M モード画像を取得した。LVEF は Teichholz の式 ($V = 7.0 / 2.4D \times D^3$) を用いて算出した。また、vehicle を投与した野生型 (WT) マウスのグループも本研究に使用した。WT マウスの LVEDD および LVEF の個体間差は、CSQ-tg マウスに比べて非常に小さかったため、3 匹の WT マウスを正常対照群として使用した。

3-6. 生存率試験

CSQ-tg マウスに 0.5% (w/v) メチルセルロース溶液 (vehicle) (n = 20) または TAK-272 (30、100、300 mg/kg、各投与群 n = 20) を投与した。週に 2 回体重を測定し、1 日 1 回マウスの状態を観察した。また 7 週齢以降は、試験終了時 (投与開始から 36 日後) まで直腸温を 1 日 1 回測定した。すべての研究スタッフは、一貫した手法で直腸温を測定できるようにトレーニングを実施した。動物の苦痛を最小限に抑えるため、直腸温が 29°C 未満を安楽死基準として予め設定し、二酸化炭素を用いて直ちに安楽死させた。また、身体活動の極端な低下や体重減少などの臨床症状が見られたマウスも安楽死させた。剖検の結果、すべ

ての死体に重度の心肥大が認められたが、目視では肝臓、腎臓、脳など他の臓器に明らかな変化は認められなかった。これらの所見から、これらのマウスは心不全が主な原因で死亡したと考えられた。本研究で使用した 80 匹のマウスのうち、試験終了までに 44 匹を安楽死させ、17 匹のマウスは自然死であった。

3-7. リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) による mRNA 発現の解析

RNeasy Mini kit (Qiagen、ドイツ) を用いて total RNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies、アメリカ) を用いて cDNA に変換した。遺伝子発現の解析は、7900HT Fast Real-Time PCR システム (Life Technologies、アメリカ) を用いて、TaqMan® Universal Master Mix II (Life Technologies、アメリカ) と NADPH oxidase 4 (Nox4、Mm00479246_m1)、nitric oxide synthase 3 (Nos3、Mm00435217_m1)、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1、Mm01178820_m1)、collagen type I α 1 (Col1 α 1、Mm00801666_g1)、 β -actin (ACTB、Mm02619580_g1) に対するプライマー・プローブセット (TaqMan® Gene Expression Assays、Life Technologies、アメリカ) を用いて行った。ACTB は内因性コントロール遺伝子として用いた。遺伝子の相対的な発現量は、 $\Delta\Delta$ CT 法により算出した。

3-8. TAK-272 とアリスキレンの in vitro でのレニン阻害活性の比較

ヒトの血漿は、武田薬品工業株式会社の研究倫理委員会の承認を得て、社内ボランティアから EDTA を用いて採血し取得した。マウスの血漿は日本チャールス・リバー株式会社から購入した。TAK-272 またはアリスキレンを DMSO/生理食塩水 (50 v/v%) で溶解および希釈して化合物溶液 (0.5 nmol/l~500 mmol/l) を調製した後、この溶液と血漿を 1:24 の割合で混合した。ヒトおよびマウスの血漿に対する TAK-272 およびアリスキレンのレニン阻害活性は、PRA と同様の方法にて測定した。

3-9. アリスキレンによる用量依存的な PRA 阻害

CSQ-tg マウスに vehicle、アリスキレン (30、100、300 mg/kg)、および TAK-272 (100 mg/kg) を単回投与した (各群 n = 8)。薬物は 5 週齢時に経口投与し、薬物単回投与の 2 時間後と 24 時間後に EDTA を用いて尾静脈から採血し、PRA を測定した。

3-10. TAK-272 とアリスキレンの有効性の比較

CSQ-tg マウスに 5 週齢から vehicle (n=8)、TAK-272 (300 mg/kg、n=8)、アリスキレン (300 mg/kg、n=8) を投与し、同一用量レベルの TAK-272 とア

リスキレンの PRA に対する効果を比較した。投与前、単回投与の 2 時間後および 24 時間後に血液を採取し、PRA を測定した。さらに別試験として、CSQ-tg マウスに vehicle (n=12)、TAK-272 (300 mg/kg、n=12)、アリスキレン (300 mg/kg、n=12) を投与し、2 つの薬剤の心保護作用を比較した。血液および組織を採取して重量を測定し、薬物投与開始 19 日後に血漿中の NT-proBNP 値を測定した。また、各試験には WT マウスのグループ (n=4) も正常対照として使用した。

3-11. 統計解析

化合物の in vitro レニン阻害活性を除くすべてのデータは、平均値±S.D.で表した。化合物の in vitro レニン阻害活性を除くすべての統計解析は、EXSUS ソフトウェア (version 8.0.0、株式会社 C A C クロア、日本) を用いて行った。2 群間の比較では、まず分散の均一性について F 検定を行い、Student's t-test (F 検定による $P > 0.20$) または Aspin-Welch's t-test (F 検定による $P < 0.20$) を行った。3 群以上の比較では、まず Bartlett の分散の均質性の検定によりデータを分析し、次に一元配置分散分析および Dunnett の検定または Williams の検定 (Bartlett の検定で $P > 0.05$)、または Kruskal-Wallis のノンパラメトリック分散分析および Steel の検定または Shirley-Williams の検定 (Bartlett の検定で P

<0.05) を行った。生存率分析は、Kaplan-Meier 法による log-rank 検定を行った。必要に応じて、多重性を考慮してボンフェローニ補正を追加で行った。詳細な統計手法は、各図表に記載した。In vitro でのレニン阻害活性に対する化合物の IC₅₀ 値およびその 95%信頼区間 (CI) は、SAS ソフトウェア (SAS Institute Japan 株式会社) を用いたロジスティック回帰分析により算出した。

4. 結果

4-1. 血漿中レニン活性、AII 濃度および血圧

まず、TAK-272 が RAS および血圧に与える影響を検討した。TAK-272 (300 mg/kg) は、7 日間連投の最終投与 24 時間後において、CSQ-tg マウスの PRA を有意に低下させた (Fig 1A)。WT 群、vehicle 群、および TAK-272 群の PRA の平均値は、それぞれ 9.5 ± 4.1 、 15.5 ± 8.6 、および 6.4 ± 1.6 ng·ml/h であった。TAK-272 投与による後負荷への影響を調べるために、覚醒下でマウスの血圧を測定した (Fig 1B)。TAK-272 (300 mg/kg) を CSQ-tg マウスに 7 日間投与しても、最終投与 24 時間後の SBP は低下しなかった。WT 群、vehicle 群、および TAK-272 群のマウスの平均 SBP は、それぞれ 120 ± 4 、 99 ± 9 、および 93 ± 8 mmHg であった。さらに別試験において、血漿中および心臓中 AII 濃度を測定したところ、CSQ-tg マウスは WT マウスに比べ両 AII 濃度が有意に増加していた (Fig 2)。さらに、CSQ-tg マウスに TAK-272 100 mg/kg を 2 週間投与したところ、血漿中および心臓中 AII 濃度は WT マウスと同等レベルに抑制されていた。

4-2. 心肥大と血漿中の心不全マーカー濃度

次に、TAK-272 による抗心不全作用について検討した。TAK-272 (300 mg/kg) は、薬物投与開始 19 日後に、CSQ-tg マウスの左右心室および右心房重量を有意に減少させた (各組織で $P < 0.005$ vs. vehicle、Table 1)。また、TAK-272 (100 および 300 mg/kg) は、肺重量を有意に減少させた (100 mg/kg: $P < 0.025$ 、300 mg/kg: $P < 0.005$ vs. vehicle)。TAK-272 (300 mg/kg) のこれらの抗心肥大作用は、血漿 NT-proBNP 値 (心不全バイオマーカー) の有意な低下 (26%) を伴っていた ($P < 0.025$ vs. vehicle)。これらの結果から、CSQ-tg マウスでは、心不全症状が改善していることが示唆された。

4-3. 心エコー

続いて、心エコーを用いて左心室の収縮性および拡張性を評価した。その結果、5 週齢の CSQ-tg マウスの LVEDD はすでに WT マウスよりも大きく、LVEF は WT マウスと同等であることが確認された。その後、2 週間で CSQ-tg マウスの LVEF は著しく低下した。TAK-272 (300 mg/kg) は、薬物投与開始 2 週間後の CSQ-tg マウスの LVEF の低下を有意に抑制した ($P < 0.01$ vs. vehicle、Table 2)。この結果から、CSQ-tg マウスにおいて TAK-272 は左心室の収縮機能を改善することが示唆された。

4-4. 生存率

さらに、CSQ-tg マウスの生存率に対する TAK-272 の影響を評価した。Vehicle を投与した CSQ-tg マウスは、投与開始から 36 日以内に死亡または予め設定された基準により安楽死させた。TAK-272 投与マウスの生存率は、投与開始から 36 日目に用量依存的に有意に (TAK-272 300 mg/kg: $P < 0.01$ vs. vehicle) 延長された (Fig 3)。

4-5. RAS 関連遺伝子の発現と心筋傷害マーカー

TAK-272 の抗心不全作用のメカニズムを解析する目的で、RAS 関連遺伝子の発現と心筋細胞傷害に及ぼす影響を調べた。CSQ-tg マウスでは、WT マウスに比べて、心筋における Nox4、TGF- β 1、および Col1 α 1 mRNA の発現が有意に高く、Nos3 mRNA の発現が有意に低かった (それぞれ $P < 0.01$) (Fig 4A)。CSQ-tg マウスにおいて、TAK-272 (300 mg/kg) 投与は線維化マーカーである TGF- β 1、および Col1 α 1 mRNA の発現を変化させなかったが、酸化ストレスマーカーである Nox4 および内皮性 NO 合成酵素である Nos3 の mRNA の発現増加を有意に抑制した (それぞれ $P < 0.05$ vs. vehicle)。また、心筋傷害マーカーである cTnI の血漿中濃度は、WT マウスと比較して CSQ-tg マウスで劇的に上

昇していたが ($P < 0.01$)、TAK-272 投与によって有意に低下した ($P < 0.05$ vs. vehicle)(Fig 4B)。

4-6. TAK-272 とアリスキレンの PRA 阻害作用の比較

TAK-272 とアリスキレンの薬効比較を行うために、まずそれぞれの PRA 阻害作用を比較した。TAK-272 の in vitro におけるヒト血漿レニン阻害作用は強力で、 IC_{50} 値は 2.1 nmol/L であり、アリスキレン (0.8 nmol/L) と同程度であった (Table 3)。また、TAK-272 のマウス血漿レニンに対する阻害作用は、アリスキレンよりも弱かった。そこで、CSQ-tg マウスに vehicle、アリスキレン (30、100、300 mg/kg)、および TAK-272 (100 mg/kg) を単回投与し、2 時間後と 24 時間後に PRA を測定したところ、30~300 mg/kg のアリスキレンで用量依存的に PRA を阻害する傾向が認められ、投与 2 時間後に最大で vehicle 投与群に比べ 50 %程度の PRA 阻害を示した (各群 $n = 8$) (Fig 5)。一方で、TAK-272 100 mg/kg は投与 2 時間後に 75%、24 時間後でも 61%の PRA 阻害を示し、その効果はアリスキレン 300 mg/kg よりも強力であった。TAK-272 は 300 mg/kg から生存率を改善したため、次に行う心筋保護効果の比較では、TAK-272 とアリスキレンの同一用量 (300 mg/kg) での比較を行うこととした。

4-7. TAK-272 とアリスキレンの心筋保護効果の比較

次に TAK-272 とアリスキレンの心筋保護効果を比較するために、CSQ-tg マウスにそれぞれ 300 mg/kg を 19 日間投与し、心肥大と血漿中 NT-proBNP 濃度に対する効果を評価した。TAK-272 は、単回投与後 24 時間にわたって PRA を有意かつ持続的に阻害し (2 時間および 24 時間: $P < 0.01$ vs. vehicle)(Fig 6)、心肺重量を減少させた (右心室および肺の重量: $P < 0.05$ 、左右の心房重量: $P < 0.01$ vs. vehicle)(Table 4)。また、TAK-272 は血漿中 NT-proBNP 濃度を有意に低下させた。本試験では、LV 重量の減少は観察されなかったが、これは投与期間中に vehicle 群で 3 匹のマウスが死亡し、検出力が低下したためと考えられる。マウスレニンに対するアリスキレンのレニン阻害作用は TAK-272 と同等に強力であったが (Table 3)、アリスキレンは投与 2 時間後および 24 時間後の CSQ-tg マウスにおける PRA をわずかに阻害するにとどまり、TAK-272 に比べてその作用は弱かった (Fig 6)。さらに、組織重量および血漿中 NT-proBNP 濃度はアリスキレンによって減少しなかった (Table 4)。

5. 考察

CSQ-tg マウスは重度の心機能障害と心肥大を呈し、早期に死亡することが報告されており (47-49)、それは本検討の結果と一致していた (Table 2 および Fig 3)。また、RAS 阻害薬は CSQ-tg マウスの死亡率を低下させ、心筋保護作用を示すことが報告されている (49,56)。我々の実験では、血漿中および心臓組織中のアンジオテンシン II 濃度が有意に上昇し (Fig 2)、PRA もわずかに上昇した (Fig 1A) ことから、CSQ-tg マウスでは心不全患者と同様に RAS が活性化されていることが示唆された。これらの結果から、CSQ-tg マウスは、DRI を含む RAS 阻害薬の心不全に対する効果を調べるうえで、生理学的に適切なモデルと考えられる。

心不全における RAS 阻害薬の有効性を説明する要因として、これまでいくつかのメカニズムが提唱されており、後負荷の軽減がその一つであると考えられている (57)。TAK-272 (300 mg/kg) は CSQ-tg マウスの PRA を持続的に阻害したが、反復投与後 24 時間経過しても SBP の有意な低下は認められなかった (Fig 1B)。これは、CSQ tg マウスの血圧レベルが正常対照マウスのそれよりも低かったためであると考えられる。臨床において、RAS 阻害薬による降圧作用は、正常血圧の被験者では非常に限定的であることが報告されている

(58,59)。また、正常血圧の心不全マウスにおいて、アリスキレンは血圧を低下させずに心筋保護作用を示したことも報告されている (53)。これらの結果は、TAK-272 の心筋保護作用に、後負荷軽減以外のメカニズムが関与している可能性を示唆している。そこで、TAK-272 が RAS 関連遺伝子の発現にどのような影響を与えるのかを検討した。TGF- β シグナルは、アンジオテンシン II の下流に作用することが広く知られており、心臓のリモデリングや線維化に重要な役割を果たしている(60)。しかし本研究では、CSQ-tg マウス心組織における TGF- β および Coll α 1 mRNA の発現は、TAK-272 投与によって変化しなかった (Fig 4A)。CSQ-tg マウスの心機能障害は、腎灌流低下によるレニン分泌を伴う RAS シグナルの活性化だけでなく、 β -アドレナリンシグナルの機能障害も誘発する可能性がある (47)。TAK-272 が CSQ-tg マウスの TGF- β および Coll α 1 mRNA を減少させることができなかったのは、アンジオテンシン II シグナルの増加だけでなく、 β -アドレナリンシグナルの異常とそれに続く β -アレスチン発現の上昇など、RAS 以外のメカニズムによっても TGF- β および Coll α 1 が発現亢進されているためではないかと推測する (61,62)。一方、酸化ストレスの増大は、アポトーシス、線維化、リモデリングなどの心不全の病態に関与することもよく知られている (63)。NADPH oxidase (Nox) は、活性酸素種の主要な発生源の一つと考えられており、心臓では Nox2 と Nox4 が主に発現している (63)。CSQ-tg

マウスの心臓組織では、WT マウスと比較して、Nox2 の mRNA の発現は変化しなかった（データは非掲載）が、Nox4 の mRNA の発現は顕著に上昇していた（Fig 4A）。さらに、TAK-272 は CSQ-tg マウスの心筋組織における Nox4 mRNA の発現を有意に低下させたことから、活性酸素種の産生が抑制されたと考えられる。心筋の Nox4 発現および Nox 活性は、アンギオテンシン II によって上昇することが報告されている（64,65）。従って、今回観察された Nox4 発現の減少は、レニン阻害薬による RAS シグナルの抑制によって誘導されたと推測できる。さらに、内皮細胞における NO 合成酵素である Nos3 の発現は、アンギオテンシン II によって減少し、RAS 阻害薬によって回復することがこれまでに示されている（66,67）。Nos3 によって産生される一酸化窒素は、血管の恒常性維持に重要な役割を果たしており、Nos3 を過剰発現させると、心不全モデルマウスの生存率と肺のうっ血が改善されることが報告されている（68）。TAK-272 投与による Nos3 発現量の増加に伴って産生亢進した NO は、活性酸素のスカルベンジャーとして作用し、心筋保護作用に寄与するのではないかと推察される（Fig 4A）。本研究では、TAK-272 投与群で血漿中 cTnI 濃度が有意に低下し、心筋細胞死が抑制されたことが示された（Fig 4B）。したがって、TAK-272 の心筋保護作用には、心臓の Nox4 および Nos3 の発現を回復させることによる、活性酸素種の産生抑制および冠動脈血管の恒常性維持が寄与している可能性が考え

られる。我々の実験では、TAK-272 を 2 週間投与した後、血漿中だけでなく心組織中でもアンジオテンシン II 濃度が低下していることが示された (Fig 2)。TAK-272 による局所的な心筋の AII 低下は、これら遺伝子発現の変化を少なくとも部分的には説明できると考えている。

TAK-272 とアリスキレンの心臓保護効果を経口投与で比較したところ、TAK-272 は心肥大を改善し、且つ心不全バイオマーカーレベルを低下させたのに対し、アリスキレンは TAK-272 と同用量を用いても同様の効果を示さなかった (Table 4)。CSQ-tg マウスでは、心エコーで示されたように心機能障害の進行が早い (Table 2)。本研究では既報の研究 (51-53) と比較して高用量のアリスキレンを用いたにもかかわらず、心保護効果が認められなかった原因の一つは、その早い病態進行であると考えられる。今回の実験条件における 2 つの DRI の有効性の違いは、主に経口投与後のレニン阻害活性の違いによって説明される。本研究では、同用量の TAK-272 の方が、げっ歯類での経口バイオアベイラビリティ (BA) が非常に低いアリスキレンよりも CSQ-tg マウスの PRA を強力かつ持続的に阻害した (Fig 5 および Fig 6)。また、ヒトにおいてもアリスキレンの経口 BA は非常に低いことが報告されている (69)。ASTRONAUT、ALOFT、ASPIRE、ATMOSPHERE など、心不全患者を対象としたアリスキレンの臨床試験が数多く行われてきた。これらの臨床試験では、アリスキレンと他

の RAS 阻害薬を併用した患者において、低血圧、高カリウム血症、腎不全などの副作用の発生率が増加していた (54,55,70,71)。これらの副作用は、高用量のレニン阻害薬を含む二重の RAS 阻害薬投与によって引き起こされる、過剰な RAS 遮断が原因であると考えられるため、収縮機能障害を有する心不全患者には単剤で使用することが望ましい。この場合、アリスキレンは経口 BA が低いいため、レニン阻害作用が十分に発揮されず、単剤でレニン阻害薬の最大の効果を発揮することができない。一方、TAK-272 は好ましい経口 PK プロファイルを有しているため、本試験と同様に臨床においてもアリスキレンよりも強力かつ持続的に PRA を阻害する可能性がある (34)。アリスキレンの心保護効果を検討した最大の臨床試験である ATMOSPHERE 試験では、アリスキレンは ACE 阻害薬であるエナラプリルに対する非劣性を証明できなかった (55)。この残念な結果の理由として、本試験で使用された中等量のアリスキレン (平均投与量: 273~278 mg/day) ではレニン阻害作用が不十分であった可能性が考えられる。以前の報告では、アリスキレン 600 mg/day で観察された BP 低下作用と血漿レニン濃度の代償上昇は、アリスキレン 300 mg/day で観察されたものよりも強力であることが示されている (72)。つまり、ATMOSPHERE 試験で使用されたものよりも高用量のアリスキレンを用いることで、より強力なレニン阻害を達成できる可能性がある。しかし、アリスキレンが 600 mg/day で下痢の発生率が有

意に増加させたことから、臨床用量は 300 mg/日以下に制限されている。TAK-272 は、良好な経口 BA を有していることから、アリスキレンよりも低用量で強力にレニンを阻害し、高用量による下痢の可能性が少なく、アリスキレンの有効性を超えて、レニン阻害薬としての最大の有効性を発揮することが期待される。レニンは、RAS の第一段階および律速段階を制御しており、この酵素を阻害することで、RAS カスケードを効率的に遮断することができると考えられている (27,28)。さらに、TAK-272 は、マウスだけでなくヒトにおいても、その良好な経口 PK プロファイルと強力なレニン阻害活性により、経口薬として強固で持続的な PRA 阻害作用を示すと予想される。このことから、TAK-272 は、他の RAS 阻害薬である ACE 阻害薬や ARB よりも強力な心保護作用を示す可能性があり、TAK-272 が心不全治療の第一選択薬となることが期待される。本研究では、アリスキレンが TAK-272 よりも強力な *in vitro* レニン阻害作用を示すことを明らかにした。したがって、経口投与以外の方法で投与すれば、アリスキレンも心筋保護作用を示す可能性がある。実際、アリスキレンの強力な心筋保護作用は、いくつかの動物モデルにおいて、腹腔内投与などの非経口的な投与経路で証明されている (73)。また、Zhi らは、浸透圧ミニポンプを用いて皮下投与したアリスキレンが、ホモシステインで誘発したマウスの心筋線維化を抑制したことを報告している (74)。

本研究で留意すべき点の一つは、高用量のレニン阻害薬を使用したことである。TAK-272 およびアリスキレンのマウスにおけるレニン阻害活性は、レニンの触媒ドメインのアミノ酸配列に関する種特異的な違いにより、ヒトにおけるレニン阻害活性よりも 10 倍以上弱い (46,75)。したがって、高用量に関連したオフターゲット効果が、本研究の結果に影響を与える可能性は排除できない。また、本研究では、30~300 mg/kg のアリスキレンで用量依存的に PRA を阻害する傾向が認められたが (Fig 5)、高用量での安全性に対する懸念から、300 mg/kg 以上のアリスキレンの経口投与による PRA 阻害作用は評価しなかった。したがって、今回の試験では、アリスキレンの最大効果を測定できなかったという可能性も否定できない。これらに対処するためには、サルにおける検討やヒトのレニンおよびアンジオテンシノーゲンのダブルトランスジェニックマウスなど、種差を克服したモデルを用いた薬理学的研究が必要であろう。

結論として、TAK-272 は、CSQ-tg 心不全モデルマウスの死亡率を有意に減少させた。この生存率改善は、心肥大および収縮機能障害の抑制、血漿中 NT-proBNP 濃度の低下を伴う、心不全の改善をよってもたらされた。またその治療効果には、心臓の Nox4 および Nos3 の発現を回復させることによる、活性酸素の産生抑制および冠血管の恒常性維持が寄与していると考えられる。さらに、TAK-272 は、心不全の進行に関与する PRA の上昇を強力かつ持続的に抑制し

た。このように、TAK-272は、RASを強力に阻害することで、心不全患者の生存率や症状を改善する、新しい魅力的な治療法となり得ることが示された。

6. 図表

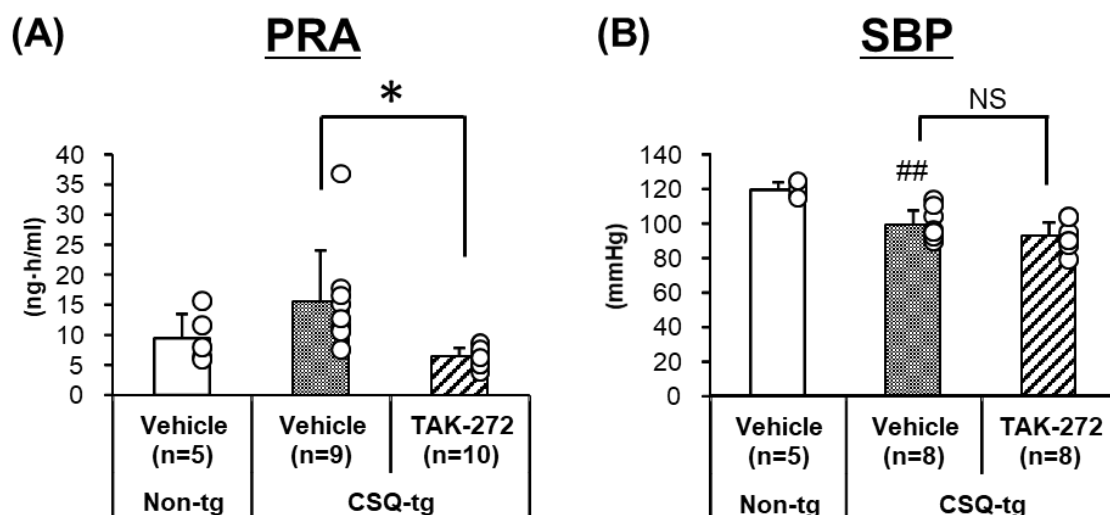


Fig 1. 血漿レニン活性 (PRA) および血圧 (BP) に対する TAK-272 の影響

WT マウスおよび CSQ-tg マウスに vehicle または TAK-272 (300 mg/kg) を 7 日間投与し、最終投与 24 時間後の(A)PRA、および (B) SBP を示した。PRA 試験中の各群の死亡数は WT 群、CSQ-tg+vehicle 群、TAK-272 (300 mg/kg) 群でそれぞれ 0、1、0 であった。BP 試験では死亡は認められなかった。データは平均値+S.D.で表した。## $P < 0.01$ vs. WT (Student's t-test)、* $P < 0.05$ vs. vehicle-treated CSQ-tg (Aspin-Welch's t-test)。

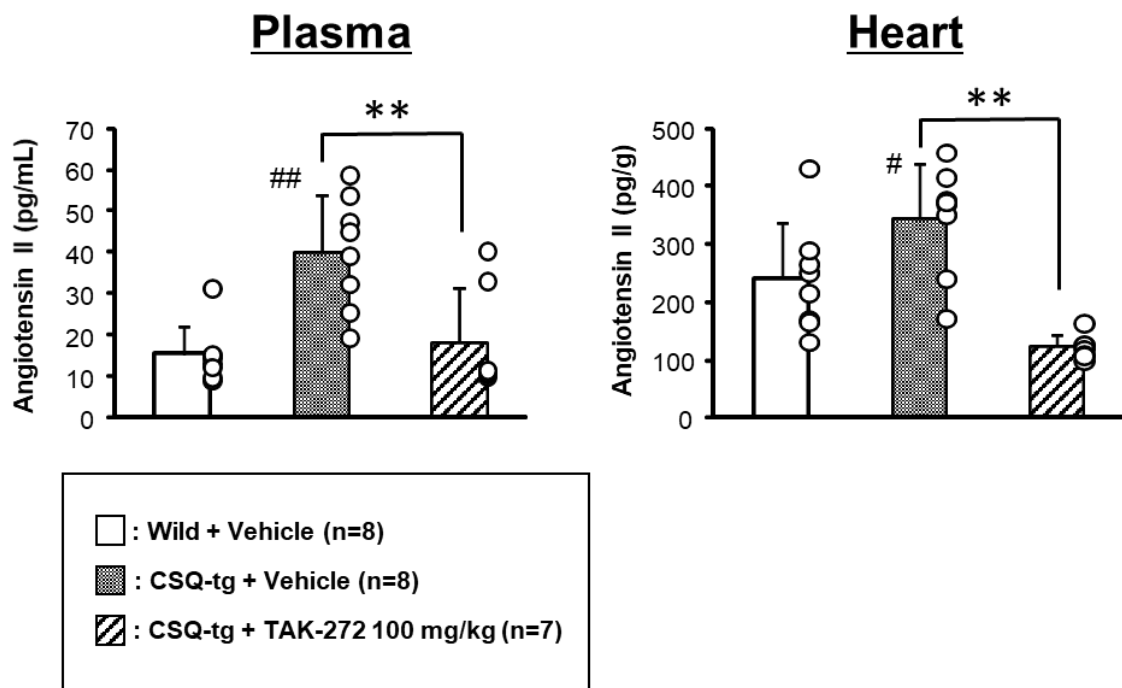


Fig 2. 血漿および心臓のアンジオテンシン II 濃度に対する TAK-272 の影響

WT マウス (n = 8) および CSQ-tg マウスに vehicle (n = 8) または TAK-272 (100 mg/kg、n = 7) を 2 週間投与した後の(A)血漿中、および (B) 心臓組織中のアンジオテンシン II (Ang II) 濃度を示した。試験期間中の各群の死亡数は、WT、CSQ-tg+vehicle、TAK-272 100 mg/kg 投与群でそれぞれ 0、0、1 であった。データは平均値+S.D.で表した。# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ vs. WT (Aspin-Welch's t-test または Student's t-test)、** $P < 0.01$ vs. vehicle-treated CSQ-tg (Aspin-Welch's t-test または Student's t-test)。

Parameter	Group (n)			
	Vehicle (7-8)	TAK-272 30 mg/kg (9)	TAK-272 100 mg/kg (10)	TAK-272 300 mg/kg (9)
Body weight (g)	15.1 ± 2.2	16.8 ± 2.8	15.1 ± 1.8	16.3 ± 3.2
Left ventricle (mg)	150.2 ± 13.9	145.2 ± 8.8	142.4 ± 9.2	132.3 ± 9.3**
Right ventricle (mg)	44.2 ± 3.4	41.6 ± 5.7	41.6 ± 2.9	37.8 ± 5.6**
Left atrium (mg)	10.8 ± 1.1	10.4 ± 5.1	10.4 ± 1.2	8.5 ± 2.6
Right atrium (mg)	8.1 ± 1.0	7.3 ± 2.2	7.1 ± 1.2	5.8 ± 1.8**
Lung (mg)	137.8 ± 12.9	128.5 ± 14.1	126.2 ± 8.3*	113.1 ± 10.9**
NT-proBNP (ng/ml)	9.9 ± 1.8	7.9 ± 2.8	9.2 ± 2.0	7.4 ± 2.4 ^a

Table 1. TAK-272 による心肥大および血漿中心不全マーカーへの影響

CSQ-tg マウスに TAK-272 (30、 100、 300 mg/kg) を経口投与したときの体重、心組織および肺の重量、血漿中 NT-proBNP 濃度を示した。データは平均値 ± S.D. で表した。試験期間中の各群の死亡数は、vehicle (n=7-8)、TAK-272 の 30 mg/kg (n=9)、100 mg/kg (n=10)、300 mg/kg (n=9) の各群で、それぞれ 2、1、0、1 であった。なお、vehicle 投与群の 1 匹は、技術的な問題で血漿サンプルを得ることができなかった。そのため、vehicle 投与群の動物の体/組織重量については 8 匹を、血漿中 NT-proBNP 濃度については 7 匹をそれぞれ測定した。* $P < 0.025$ 、 ** $P < 0.005$ vs. vehicle (片側 Williams's test)。

Parameter	Age (weeks)	Group (n)		
		WT Vehicle (3)	CSQ-tg Vehicle (10)	CSQ-tg TAK-272 (12)
LVEF (%)	5	74.1 ± 5.6	64.2 ± 9.5	64.5 ± 9.6
	7	82.7 ± 2.4	13.0 ± 7.1 ^{##}	26.7 ± 9.8*
LVEDD (mm)	5	3.3 ± 0.4	4.3 ± 0.3 [#]	4.3 ± 0.3
	7	3.3 ± 0.4	5.3 ± 0.5 ^{##}	5.0 ± 0.4

Table 2. TAK-272 による心エコーパラメーターに対する影響

WT マウス (n = 3) および CSQ-tg マウスに vehicle (n = 10) または TAK-272 (300 mg/kg, n = 12) を経口投与したときの左心室駆出率 (LVEF) および左心室拡張末期径 (LVEDD) を示した。データは平均値 ± S.D. で表した。vehicle 群は投与開始時には 12 匹であったが、2 匹が試験期間中に死亡したため、残りの 10 匹について解析した。[#]*P* < 0.05、^{##}*P* < 0.01 vs. WT (Aspin-Welch's t-test)。

**P* < 0.01 vs. vehicle-treated CSQ-tg (Aspin-Welch's t-test)。

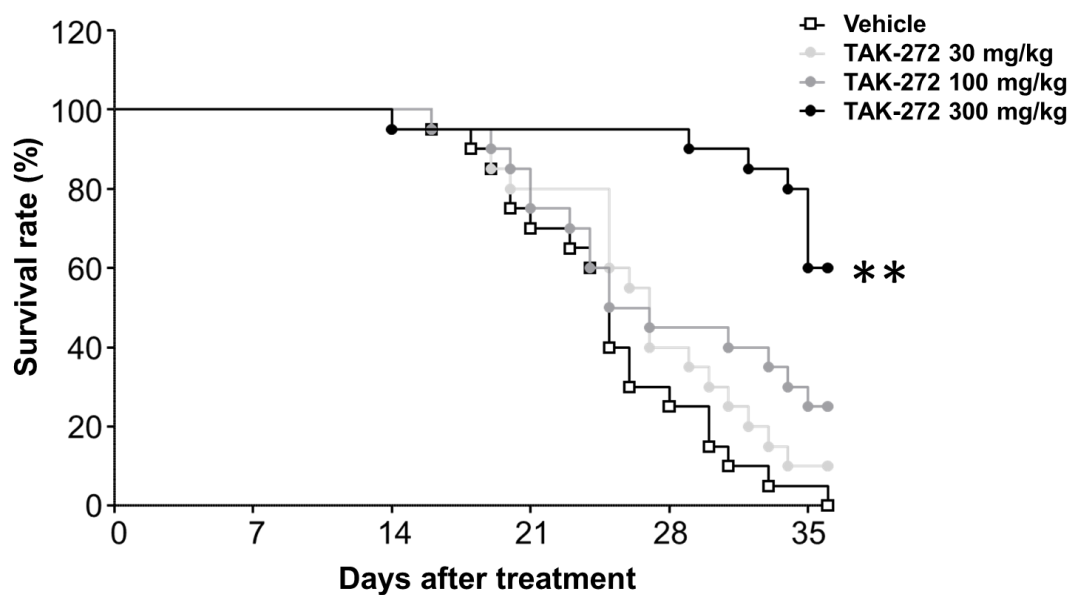


Fig 3. vehicle または TAK-272 を投与したカルセクエストロントランスジェニックマウス (CSQ-tg) の生存率

CSQ-tg マウスに vehicle、あるいは TAK-272 30、100、300 mg/kg を 1 日 1 回 経口投与した (各群 n = 20)。安楽死または自然死した動物の数は、Vehicle (E: 16、F: 4)、TAK-272 30 mg/kg (E: 17、F: 1)、100 mg/kg (E: 9、F: 6)、300 mg/kg (E: 2、F: 6) (E: 安楽死、F: 自然死) であった。** $P < 0.01$ vs. vehicle (Kaplan-Meier 法による log-rank 検定の後に Bonferroni 補正を実施)。

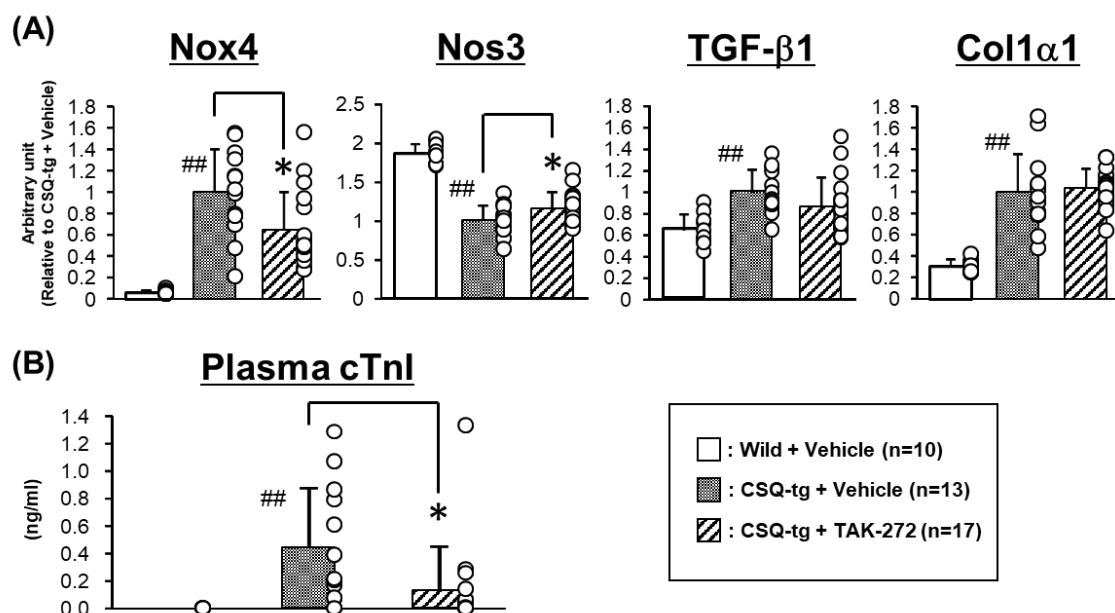


Fig 4. レニン・アンジオテンシン・システム (RAS) 関連遺伝子の発現および心

筋傷害マーカーに対する TAK-272 の効果

WT マウスおよび CSQ-tg マウスに vehicle または TAK-272 (300 mg/kg) を 16-17 日間投与した後の (A) 左心室 NADPH oxidase 4 (Nox4)、nitric oxide synthase 3 (Nos3)、transforming growth factor-β1 (TGF-β1)、collagen type I α1 (Col1α1) の発現量、および (B) 血漿中 cardiac troponin I (cTnI) 濃度を示した。試験期間中の各群の死亡数は、WT 群、CSQ-tg+vehicle 群、TAK-272 (300 mg/kg) 群でそれぞれ 0、5、1 であった。データは平均値+S.D.で表した。## $P < 0.01$ vs. WT (Aspin-Welch's t-test もしくは Student's t-test)、* $P < 0.05$ vs. vehicle-treated CSQ-tg (Student's t-test)。

	IC₅₀, nmol/L (95% CI)	
	Human	Mouse
TAK-272	2.1 (1.7-2.6)	53 (40-69)
Aliskiren	0.8 (0.7-1.0)	9 (6-12)

Table 3: TAK-272 およびアリスキレンの in vitro 血漿レニン阻害活性

TAK-272 及びアリスキレンの in vitro におけるレニン阻害活性の IC₅₀ 値及びその 95%信頼区間 (CI) を示した。IC₅₀ 値は、TAK-272 およびアリスキレンそれぞれ 6 つの濃度を用いた用量反応曲線から算出した。

PRA

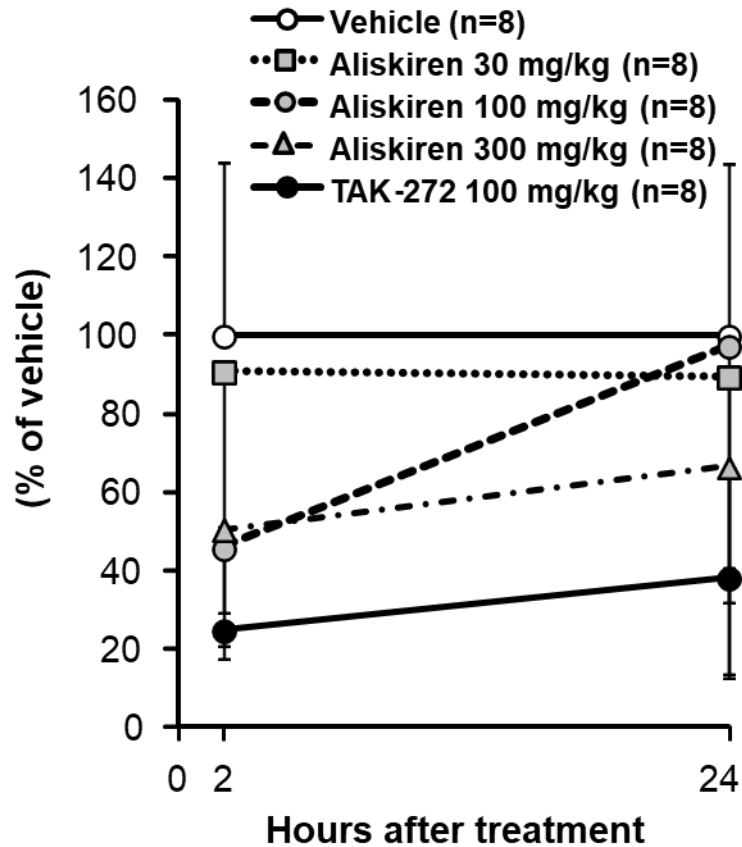


Fig 5. アリスキレンによる用量依存的な PRA 阻害効果

CSQ-tg マウスに vehicle、アリスキレン (30、100、300 mg/kg)、および TAK-272 (100 mg/kg) を単回投与し、2 時間後と 24 時間後の PRA を示した (各群 n = 8)。データは平均値+S.D.で表した。** $P < 0.01$ vs. vehicle (Dunnett's test の後に Bonferroni 補正を実施)。

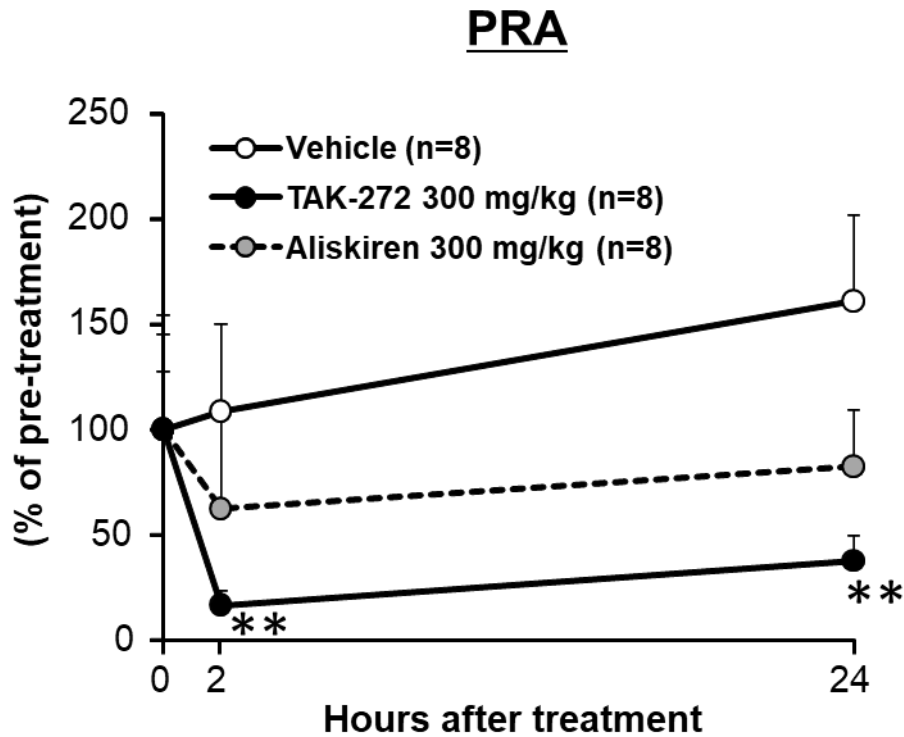


Fig 6. 血漿レニン活性 (PRA) 阻害に関する TAK-272 とアリスキレンの有効性の比較

Vehicle、TAK-272 (300 mg/kg) 、アリスキレン (300 mg/kg) を単回経口投与した CSQ-tg の PRA を示した。データは平均値+S.D.で表した。** $P < 0.01$ vs. vehicle (Dunnett's test の後に Bonferroni 補正を実施)。

Parameter	Group (n)			
	WT	CSQ-tg		
	Vehicle (4)	Vehicle (8)	TAK-272 300 mg/kg (11)	Aliskiren 300 mg/kg (12)
Body weight (g)	19.6 ± 0.6	15.8 ± 1.5 ^{##}	19.1 ± 1.0 ^{**}	16.6 ± 2.3
Left ventricle (mg)	67.4 ± 1.4	154.4 ± 15.8 ^{##}	150.0 ± 9.2	150.2 ± 11.6
Right ventricle (mg)	14.5 ± 1.4	46.0 ± 6.8 ^{##}	40.6 ± 5.3 [*]	45.5 ± 3.0
Left atrium (mg)	2.1 ± 0.3	14.3 ± 3.8 ^{##}	8.2 ± 3.0 ^{**}	11.4 ± 2.2
Right atrium (mg)	2.9 ± 0.8	8.1 ± 1.8 ^{##}	5.3 ± 0.8 [*]	7.9 ± 2.2
Lung (mg)	120.5 ± 7.4	138.7 ± 15.0 [#]	121.3 ± 10.1 [*]	129.9 ± 13.6
NT-proBNP (ng/ml)	1.0 ± 0.1	8.5 ± 3.5 ^{##}	4.5 ± 1.3 [*]	7.7 ± 2.3

Table 4: TAK-272 およびアリスキレンによる心肥大および血漿中心不全マーカー

一への作用比較

WT マウス (n=4) 、および CSQ-tg マウスに vehicle (n=8)、 TAK-272 (300 mg/kg、 n=11)、 アリスキレン (300 mg/kg、 n=12) を経口投与した際の、 体重、 心筋組織および肺の重量、 血漿中 NT-proBNP 濃度を示した。 データは平均値 ± S.D. で表した。 試験期間中の各群の死亡数は、 WT 群、 vehicle 群、 TAK-272 群、 アリスキレン群でそれぞれ 0、 4、 1、 0 であった。 #*P* < 0.05、 ##*P* < 0.01 vs. vehicle (Student's t-test または Aspin-Welch's t-test)、 **P* <

0.05、 ** $P < 0.01$ vs. vehicle-treated CSQ-tg (Dunnett's test または Steel's test)。

第三章

ヒトレニンおよびアンジオテンシノーゲンを過剰発現させた、新規
マウス心不全モデルの開発

1. 要旨

レニン、RAS カスケードの律速段階を担い、心不全の病態生理を進行させる。レニンの触媒ドメインのアミノ酸配列には種差があるため、ヒトレニンに最適化されたレニン阻害薬の効力や有効性を動物モデルで評価するには限界があり、また、げっ歯類で臓器保護作用を示すには、通常、非常に高用量が必要となる。本研究では、CSQ-tg マウスとヒトレニンおよびヒトアンジオテンシノーゲンのダブルトランスジェニックマウスを交配することにより、ヒトにとってより適切な用量でレニン阻害薬の心保護効果を評価できる新しい心不全モデルマウス (triple-tg) を開発した。Triple-tg マウスは、CSQ-tg マウスと比較して、PRA の上昇、心肥大の悪化、高い死亡率を呈した。CSQ-tg マウスでは 300 mg/kg の投与が必要であったが、DRI である TAK-272 を 10 mg/kg 投与した triple-tg マウスでは、心肥大や生存率などの心不全症状の悪化が改善された。これらの結果から、この新たに作製した triple-tg 心不全モデルは、ヒトレニン阻害薬の心保護作用を臨床に適した用量で評価するのに有用であり、通常のげっ歯類モデルで懸念される、臨床とはかけ離れた高い薬物暴露に関連するオフターゲット効果の懸念を、最小限に抑えることができると考えられる。

2. 背景および目的

マウスのようなげっ歯類とヒトでは、薬物動態や標的タンパクのアミノ酸配列の違いなどにより、薬効評価に必要な用量が異なる場合がある。特に前臨床モデルにおいて、ヒトよりも高用量で薬効評価を行う必要がある場合には、いくつか注意すべき点がある。最も重要な点は、高用量に伴うオフターゲット効果の懸念である。各種薬剤は標的タンパクに対して選択的であると考えられるが、用量が高いこと、また血中動態の違いなどから、従来選択性が低いはずの非標的タンパクに対する作用が予想外に発揮されてしまう可能性がある。さらに、薬剤自体が物理的に影響を及ぼす可能性もある。例えばアリスキレンは、臨床において600 mg/day 以上になると下痢の副作用が増加した (72)。この作用のメカニズムについては不明であるが、ACE 阻害薬や ARB での報告から考えると RAS 阻害が直接下痢を引き起こすとは考えにくく、オフターゲット効果もしくは消化管への物理的な作用等に因ると推察される。さらに、もしこのような作用が本来評価すべき薬効指標に関係してくる場合には、その評価系自体が適切ではなくなってしまう。例えば、薬物による心臓の陽性変力作用を評価したい場合に、その薬物のオフターゲット効果が血圧に影響する場合などが挙げられる。また、前臨床試験で高用量を要する場合には、薬効試験用に大量の薬剤を合成もしくは

精製する必要があり、費用および準備期間の面から、薬剤評価の処理能力は下がってしまう。このような理由から、適切な評価をする上でも、薬剤開発を効率的に行う上でも、臨床用量に近い用量で薬効評価を行うことが望ましい。

第二章の検討において、CSQ-tg マウスを用いて TAK-272 の心臓保護作用を評価したが、心肥大および死亡率の有意な改善を得るためには高用量が必要であった。TAK-272 に限らず、ヒトのレニンに最適化された他のレニン阻害薬では、レニンの触媒ドメインのアミノ酸配列が種によって異なるため、げっ歯類のレニンに対して阻害効果を発揮するためには、一般的に高濃度が必要とされる (46,75)。実際、第二章で示したように、TAK-272 のマウスにおけるレニン阻害活性は、ヒトにおけるレニン阻害活性の 25 倍も弱かった。また、ヒトのレニンは、げっ歯類のアンジオテンシノーゲンを効率よく切断できず、その逆もまた然りである (46,76)。これらの知見に基づき、ヒトレニンとヒトアンジオテンシノーゲンのダブルトランスジェニック (RA-tg) 動物は、レニン阻害薬の投与量を減らし、高用量に関連するオフターゲット効果の可能性を除くために、高血圧および腎機能障害に対するレニン阻害薬の *in vivo* 評価に使用されてきた (57,77)。

RA-tg マウスは、野生型およびヒトレニンとヒトアンジオテンシノーゲンそれぞれの単遺伝子トランスジェニック動物に比して高い血漿中アンジオテン

シン I および II 濃度を有するが、血圧は RA-tg ラットに比べて低く、また RA-tg ラットのような腎機能障害を伴う若週齢での死亡も認められず、6-8 ヶ月齢でも問題なく生存していると報告されている (46,57)。したがって、この RA-tg マウスを CSQ-tg マウスと交配することで、ヒトレニン阻害薬に感受性の高い心不全モデルマウスが作製できると期待される。

本章では、ヒトレニン、ヒトアンジオテンシノーゲン、およびイヌカルセクエストリンのトランスジェニックマウス (triple-tg) を作製し、このモデルの心不全病態を解析すると共に、TAK-272 の心保護効果を検討した。

3. 材料および方法

3-1. 動物

イヌ CSQ を心臓特異的に過剰発現させたトランスジェニック DBA/2N マウスは、第二章と同様のものを使用した。まず、プロモーター領域を含むヒトレニン全体 (15.3Kbp)、またはプロモーター領域を含むヒトアンジオテンシノーゲン全体 (14Kbp) の遺伝子からなる直鎖状の DNA 断片を C57BL/6J の卵に注入することにより、ヒトレニン、またはヒトアンジオテンシノーゲンのいずれかを持つトランスジェニックマウスを作製した。ヘテロ接合のヒトレニンマウスとヘテロ接合のヒトアンジオテンシノーゲンマウスを武田薬品工業株式会社で交配し、ヒトレニンとヒトアンジオテンシノーゲンを全身に過剰発現させたダブルトランスジェニックマウス (RA-tg) を作製した。今回使用した CSQ、ヒトレニン、ヒトアンジオテンシノーゲンのトリプルトランスジェニック (triple-tg) マウス、CSQ-tg、RA-tg、野生型 (WT) マウスは、ヘテロ接合の CSQ-tg マウスとヘテロ接合の RA-tg マウスを交配して作製した。これらのトランスジェニック系統はすべて、ハイブリッド (DBA/2N×C57BL/6J) F1 背景を持つ。Polymerase chain reaction (PCR) アッセイは、LabChip GX Software Version 4.0.1418.0 (ParkinElmer、アメリカ)、および Tks Gflex™ DNA Polymerase

(Takara Bio Inc、日本) を用いて、ヒトレニンプライマー (TTGGGAGCCAAGAAGAGGCTG and GCGCTGGTGAGCGTGTATTC、370bp)、ヒトアンジオテンシノーゲンプライマー (AAAATTGAGCAATGACCGCATCAG および GCTTCAAGCTCAAAAAAAAAATGCTGTTC、930bp)、もしくはイヌカルセクエストリンプライマー (CTCTGACAGAGAAGCAGGCACTTTACATGG および GATGAACAGGTGTTCTCTTCAT、407bp) を用いてこれらの遺伝子の発現を確認した後、遺伝子型によって triple-tg、CSQ-tg、RA-tg、WT マウスに区別した。予備的な研究で雄と雌のマウスが同等の症状と生存率を示したことから、また動物の入手が限られていたことから、本研究では雌雄のマウスをともに使用した。すべての動物実験は、武田薬品工業株式会社湘南研究所の Institutional Animal Care and Use Committee の承認を得て実施した。

3-2. トランスジェニックマウスにおける心循環パラメータおよび PRA

4 週齢の WT、RA-tg、CSQ-tg、triple-tg の雄マウス (各群 n = 10) の SBP は、第二章と同様のテールカフ法により、ブラインド条件下で測定した。血液サンプルは 5 週齢時に覚醒下で尾静脈から採取した。抗凝固剤として EDTA を最終濃度 3mM になるように添加した。PRA は、第二章と同様のキットを用いて

測定した。このキットは、ヒトおよびマウスのアンジオテンシノーゲンからヒトおよびマウスのレニンによって変換された総アンジオテンシン I を測定するものである。また、血行動態パラメータは 5 週齢で評価した。マウスは 1-2% イソフルラン (Mylan、イギリス) で麻酔した。直径 1.4F の圧力センサー付きカテーテル SPR-671 (Millar Instruments、アメリカ) を、右頸動脈から左心室に挿入した。左心室拡張末期圧 (LVEDP)、心室内圧の上昇率 ($dp/dt \max$) と下降率 ($dp/dt \min$) をブラインド条件で測定した。麻酔深度の指標となる心拍数は、これらの動物間で一貫させた。これらのデータを PowerLab に取り込み、LabChart v.8 と血圧モジュール (ADInstruments、オーストラリア) を用いて解析した。測定後、腹腔静脈から血液を採取し、心臓と肺を摘出して重量を測定した。心不全バイオマーカーである血漿中 NT-proBNP 濃度は、第二章と同様の方法で測定した。左心室 (LV) は、さらなる組織化学的分析および遺伝子発現分析に使用した。LV の上半分を Bouin 液で室温で 5 時間固定した後、さらなる染色のためにパラフィンに包埋した。パラフィン包埋した左心室組織を、乳頭筋レベルで $3 \mu\text{m}$ にスライスし、生理食塩水でコートしたスライドグラスに置いた。これらの切片をピクロシリウスレッドで染色した後、NonoZoomer (浜松ホトニクス株式会社、日本) を用いて画像を撮影した。残った LV からは RNeasy Mini kit (Qiagen、ドイツ) を用いて total RNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse

Transcription kit (Life Technologies、アメリカ) を用いて cDNA に変換した。遺伝子発現は、第二章と同様の方法で、atrial natriuretic peptide (ANP、Mm01255747_g1)、NADPH oxidase 4 (Nox4、Mm00479246_m1)、および β -actin (ACTB、Mm02619580_g1) に対するプライマー・プローブセット (TaqMan® Gene Expression Assays、Life Technologies、アメリカ) を用いて解析した。ACTB は内因性コントロール遺伝子として用いた。遺伝子の相対的な発現量は、 $\Delta\Delta$ CT 法により算出した。

3-3. CSQ-tg マウスと triple-tg マウスの生存率の違い

雄の CSQ-tg マウス (n=43) と triple-tg マウス (n=41) の生存率を 68 日間観察した。動物の苦痛を最小限に抑えるため、直腸温が 29°C 未満を安楽死基準として予め設定し、二酸化炭素を用いて直ちに安楽死させた。また、身体活動の極端な低下や体重減少などの臨床症状が見られたマウスも安楽死させた。体重は週に 2 回測定し、直腸温も試験終了まで 1 日 1 回測定した。

3-4. 薬剤

TAK-272 は武田薬品工業株式会社により合成され、アリスキレンは KNC ラボラトリーズより購入した。これらの化合物を 0.5% (w/v) メチルセルロース

溶液に溶解し、1日1回、経口投与した。

3-5. ヒトレニン阻害薬に対する triple-tg マウスの反応性

4週齢の雌性 triple-tg マウスに vehicle (n = 10)、または TAK-272 (10 mg/kg、n = 9) を1日1回投与し、血圧に対する TAK-272 の影響を評価した。SBP は投与開始7日目の投与2時間後と24時間後に測定した。血漿中 NT-proBNP 測定のため、SBP 測定の5日後に血液を採取した。TAK-272 投与群のマウス1匹は SBP 測定前に死亡した。Vehicle 投与群では2匹のマウスは採血前に死亡した。2週間の投与後に動物を安楽死させ、心臓を摘出し、3-2節に記載の方法で RNA を抽出後、ANP および Nox4 について遺伝子発現解析を行った。別の実験では、雌の triple-tg マウスに vehicle (n = 6) または TAK-272 (10 mg/kg、n = 6) を投与した。投与前、単回投与の2時間後、24時間後に血液を採取し、PRA を測定した。PRA の測定は前述のとおり実施した。

3-6. Triple-tg マウスにおける TAK-272 の心保護作用

TAK-272 の心筋保護作用を調べるために、1投与群あたり6匹の WT マウス (雄: 3、雌: 3) と9匹の triple-tg マウス (雄: 5、雌: 4) を用いた。WT マウスには vehicle を投与し、triple-tg マウスには4週齢から vehicle または TAK-

272 を 3 または 10 mg/kg を 1 日 1 回投与した。血液サンプルは、投与前、最初の投与の 2、6、および 24 時間後に採取した。PRA は 3-2 節に記載した方法で測定した。SBP は、3-2 節に記載した方法に従って、投与開始 6 日目の投与 2 時間後および 24 時間後に評価した。2 週間の投与後に動物を安楽死させ、心臓と肺を摘出して重量を測定した。合計 6 匹の triple-tg マウス (vehicle 投与: 3 匹、TAK-272 3 mg/kg: 2 匹、TAK-272 10 mg/kg: 1 匹) が試験終了前に死亡した。別の動物実験では、triple-tg マウスにおいて、TAK-272 を 10 mg/kg 投与した場合の生存率への影響を評価した。20 匹の triple-tg マウス (雄: 8 匹、雌: 12 匹) に、4 週齢から 1 日 1 回、vehicle または TAK-272 を投与し、24 日間観察した。生存率は前述した方法でモニターした。

3-7. 統計解析

すべての統計解析は、EXSUS ソフトウェア (version 8.0.0、株式会社 C A C クロア、日本) を用いて行った。2 群間の比較ではまず分散の均一性について F 検定を行い、Student's t-test (F 検定による $P > 0.20$) または Aspin-Welch's t-test (F 検定による $P < 0.20$) を行った。3 群以上の比較では、まず Bartlett の分散の均質性の検定によりデータを分析し、次に一元配置分散分析および Dunnett

の検定または Williams の検定 (Bartlett の検定で $P > 0.05$)、または Kruskal-Wallis のノンパラメトリック分散分析および Steel の検定または Shirley-Williams の検定 (Bartlett の検定で $P < 0.05$) を行った。生存率分析は、Kaplan-Meier 法による log-rank 検定を行った。すべてのデータは平均値±S.D.で表した。

4. 結果

4-1. Triple-tg マウスにおける PRA および BP の増加

ヒトレニンとヒトアンジオテンシノーゲンを過剰発現させると、PRA と SBP が顕著に上昇した (Fig 1)。CSQ-tg マウスは WT マウスに比べて PRA がわずかに高かったのに対し、triple-tg マウスでは PRA と SBP の両方が CSQ-tg マウスに比して有意に上昇していた。

4-2. Triple-tg マウスの心不全パラメータ

CSQ-tg マウスと triple-tg マウスの生存期間を比較した。triple-tg マウスの生存期間の中央値は、CSQ-tg マウスよりも短かった (Fig 2A、CSQ-tg: 54 日、triple-tg: 44 日)。同実験では RA-tg マウスの生存率をモニターしていないが、RA-tg マウスは少なくとも 10 週間は健康上の問題なく生存していることを確認している。また 6~8 ヶ月齢の RA-tg マウスを血圧および PRA 測定の対象としたことが報告されている (46)。4 系統の血漿中 NT-proBNP 濃度、心臓 ANP mRNA 発現量、心肥大を評価した (Fig 2B、2C)。CSQ-tg マウスでは、WT マウスに比べて心肥大が進行し、肺重量が増加していた。RA-tg マウスでは左心房、LV、肺重量の増加はわずかであったが、triple-tg マウスでは心臓と

肺の重量が著しく増加し、血漿中 NT-proBNP 濃度も上昇した。triple-tg マウスの心筋 ANP mRNA 発現量も CSQ-tg マウスよりわずかに増加していた。LV 切片像においても triple-tg マウスでは重度の心肥大が認められた (Fig 2D)。

しかし、心循環パラメータは、CSQ-tg マウスに比べて triple-tg マウスでは悪化しなかった (Fig 2E)。同様に、CSQ-tg マウスと triple-tg マウスでは、WT や RA-tg マウスに比べて心臓の線維化がわずかに増加していたが、心臓の線維化の重症度については、CSQ-tg マウスと triple-tg マウスの間に明確な違いはなかった (Fig 2D)。

4-3. CSQ-tg および triple-tg マウスにおける TAK-272 の心保護作用

TAK-272 は、3 および 10 mg/kg で PRA を 6 時間にわたって完全に抑制し、10 mg/kg では、単回投与後 24 時間にわたってより持続的に PRA を抑制した (Fig 3A)。TAK-272 投与群では、投与 2 時間後に一過性の SBP 低下が見られたが、24 時間後には低下した SBP は回復した (Fig 3B)。Triple-tg マウスでは、TAK-272 を 3 または 10 mg/kg で投与すると、用量依存的に心肥大と肺重量が改善した (Fig 3C)。TAK-272 を 10 mg/kg を投与した際の血漿中 NT-proBNP 濃度および ANP mRNA 発現量の減少は、統計的に有意ではなかったが (Fig 3D)、この投与によって、心肥大の改善とともに死亡率が有意に改

善された (Fig 3E)。Vehicle 投与群と TAK-272 投与群の生存期間の中央値は、それぞれ 18 日と 22.5 日であった。さらに、triple-tg マウスの心筋 Nox4 mRNA 発現量は CSQ-tg マウスより有意に高かったが、TAK-272 を 10 mg/kg で 2 週間投与したところ、triple-tg マウスの Nox4 mRNA の発現量が有意に低下した (Fig 4)。TAK-272 10 mg/kg 投与による、triple-tg マウスの心循環パラメータの増強は確認できなかった (Fig 5)。

5. 考察

前臨床試験では、臨床に適した用量で薬剤の有効性を検討することが理想的であり、それよりはるかに高い用量を用いることによるオフターゲット効果が結果に影響を与える懸念を、最小限に抑えることができる。しかし、ヒトとげっ歯類ではレニンの触媒ドメインのアミノ酸配列が異なるため、一般に、げっ歯類の疾患モデルで効果を示すためには、より高用量のヒトのレニン阻害薬が必要となる (46,75)。この問題を解決するために、我々は CSQ-tg マウスと RA-tg マウスを交配して、ヒトレニンとヒトアンジオテンシノーゲンを発現させた心不全モデル動物を作製した。triple-tg マウスは RA-tg マウスに比べて SBP が低かったが、それはそもそも CSQ-tg マウスが WT マウスに比べて SBP が低いためだと考えられる (Fig 1)。しかし、triple-tg マウスは、我々の予想通り、CSQ-tg マウスよりも高い PRA と SBP を呈した。この新たに開発した triple-tg 心不全マウスは、CSQ-tg マウスに比べて重度の心肥大を伴い、生存期間も短かった (Fig 2)。第二章において、CSQ-tg マウスでは、TAK-272 を 300 mg/kg 投与することで、心肥大抑制効果を発揮した。また、TAK-272 を 300 mg/kg で投与すると CSQ-tg マウスの生存率が向上したが、100 mg/kg ではその効果は顕著ではなかった。一方、本研究では、はるかに低用量の TAK-272 (10 mg/kg) が、

triple-tg マウスの心肥大と死亡率を有意に改善した。TAK-272 の初期のヒト臨床試験では、健常者を対象に 5-200 mg の投与量が試験された。その際、TAK-272 は、5 mg の投与で 24 時間にわたる強力かつ長時間のレニン阻害作用を示し、その効果は、我々が示した triple-tg マウスにおける 10 mg/kg の効果、および CSQ-tg マウスにおける 300 mg/kg の効果とほぼ同等であった (Fig 3A) (34,78)。このことから、triple-tg マウスにおける TAK-272 の有効用量は、CSQ-tg マウスにおける有効用量と比べて、ヒトの臨床用量に非常に近いことが明らかとなった。この結果は、有効用量を下げてオフターゲット効果の懸念を最小限に抑えるために、triple-tg マウスの利用が有用であることを示唆している。また、triple-tg マウスの心保護作用は、純粹にオンターゲット効果によって誘発されたことを示唆している。

Triple-tg マウスのヒトレニン阻害薬に対する感受性が高まった結果、TAK-272 を単回投与した 2 時間後に、一過性ではあるが明らかな SBP の低下が認められた (Fig 3B)。したがって、TAK-272 の心保護作用のメカニズムに、血圧低下による後負荷軽減が関与している可能性は否定できない。さらに、TAK-272 を 10 mg/kg で 2 週間投与したところ、triple-tg マウスの Nox4 mRNA の発現量が低下した (Fig 4B)。これは、CSQ-tg マウスを用いた第二章の結果と一致する。つまり、活性酸素種の減少も心保護作用に寄与していると考えられる。一方、

TAK-272 を 10 mg/kg で投与することによる血漿中 NT-proBNP 濃度および心臓中 ANP mRNA 発現レベルの低下は、本研究では有意ではなかった (Fig 3D)。Triple-tg マウスだけでなく、CSQ-tg マウスはそもそも WT マウスに比べてこれらのレベルが非常に高かった。これらの結果から、triple-tg マウスにおけるこれら指標の上昇はレニン活性にあまり依存していない可能性があり、それが TAK-272 の投与により有意な改善が見られなかった理由であると考えられる。さらに今後、心エコー解析を行うことで、この動物モデルの構造的特徴や TAK-272 治療の効果について、より多くの知見が得られる可能性がある。TAK-272 の心筋保護作用のメカニズムを完全に解明するためには、さらなる実験が必要である。

本研究で留意すべき点の一つは、triple-tg マウスの PRA レベルである。WT または CSQ-tg マウスの PRA は、健常者や心不全患者の PRA と同等またはわずかに高い程度であるが (79,80)、triple-tg マウスは、ヒトレニンおよびヒトアンジオテンシノーゲンの過剰発現により、PRA が非常に高かった (Fig 1A)。したがって、triple-tg マウスにおける TAK-272 による PRA 阻害と心保護作用との関係が、そのまま臨床に反映させられるかについては注意が必要である。

結論として、我々は、心肥大と高い死亡率を有し、ヒトレニン阻害に対する感受性が高い心不全モデルマウスの作製に成功した。今回の結果は、triple-tg マ

ウスを用いることで、ヒトレニン阻害薬の心保護作用を検討する際に、臨床的に適切な用量を用いることができ、高用量でのオフターゲット効果の懸念を最小限に抑えることができることを示している。本研究はまた、今回のレニンの例のように、薬物標的タンパク質に種差がある場合には、ヒトタンパク質を持つげっ歯類モデルの作製を検討すべきであることも示唆している。このような戦略は、創薬を加速するための薬効評価に有効であると考えられる。

6. 図表

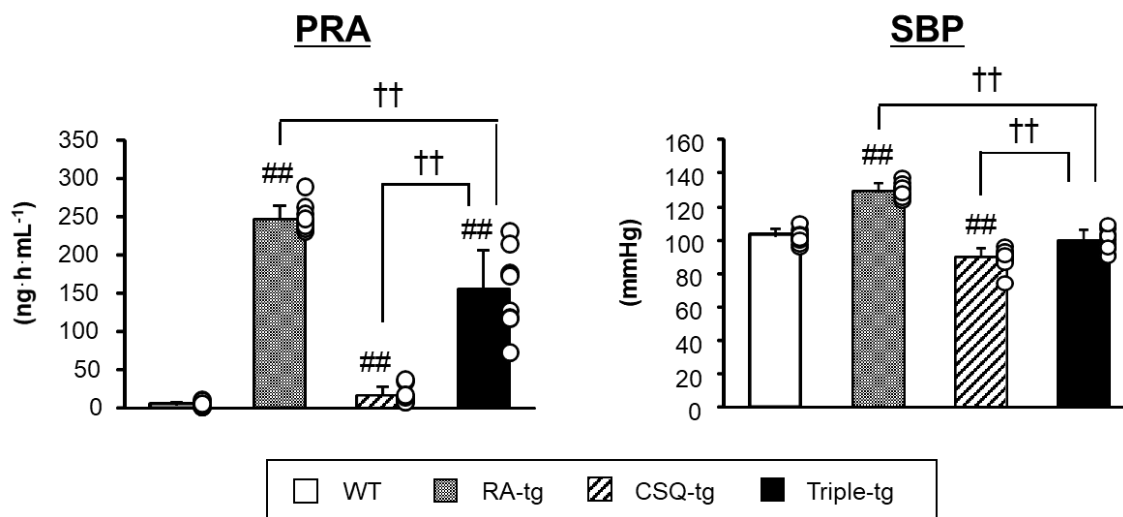


Fig 1: Triple-tg マウスの PRA および BP のベースライン

WT、RA-tg、CSQ-tg、および triple-tg マウスの PRA と SBP のベースライン (各群 n = 9-10) を示した。# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ vs. WT、†† $P < 0.01$ vs. triple-tg (Dennett's test または Steel's test)。

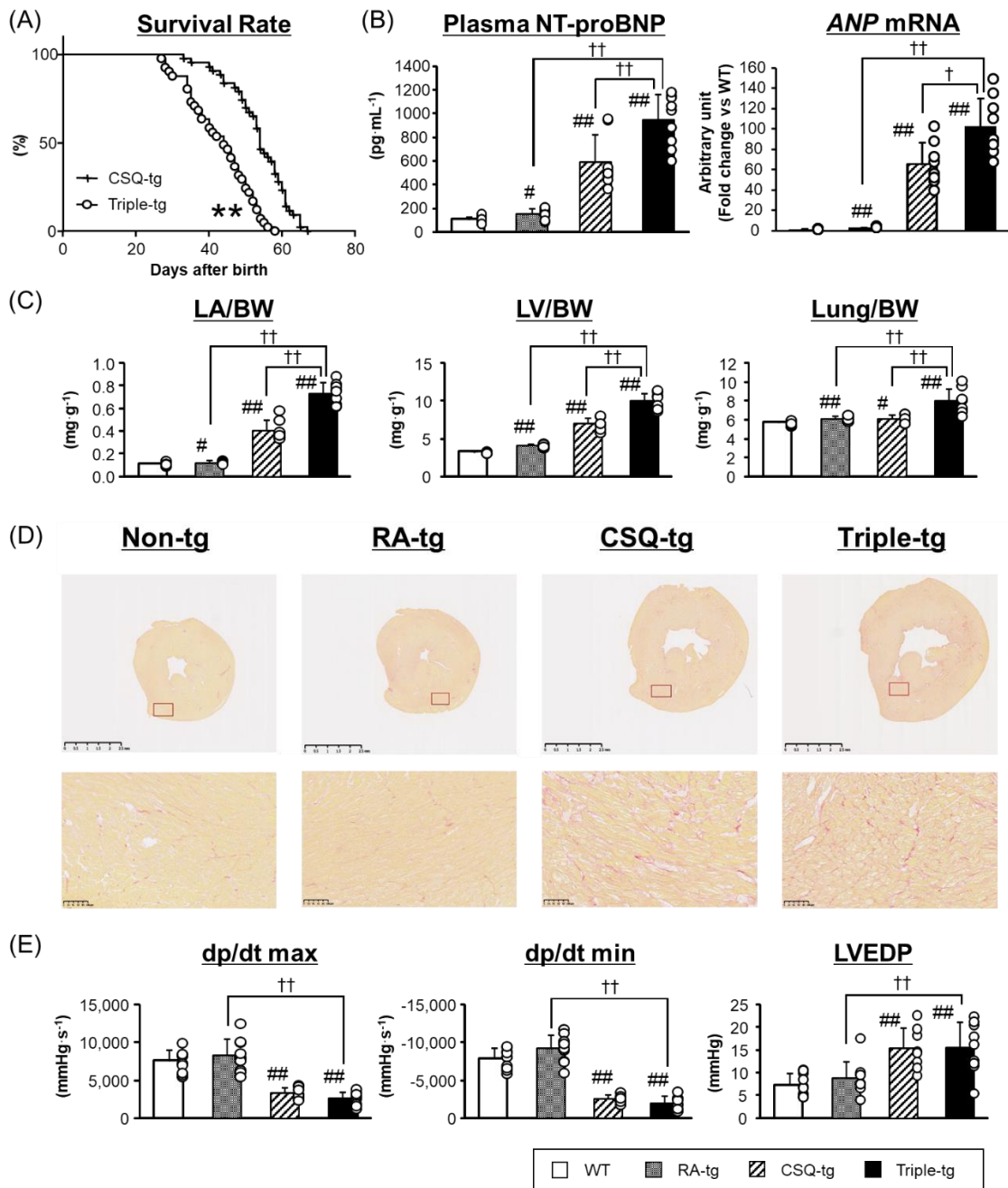


Fig 2: Triple-tg マウスの心不全パラメータ

(A) CSQ-tg マウス (n = 43) および triple-tg マウス (n = 41) の生存曲線。** $P < 0.01$ vs. CSQ-tg マウス (Kaplan-Meier 法による log-rank 検定)。WT、RA-tg、CSQ-tg、triple-tg マウスの、(B) 血漿中 NT-proBNP 濃度と心臓 ANP mRNA

発現量、(C) 体重で標準化した心臓と肺の重量、(D) シリウスレッドで染色した WT、RA-tg、CSQ-tg および triple-tg マウスの左心室の代表的な断面図、および (E) 心循環パラメータ (各群 n = 8-10)。# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs. WT、† $P < 0.05$ 、†† $P < 0.01$ vs. triple-tg (Dennett's test または Steel's test)。

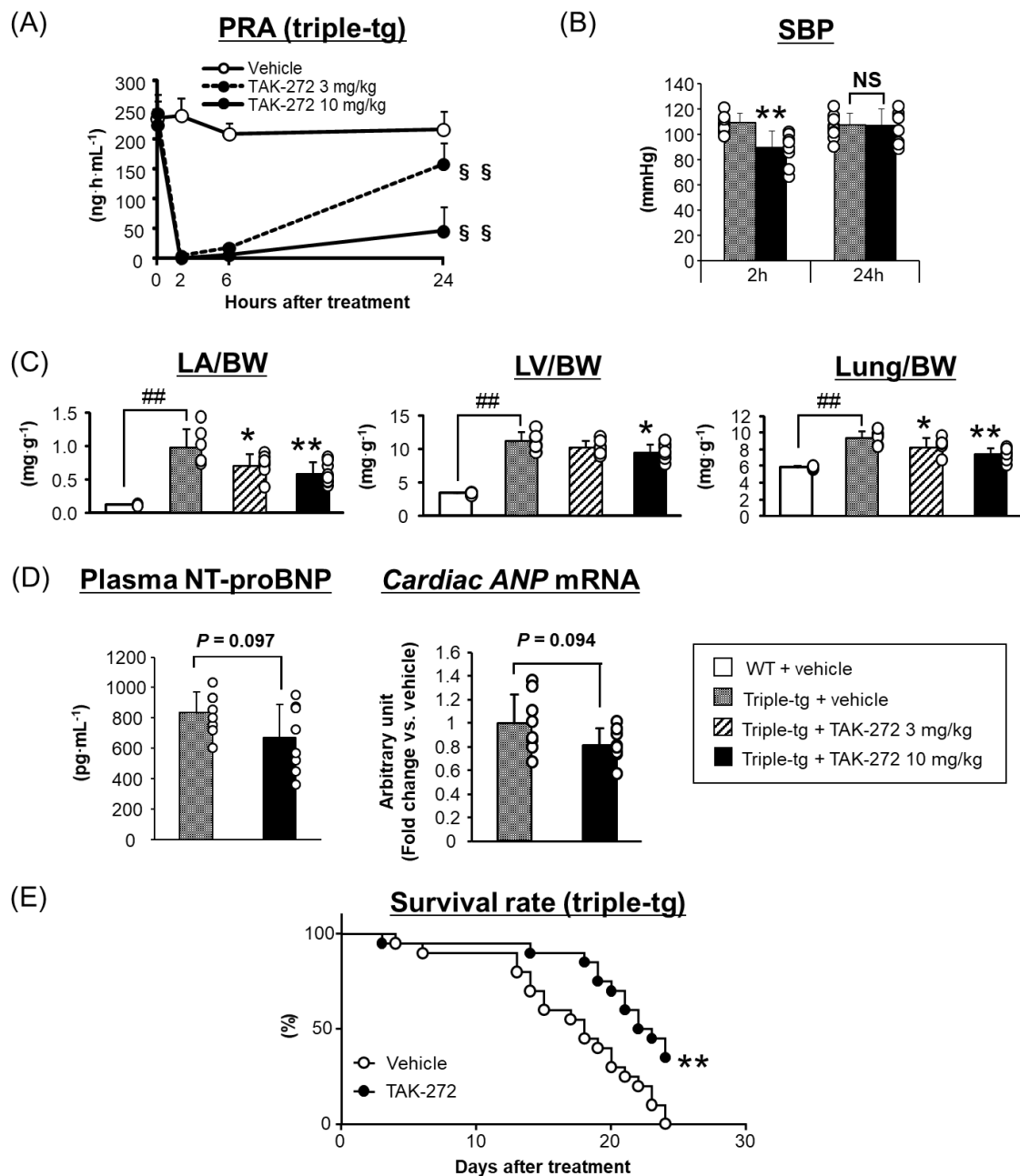


Fig 3: TAK-272 の triple-tg マウスにおける心保護作用

(A) Triple-tg マウスに TAK-272 (3 または 10 mg/kg) を単回経口投与した後の 24 時間にわたる PRA 阻害作用 (各群 n = 9)。 (B) Triple-tg マウスに vehicle または TAK-272 (3 または 10 mg/kg) を 1 日 1 回経口投与した後、6 日目の 2 お

よび 24 時間後に測定した SBP (各群 n = 6-8)。** $P < 0.01$ vs. vehicle (Williams' or Shirley-Williams' test)。(C) WT または triple-tg マウスに vehicle または TAK-272 (3 または 10 mg/kg) を 2 週間経口投与したときの心肺重量 (体重で標準化、各群 n = 6-8)。§ § $P < 0.01$ vs. pre-treatment (paired t-test の後に Bonferroni 補正を実施)、## $P < 0.01$ vs. WT (Student's t-test または Aspin-Welch's test)、* $P < 0.05$ および** $P < 0.01$ vs. triple-tg + vehicle (Williams' test または Shirley-Williams' test)。(D) Vehicle または TAK-272 を 10 mg/kg で 2 週間投与した triple-tg マウスの血漿中 NT-proBNP 濃度および心臓 ANP mRNA 発現量 (各群 n = 8)。(E) Vehicle または TAK-272 を 10 mg/kg で経口投与した triple-tg マウスの生存曲線 (各群 n = 20)。** $P < 0.01$ vs. vehicle (Kaplan-Meier 法による log-rank 検定の後に Bonferroni 補正を実施)。

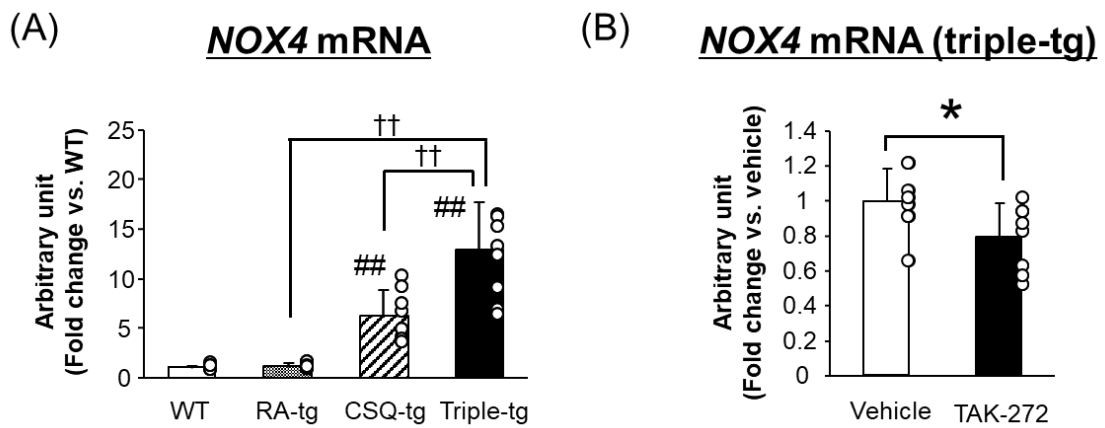


Fig 4: Triple-tg マウスにおける心臓 Nox4 mRNA 発現レベル

(A) WT、RA-tg、CSQ-tg および triple-tg マウスの心臓 Nox4 mRNA 発現レベル (n=8-10)。# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$ vs. WT (Dennett's test or Steel's test)、†† $P < 0.01$ vs. triple-tg (Dennett's test or Steel's test)。 (B) Vehicle または TAK-272 を 10 mg/kg で 2 週間経口投与した triple-tg マウスの心臓 Nox4 mRNA 発現レベル (n = 8)。* $P < 0.05$ vs. vehicle (Student's t-test)。

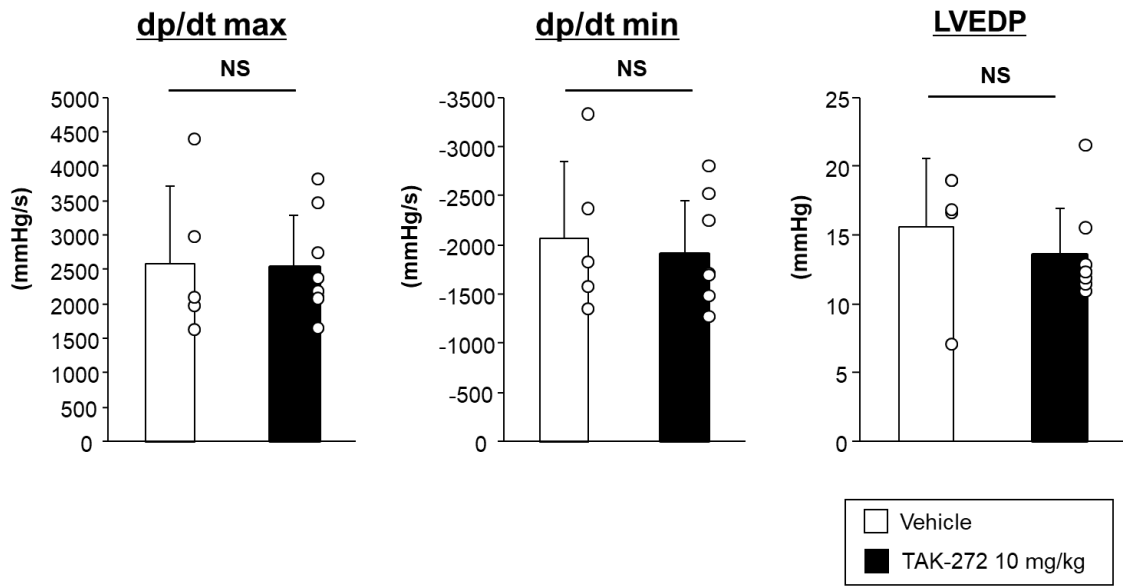


Fig 5: TAK-272 投与後の triple-tg マウスの心鬱血指標と心循環パラメータ

Triple-tg マウスに vehicle (n = 5) または TAK-272 (10 mg/kg) を 2 週間経口投与したときの心循環パラメータ (n = 8)。投与開始時のマウス数は、vehicle 群が 10 匹、TAK-272 群が 9 匹であった。Vehicle 群の 2 匹と TAK-272 群の 1 匹が測定前に死亡し、Vehicle 群の 3 匹が状態不良のために評価できなかった。

第四章

レニン・アンジオテンシン系の最新知見と心不全治療薬の展開

1. レニン・アンジオテンシン系の研究開発状況と最新の知見

1-1. レニン阻害薬の開発環境

アリスキレンの創製後、メガファーマを含む多くの製薬企業が第 2 世代のノンペプチド様低分子化合物の DRI の開発に注力し、その結果、TAK-272 を含む様々な薬剤が創製された (31)。しかしながら、現在においてアリスキレン以外の薬剤は承認に至っていない。その理由について、私見として 3 つの要因を挙げたい。

まず第一に、レニン阻害薬の代表的な適応症である高血圧症の競合性が、非常に高いことが挙げられる。RAS 阻害薬が従来適応症となっている高血圧症については、まさに ACE 阻害薬や ARB といった RAS 阻害薬がジェネリック医薬品として安価に入手可能であり、同じく RAS 阻害薬である DRI が、それらと比較して圧倒的な優位性を示すことは容易ではない。また高血圧症にはその他にもカルシウム拮抗薬や利尿薬といった他の作用機序を有する薬剤もジェネリック医薬品として存在し、それらの異なるクラスの薬剤を併用することで良好な降圧作用を得られることから、高価な新規薬剤が市場に受け入れられる見込みは高くない。

第二に、心血管系疾患に対するアウトカムを評価する臨床試験実施のハー

ドルが非常に高くなってきていることが挙げられる。RAS は心疾患や腎疾患に深く関与することが知られており、ACE 阻害薬や ARB などを用いた数々の臨床試験がこれまでに実施されてきた。心不全や腎不全の患者数は増加の一途をたどっており、未だに満たされていない医療ニーズが拡大する一方、ACE 阻害薬や ARB の普及により、以前に比べると疾患がコントロールできている患者が増えてきているのも事実である。結果として、心不全における死亡や入院、もしくは腎不全における血清クレアチニンの倍化といった事象を十分数確保してアウトカムを評価するには、数千人規模で数年間の追跡をする大規模な臨床試験が必要となっている。このような試験には数百億円から千億円を超えるような多大なコストがかかるため、実際に臨床試験を行える製薬企業はメガファーマのような一部のみである。つまり会社の経営から考えれば、非常にリスクの高い試験が必要になっていると言える。

第三に、DRI の先行品であるアリスキレンが、心保護作用および腎保護作用のいずれにおいても、臨床試験において既存薬に対する優位性もしくは既存薬との併用による有益性を示せなかったことが挙げられる。心保護作用および腎保護作用には大きな市場が期待できるものの、その有効性を証明するには、現行の制度では上述のようにリスクの高い臨床試験の実施が必要であり、既存品の状況を鑑みると、それに続く薬剤の開発を進めるには様々な困難が伴うこと

は想像に難くない。

現在臨床試験が進行中である DRI は、SCO-272 (SCOHIA Pharma、日本) が糖尿病性腎症、SPH-3127 (Shanghai Pharmaceuticals Holding、中国) が高血圧症をそれぞれ対象に臨床第二相試験を行っているのみで、その他の薬剤については臨床開発が進行していないようである (81,82)。慢性腎不全の臨床試験については、従来用いられてきた血清クレアチニンの倍化といった真のエンドポイントではなく、代替エンドポイントとして推定糸球体濾過量 (eGFR) の 30-40%低下の使用が近年提唱されるなど、臨床研究を推進する試みが活発化してきている (83)。心腎不全のアンメットメディカルニーズが増大する中で、産官学が一体となり、臨床試験実施のハードルを下げて治療薬開発が推進される環境整備に期待したい。

1-2. 非古典的レニン・アンジオテンシン系調節機構に関する知見

アンジオテンシノーゲンから、レニンおよび ACE を介して産生されたアンジオテンシン II が AT1 受容体に結合する、いわゆる古典的 RAS についての薬剤開発が成熟してきた中、近年研究が進んできているのが、AT2 受容体、Mas 受容体、アンジオテンシン 1-7、ACE2、およびアペリン/APJ 系といった、古典的 RAS に拮抗する経路である (Fig 1)。本章では特に治療薬の開発が進んでい

る AT2 受容体および ACE2、さらに AT1 受容体や ACE2 を介して RAS を調節するアペリン/APJ 系について述べたい。

1-2-1. AT2 受容体

AT2 受容体は 1980 年代後半に、アンジオテンシン受容体の中で当時開発が進んでいた、AT1 受容体の拮抗薬 (ARB) との結合が弱いアンジオテンシン受容体として見出されてきた。1990 年代半ばには、AT2 受容体が Gi に共役して脱リン酸化酵素 PP2A の活性化に関与していることが示され、同時に古典的な Gs/Gq 共役型の受容体ではないことが示唆された (84,85)。近年、AT2 受容体の結晶構造解析に関する報告により、AT2 受容体は 7 回膜貫通型で G タンパク共役型受容体としての構造をしているものの、アゴニストによって活性化された際に、通常とは異なる位置にある細胞内のヘリックス VIII が影響して、立体的に G タンパクや β -arrestin との結合が阻害されていることが明らかとなった (86)。

AT2 受容体は、アンジオテンシン II の他に、アンジオテンシン II がアミノペプチダーゼ III で切断されたアンジオテンシン III や、アンジオテンシン I が ACE2 に切断されて産生されるアンジオテンシン 1-9 などをリガンドとする。その生理活性は多岐に渡り、血圧低下、血管拡張、NO 産生、ナトリウム利尿など

を亢進するとともに、心肥大、線維化、炎症などを抑制することが報告されている (87)。その作用は Mas 受容体を介したアンジオテンシン 1-7 の作用と非常によく似ており、実際に AT2 受容体は Mas 受容体とヘテロダイマーを形成することも報告されている (88)。アンジオテンシン 1-7 の作用が AT2 受容体拮抗薬によって阻害されてしまうなど、これらの下流シグナルは共有されていることが示唆されている (89)。

AT2 受容体活性化による生理活性は心不全や腎不全をはじめとする心血管疾患に改善効果をもたらす知見が集まっており、これが臨床応用されることが期待されている (90)。肺高血圧症は心臓から肺に血液を送るための血管である、肺動脈の血圧 (肺動脈圧) が高くなることで、心臓と肺の機能障害をもたらす予後不良な進行性の疾患群である。AT2 受容体活性化は、肺高血圧症の進展に重要な役割を果たす右心室と肺の病的なりモデリングを抑制し、ラットモデルにおいては抗炎症作用による右心肥大および肺血管の肥厚を抑制することが報告されている (91,92)。また、AT2 受容体のアゴニストである Compound 21 (Vicore Pharma) は、モノクロタリン誘導性の肺高血圧モデルラットにおいて、心肺の線維化や右心室のリモデリングを抑制した。これらの知見から、Compound 21 は特発性肺動脈高血圧症を対象として臨床第 2 相の試験が進行中

であり、その他にも AT2 受容体に対する様々な低分子化合物の創製が各所で進められている (93,94)。

1-2-2. ACE2

ACE2 は 2000 年に同定された、RAS の中では比較的新しい分子で、各種臓器で細胞膜に発現しているペプチダーゼである。アンジオテンシン I、アンジオテンシン II、およびアンジオテンシン A から 1 アミノ酸を切断し、それぞれアンジオテンシン 1-7、アンジオテンシン 1-9、およびアラマンジンを産生する (87)。産生されたそれらペプチドは、Mas 受容体、AT2 受容体、Mas-related G protein-coupled receptor member D (MRGD)などを活性化させ、圧受容器反射感受性、血管拡張、NO 産生などを亢進させて血圧を低下させるなど、古典的 RAS とは相反する、心血管保護的な作用を発揮する。さらに 2003 年に流行した、severe acute respiratory syndrome (SARS) を引き起こす新型コロナウイルスである、SARS coronavirus (SARS-CoV) の細胞内侵入に関与することから、その感染によって引き起こされる急性肺傷害や急性呼吸促迫症候群 (ARDS) といった肺疾患に対する ACE2 の保護効果が検討されてきた (95)。このような経緯から、ACE2 では、心不全および腎不全に対する改善作用に加え、AT2 受容体と同様に、肺高血圧症に対する研究が数多く行われている。

レンチウイルスを用いて ACE2 を過剰発現させたところ、モノクロタリン誘導性のラット肺高血圧モデルにおいて、炎症性サイトカインの抑制を伴うメカニズムを介して、右心室収縮期血圧の低下、右心室肥大の抑制、および肺血管の筋化が有意に抑制されることが示された (96)。これは ACE2 の過剰発現が、血管収縮、増殖、線維化のいずれにおいても有効であることを示唆している。また、ACE2 の活性化剤は、endothelial NO synthase のリン酸化を誘導し NO の生物学的利用能を上昇させることで、肺動脈の内皮機能を改善することが報告されている (97,98)。さらに、ACE2 は膜上で切断されて、ACE2 としての酵素活性を維持したまま soluble ACE2 (sACE2) として存在することが知られている (99)。そこで、リコンビナントのヒト sACE2 (rhsACE2) を浸透圧ポンプを用いて持続投与したところ、圧負荷モデルにおける右心室機能の改善や、ブレオマイシン誘導性の肺高血圧モデルマウスにおいて心室リモデリングの改善効果が認められた (100,101)。このような知見から、rhsACE2 の肺高血圧症患者に対する薬効を臨床で検討したところ、血漿中の炎症マーカーの低下や Superoxide dismutase 2 の上昇とともに、心拍出量や肺血管抵抗の改善が認められた (102)。この結果を受けて、グラクソスミスクラインは臨床第 2 相試験での rhsACE2 (GSK2586881) の薬効評価を肺高血圧症を適応疾患として実施していたが、当社の経営戦略の変更に伴い、他の呼吸器疾患を対象とした薬剤と共に

に 2019 年に開発が中止されている (103)。臨床試験では良好な成績が得られていたため、これに続く薬剤の開発に期待したい。

ACE2 はウイルス感染による呼吸器疾患への関与について、最近非常に高い注目を集めている。2019 年 12 月中国の武漢で発見された新型コロナウイルスは SARS-CoV-2 と名付けられ、それによって重篤な ARDS を引き起こす coronavirus disease 2019 (COVID-19) は、その後全世界でのパンデミックとなり、2021 年 11 月時点で罹患者数 2.5 億人、死者数 500 万人に達するなど、現在も各国において医療体制のひっ迫、人々の行動制限、経済活動の低下など、様々かつ深刻な影響を及ぼし続けている (104)。先述の SARS-CoV に加え、この SARS-CoV-2 に関しても、ACE2 がウイルスのスパイクタンパクの S1 ドメインと結合することで細胞内への侵入を促進していることが明らかとなった (105)。また、高血圧や糖尿病といった心血管疾患に罹患している患者は COVID-19 による重症化リスクが高いこと、さらには ACE 阻害薬や ARB の投与が心臓や腎臓における ACE2 の発現を上昇させることが知られていたため、ACE 阻害薬や ARB の投与は、この COVID-19 の重症化をもたらすのではないかと懸念された (106)。

この懸念に関しては COVID-19 罹患者の増加と共に、短期間のうちに数々の論文が報告されたが、ACE 阻害薬および ARB の使用と COVID-19 の重症化

リスクや全死亡率との関係については、統一した見解が得られていなかった。しかしながら、それら臨床試験を纏めて解析した最新のメタアナリシスの報告によると、ACE 阻害薬および ARB の使用は、COVID-19 患者の全死亡率に影響はない、もしくは下げると報告されているようである (107-109)。SARS-CoV を用いたマウスの研究では、SARS-CoV 感染後に、肺の ACE2 タンパク発現量が低下することが報告されている (110)。このとき、ACE 発現量は変化しないため、結果としてアンジオテンシン II の濃度が上昇して炎症が亢進し、急性肺傷害を悪化させた。この知見を踏まえると、ACE 阻害薬および ARB によってアンジオテンシン II の作用を抑制することは、肺の病変悪化の抑制に寄与する可能性が推察される。今後さらにエビデンスが蓄積し、RAS 阻害薬の COVID-19 に対する影響について解析が進むことが望まれる。

rhsACE2 は SARS-CoV-2 への結合能を有することから、そのウイルスを中和するデコイ受容体として作用し、SARS-CoV-2 が膜状に発現する ACE2 を介して細胞内に侵入するのを防ぐことが推察される (111)。実際に GSK2586881 (現在は APN01 として APEIRON Biologics が開発) は *in vitro* レベルでウイルス感染を抑制した (112)。先述のように GSK2586881 は肺高血圧症を対象として臨床試験が進められていた経緯があり、また ARDS 患者においても rhsACE2 はパイロット試験で忍容性を示していた (103)。これらの知見から、2021 年 5

月現在、APN01 の COVID-19 を対象とした臨床試験が実施されている (113)。

2020 年に報告されたケーススタディでは、ウイルス量の急速な減少や炎症性メディエーターの減少など、有望なデータが示されており、COVID-19 への有効な治療薬となることが期待される (114)。

1-2-3. アペリン/APJ 系

内在性ペプチドであるアペリンは、オーファン G タンパク質共役型受容体、APJ 受容体のリガンドである (115)。APJ 受容体遺伝子は、アンジオテンシン受容体と密接に関連する受容体タンパク質をコードしており、両タンパク質は膜貫通領域において 54% の同一性を有しているが、アンジオテンシン II は APJ に結合しない (116,117)。77 アミノ酸のプレプロアペリンは、その C 末端から切断されて、成熟したアペリンペプチドであるアペリン-36 や、より短いペプチド群 (アペリン-17、12、13) を生成するが、後者はピログルタミル型の [Pyr1]-アペリン-13 としても存在する (118)。アペリン-36 よりもアペリン-13 および [Pyr1]-アペリン-13 の方が活性が高く、心臓や血漿中では [Pyr1]-アペリン-13 が主なアイソフォームであると報告されている (119,120)。

その広範な組織分布から、アペリン/APJ 系は、体液のホメオスタシスの調節、血圧、内分泌系ストレス応答、心筋収縮力、血管新生、エネルギー代謝など

への影響とともに、循環器疾患、肥満、および癌など、種々の疾患に関与することが報告されている (121)。

アペリンが血圧降下作用を有することは広く知られているが、その作用には内皮由来の NO を介することが示されている (122-124)。内皮細胞の APJ 受容体が活性化されると、アペリンは PI3K/Akt の活性化を介して eNOS のリン酸化を誘導し、内皮由来の NO は血管平滑筋細胞に拡散し、そこで血管拡張作用を発揮する (125)。また、アペリン/APJ 系は AT1 受容体シグナルに拮抗することも知られている (124)。ACE2 は、アペリン-13、36 の C 末端にある APJ 受容体を活性化するのに重要な残基、フェニルアラニンを切断し、不活化すると考えられている (126)。一方、アペリン-13 投与は、AT1 受容体シグナルに関係なく、アンジオテンシン 1-7 の産生を担う ACE2 の発現を不全心で上昇させることで、古典的 RAS に拮抗する (127)(Fig 1)。さらに、APJ 受容体は AT1 受容体とのヘテロ二量体化を介して、アンジオテンシン II/AT1 受容体シグナルを負に制御することも報告されている (128,129)。

免疫組織化学的に、ヒト心臓の心筋細胞および血管と心内膜の内皮にアペリンが発現していることが示されている (130)。アペリンは陽性変力作用を有し、動脈圧の低下、動脈血管拡張の誘導、心拍出量の改善に関与している (122,123,131,132)。2003 年にはアペリンと心不全病態との最初の関連性として、

ヒトの不全心においては、正常組織に比べてアペリンの mRNA の発現レベルが高いことが報告され、アペリンがヒトの心不全の病態生理に関与している可能性が示唆された (133)。さらに、心筋梗塞モデルラットに[Pyr1]-アペリン-13 を投与すると、梗塞サイズが減少し、血清中 NO レベルが持続的に上昇したことから、アペリンが心筋梗塞に対して NO 産生増強を介した保護効果を持つことが示された (134)。また、アペリン-13 はカタラーゼ活性化因子として働き、ROS の除去を介して心肥大を予防することも示されている (135)。

これらの知見から、いくつもの APJ アゴニストが開発されてきた。代表的なものでは Novartis (スイス) のペプチド性 APJ アゴニスト CLR325、低分子 APJ アゴニストでは Amgen (アメリカ) の AMG986、および Bristol-Myers Squibb (アメリカ) の BMS-986224 などがある。CLR325 は Phase IIa 試験、AMG986 および BMS-986224 は Phase I 試験を心不全を対象に実施していたが、いずれも特定の理由の開示がないか、もしくはビジネス戦略の変更などを理由に、2019 年から 2021 年の間に開発が中止されている (136-138)。開示された臨床試験情報では、これら薬剤の投与に対する忍容性が高かったことが示されており、安全性の懸念が主な理由ではないと考える。先述したように心不全治療薬開発に対する経営的なハードルが高いこと、さらに後述するように競合品の相次ぐ承認などが、APJ 受容体アゴニスト開発の経営的判断に影響しているも

のと筆者は推察する。アペリンは血管拡張作用と強心作用を併せもち、古典的 RAS との拮抗作用も有するそのユニークなプロファイルから、臨床での開発再開に期待したい。

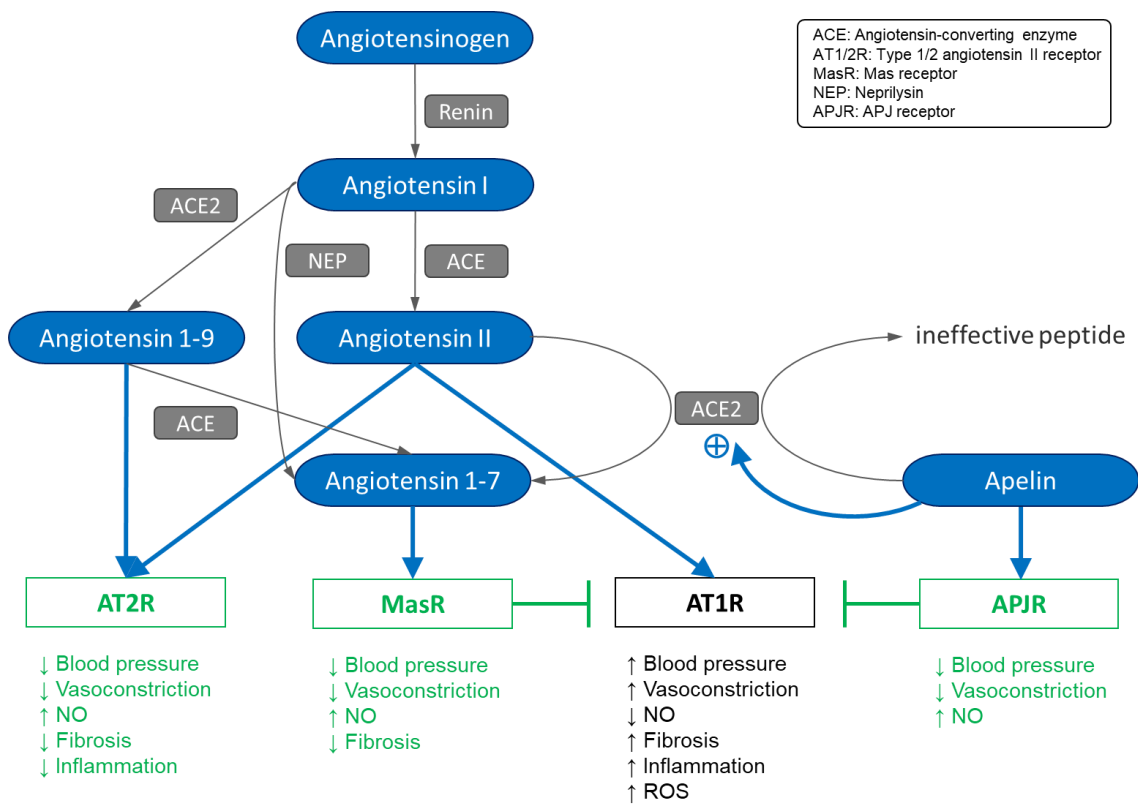


Fig 1: 代表的な古典的・非古典的 RAS 調節機構

2. 心不全治療薬の研究開発状況と最新の知見

2-1. Angiotensin receptor neprilysin inhibitor (ARNI)

Entresto™ (開発コード: LCZ696, Sacubitril/Valsartan) は Novartis (スイス) が創製した薬剤で、2015 年に FDA より心不全治療薬として承認され、近年その使用が急速に広がっている。この薬剤はネプリライシン阻害薬 (Sacubitril) と ARB (valsartan) を 1:1 のモル比で含有する単一の結晶複合体であり、ARNI と呼ばれる。エンドペプチダーゼであるネプリライシンは、ナトリウム利尿ペプチド、ブラジキニン、アドレノメデュリンなど、いくつかの内因性血管作動性ペプチドを分解する (139-141)。ネプリライシンを阻害すると、これらの物質の濃度が上昇し、血管収縮、ナトリウムの貯留、病的な組織リモデリングの原因となる神経ホルモンの過剰活性化に対抗することができる (142)。一方でネプリライシンはアンジオテンシン I および II の切断も担っているため、この阻害はアンジオテンシン II 濃度の上昇をもたらす (143)。したがってネプリライシンを阻害することによって引き起こされる AT1 受容体の活性化を、ARB をもって阻害することは理にかなった戦略といえる。

2014 年に 18 歳以上の NYHA class II-IV の左室駆出率が 40%以下の収縮不全の患者、いわゆる HFrEF (Heart Failure reduced Ejection Fraction) を対象に

した LCZ696 の臨床第 3 相試験 (PARADIGM-HF) の結果が報告された (144)。8,442 人もの患者を 27 か月 (中央値) という長期に渡って追跡した、この大規模試験は非常に大きな注目を浴び、一次エンドポイント (心血管死もしくは心不全による初入院) を、ACE 阻害薬であるエナラプリルに対して 20%抑制するという素晴らしい結果であった。第二章で述べたように、同じく HFrEF を対象として同社のアリスキレンを評価した ATMOSPHERE 試験では、アリスキレンのエナラプリルに対する非劣性を証明できなかったことと比較すると、PARADIGM-HF がもたらしたインパクトの大きさがより強調される。この試験の結果を受けて、収縮不全のある心不全を適応症として承認された LCZ696 は、その後に 1 歳以上の心不全患者に適応を広げ、さらなる適応拡大を目指して、2019 年には NYHA class II-IV の左室駆出率が 45%以上の収縮不全のない心不全患者、いわゆる HFpEF (Heart Failure preserved Ejection Fraction) を対象にした大規模臨床試験 (PARAGON-HF) の結果を報告した (145)。同様に 4822 名もの患者が参加したこの試験では、LCZ696 が Valsartan と比較して 13%の一次エンドポイント (心血管死もしくは心不全による総入院回数) の改善傾向を示したものの、統計的に有意な差は認められなかった ($P = 0.06$)。この試験では後の解析で、男性に比べ女性でより薬効が強く認められていたことがわかった (hazard ratio: 0.73 (95% CI, 0.59–0.90) in women and 1.03 (95% CI, 0.84–

1.25) in men) (146)。その原因は特定されていないが、女性の心不全のうち約半数が HFpEF であるというデータを鑑みると、ARNI がこれらの患者に対する治療オプションとなり得ることを示していた。そして 2020 年 2 月には、実際に FDA より HFpEF に対する適応拡大が認められ、LCZ696 は HFpEF を適応症に加えた世界初の治療薬となった。

2020 年には日本での承認も取得した Entresto™ は、現在世界 100 か国以上で既に販売されており、2020 年には約 25 億 US ドル (約 2700 億円) を売り上げて、前年比 45% 増という急速な売り上げの増加を見せており、ピーク時の売り上げは約 50 億 US ドルが見込まれている (147)。

2-2. Sodium/glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬

RAS 阻害薬とは異なるクラスの心不全治療薬として最近注目を浴びている薬剤としては、SGLT2 阻害薬が挙げられる。これは、近位尿細管においてグルコースの再吸収を阻害し尿糖排泄量を増加させることにより、インスリンに依存せずに血糖値を低下させる新規作用機序の経口糖尿病治療薬である。近年、この SGLT2 阻害薬に関して、糖尿病患者の心血管アウトカム試験として行われた臨床試験において、同クラスの薬剤が心血管イベント (心血管死および心不全による入院) 抑制効果をもつことが次々と発表された (148-150)。これらの試験結

果から SGLT2 阻害薬の心保護作用に注目が集まったが、これまでの試験対象の多くは心不全を合併していない糖尿病患者であった。そこで 2019 年と 2020 年に、心不全患者を対象とした 2 つの印象的な臨床試験の結果が報告された。ダパグリフロジンを評価した DAPA-HF 試験とエンパグリフロジンを評価した EMPEROR-Reduced である (151,152)。

両試験のデザインは非常に似ており、ともに NYHA class II-IV で、LVEF40%以下、NT-proBNP が 600 pg/mL 以上 (DAPA-HF では一部患者で 400 pg/mL 以上) の、HFrEF (DAPA-HF: 4,744 例、EMPEROR-Reduced: 3,730 例) を対象に、既存療法への SGLT2 阻害薬の上乗せ効果を、プラセボ投与群と比較したものである。心血管死および心不全による入院の各プライマリーエンドポイントに対するハザード比は試験により差があるものの、複合エンドポイントとしては、DAPA-HF 試験と EMPEROR-Reduced 試験のハザード比がそれぞれ 0.74 および 0.75 と、同等に有意な改善効果をもたらした。特筆すべきは、いずれの試験においても、糖尿病の有無にかかわらず、いずれの患者群でも同等のプライマリーエンドポイント抑制効果を示したことである。この結果により、SGLT2 阻害薬は糖尿病治療薬としてだけでなく、心不全治療薬としての地位を確実なものにしたと言えよう。

SGLT2 は心臓にはほとんど発現していないことから、その心保護作用の発

現には様々な要因が関係していると考えられる。1. SGLT2 阻害薬は近位尿細管での Na とグルコースの再吸収を抑制するため、Na 利尿と浸透圧利尿が働き、血漿量が低下して心臓の前負荷が減少するとともに、若干の血圧低下によって後負荷が軽減される (153,154)。2. SGLT2 阻害薬の投与で膵臓の α 細胞からグルカゴンが放出されるが、これが心筋に対して陽性変力作用を及ぼす (155)。3. SGLT2 阻害薬がグルカゴンの産生を増加し、また全身の代謝をグルコースから脂肪酸酸化へと変化させることで、肝臓でのケトン体合成が促進し、少ない酸素で効率的に ATP を産生できる β -ヒドロキシ酪酸の心臓での利用が増える (156)。その他にもグルコース毒性による血管機能低下の改善、グルコース再吸収阻害によるカロリー摂取の低下と肥満の改善、RAS 系阻害薬との併用による AT2 受容体およびアンジオテンシン 1-7 へのシグナル増強など、数多くの要因が考えられる (153)。実際に、ARNI 投与患者においても、先述の両試験ではハザード比でそれぞれ 0.75 および 0.64 と、顕著な心血管イベント抑制効果を示した。薬効に決定的な因子の特定には、更なる作用機序解明が必要であろう。研究が進み心保護効果に決定的な因子が特定されることで、新たな薬剤の開発へと繋がることが期待される。

SGLT2 阻害薬は心腎不全における臨床試験で良好な成績を出し続けているが、それに伴って売り上げも飛躍的に増加している。代表的な SGLT2 阻害薬で

あるダパグリフロジン（アストラゼネカ、イギリス）とエンパグリフロジン（ベーリンガーインゲルハイム、ドイツ）は、2020年にそれぞれ単剤として19億USドル（前年比27%増）と28億USドル（前年比15%増）を記録した（157,158）。SGLT2阻害薬のダパグリフロジンとエンパグリフロジン両剤は、さらにHFpEFに対する大規模臨床試験が進行中であり、今後の研究の進展に注目したい（159,160）。

2-3. 心不全に対する心筋再生療法研究の現状

これまでに紹介したRAS阻害をはじめとする薬物療法は、心不全患者の心臓に残存する心筋の保護や活性化を焦点にした治療法である。例えば心筋梗塞は、冠動脈の閉塞によって心臓への酸素及び栄養の送達を不可逆的に減少させ、心臓組織の壊死を引き起こす。このような損傷心筋に対する治療法は現状ではまだ非常に限られるとともに、虚血性傷害後に線維性瘢痕の形成が起こり、心臓組織の機械的及び電氣的機能を妨げる（161）。このような病的状態は、心筋の有害なリモデリングを生じ、最終的に心不全を発症する。これに代表されるように、収縮不全を伴う心不全の大部分は、心筋細胞の減少が基本的なメカニズムだと考えられている。現在、一般的に使用されている治療法のいずれも、このような失われた心筋細胞および組織を、新しく機能的な心筋細胞で置き換えることは

できない。また、成人ヒト心筋細胞の再生能は通常約 1%/年と非常に低いことから、既に相当量の心筋細胞が失われてしまった患者において、従来の残存する心筋の保護や活性化を焦点にした治療法には限界があることを示唆している(162)。従って、損傷心筋を回復させる理想的なアプローチは、残存心筋細胞の増殖を促進するか、新規心筋細胞を生体内でリプログラミングにより産生するか、もしくは多能性幹細胞由来の心筋細胞を外部から提供することである(163)。近年、この心筋再生は、心不全治療の根本治療となる可能性から、非常に多くの基礎研究が進められている。

残存心筋細胞の増殖促進については、心筋細胞増殖のメカニズムを解明し、ヒトの自然な心臓再生を誘発する治療法を開発することが課題である。上述のように成人ヒト心筋細胞の再生能は非常に低く、その原因の一つは心筋細胞の細胞周期停止であると考えられている。そのため、成体心筋細胞の増殖を誘導する多数の戦略が検討されており、環境因子の操作、神経、キナーゼ、転写因子、マイクロ RNA、表面受容体、心外因子、細胞外因子などの利用によって心筋細胞の増殖が認められている。一方で、この方法による心筋増殖で課題として残っているのが、増殖した心筋細胞による不整脈の誘発と、収縮能の不完全性である(163)。また、心筋梗塞のような広範囲の線維性瘢痕の形成を伴う場合、そもそも増殖させる心筋細胞が十分量でないため、この方法が有効な手段であるか判

断するにはさらなる検討が必要である。

生体内の非心筋細胞を心筋様細胞に直接リプログラミングできることは、2010年に三つの発生転写因子（Gata 4、Mef 2c、およびTbx 5）を皮膚マウス線維芽細胞に導入することで初めて示された（164）。このアプローチは、心筋梗塞などによって引き起こされる心臓線維性瘢痕の程度を軽減し、その心臓線維芽細胞を新しい機能性心筋細胞を生成するという、二重の効果をもたらすことから魅力的である。実際にマウス心筋梗塞モデルにおいても、これら三因子の導入により心臓線維芽細胞が心筋様細胞に変化し、心筋梗塞後の線維化を抑制するとともに心機能を改善することが示された（165）。このアプローチでもやはりいくつかの課題が残されている。ヒト線維芽細胞のリプログラミングに必要なリプログラミング因子はマウスのものとは異なると報告され、またヒト細胞はこのリプログラミングに対してマウスより抵抗性を示すようである（166）。また、老齢マウスを用いた検討では、老齢線維芽細胞の性質や放出される炎症性サイトカインにより、心筋様細胞へのリプログラミング効率が不安定になることが示された（167）。リプログラミングされた心筋様細胞の寿命や心筋の血行再建などについても今後議論が必要であろう。

多能性幹細胞由来の心筋細胞を用いるアプローチは、2006年に、多分化能を有し倫理的制限を克服できる、iPS細胞が発見されたことにより急速に研究が

進んできた (168)。最近の研究では、多能性細胞由来心筋細胞が霊長類を含む小型及び大型動物の心筋に移植できることが示され、心筋再生の中では最も開発が進んでいる。一方で、ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞は、成人の心筋細胞とは異なり、胎児期の心筋細胞のような特徴を有する。実際、ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞は自発的収縮活性を有し、特にサルコメア長の短縮、 β アドレナリン受容体、イオンチャンネル及びカルシウム結合蛋白質の低発現により、十分に組織化された収縮機構を持ち合わせていないことが報告されている (169)。

この未成熟心筋細胞の移植によって誘発される心室性不整脈、非自己細胞を用いる場合の免疫抑制の必要性など、多能性細胞由来心筋細胞の移植にはいくつかの課題も残っている (170,171)。この数年には、心臓組織に機能的に類似し、心臓移植に適した三次元構造をもった移植組織の最適化にも多くの努力が向けられている。1. 自己集合により形成され、天然組織構造や機能性を再現できるスフェロイドおよびオルガノイド、2. 外因性足場の使用と、生細胞および最終的に電気機械信号を組み合わせた人工心臓組織構築物などが研究されている (169)。

再生医療等製品はその特性により従来の医薬品、医療機器と同様のデータの収集が困難であることから、日本では、「再生医療等の国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律」に基づいて制

定された、条件及び期限付き承認制度が導入されており、再生医療の臨床試験にも積極的である（172）。2020年には虚血性心筋症患者を対象に、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの移植手術が大阪大学の研究チームによって初めて行われた（173）。この制度自体に対しては、安全性懸念から諸外国からの賛否があるものの、このような臨床試験は、再生医療の進展に向けた重要な一步になることは間違いない。

参考文献

1. Tomaselli, G. F., Beuckelmann, D. J., Calkins, H. G., Berger, R. D., Kessler, P. D., Lawrence, J. H., Kass, D., Feldman, A. M., and Marban, E. (1994) Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization. *Circulation* **90**, 2534-2539
2. Avery, C. L., Loehr, L. R., Baggett, C., Chang, P. P., Kucharska-Newton, A. M., Matsushita, K., Rosamond, W. D., and Heiss, G. (2012) The population burden of heart failure attributable to modifiable risk factors: the ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) study. *J Am Coll Cardiol* **60**, 1640-1646
3. Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., Das, S. R., de Ferranti, S., Despres, J. P., Fullerton, H. J., Howard, V. J., Huffman, M. D., Isasi, C. R., Jimenez, M. C., Judd, S. E., Kissela, B. M., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Liu, S., Mackey, R. H., Magid, D. J., McGuire, D. K., Mohler, E. R., 3rd, Moy, C. S., Muntner, P., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Nichol, G., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Reeves, M. J., Rodriguez, C. J., Rosamond, W., Sorlie, P. D., Stein, J., Towfighi, A., Turan, T. N., Virani, S. S., Woo, D., Yeh, R. W., Turner, M. B., American Heart Association Statistics, C., and Stroke Statistics, S. (2016) Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **133**, e38-360
4. Collaborators, G. B. D. C. o. D. (2018) Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **392**, 1736-1788
5. Jones, N. R., Roalfe, A. K., Adoki, I., Hobbs, F. D. R., and Taylor, C. J. (2019) Survival of patients with chronic heart failure in the community: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail* **21**, 1306-1325
6. Virani, S. S., Alonso, A., Aparicio, H. J., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Cheng, S., Delling, F. N., Elkind, M. S. V., Evenson, K. R., Ferguson, J. F., Gupta, D. K., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Lee, C. D., Lewis, T. T., Liu, J., Loop, M. S., Lutsey, P. L., Ma, J., Mackey, J., Martin, S. S., Matchar, D. B., Mussolino, M. E., Navaneethan, S. D., Perak, A. M., Roth, G. A., Samad, Z., Satou, G. M., Schroeder, E. B., Shah, S. H., Shay, C. M., Stokes, A., VanWagner, L. B., Wang, N. Y., Tsao, C. W., American Heart Association Council on, E., Prevention Statistics, C., and Stroke Statistics, S. (2021) Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **143**, e254-e743
7. Okura, Y., Ramadan, M. M., Ohno, Y., Mitsuma, W., Tanaka, K., Ito, M., Suzuki, K.,

- Tanabe, N., Kodama, M., and Aizawa, Y. (2008) Impending epidemic: future projection of heart failure in Japan to the year 2055. *Circ J* **72**, 489-491
8. Conrad, N., Judge, A., Tran, J., Mohseni, H., Hedgecott, D., Crespillo, A. P., Allison, M., Hemingway, H., Cleland, J. G., McMurray, J. J. V., and Rahimi, K. (2018) Temporal trends and patterns in heart failure incidence: a population-based study of 4 million individuals. *Lancet* **391**, 572-580
 9. Groenewegen, A., Rutten, F. H., Mosterd, A., and Hoes, A. W. (2020) Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail* **22**, 1342-1356
 10. Dunlay, S. M., Weston, S. A., Jacobsen, S. J., and Roger, V. L. (2009) Risk factors for heart failure: a population-based case-control study. *Am J Med* **122**, 1023-1028
 11. Johns, E. J., Kopp, U. C., and DiBona, G. F. (2011) Neural control of renal function. *Compr Physiol* **1**, 731-767
 12. Bouhnik, J., Galen, F. X., Menard, J., Corvol, P., Seyer, R., Fehrentz, J. A., Nguyen, D. L., Fulcrand, P., and Castro, B. (1987) Production and characterization of human renin antibodies with region-oriented synthetic peptides. *J Biol Chem* **262**, 2913-2918
 13. Drenjancevic-Peric, I., Jelakovic, B., Lombard, J. H., Kunert, M. P., Kibel, A., and Gros, M. (2011) High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res* **34**, 1-11
 14. Verdecchia, P., Angeli, F., Mazzotta, G., Gentile, G., and Reboldi, G. (2008) The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag* **4**, 971-981
 15. Crisan, D., and Carr, J. (2000) Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. *J Mol Diagn* **2**, 105-115
 16. Bernstein, K. E., Gonzalez-Villalobos, R. A., Giani, J. F., Shah, K., Bernstein, E., Janjulia, T., Koronyo, Y., Shi, P. D., Koronyo-Hamaoui, M., Fuchs, S., and Shen, X. Z. (2014) Angiotensin-converting enzyme overexpression in myelocytes enhances the immune response. *Biol Chem* **395**, 1173-1178
 17. Patel, S., Rauf, A., Khan, H., and Abu-Izneid, T. (2017) Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother* **94**, 317-325
 18. Matsumoto, R., Yoshiyama, M., Omura, T., Kim, S., Nakamura, Y., Izumi, Y., Akioka, K., Iwao, H., Takeuchi, K., and Yoshikawa, J. (2004) Effects of aldosterone receptor antagonist and angiotensin II type I receptor blocker on cardiac transcriptional factors and mRNA expression in rats with myocardial infarction. *Circ J* **68**, 376-382
 19. Pourdjabbar, A., Parker, T. G., Nguyen, Q. T., Desjardins, J. F., Lapointe, N., Tsoporis, J. N., and Rouleau, J. L. (2005) Effects of pre-, peri-, and postmyocardial infarction

- treatment with losartan in rats: effect of dose on survival, ventricular arrhythmias, function, and remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H1997-2005
20. Mann, D. L., and Bristow, M. R. (2005) Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* **111**, 2837-2849
 21. Schrier, R. W., and Abraham, W. T. (1999) Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med* **341**, 577-585
 22. Cohn, J. N., Tognoni, G., and Valsartan Heart Failure Trial, I. (2001) A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* **345**, 1667-1675
 23. Group, T. C. T. S. (1987) Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* **316**, 1429-1435
 24. Pfeffer, M. A., Braunwald, E., Moye, L. A., Basta, L., Brown, E. J., Jr., Cuddy, T. E., Davis, B. R., Geltman, E. M., Goldman, S., Flaker, G. C., and et al. (1992) Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* **327**, 669-677
 25. Pfeffer, M. A., Swedberg, K., Granger, C. B., Held, P., McMurray, J. J., Michelson, E. L., Olofsson, B., Ostergren, J., Yusuf, S., Pocock, S., Investigators, C., and Committees. (2003) Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* **362**, 759-766
 26. Ferrario, C. M. (2010) Addressing the theoretical and clinical advantages of combination therapy with inhibitors of the renin-angiotensin-aldosterone system: antihypertensive effects and benefits beyond BP control. *Life Sci* **86**, 289-299
 27. Fisher, N. D., and Hollenberg, N. K. (2005) Renin inhibition: what are the therapeutic opportunities? *J Am Soc Nephrol* **16**, 592-599
 28. Stanton, A. (2003) Potential of renin inhibition in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **4**, 6-10
 29. Gross, F., Lazar, J., and Orth, H. (1972) Inhibition of the renin-angiotensinogen reaction by pepstatin. *Science* **175**, 656
 30. Sielecki, A. R., Hayakawa, K., Fujinaga, M., Murphy, M. E., Fraser, M., Muir, A. K., Carilli, C. T., Lewicki, J. A., Baxter, J. D., and James, M. N. (1989) Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science* **243**, 1346-1351
 31. Ramya, K., Suresh, R., Kumar, H. Y., Kumar, B. R. P., and Murthy, N. B. S. (2020) Decades-old renin inhibitors are still struggling to find a niche in antihypertensive therapy.

- A fleeting look at the old and the promising new molecules. *Bioorg Med Chem* **28**, 115466
32. Vaidyanathan, S., Jarugula, V., Dieterich, H. A., Howard, D., and Dole, W. P. (2008) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren. *Clin Pharmacokinet* **47**, 515-531
 33. Imaeda, Y., Tokuhara, H., Fukase, Y., Kanagawa, R., Kajimoto, Y., Kusumoto, K., Kondo, M., Snell, G., Behnke, C. A., and Kuroita, T. (2016) Discovery of TAK-272: A Novel, Potent, and Orally Active Renin Inhibitor. *ACS Med Chem Lett* **7**, 933-938
 34. Matsuno, K., Kuroda, S., Tanaka, S., Nakamichi, H., Kagawa, T., and Koumura, E. (2018) Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Safety of a Single Dose of Imarikiren, a Novel Renin Inhibitor, in Healthy Male Subjects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **123**, 607-614
 35. Ito, S., Kagawa, T., Saiki, T., Shimizu, K., Kuroda, S., Sano, Y., and Umeda, Y. (2019) Efficacy and Safety of Imarikiren in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria: A Randomized, Controlled Trial. *Clin J Am Soc Nephrol* **14**, 354-363
 36. Silva, K. A. S., and Emter, C. A. (2020) Large Animal Models of Heart Failure: A Translational Bridge to Clinical Success. *JACC Basic Transl Sci* **5**, 840-856
 37. Riehle, C., and Bauersachs, J. (2019) Small animal models of heart failure. *Cardiovasc Res* **115**, 1838-1849
 38. Balakumar, P., Singh, A. P., and Singh, M. (2007) Rodent models of heart failure. *J Pharmacol Toxicol Methods* **56**, 1-10
 39. Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Fishbein, M. C., Fletcher, P. J., Spadaro, J., Kloner, R. A., and Braunwald, E. (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* **44**, 503-512
 40. Francis, J., Weiss, R. M., Wei, S. G., Johnson, A. K., and Felder, R. B. (2001) Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R1734-1745
 41. Bayat, H., Swaney, J. S., Ander, A. N., Dalton, N., Kennedy, B. P., Hammond, H. K., and Roth, D. M. (2002) Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Res Cardiol* **97**, 206-213
 42. Lutgens, E., Daemen, M. J., de Muinck, E. D., Debets, J., Leenders, P., and Smits, J. F. (1999) Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* **41**, 586-593
 43. Monnet, E., and Chachques, J. C. (2005) Animal models of heart failure: what is new? *Ann Thorac Surg* **79**, 1445-1453
 44. Abbate, A., Scarpa, S., Santini, D., Palleiro, J., Vasaturo, F., Miller, J., Morales, C., Vetovec, G. W., and Baldi, A. (2006) Myocardial expression of survivin, an apoptosis inhibitor, in aging and heart failure. An experimental study in the spontaneously

- hypertensive rat. *Int J Cardiol* **111**, 371-376
45. Sicard, P., Oudot, A., Guillard, J. C., Moreau, D., Vergely, C., and Rochette, L. (2006) Dissociation between vascular oxidative stress and cardiovascular function in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Vascul Pharmacol* **45**, 112-121
 46. Fukamizu, A., Sugimura, K., Takimoto, E., Sugiyama, F., Seo, M. S., Takahashi, S., Hatae, T., Kajiwara, N., Yagami, K., and Murakami, K. (1993) Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J Biol Chem* **268**, 11617-11621
 47. Cho, M. C., Rapacciuolo, A., Koch, W. J., Kobayashi, Y., Jones, L. R., and Rockman, H. A. (1999) Defective beta-adrenergic receptor signaling precedes the development of dilated cardiomyopathy in transgenic mice with caldesmon overexpression. *J Biol Chem* **274**, 22251-22256
 48. Jones, L. R., Suzuki, Y. J., Wang, W., Kobayashi, Y. M., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C., Cleemann, L., and Morad, M. (1998) Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing caldesmon. *J Clin Invest* **101**, 1385-1393
 49. Kaneko, M., Satomi, T., Fujiwara, S., Uchiyama, H., Kusumoto, K., and Nishimoto, T. (2016) AT1 receptor blocker azilsartan medoxomil normalizes plasma miR-146a and miR-342-3p in a murine heart failure model. *Biomarkers*, 1-8
 50. Harding, V. B., Jones, L. R., Lefkowitz, R. J., Koch, W. J., and Rockman, H. A. (2001) Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5809-5814
 51. Rashikh, A., Ahmad, S. J., Pillai, K. K., Kohli, K., and Najmi, A. K. (2012) Aliskiren attenuates myocardial apoptosis and oxidative stress in chronic murine model of cardiomyopathy. *Biomed Pharmacother* **66**, 138-143
 52. Weng, L. Q., Zhang, W. B., Ye, Y., Yin, P. P., Yuan, J., Wang, X. X., Kang, L., Jiang, S. S., You, J. Y., Wu, J., Gong, H., Ge, J. B., and Zou, Y. Z. (2014) Aliskiren ameliorates pressure overload-induced heart hypertrophy and fibrosis in mice. *Acta Pharmacol Sin* **35**, 1005-1014
 53. Westermann, D., Riad, A., Lettau, O., Roks, A., Savvatis, K., Becher, P. M., Escher, F., Jan Danser, A. H., Schultheiss, H. P., and Tschope, C. (2008) Renin inhibition improves cardiac function and remodeling after myocardial infarction independent of blood pressure. *Hypertension* **52**, 1068-1075
 54. McMurray, J. J., Pitt, B., Latini, R., Maggioni, A. P., Solomon, S. D., Keefe, D. L., Ford, J., Verma, A., Lewsey, J., and Aliskiren Observation of Heart Failure Treatment, I. (2008) Effects of the oral direct renin inhibitor aliskiren in patients with symptomatic heart failure. *Circ Heart Fail* **1**, 17-24

55. McMurray, J. J., Krum, H., Abraham, W. T., Dickstein, K., Kober, L. V., Desai, A. S., Solomon, S. D., Greenlaw, N., Ali, M. A., Chiang, Y., Shao, Q., Tarnesby, G., Massie, B. M., and Investigators, A. C. (2016) Aliskiren, Enalapril, or Aliskiren and Enalapril in Heart Failure. *N Engl J Med* **374**, 1521-1532
56. Gunther, S., Baba, H. A., Hauptmann, S., Holzhausen, H. J., Grossmann, C., Punkt, K., Kusche, T., Jones, L. R., Gergs, U., and Neumann, J. (2010) Losartan reduces mortality in a genetic model of heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **382**, 265-278
57. Pilz, B., Shagdarsuren, E., Wellner, M., Fiebeler, A., Dechend, R., Gratzke, P., Meiners, S., Feldman, D. L., Webb, R. L., Garrelds, I. M., Jan Danser, A. H., Luft, F. C., and Muller, D. N. (2005) Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension* **46**, 569-576
58. Wong, P. C., Price, W. A., Jr., Chiu, A. T., Carini, D. J., Duncia, J. V., Johnson, A. L., Wexler, R. R., and Timmermans, P. B. (1990) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Studies with EXP9270 and DuP 753. *Hypertension* **15**, 823-834
59. Christen, Y., Waeber, B., Nussberger, J., Porchet, M., Borland, R. M., Lee, R. J., Maggon, K., Shum, L., Timmermans, P. B., and Brunner, H. R. (1991) Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II. *Circulation* **83**, 1333-1342
60. Dobaczewski, M., Chen, W., and Frangogiannis, N. G. (2011) Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* **51**, 600-606
61. Li, J., Philip, J. L., Xu, X., Theccanat, T., Abdur Razzaque, M., and Akhter, S. A. (2014) beta-Arrestins regulate human cardiac fibroblast transformation and collagen synthesis in adverse ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* **76**, 73-83
62. Annes, J. P., Munger, J. S., and Rifkin, D. B. (2003) Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* **116**, 217-224
63. Akki, A., Zhang, M., Murdoch, C., Brewer, A., and Shah, A. M. (2009) NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *J Mol Cell Cardiol* **47**, 15-22
64. Ago, T., Kuroda, J., Pain, J., Fu, C., Li, H., and Sadoshima, J. (2010) Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res* **106**, 1253-1264
65. Seshiah, P. N. (2002) Angiotensin II Stimulation of NAD(P)H Oxidase Activity: Upstream Mediators. *Circ Res* **91**, 406-413
66. Bai, F., Pang, X. F., Zhang, L. H., Wang, N. P., McKallip, R. J., Garner, R. E., and Zhao, Z. Q. (2016) Angiotensin II AT1 receptor alters ACE2 activity, eNOS expression and CD44-hyaluronan interaction in rats with hypertension and myocardial fibrosis. *Life Sci* **153**, 141-152

67. Zhuo, J. L., Mendelsohn, F. A., and Ohishi, M. (2002) Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension* **39**, 634-638
68. Jones, S. P., Greer, J. J., van Haperen, R., Duncker, D. J., de Crom, R., and Lefer, D. J. (2003) Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4891-4896
69. Buczko, W., and Hermanowicz, J. M. (2008) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren, an oral direct renin inhibitor. *Pharmacol Rep* **60**, 623-631
70. Solomon, S. D., Shin, S. H., Shah, A., Skali, H., Desai, A., Kober, L., Maggioni, A. P., Rouleau, J. L., Kelly, R. Y., Hester, A., McMurray, J. J., Pfeffer, M. A., and Aliskiren Study in Post, M. I. P. t. R. R. I. (2011) Effect of the direct renin inhibitor aliskiren on left ventricular remodelling following myocardial infarction with systolic dysfunction. *Eur Heart J* **32**, 1227-1234
71. Gheorghide, M., Bohm, M., Greene, S. J., Fonarow, G. C., Lewis, E. F., Zannad, F., Solomon, S. D., Baschiera, F., Botha, J., Hua, T. A., Gimpelewicz, C. R., Jaumont, X., Lesogor, A., Maggioni, A. P., Investigators, A., and Coordinators. (2013) Effect of aliskiren on postdischarge mortality and heart failure readmissions among patients hospitalized for heart failure: the ASTRONAUT randomized trial. *JAMA* **309**, 1125-1135
72. Oh, B. H., Mitchell, J., Herron, J. R., Chung, J., Khan, M., and Keefe, D. L. (2007) Aliskiren, an oral renin inhibitor, provides dose-dependent efficacy and sustained 24-hour blood pressure control in patients with hypertension. *J Am Coll Cardiol* **49**, 1157-1163
73. Parodi-Rullan, R., Barreto-Torres, G., Ruiz, L., Casasnovas, J., and Javadov, S. (2012) Direct renin inhibition exerts an anti-hypertrophic effect associated with improved mitochondrial function in post-infarction heart failure in diabetic rats. *Cell Physiol Biochem* **29**, 841-850
74. Zhi, H., Luptak, I., Alreja, G., Shi, J., Guan, J., Metes-Kosik, N., and Joseph, J. (2013) Effects of direct Renin inhibition on myocardial fibrosis and cardiac fibroblast function. *PLoS One* **8**, e81612
75. Wood, J. M., Stanton, J. L., and Hofbauer, K. G. (1987) Inhibitors of renin as potential therapeutic agents. *J Enzyme Inhib* **1**, 169-185
76. Bohlender, J., Fukamizu, A., Lippoldt, A., Nomura, T., Dietz, R., Menard, J., Murakami, K., Luft, F. C., and Ganten, D. (1997) High human renin hypertension in transgenic rats. *Hypertension* **29**, 428-434
77. Savoia, C., Arrabito, E., Parente, R., Sada, L., Madaro, L., Nicoletti, C., Zezza, L., Alonzo, A., Rubattu, S., Michelini, S., Muller, D. N., and Volpe, M. (2013) The direct renin inhibitor aliskiren improves vascular remodelling in transgenic rats harbouring human

- renin and angiotensinogen genes. *Clin Sci (Lond)* **125**, 183-189
78. Hara, T., Nishimura, S., Yamamoto, T., Kajimoto, Y., Kusumoto, K., Kanagawa, R., Ikeda, S., and Nishimoto, T. (2018) TAK-272 (imarikiren), a novel renin inhibitor, improves cardiac remodeling and mortality in a murine heart failure model. *PLoS One* **13**, e0202176
 79. Levine, T. B., Francis, G. S., Goldsmith, S. R., Simon, A. B., and Cohn, J. N. (1982) Activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure. *Am J Cardiol* **49**, 1659-1666
 80. Francis, G. S., Benedict, C., Johnstone, D. E., Kirlin, P. C., Nicklas, J., Liang, C. S., Kubo, S. H., Rudin-Toretsky, E., and Yusuf, S. (1990) Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* **82**, 1724-1729
 81. SCOHIA Pharma, I. (2021) Pipeline (<https://www.scohia.com/eng/sys/pipeline/>).
 82. Shanghai Pharmaceuticals Holding Co., L. (2018) Safety and Efficacy of SPH3127 on Treating Mild-moderate Essential Hypertension Patients (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03756103).
 83. Kanda, E., Kashihara, N., Matsushita, K., Usui, T., Okada, H., Iseki, K., Mikami, K., Tanaka, T., Wada, T., Watada, H., Ueki, K., Nangaku, M., and Research Working Group for Establishing Guidelines for Clinical Evaluation of Chronic Kidney, D. (2018) Guidelines for clinical evaluation of chronic kidney disease : AMED research on regulatory science of pharmaceuticals and medical devices. *Clin Exp Nephrol* **22**, 1446-1475
 84. Bottari, S. P., Taylor, V., King, I. N., Bogdal, Y., Whitebread, S., and de Gasparo, M. (1991) Angiotensin II AT₂ receptors do not interact with guanine nucleotide binding proteins. *Eur J Pharmacol* **207**, 157-163
 85. Hansen, J. L., Servant, G., Baranski, T. J., Fujita, T., Iiri, T., and Sheikh, S. P. (2000) Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation. *Circ Res* **87**, 753-759
 86. Zhang, H., Han, G. W., Batyuk, A., Ishchenko, A., White, K. L., Patel, N., Sadybekov, A., Zamlynny, B., Rudd, M. T., Hollenstein, K., Tolstikova, A., White, T. A., Hunter, M. S., Weierstall, U., Liu, W., Babaoglu, K., Moore, E. L., Katz, R. D., Shipman, J. M., Garcia-Calvo, M., Sharma, S., Sheth, P., Soisson, S. M., Stevens, R. C., Katritch, V., and Cherezov, V. (2017) Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors. *Nature* **544**, 327-332
 87. Paz Ocaranza, M., Riquelme, J. A., Garcia, L., Jalil, J. E., Chiong, M., Santos, R. A. S., and Lavandero, S. (2020) Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular

- disease. *Nat Rev Cardiol* **17**, 116-129
88. Leonhardt, J., Villela, D. C., Teichmann, A., Munter, L. M., Mayer, M. C., Mardahl, M., Kirsch, S., Namsolleck, P., Lucht, K., Benz, V., Alenina, N., Daniell, N., Horiuchi, M., Iwai, M., Multhaup, G., Schulein, R., Bader, M., Santos, R. A., Unger, T., and Steckelings, U. M. (2017) Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension* **69**, 1128-1135
 89. Villela, D., Leonhardt, J., Patel, N., Joseph, J., Kirsch, S., Hallberg, A., Unger, T., Bader, M., Santos, R. A., Sumners, C., and Steckelings, U. M. (2015) Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. *Clin Sci (Lond)* **128**, 227-234
 90. Kaschina, E., Namsolleck, P., and Unger, T. (2017) AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Res* **125**, 39-47
 91. Ocaranza, M. P., and Jalil, J. E. (2012) Protective Role of the ACE2/Ang-(1-9) Axis in Cardiovascular Remodeling. *Int J Hypertens* **2012**, 594361
 92. Wagenaar, G. T., Laghmani el, H., Fidder, M., Sengers, R. M., de Visser, Y. P., de Vries, L., Rink, R., Roks, A. J., Folkerts, G., and Walther, F. J. (2013) Agonists of MAS oncogene and angiotensin II type 2 receptors attenuate cardiopulmonary disease in rats with neonatal hyperoxia-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **305**, L341-351
 93. Pharma, V. (2021) Safety, Efficacy and Pharmacokinetics of C21 in Subjects With IPF (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04533022).
 94. Juillerat-Jeanneret, L. (2020) The Other Angiotensin II Receptor: AT2R as a Therapeutic Target. *J Med Chem* **63**, 1978-1995
 95. Imai, Y., Kuba, K., and Penninger, J. M. (2008) The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. *Exp Physiol* **93**, 543-548
 96. Yamazato, Y., Ferreira, A. J., Hong, K. H., Sriramula, S., Francis, J., Yamazato, M., Yuan, L., Bradford, C. N., Shenoy, V., Oh, S. P., Katovich, M. J., and Raizada, M. K. (2009) Prevention of pulmonary hypertension by Angiotensin-converting enzyme 2 gene transfer. *Hypertension* **54**, 365-371
 97. Ferreira, A. J., Shenoy, V., Yamazato, Y., Sriramula, S., Francis, J., Yuan, L., Castellano, R. K., Ostrov, D. A., Oh, S. P., Katovich, M. J., and Raizada, M. K. (2009) Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **179**, 1048-1054
 98. Li, G., Zhang, H., Zhao, L., Zhang, Y., Yan, D., and Liu, Y. (2017) Angiotensin-converting enzyme 2 activation ameliorates pulmonary endothelial dysfunction in rats with pulmonary arterial hypertension through mediating phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Am Soc Hypertens* **11**, 842-852

99. Epelman, S., Tang, W. H., Chen, S. Y., Van Lente, F., Francis, G. S., and Sen, S. (2008) Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure: insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Am Coll Cardiol* **52**, 750-754
100. Johnson, J. A., West, J., Maynard, K. B., and Hemnes, A. R. (2011) ACE2 improves right ventricular function in a pressure overload model. *PLoS One* **6**, e20828
101. Rathinasabapathy, A., Bryant, A. J., Suzuki, T., Moore, C., Shay, S., Gladson, S., West, J. D., and Carrier, E. J. (2018) rhACE2 Therapy Modifies Bleomycin-Induced Pulmonary Hypertension via Rescue of Vascular Remodeling. *Front Physiol* **9**, 271
102. Hemnes, A. R., Rathinasabapathy, A., Austin, E. A., Brittain, E. L., Carrier, E. J., Chen, X., Fessel, J. P., Fike, C. D., Fong, P., Fortune, N., Gerszten, R. E., Johnson, J. A., Kaplowitz, M., Newman, J. H., Piana, R., Pugh, M. E., Rice, T. W., Robbins, I. M., Wheeler, L., Yu, C., Loyd, J. E., and West, J. (2018) A potential therapeutic role for angiotensin-converting enzyme 2 in human pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* **51**
103. Khan, A., Benthin, C., Zeno, B., Albertson, T. E., Boyd, J., Christie, J. D., Hall, R., Poirier, G., Ronco, J. J., Tidswell, M., HARDS, K., Powley, W. M., Wright, T. J., Siederer, S. K., Fairman, D. A., Lipson, D. A., Bayliffe, A. I., and Lazaar, A. L. (2017) A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* **21**, 234
104. Organization, W. H. (2021) WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard (<https://covid19.who.int/>).
105. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Kruger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Muller, M. A., Drosten, C., and Pohlmann, S. (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **181**, 271-280 e278
106. Kai, H., and Kai, M. (2020) Interactions of coronaviruses with ACE2, angiotensin II, and RAS inhibitors-lessons from available evidence and insights into COVID-19. *Hypertens Res* **43**, 648-654
107. Baral, R., Tsampasian, V., Debski, M., Moran, B., Garg, P., Clark, A., and Vassiliou, V. S. (2021) Association Between Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors and Clinical Outcomes in Patients With COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* **4**, e213594
108. Lee, T., Cau, A., Cheng, M. P., Levin, A., Lee, T. C., Vinh, D. C., Lamontagne, F., Singer, J., Walley, K. R., Murthy, S., Patrick, D., Rewa, O. G., Winston, B. W., Marshall, J., Boyd, J., Tran, K., Kalil, A., McCulloh, R., Fowler, R., Luther, J. M., Russell, J. A., and CORONA, A. R. (2021) Angiotensin Receptor Blockers and Angiotensin Converting Enzyme

- Inhibitors in Covid-19 -Meta-Analysis/Meta-Regression Adjusted for Confounding Factors. *CJC Open*
109. Iheanacho, C. O., Odili, V. U., and Eze, U. I. H. (2021) Risk of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 prognosis with the use of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) inhibitors: a systematic review. *Futur J Pharm Sci* **7**, 73
 110. Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, Z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Leibbrandt, A., Wada, T., Slutsky, A. S., Liu, D., Qin, C., Jiang, C., and Penninger, J. M. (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* **11**, 875-879
 111. Krishnamurthy, S., Lockey, R. F., and Kolliputi, N. (2021) Soluble ACE2 as a potential therapy for COVID-19. *Am J Physiol Cell Physiol* **320**, C279-C281
 112. Monteil, V., Kwon, H., Prado, P., Hagelkruys, A., Wimmer, R. A., Stahl, M., Leopoldi, A., Garreta, E., Hurtado Del Pozo, C., Prosper, F., Romero, J. P., Wirnsberger, G., Zhang, H., Slutsky, A. S., Conder, R., Montserrat, N., Mirazimi, A., and Penninger, J. M. (2020) Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell* **181**, 905-913 e907
 113. AG, A. B. (2020) APEIRON Biologics: Patient recruitment completed in Phase II COVID-19 Clinical Trial of APN01 (https://www.apeiron-biologics.com/wp-content/uploads/20201204_APEIRON_LPI_Covid-trial_ENG_FINAL.pdf).
 114. Zoufaly, A., Poglitsch, M., Aberle, J. H., Hoepler, W., Seitz, T., Traugott, M., Grieb, A., Pawelka, E., Laferl, H., Wenisch, C., Neuhold, S., Haider, D., Stiasny, K., Bergthaler, A., Puchhammer-Stoeckl, E., Mirazimi, A., Montserrat, N., Zhang, H., Slutsky, A. S., and Penninger, J. M. (2020) Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19. *Lancet Respir Med* **8**, 1154-1158
 115. Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M. X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., and Fujino, M. (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 471-476
 116. O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., Shi, X., Petronis, A., George, S. R., and Nguyen, T. (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* **136**, 355-360
 117. Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., Osmond, D. H., George, S. R., and O'Dowd, B. F. (2000) Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* **74**, 34-41

118. Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Tatemoto, K., and Fujino, M. (1999) Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta* **1452**, 25-35
119. Maguire, J. J., Klein, M. J., Pitkin, S. L., and Davenport, A. P. (2009) [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* **54**, 598-604
120. Zhen, E. Y., Higgs, R. E., and Gutierrez, J. A. (2013) Pyroglutamyl apelin-13 identified as the major apelin isoform in human plasma. *Anal Biochem* **442**, 1-9
121. Wysocka, M. B., Pietraszek-Gremplewicz, K., and Nowak, D. (2018) The Role of Apelin in Cardiovascular Diseases, Obesity and Cancer. *Front Physiol* **9**, 557
122. Japp, A. G., Cruden, N. L., Amer, D. A., Li, V. K., Goudie, E. B., Johnston, N. R., Sharma, S., Neilson, I., Webb, D. J., Megson, I. L., Flapan, A. D., and Newby, D. E. (2008) Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol* **52**, 908-913
123. Japp, A. G., Cruden, N. L., Barnes, G., van Gemeren, N., Mathews, J., Adamson, J., Johnston, N. R., Denvir, M. A., Megson, I. L., Flapan, A. D., and Newby, D. E. (2010) Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation* **121**, 1818-1827
124. Ishida, J., Hashimoto, T., Hashimoto, Y., Nishiwaki, S., Iguchi, T., Harada, S., Sugaya, T., Matsuzaki, H., Yamamoto, R., Shiota, N., Okunishi, H., Kihara, M., Umemura, S., Sugiyama, F., Yagami, K., Kasuya, Y., Mochizuki, N., and Fukamizu, A. (2004) Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* **279**, 26274-26279
125. Zhong, J. C., Yu, X. Y., Huang, Y., Yung, L. M., Lau, C. W., and Lin, S. G. (2007) Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* **74**, 388-395
126. Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., and Tummino, P. (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* **277**, 14838-14843
127. Sato, T., Suzuki, T., Watanabe, H., Kadowaki, A., Fukamizu, A., Liu, P. P., Kimura, A., Ito, H., Penninger, J. M., Imai, Y., and Kuba, K. (2013) Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *J Clin Invest* **123**, 5203-5211
128. Chun, H. J., Ali, Z. A., Kojima, Y., Kundu, R. K., Sheikh, A. Y., Agrawal, R., Zheng, L., Leeper, N. J., Pearl, N. E., Patterson, A. J., Anderson, J. P., Tsao, P. S., Lenardo, M. J., Ashley, E. A., and Quertermous, T. (2008) Apelin signaling antagonizes Ang II effects in

- mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest* **118**, 3343-3354
129. Siddiquee, K., Hampton, J., McAnally, D., May, L., and Smith, L. (2013) The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br J Pharmacol* **168**, 1104-1117
 130. Kleinz, M. J., and Davenport, A. P. (2004) Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept* **118**, 119-125
 131. Szokodi, I., Tavi, P., Foldes, G., Voutilainen-Myllyla, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piuholta, J., Rysa, J., Toth, M., and Ruskoaho, H. (2002) Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* **91**, 434-440
 132. Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M. X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., and Fujimiya, M. (2001) The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* **99**, 87-92
 133. Foldes, G., Horkay, F., Szokodi, I., Vuolteenaho, O., Ilves, M., Lindstedt, K. A., Mayranpaa, M., Sarman, B., Seres, L., Skoumal, R., Lako-Futo, Z., deChatel, R., Ruskoaho, H., and Toth, M. (2003) Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 480-485
 134. Azizi, Y., Faghihi, M., Imani, A., Roghani, M., and Nazari, A. (2013) Post-infarct treatment with [Pyr1]-apelin-13 reduces myocardial damage through reduction of oxidative injury and nitric oxide enhancement in the rat model of myocardial infarction. *Peptides* **46**, 76-82
 135. Foussal, C., Lairez, O., Calise, D., Pathak, A., Guilbeau-Frugier, C., Valet, P., Parini, A., and Kunduzova, O. (2010) Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* **584**, 2363-2370
 136. Pharmaceuticals, N. (2021) A Study of CLR325 in Chronic Stable Heart Failure Patients. (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02696967).
 137. Amgen. (2019) Study to Evaluate the Safety and Tolerability of AMG 986 in Healthy Subjects and Heart Failure Patients (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03276728).
 138. Squibb, B.-M. (2021) A Study of BMS-986224 in Healthy Subjects and Heart Failure Patients With Reduced Ejection Fraction (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03281122).
 139. Cruden, N. L., Fox, K. A., Ludlam, C. A., Johnston, N. R., and Newby, D. E. (2004) Neutral endopeptidase inhibition augments vascular actions of bradykinin in patients treated with angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension* **44**, 913-918
 140. Rademaker, M. T., Charles, C. J., Espiner, E. A., Nicholls, M. G., Richards, A. M., and Kosoglou, T. (1996) Neutral endopeptidase inhibition: augmented atrial and brain

- natriuretic peptide, haemodynamic and natriuretic responses in ovine heart failure. *Clin Sci (Lond)* **91**, 283-291
141. Wilkinson, I. B., McEniery, C. M., Bongaerts, K. H., MacCallum, H., Webb, D. J., and Cockcroft, J. R. (2001) Adrenomedullin (ADM) in the human forearm vascular bed: effect of neutral endopeptidase inhibition and comparison with proadrenomedullin NH₂-terminal 20 peptide (PAMP). *Br J Clin Pharmacol* **52**, 159-164
 142. Maric, C., Zheng, W., and Walther, T. (2006) Interactions between angiotensin II and atrial natriuretic peptide in renomedullary interstitial cells: the role of neutral endopeptidase. *Nephron Physiol* **103**, p149-156
 143. Rice, G. I., Thomas, D. A., Grant, P. J., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2004) Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J* **383**, 45-51
 144. McMurray, J. J., Packer, M., Desai, A. S., Gong, J., Lefkowitz, M. P., Rizkala, A. R., Rouleau, J. L., Shi, V. C., Solomon, S. D., Swedberg, K., Zile, M. R., Investigators, P.-H., and Committees. (2014) Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* **371**, 993-1004
 145. Solomon, S. D., McMurray, J. J. V., Anand, I. S., Ge, J., Lam, C. S. P., Maggioni, A. P., Martinez, F., Packer, M., Pfeffer, M. A., Pieske, B., Redfield, M. M., Rouleau, J. L., van Veldhuisen, D. J., Zannad, F., Zile, M. R., Desai, A. S., Claggett, B., Jhund, P. S., Boytsov, S. A., Comin-Colet, J., Cleland, J., Dungen, H. D., Goncalvesova, E., Katova, T., Kerr Saraiva, J. F., Lelonek, M., Merkely, B., Senni, M., Shah, S. J., Zhou, J., Rizkala, A. R., Gong, J., Shi, V. C., Lefkowitz, M. P., Investigators, P.-H., and Committees. (2019) Angiotensin-Neprilysin Inhibition in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med* **381**, 1609-1620
 146. McMurray, J. J. V., Jackson, A. M., Lam, C. S. P., Redfield, M. M., Anand, I. S., Ge, J., Lefkowitz, M. P., Maggioni, A. P., Martinez, F., Packer, M., Pfeffer, M. A., Pieske, B., Rizkala, A. R., Sabarwal, S. V., Shah, A. M., Shah, S. J., Shi, V. C., van Veldhuisen, D. J., Zannad, F., Zile, M. R., Cikes, M., Goncalvesova, E., Katova, T., Kosztin, A., Lelonek, M., Sweitzer, N., Vardeny, O., Claggett, B., Jhund, P. S., and Solomon, S. D. (2020) Effects of Sacubitril-Valsartan Versus Valsartan in Women Compared With Men With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction: Insights From PARAGON-HF. *Circulation* **141**, 338-351
 147. AG, N. (2021) Full Year 2020 Product Sales (<https://www.novartis.com/investors/financial-data/product-sales>).
 148. Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J. M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O. E., Woerle, H. J., Broedl, U. C., Inzucchi, S. E., and

- Investigators, E.-R. O. (2015) Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* **373**, 2117-2128
149. Neal, B., Perkovic, V., Mahaffey, K. W., de Zeeuw, D., Fulcher, G., Erondu, N., Shaw, W., Law, G., Desai, M., Matthews, D. R., and Group, C. P. C. (2017) Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* **377**, 644-657
150. Wiviott, S. D., Raz, I., Bonaca, M. P., Mosenzon, O., Kato, E. T., Cahn, A., Silverman, M. G., Zelniker, T. A., Kuder, J. F., Murphy, S. A., Bhatt, D. L., Leiter, L. A., McGuire, D. K., Wilding, J. P. H., Ruff, C. T., Gause-Nilsson, I. A. M., Fredriksson, M., Johansson, P. A., Langkilde, A. M., Sabatine, M. S., and Investigators, D.-T. (2019) Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* **380**, 347-357
151. McMurray, J. J. V., Solomon, S. D., Inzucchi, S. E., Kober, L., Kosiborod, M. N., Martinez, F. A., Ponikowski, P., Sabatine, M. S., Anand, I. S., Belohlavek, J., Bohm, M., Chiang, C. E., Chopra, V. K., de Boer, R. A., Desai, A. S., Diez, M., Drozd, J., Dukat, A., Ge, J., Howlett, J. G., Katova, T., Kitakaze, M., Ljungman, C. E. A., Merkely, B., Nicolau, J. C., O'Meara, E., Petrie, M. C., Vinh, P. N., Schou, M., Tereshchenko, S., Verma, S., Held, C., DeMets, D. L., Docherty, K. F., Jhund, P. S., Bengtsson, O., Sjostrand, M., Langkilde, A. M., Committees, D.-H. T., and Investigators. (2019) Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med* **381**, 1995-2008
152. Packer, M., Anker, S. D., Butler, J., Filippatos, G., Pocock, S. J., Carson, P., Januzzi, J., Verma, S., Tsutsui, H., Brueckmann, M., Jamal, W., Kimura, K., Schnee, J., Zeller, C., Cotton, D., Bocchi, E., Bohm, M., Choi, D. J., Chopra, V., Chuquiure, E., Giannetti, N., Janssens, S., Zhang, J., Gonzalez Juanatey, J. R., Kaul, S., Brunner-La Rocca, H. P., Merkely, B., Nicholls, S. J., Perrone, S., Pina, I., Ponikowski, P., Sattar, N., Senni, M., Seronde, M. F., Spinar, J., Squire, I., Taddei, S., Wanner, C., Zannad, F., and Investigators, E. M.-R. T. (2020) Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med* **383**, 1413-1424
153. Staels, B. (2017) Cardiovascular Protection by Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors: Potential Mechanisms. *Am J Med* **130**, S30-S39
154. Ohara, K., Masuda, T., Murakami, T., Imai, T., Yoshizawa, H., Nakagawa, S., Okada, M., Miki, A., Myoga, A., Sugase, T., Sekiguchi, C., Miyazawa, Y., Maeshima, A., Akimoto, T., Saito, O., Muto, S., and Nagata, D. (2019) Effects of the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor dapagliflozin on fluid distribution: A comparison study with furosemide and tolvaptan. *Nephrology (Carlton)* **24**, 904-911
155. Ceriello, A., Genovese, S., Mannucci, E., and Gronda, E. (2016) Glucagon and heart in type 2 diabetes: new perspectives. *Cardiovasc Diabetol* **15**, 123
156. Ferrannini, E., Mark, M., and Mayoux, E. (2016) CV Protection in the EMPA-REG

- OUTCOME Trial: A "Thrifty Substrate" Hypothesis. *Diabetes Care* **39**, 1108-1114
157. PLC, A. (2021) Full-year 2020 results (https://www.astrazeneca.com/content/dam/az/PDF/2020/full-year/Full-year_2020_results_announcement.pdf).
 158. Ingelheim, B. (2021) Annual Report 2020 (https://annualreport.boehringer-ingenelheim.com/fileadmin/downloads/en/bi_finanzbericht_2020_en.pdf).
 159. AstraZeneca. (2018) Dapagliflozin Evaluation to Improve the LIVEs of Patients With PReserved Ejection Fraction Heart Failure. (DELIVER) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03619213).
 160. Anker, S. D., Butler, J., Filippatos, G. S., Jamal, W., Salsali, A., Schnee, J., Kimura, K., Zeller, C., George, J., Brueckmann, M., Zannad, F., Packer, M., Committees, E. M.-P. T., and Investigators. (2019) Evaluation of the effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibition with empagliflozin on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure and a preserved ejection fraction: rationale for and design of the EMPEROR-Preserved Trial. *Eur J Heart Fail* **21**, 1279-1287
 161. Talman, V., and Ruskoaho, H. (2016) Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res* **365**, 563-581
 162. Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S., and Frisen, J. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98-102
 163. Sadek, H., and Olson, E. N. (2020) Toward the Goal of Human Heart Regeneration. *Cell Stem Cell* **26**, 7-16
 164. Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., and Srivastava, D. (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* **142**, 375-386
 165. Miyamoto, K., Akiyama, M., Tamura, F., Isomi, M., Yamakawa, H., Sadahiro, T., Muraoka, N., Kojima, H., Haginiwa, S., Kurotsu, S., Tani, H., Wang, L., Qian, L., Inoue, M., Ide, Y., Kurokawa, J., Yamamoto, T., Seki, T., Aeiba, R., Yamagishi, H., Fukuda, K., and Ieda, M. (2018) Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Cell Stem Cell* **22**, 91-103 e105
 166. Nam, Y. J., Song, K., Luo, X., Daniel, E., Lambeth, K., West, K., Hill, J. A., DiMaio, J. M., Baker, L. A., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2013) Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5588-5593
 167. Mahmoudi, S., Mancini, E., Xu, L., Moore, A., Jahanbani, F., Hebestreit, K., Srinivasan, R., Li, X., Devarajan, K., Prelot, L., Ang, C. E., Shibuya, Y., Benayoun, B. A., Chang, A. L. S., Wernig, M., Wysocka, J., Longaker, M. T., Snyder, M. P., and Brunet, A. (2019)

- Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing. *Nature* **574**, 553-558
168. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676
169. Mazzola, M., and Di Pasquale, E. (2020) Toward Cardiac Regeneration: Combination of Pluripotent Stem Cell-Based Therapies and Bioengineering Strategies. *Front Bioeng Biotechnol* **8**, 455
170. Chong, J. J., Yang, X., Don, C. W., Minami, E., Liu, Y. W., Weyers, J. J., Mahoney, W. M., Van Biber, B., Cook, S. M., Palpant, N. J., Gantz, J. A., Fugate, J. A., Muskheli, V., Gough, G. M., Vogel, K. W., Astley, C. A., Hotchkiss, C. E., Baldessari, A., Pabon, L., Reinecke, H., Gill, E. A., Nelson, V., Kiem, H. P., Laflamme, M. A., and Murry, C. E. (2014) Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* **510**, 273-277
171. Zhu, K., Wu, Q., Ni, C., Zhang, P., Zhong, Z., Wu, Y., Wang, Y., Xu, Y., Kong, M., Cheng, H., Tao, Z., Yang, Q., Liang, H., Jiang, Y., Li, Q., Zhao, J., Huang, J., Zhang, F., Chen, Q., Li, Y., Chen, J., Zhu, W., Yu, H., Zhang, J., Yang, H. T., Hu, X., and Wang, J. (2018) Lack of Remuscularization Following Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitor Cells in Infarcted Nonhuman Primates. *Circ Res* **122**, 958-969
172. (2013) 再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律 (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10800000-Iseikyoku/0000150832.pdf>).
173. Toda, K. (2019) Clinical trial of human (allogeneic) iPS cell-derived cardiomyocytes sheet for ischemic cardiomyopathy (Trial ID: jRCT2053190081).