

## 新規アンジオテンシン AT<sub>1</sub> 受容体ブロッカー アジルサルタンの in vitro および in vivo 薬理作用

楠本 啓司

**要約:** 新規アンジオテンシン II (AII) タイプ 1 (AT<sub>1</sub>) 受容体ブロッカー (ARB) であるアジルサルタン (azilsartan, TAK-536) の薬効薬理作用を明らかにする目的で、種々の in vitro および in vivo 試験を実施した。ヒト AT<sub>1</sub> 受容体を用いた結合実験の結果、アジルサルタンは受容体へ強固に結合し、他の ARB と比較して受容体からの解離が極めて緩やかであることが明らかとなった。アジルサルタンの持つこの特徴は AII により惹起される細胞内情報伝達系の活性化や血管収縮反応に対する抑制効果においても認められており、薬物洗浄後においても他の ARB と比較して持続的な AII 拮抗作用を示した。またアジルサルタンは正常ラットにおいて経口投与により 24 時間に渡って用量に依存した AII 昇圧抑制作用を示し、その作用は既存 ARB であるカンデサルタン シレキセチルおよびオルメサルタン メドキシミルよりも持続的であった。さらに高血圧自然発症ラット (SHR) において、アジルサルタンは 2 週間の反復経口投与により用量に応じた降圧作用を示し、その作用はオルメサルタン メドキシミルと比べて強力かつ持続的であった。またアジルサルタンは SHR で認められるインスリン感受性低下を 2 週間の反復経口投与により有意に改善し、その作用はオルメサルタン メドキシミルよりも強力であった。さらに 2 型糖尿病モデルである Zucker diabetic fatty ラットにおいて、アジルサルタンは 4 週間の反復経口投与によりカンデサルタン シレキセチルよりも強力な尿中アルブミン排泄抑制作用を示した。以上の成績より、アジルサルタンは優れたプロファイルを有する新たな ARB となることが期待される。

### 緒言

高血圧は最も罹患率の高い疾患の一つであり、2025 年には患者数が全世界で 15 億人に達すると予測されている (1)。高血圧が脳血管疾患や心筋梗塞をはじめとする循環器疾患の危険因子であることから、血圧の

適切な管理は重要な課題である。しかしながら、治療ガイドライン等で降圧目標の達成を強く求めているものの、現在でも高血圧患者の半数程度しか降圧目標には達していない (2)。このような観点から、標準療法に上乘せして降圧効果の期待できる新規メカニズムの薬剤や既存薬を上回る降圧効果を生み出すことが可能な“ベスト・イン・クラス (best-in-class)”の薬剤は、有用な治療手段を提供するものと考えられる。

アンジオテンシン II タイプ 1 (AT<sub>1</sub>) 受容体ブロッカー (ARB) は、レニン-アンジオテンシン系の最終産物であるアンジオテンシン II (AII) の作用を受容体レベルで遮断することにより降圧効果を発揮する薬剤であり、高い有効性と安全性を示すことから臨床の場において広く使用されている。現在国内において最も多く処方されている ARB の一つであるカンデサルタン シレキセチルは、活性本体であるカンデサルタンの経口吸収性を改善するためにカルボキシル基をエステル化したプロドラッグである (3)。一般に分子内に 2 つの酸性基を有する有機化合物は細胞膜の透過性が低いために経口吸収され難いことが知られている。そこで酸性基であるテトラゾール環を酸性度が低い他の複素環へ変換することが試みられた。またそのような化合物は脂溶性が高まるために、経口吸収性の改善のみならず、AT<sub>1</sub> 受容体との結合や組織分布が変化し、既存薬とは異なる特徴を持つ ARB を開発できる可能性があることが期待された。種々の酸性複素環を有するカンデサルタン類縁体を合成し、その AII 受容体拮抗作用・薬効・薬物動態 (生物学的利用率) を調べた結果、オキサジアゾロン環へ変換したアジルサルタンを見出すに至った (4) (図 1)。

本研究では、種々の薬理試験を通して、アジルサルタンのヒト AT<sub>1</sub> 受容体への結合様式や、細胞、血管および生体での AII 拮抗作用を明らかにした。また様々な高血圧および腎障害モデルを用いて既存 ARB と薬効面での比較を行った。

### 1. ヒト AT<sub>1</sub> 受容体に対する結合阻害様式

ヒト AT<sub>1</sub> 受容体を高発現させた CHO 細胞から調製した膜画分への [<sup>125</sup>I]-Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-AII の特異的結合に対する ARB の結合阻害作用を検討した。アジルサルタンは [<sup>125</sup>I]-Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-AII の結合を濃度依存的に抑制し (図 2A), その IC<sub>50</sub> 値は 2.3 nmol/L であった (5)。その阻害作用はオルメサルタン (IC<sub>50</sub> 値: 6.7 nmol/L) やテルミサルタン (IC<sub>50</sub> 値: 5.1 nmol/L) よりもやや強く, バルサルタン (IC<sub>50</sub> 値: 44.9 nmol/L) やイルベサルタン (IC<sub>50</sub> 値: 15.8 nmol/L) より強力であった (5)。また [<sup>125</sup>I]-Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-AII の特異的結合に対する阻害作用を薬物洗浄 5 時間後に検討した結果, アジルサルタンのヒト AT<sub>1</sub> 受容体に対する結合阻害作用は他の ARB と比べて強力であることが明らかとなった (図 2B)。即ち, 受容体に対する結合阻害作用が, オルメサルタン, テルミサルタン, バルサルタンおよびイルベサルタンでは薬物洗浄後にそれぞれ 1/36, 1/37, <1/223 および <1/635 に減弱するのに対して, アジルサルタンでは 1/3 の減弱に留まった (5)。アジルサルタンが強い結合阻害活性を維持する原因を明らかにするために, ヒト AT<sub>1</sub> 受容体に対する結合阻害活性の薬物洗浄後の減弱を経時的に検討した結果, ヒト AT<sub>1</sub> 受容体からの解離は, 他の ARB と比べて極めて緩やかであることが明らかとなった (5)。

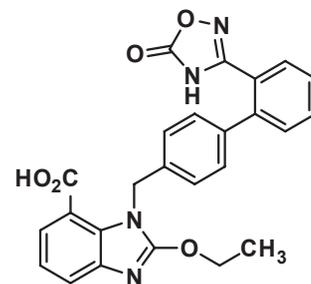
これまでの研究により化学構造にカルボン酸を持つ ARB は薬物洗浄後も AII 拮抗作用を維持し, カルボン酸を持たないロサルタンのような化合物では作用が消失することが報告されている (6, 7)。アジルサルタンもまたカルボン酸を持つことから (4), この化学構造が AT<sub>1</sub> 受容体との強固な結合をもたらす要因の一つであると考えられる。さらに多くの ARB はテトラゾール環を有しており, この部位が AT<sub>1</sub> 受容体との結合に必要であることが報告されている (8)。これに対してアジルサルタンはテトラゾール環がより脂溶性の高いオキサジアゾロン環に置換された構造を持つ (4)。このアジルサルタンに特有の化学構造が AT<sub>1</sub> 受容体からの緩やかな解離に大きく寄与している可能性が考えられる。この点については今後の研究課題の一つである。

AT<sub>1</sub> 受容体に対する結合特異性を検証するために, ヒト AT<sub>2</sub> 受容体, ヒトレニンおよびウサギアンジオテンシン変換酵素を含む 129 種類の機能タンパク質 (受容体, イオンチャンネル, 酵素, 輸送体等) に対する影響を検討した結果, アジルサルタンはこれらの機能タンパク質には作用しないことが明らかとなった (5, 9)。また, ウサギ単

離動脈標本において, アジルサルタンは 10 μmol/L においても KCl, ノルエピネフリン, セロトニンおよびプロスタグランジン F<sub>2α</sub> による血管収縮に対して影響を及ぼさなかった。これらの成績からアジルサルタンは AT<sub>1</sub> 受容体に特異性の高い化合物であると考えられる (5)。

### 2. AII の生理活性に対する抑制作用

アジルサルタンは他の ARB と比べて AT<sub>1</sub> 受容体からの解離が緩やかであるが, この特性は本化合物の持つ AII 拮抗作用にも反映されている。即ち, 他の ARB と比べて薬物洗浄後においても持続的な AII 拮抗作用を示すことが細胞や血管標本を用いた研究において示されている (5)。たとえば, ヒト AT<sub>1</sub> 受容体を過剰発現させた細胞において, アジルサルタンは AII によるイノシトール 1 リン酸 (IP<sub>1</sub>) 産生を濃度依存的に抑制 (EC<sub>50</sub> 値は 9.2 nmol/L) し, 薬物洗浄 4 時間後におい



Azilsartan

図 1 アジルサルタン (azilsartan, 2-ethoxy-1-{[2'-(5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]methyl}-1H-benzimidazole-7-carboxylic acid) の構造式

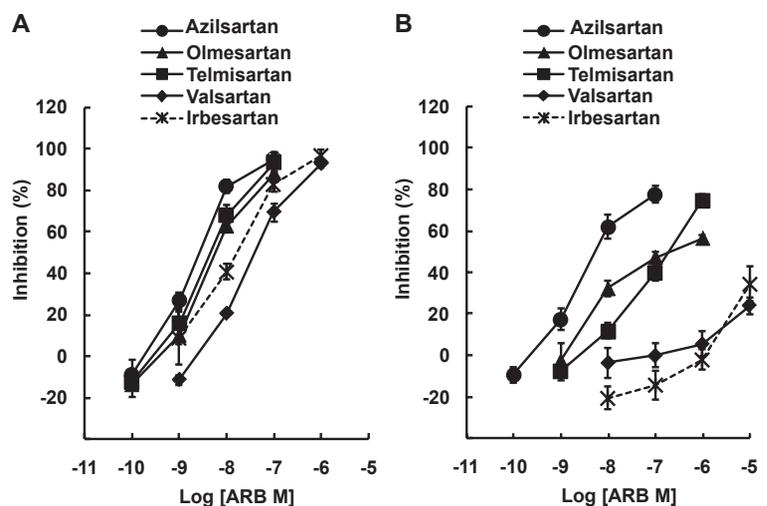


図 2 ヒト AT<sub>1</sub> 受容体への [<sup>125</sup>I]-Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-AII 特異的結合に対するアジルサルタン (azilsartan), オルメサルタン, テルミサルタン, バルサルタンおよびイルベサルタンの濃度-阻害曲線  
結果は平均値±標準誤差で示した (n=4)。ヒト AT<sub>1</sub> 受容体と [<sup>125</sup>I]-Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-AII を各種 ARB 存在下で 90 分間共存させた後, ARB 存在下 (A) あるいは非存在下 (B) にてさらに 300 分間共存させて各時点での特異的結合から抑制率を求めた。(文献 5 から転載)

でも抑制作用を維持した（活性は1/9に低下）。一方、オルメサルタンおよびバルサルタンはAIIによるIP<sub>1</sub>産生を強力に抑制（EC<sub>50</sub>値はそれぞれ12.2 nmol/Lおよび59.8 nmol/L）するものの、薬物洗浄4時間後にはその作用はそれぞれ1/74および1/379に減弱した。

またウサギ大動脈標本でのAII収縮に対するアジルサルタンの抑制作用を検討したところ、アジルサルタンは持続性の（insurmountable）AII収縮抑制作用を示し、最大収縮を50%抑制するpD'<sub>2</sub>値は9.9と強力であった(5)。またオルメサルタンのAII収縮抑制作用が薬物洗浄後に明らかに減弱するのに対して、アジルサルタンは薬物洗浄後においてもAII収縮抑制作用を維持した。

この様なアジルサルタンの持つ持続的なAII拮抗作用はin vivoにおいても確認された(図3)。即ち、ラットを用いたAII負荷試験においてアジルサルタン、カンデサルタンシレキセチルおよびオルメサルタンメドキシミルは0.5 mg/kg投与により1時間後に91%、98%および96%とほぼ同程度のAII昇圧に対する抑制作用を示したが、24時間後での抑制率はそれぞれ77%、34%および12%であった(10)。これらのことから、アジルサルタンは24時間に渡って強力なAIIの拮抗作用を示し、その作用はカンデサルタンシレキセチルおよびオルメサルタンメドキシミルよりも持続的であることが明らかとなった。

### 3. 高血圧モデル動物における降圧作用

高血圧自然発症ラット（SHR）においてアジルサルタンは0.15および0.5 mg/kgの単回経口投与により、反射性頻脈を生じることなく用量に依存した有意な降圧作用を示した(10)。その降圧作用は投与8~24時間後に安定化し、いずれの投与量においても24時間後まで有意な降圧作用が認められた。一方、カンデサルタンシレキセチルおよびオルメサルタンメドキシミルも0.15および0.5 mg/kgの単回経口投与により用量に依存して血圧を低下させたが、24時間後の時点においてカンデサルタンシレキセチルは高用量でのみ有意な降圧が認められ、オルメサルタンメドキシミルでは有意な作用は認められなかった(10)。これらの成績から、SHRにおいてアジルサルタンは、カンデサルタンシレキセチルおよびオルメサルタンメドキシミルと比べて単回投与により持続的な降圧作用を示すことが明らかとなった。

さらに、SHRにアジルサルタンおよびオルメサルタンメドキシミルを1日1回、2週間反復経口投与して降圧作用を検討した結果、アジルサルタン（1 mg/kg）は24時間に渡って安定した降圧作用を示した(図4)。また反復投与による作用の減弱および投薬中止後のリバウンド現象は認められなかった。同用量のオルメサルタンメドキシミルも降圧作用を示したが、投与5時

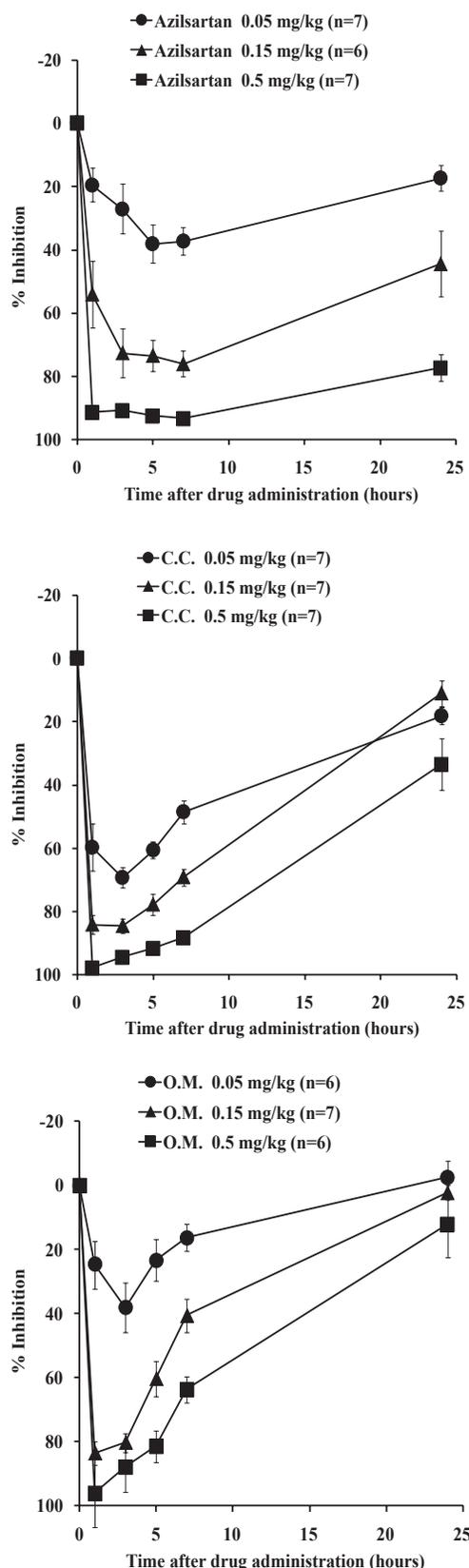


図3 正常ラットにおけるアジルサルタン (azilsartan, 上図)、カンデサルタンシレキセチル (C.C., 中図) およびオルメサルタンメドキシミル (O.M., 下図) のAII昇圧に対する抑制作用（単回経口投与）

結果は平均値±標準誤差で示した (n=6~7)。AIIは薬物投与1, 3, 5, 7および24時間後に静脈内より投与して血圧上昇を測定した。薬物を強制経口投与した後、各時点における薬物投与前値からの抑制率を算出した。(文献10から転載)

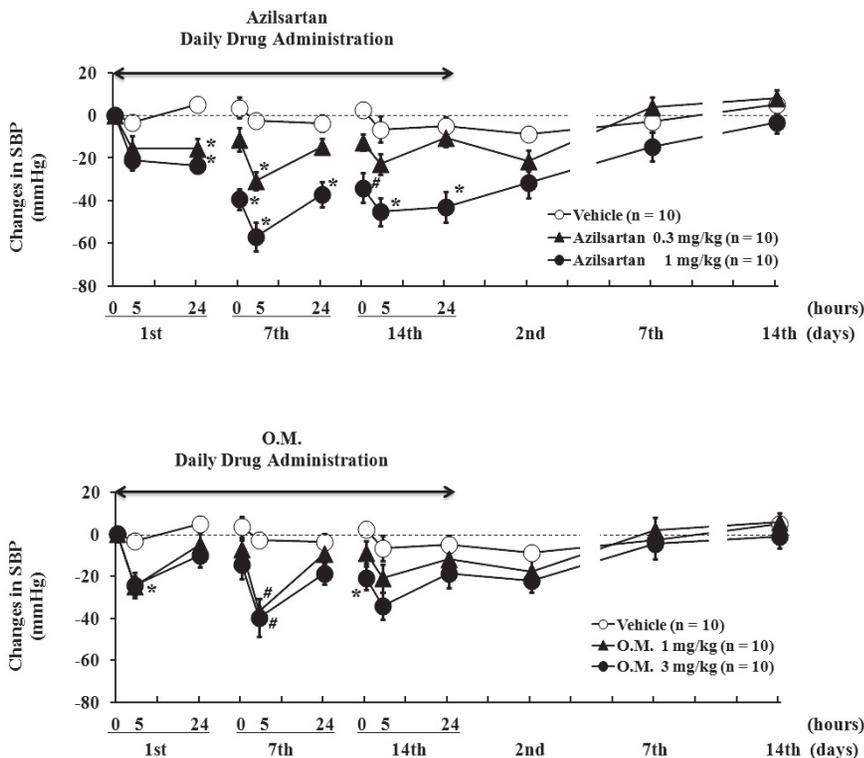


図4 SHRにおけるアジルスルタン (azilsartan, 上段) およびオルメサルタン メドキシミル (O.M., 下段) の収縮期血圧 (SBP) に対する作用 (2週間反復経口投与)  
 結果は平均値±標準誤差で示した (n=10)。ベヒクルあるいは薬物を1日1回、2週間反復経口投与した。投与前、投与後5時間および24時間の血圧を1, 7および14日目に尾動脈より tail-cuff法を用いて非観血的に測定した。さらに休薬2, 7および14日目に血圧測定を実施した。\* $P \leq 0.025$  (Williams 検定), # $P \leq 0.025$  (Shirley-Williams 検定)。 (文献10から転載)

間後と比べて24時間後では降圧の程度が減弱した (図4)。また各時点での血圧低下を比較した結果、アジルスルタンはいずれの時点においてもオルメサルタンメドキシミルより強力に血圧を低下させることが明らかとなった(11)。アジルスルタンの持続的な降圧作用の機序の一つとして、AT<sub>1</sub>受容体からの解離が緩やかなことによって生じる24時間に渡る内因性AIIの抑制が挙げられる。

最近の研究により夜間血圧が高血圧患者の予後に強く関係していることが明らかとなっている(12)。また高血圧は心血管イベントや臓器障害を発症するまではほとんど無症候の疾患であるために、しばしば服用アドヒアランスの低下が生じることが指摘されている(13,14)。従って、アジルスルタンの有する強力かつ持続的な降圧作用ならびに投与中止後も作用が持続するという特徴は、アジルスルタンによる心血管イベントの発症抑制に寄与するものと期待される。

#### 4. 高血圧モデルにおけるインスリン抵抗性改善作用

インスリン抵抗性は本態性高血圧患者の多くで認められており、ARBがインスリン抵抗性を改善することが報告されている(15)。このことから内因性のAIIは

高血圧患者においてインスリン抵抗性の発現に深く関与しているものと考えられている。本態性高血圧のモデルであるSHRも同様に正常ラットと比較してインスリン抵抗性が惹起されている。アジルスルタンは降圧作用を発現する用量(0.3, 1および3 mg/kg)の2週間経口反復投与により用量依存的にインスリン感受性の指標となるグルコース注入速度を増加させ、その作用はオルメサルタンメドキシミルよりも強力であることが明らかとなった(図5)。インスリン抵抗性は循環器系疾患の独立した危険因子であることが知られており(16,17)、アジルスルタンの持つインスリン抵抗性改善作用は高血圧患者の合併症抑止に有益な効果をもたらすと考えられる。

AIIがインスリン抵抗性を惹起する機序は、AT<sub>1</sub>受容体の活性化によって生じるinsulin receptor substrate-1 (IRS-1)のSerリン酸化が、インスリンによるIRS-1のTyrリン酸化を抑制し、最終的に糖取り込み能を低下させることであるとされている(18)。我々はラット初

代骨格筋培養細胞においてアジルスルタンがAIIによるIRS-1のTyrリン酸化抑制を阻止することを見出し(未発表データ)、この作用がインスリン抵抗性改善に一部寄与していると考えている。また、2型糖尿病マウスにおいてアジルスルタンが骨格筋や脂肪組織のTNF $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ )の発現量を低下させるとともに脂肪組織のアディポネクチン(adiponectin)やPPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ )の発現量を増加させることから(19)、SHRにおいてもこのような機序が働いている可能性が考えられる。この点については今後さらなる検討が必要である。

#### 5. 2型糖尿病肥満ラットにおける抗アルブミン尿作用

アジルスルタン(0.1および1 mg/kg)は、2型糖尿病肥満モデルであるZDF (Zucker diabetic fatty)ラットにおいて4週間の反復経口投与により0.1 mg/kg群から有意に尿中アルブミン排泄を抑制した(図6)。カンデサルタンシレキセチルも尿中アルブミン排泄を抑制したが、0.1 mg/kg投与群での効果はアジルスルタンの方が強力であった。両化合物とも収縮期血圧に対して有意な影響を与えず、血漿クレアチニン濃度、

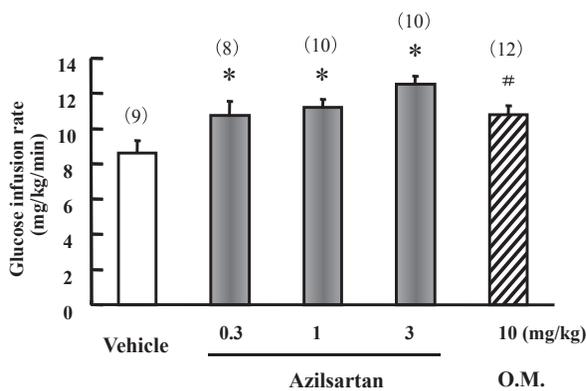


図5 SHRにおけるアジルサルタン (azilsartan) およびオルメサルタン メドキシミル (O.M.) のインスリン感受性に対する作用 (2週間反復経口投与)

結果は平均値±標準誤差で示した (n=8~12)。ベヒクルあるいは薬物を1日1回2週間反復経口投与し、最終投与後一晩絶食し、グルコースクランプ法によるインスリン感受性測定を行った。\* $P \leq 0.025$  (Williams検定), # $P \leq 0.05$  (Student's *t*検定)。 (文献10から転載)

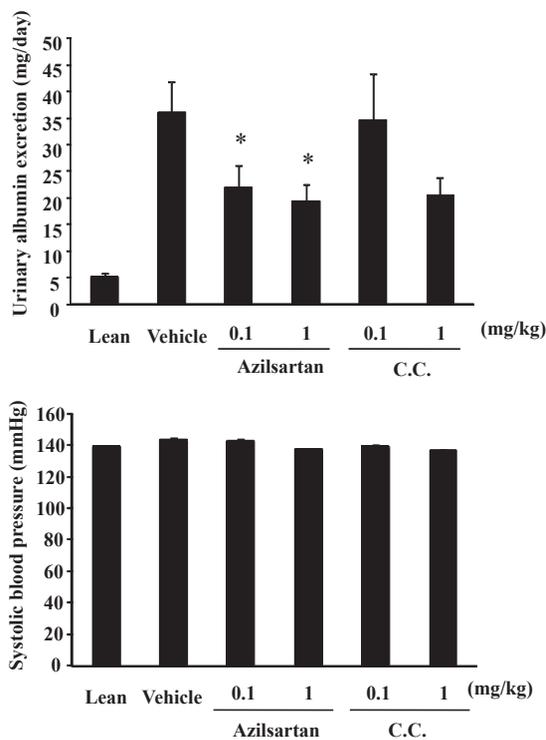


図6 ZDFラットにおけるアジルサルタン (azilsartan) およびカンデサルタン シレキセチル (C.C.) の抗アルブミン尿作用 (上段) および収縮期血圧に対する作用 (下段) (4週間反復経口投与)

数値は平均値±標準誤差で示した (n=5~8)。ベヒクルあるいは薬物を1日1回反復経口投与し、4週間後に自由飲水、自由摂食下で24時間採尿を行い、尿中アルブミン濃度を測定し、尿中アルブミン排泄量を求めた。\* $P \leq 0.025$  (Williams検定)。 (文献10から転載)

血漿インスリン濃度、血中GHb等にも変化は生じなかった (図6)。

ARBは臨床および前臨床試験において尿中タンパク質/アルブミン排泄量を低下させる (20, 21)。また

糖尿病性腎症患者の腎イベント発症を抑制することが大規模試験によって示されている (22, 23)。従って、アジルサルタンは臨床においても明確な腎保護効果を示すことが期待される。

アジルサルタンが血中生化学パラメータや血圧に影響することなくZDFラットでのアルブミン排泄量を低下させたことから、本化合物の作用は腎臓直接的なものと考えられる。ARBの腎臓への直接作用として、たとえば糸球体毛細血管圧の正常化、蝸足細胞障害の軽減、メサングウム細胞の増殖抑制などが挙げられる (24)。本研究で得られたアジルサルタンの腎保護作用は、これらの腎臓直接作用が一部あるいは相互に作用して生み出された可能性が考えられる。

## 結論

アジルサルタンはヒトAT<sub>1</sub>受容体に対して特異的かつ強力な結合阻害作用を持ち、他のARBと異なり持続的なAII拮抗作用を示す。この特徴はアジルサルタンによる降圧作用に反映されており、高血圧モデルにおいて、経口投与により24時間に渡って強力かつ安定した降圧作用を発揮した。最近の臨床試験において血圧低下効果が昼間、夜間を問わずカンデサルタンよりも有意に強いことが明らかとなっており、アジルサルタンは高血圧患者において厳格な血圧コントロールを可能とする薬剤であると考えられる (25)。さらに高血圧や糖尿病モデルにおいてアジルサルタンは他のARBよりも強いインスリン抵抗性改善作用と臓器保護作用を発揮することが明らかとなった。従って、アジルサルタンは臓器保護効果に関して高い有効性が期待される。

## 文 献

- 1) Kearney PM, et al. *Lancet*. 2005;365:217-223.
- 2) Egan BM, et al. *JAMA*. 2010;303:2043-2050.
- 3) Kubo K, et al. *J Med Chem*. 1993;36:2343-2349.
- 4) Kohara Y, et al. *J Med Chem*. 1996;39:5228-5235.
- 5) Ojima M, et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;336:801-808.
- 6) Noda M, et al. *Biochem Pharmacol*. 1993;46:311-318.
- 7) Ojima M, et al. *Eur J Pharmacol*. 1997;319:137-146.
- 8) Vauquelin G, et al. *Biochem Pharmacol*. 2001;61:277-284.
- 9) Kusumoto K, et al. *Eur J Pharmacol*. 2011;669:84-93.
- 10) Kanagawa R, et al. *Jpn Pharmacol Ther*. 2012;40:125-135.
- 11) 楠本啓司, 他. *Medical Science Digest*. 2011;37:25-29.
- 12) Mancica G, et al. *Am J Cardiol*. 2007;100:3J-9J.
- 13) Fodor GJ, et al. *J Hypertens*. 2005;23:1261-1266.
- 14) Weir MR, et al. *Arch Intern Med*. 2000;160:481-490.
- 15) Imura O, et al. *Am J Hypertens*. 1995;8:353-357.
- 16) Haffner SM, et al. *JAMA*. 1990;263:2893-2898.
- 17) Howard G, et al. *Circulation*. 1996;93:1809-1817.
- 18) Olivares-Reyes JA, et al. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;302:128-139.
- 19) Iwata M, et al. *Am J Hypertens*. 2007;20:579-586.
- 20) Parving HH, et al. *N Engl J Med*. 2001;345:870-878.
- 21) Noda M, et al. *Jpn J Pharmacol*. 2001;85:416-422.
- 22) Brenner BM, et al. *N Engl J Med*. 2001;345:861-869.
- 23) Lewis EJ, et al. *N Engl J Med*. 2001;345:851-860.
- 24) Jefferson JA, et al. *Kidney Int*. 2008;74:22-36.
- 25) Rakugi H, et al. *Hypertens Res*. In press.