

主論文の要旨

**Corticotropin releasing hormone receptor 2 antagonist,
RQ-00490721, for the prevention of pressure
overload-induced cardiac dysfunction**

副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体2阻害薬である
RQ-00490721 は圧負荷による心不全を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

森 悠

【緒言】

心臓では GPCR (G タンパク質共役型受容体) がカテコールアミンやアンジオテンシン II などの細胞外刺激に応答して心機能を調節し、心不全の病態にも関与している。β 受容体阻害薬およびアンジオテンシン II 受容体阻害薬などの GPCR 阻害薬は、慢性心不全に広く使用されている。これらの有効な治療法にもかかわらず、心不全の死亡率や入院率は高く、新たな治療法の開発が求められている。GPCR は 800 種以上存在するが、循環器疾患との関連が不明なものが多く、機能未知な GPCR の中に新たな治療ターゲットが存在する可能性を考え、心筋特異的に発現する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体 2 (CRHR2) が心不全発症に関わることを見出し、新規経口型 CRHR2 阻害薬の創薬研究を行った。

【方法と結果】

今回我々は、CRHR2 に対する新規経口型阻害薬(リード化合物)である RQ-00490721 を創出した。RQ-00490721 はラクオリア創薬株式会社により合成され、同化合物及びその類縁体化合物は、物理的性質、生物活性、in vitro の薬物動態に関するデータは特許 WO2019198692 により開示している。RQ-00490721 が慢性心不全の新規治療薬になり得るかどうかを調べるために、マウスへの経口投与により、薬効薬理試験及び薬物動態試験を実施し、薬剤の有効性や副作用の有無、さらに、マウス病気モデルを用いた圧過負荷誘発性心機能障害に対する有効性を検討した。マウスは手術前にランダムにグループ分けされ、RQ-00490721 を 1 日 2 回 4 週間連続で経口投与した。

CRHR2 を強発現させたヒト及びマウス心筋細胞を用いて CRHR2 阻害活性を検討した。pIC₅₀ 値は、ヒト心筋細胞では 7.09±0.03 (Figure 1A)、マウス心筋細胞では 6.33±0.07 (Figure 1B)であることを確認した。また、ヒトウロコルチン 2 (Ucn2) の容量反応曲線は濃度依存性に右方にシフトし、最大反応に変化を認めなかった (Figure 1C)。さらに、シルトプロットの傾きは 1.00 でヒト CRHR2 における RQ-00490721 の pA₂ 値は、7.12±0.02 であった (Figure 1D)。

次に、薬物動態試験にて PK プロファイルの確認を行った。RQ-00490721 (1 mg/kg) を経静脈的に投与したところ、クリアランスは 0.18 L/h/kg、定常状態での分布容積も 0.73 L/kg と中等度であった。また、RQ-00490721 (1 mg/kg) を経口投与した際の最大血漿中濃度 (C_{max}) は 0.816 µg/mL、消失半減期は 3.8 時間、バイオアベイラビリティはほぼ 100%であった (Figure 2A, B)。さらに、RQ-00490721 (100 mg/kg) を 5 日間連続で経口投与した際の血中薬物濃度の推移を検討したところ、C_{max} および曲線下面積 (AUC) は 1 日目と 5 日目の間で変化しないことが確認された (Figure 2C, D)。

次に、マウスでの経口投与における有効性を検討した。cAMP-response element binding (CREB) のリン酸化は心不全関連遺伝子を増強することから、RQ-00490721 をマウスに経口投与した際の、Ucn2 による CREB のリン酸化の抑制効果を確認した。Ucn2 (25、50、100 µg/kg) 皮下注射後、マウス心臓における CREB のリン酸化の状態を確認したところ、Ucn2 の用量依存的に CREB のリン酸化を増強することが確認され

た (Figure 3A, B)。次に、RQ-00490721 の *in vivo* での CREB のリン酸化の抑制効果を確認するため、Ucn2 (100mg/kg) 皮下注射後、RQ-00490721 (10、30、100 mg/kg) の経口投与を行った。結果、マウス心臓において RQ-00490721 の用量依存的に CREB のリン酸化を抑制することが確認された (Figure 3C, D)。

続いて、*in vivo* でマウスに RQ-00490721 (100mg/kg) を 4 週間連続で経口投与した際の副作用発現の有無を検討した。コントロール群と比較して体重と血圧に有意差はなく、心電図検査では心拍数、PR 間隔、および QT 間隔に有意差を認めなかった。さらに、心エコー検査を実施したが、2 群間での左室短縮率 (FS) に有意差は認めず、RQ-00490721 が正常な心機能に与える影響が少ないことを確認した。以上より、RQ-00490721 のマウスへの 4 週間連続経口投与に伴う明らかな副作用は認めなかった (Table 1)。

さらに、RQ-00490721 の圧負荷心不全に対する効果を確認するため、マウスの横大動脈狭窄手術 (TAC) による心不全モデルを作成し、心肥大抑制効果を検討した。比較対象を Sham/Vehicle 群、TAC/Vehicle 群、TAC/RQ-00490721 群の 3 群に分けて行い、経口薬治療は心肥大が進行すると想定される、術後 1 週目から Vehicle 及び RQ-00490721 (100mg/kg) を 1 日 2 回 4 週間連続で経口投与を行った。心エコー検査は手術前及び術後 1, 3, 5 週目に実施し、FS が測定された (Figure 4A)。摘出心臓を観察したところ、肉眼的に TAC/Vehicle 群はその他の群と比較し肥大傾向が強く、TAC/Vehicle 群では心肥大抑制傾向を認めた (Figure 4B)。さらに、TAC/RQ-00490721 群で左心室重量/脛骨長比 (LVW/TL) は有意に低値を示した (Figure 4C)。また、qRT-PCR では脳性利尿ペプチド (BNP) の遺伝子発現量が TAC/RQ-00490721 群で有意に低値であった (Figure 4D)。心エコー所見では、TAC/Vehicle 群で術後 3 週間目から FS の低下傾向を認めたが、TAC/RQ-00490721 群では有意に術後 3 週目以降の FS 低下を抑制した (Figure 4E)。続いて HE 染色を行い、心筋細胞の大きさを断面積の測定値で比較したところ、TAC/RQ-00490721 群で有意に TAC に伴う心筋細胞の肥大化が抑制され (Figure 4F, G)、また、シリウスレッド染色では、TAC/RQ-00490721 群で有意に心筋繊維化が抑制された (Figure 4H, I)。以上の結果から、RQ-00490721 が圧負荷心機能障害の抑制に有効である可能性が示唆された。

【考察】

薬効薬理試験では、マウス CRHR2 における pA2 値は 6.61 ± 0.16 (Supplemental Figure 1B) であった。ヒト CRHR2 の pA2 値 (7.12 ± 0.02) と比較した場合、RQ-00490721 の効果が、マウスよりヒトに対して約 3 倍高いことが確認され、RQ-00490721 がヒトに対してより効果的に作用する可能性が示唆された。

薬物動態試験では、RQ-00490721 のバイオアベイラビリティはほぼ 100% であり、体循環血液移行も非常に良いことが確認され (Figure 2B)、また、C_{max} および曲線下面積 (AUC) が 1 日目と 5 日目の間で変化しないことから、マウスでの長期経口投与も可能であることが示唆された (Figure 2C, 2D)。加えて、Brain/Plasma Ratio は 0.038 と非常

に低く、中枢移行が少ない末梢型の薬剤であることが確認され、薬剤の脳への影響を抑えられる可能性が示唆された (Supplemental Table 1)。

マウスでの経口投与における有効性の検討では、マウス心臓において RQ-00490721 の経口投与が用量依存的に Ucn2 による CREB のリン酸化を抑制することが確認され (Figure 2C, D)、同時に TAC に伴う圧負荷による CREB のリン酸化も抑制することが確認された (Supplemental Figure 2A)。さらに、AKT シグナル伝達の慢性的な過剰活性化は心肥大及び心機能障害を誘発するとされるが、RQ-00490721 の経口投与により TAC に伴う圧負荷による AKT のリン酸化も抑制した (Supplemental Figure 2A)。以上のことから、RQ-00490721 が上記に関連する細胞シグナル伝達を介した機序で、心不全抑制効果を発揮することが示唆された (Supplemental Figure 2B)。

続いて、RQ-00490721 (100mg/kg) を 4 週間連続で経口投与した際の明らかな心毒性は認めず、さらなる長期投与も十分に許容される可能性があることが示された。そして、マウス病気モデルにおいて RQ-00490721 の 4 週間連続での経口投与で左室肥大における圧負荷心機能障害を抑制することが確認された。

以上より RQ-00490721 の経口投与による心機能低下抑制効果が確認され、今後の心不全治療における新たな選択肢となり得ることが示唆された。ただし、RQ-00490721 のより長期投与における予後改善効果や、治療対象となる慢性心不全の適切な病態を把握するためには、今後さらなる研究が必要と思われる。

【結語】

新規経口型 CRHR2 阻害薬 (リード化合物) である RQ-00490721 を創出し、マウス心不全モデルでの心機能低下抑制効果を確認した。in vitro におけるヒト CRHR2 に対する RQ-00490721 の阻害効果は、マウス CRHR2 に対するそれより高いことがわかり、また、in vivo では、経口投与後の明らかな心毒性は観察されなかった。以上の結果から、新規経口型 CRHR2 阻害薬である RQ-00490721 が、将来のヒトにおける慢性心不全の新たな治療法開発の先駆けとなる可能性が示唆された。