

心血管イベントの発症予防に向けた薬剤開発に関する
薬理学的研究

2008年9月

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

池野 明久

目次

第1章 緒言.....	1
第2章 複数の危険因子を軽減するCa拮抗性降圧剤の薬理特性.....	16
序論	
第1節 高血圧モデルにおける降圧ならびに心拍数変動作用	
第2節 高脂血症モデルにおける脂質代謝改善作用ならびにそのメカニズム	
第3節 抗酸化作用	
第4節 動脈硬化モデルにおける抗動脈硬化作用	
第5節 まとめ	
第3章 複数の危険因子を軽減し、血管保護作用を有する副作用（性ホルモン作用）の 減弱した選択的エストロゲン受容体作動薬の創製.....	55
序論	
第1節 コレステロール低下作用を有する性ホルモン作用が軽減された選択的エス トロゲン受容体作動薬の創製	
第2節 OS-0689の子宮重量に対する作用	
第3節 OS-0689の心血管イベント発症のリスクファクターに対する作用	
第4節 OS-0689の血管保護作用	
第5節 まとめ	
第4章 結語.....	88
第5章 今後の展開.....	91
謝辞.....	93
研究業績リスト.....	94

第1章 緒言

近年、生活習慣の欧米化に伴い、生活習慣病（高血圧、高脂血症、糖尿病等）を有する患者が増加の一途をたどっている。それに伴い心血管等の合併症である心筋梗塞や狭心症などの心血管イベントを発症する患者も増加（Figure 1-1）（1）し、今後ますます医療費を圧迫する事が予測される。

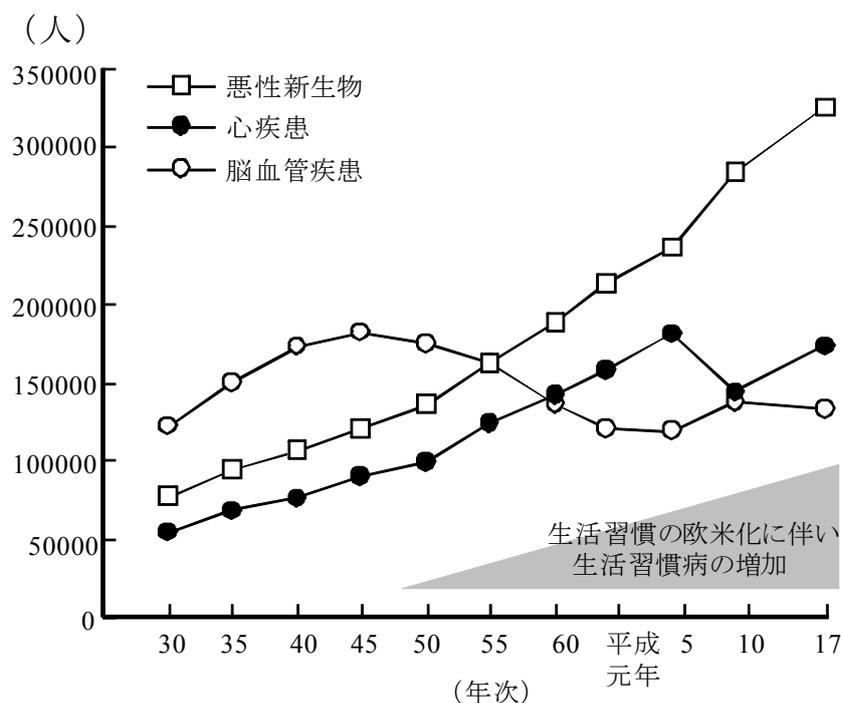


Figure 1-1. 我が国における死因別にみた死亡数の年次推移

心血管イベント発症における主な要因は、冠状動脈に発生する動脈硬化病変ならびに攣縮である（2-9）。これらの動脈硬化病変ならびに攣縮の発生における主要な危険因子は、高血圧、高脂血症、糖尿病、酸化ストレス、交感神経の亢進ならびに閉経等である。つまり、収縮ならびに拡張を繰り返す心臓（心筋細胞）に栄養を送る冠状動脈が、高血圧、高脂血症、糖尿病、酸化ストレス、交感神経の亢進ならびに閉経によるエストロゲンの減少などの環境を長期に暴露されると、血管壁の機能が障害される。特に、血管内皮細胞における機能低下ならびに血管平滑筋の過剰収縮である。血管内皮細胞の機能低下が起ると血中の炎症性細胞や低比重リポ蛋白（LDL）が血管壁内に侵入し、マクロファージが脂質を取り込み泡沫化する。さらに、平滑筋細胞の増殖も起こり、動脈硬化病変（プラーク）が発生し、血流減少による狭心症の原因となる。その後、何らかの刺激等によりプラークに亀裂が発生し、その部位に血小板由来の血栓が生じ、その一部分が末梢へ流れ閉塞の原因となり、心筋梗塞が生じる。また、動脈硬化病変未発生においても血管内皮機能障害と交感神経活性の亢進に伴う血管の攣

縮を原因とした心血管イベント（狭心症や心筋梗塞）が発生する（Figure 1-2）。

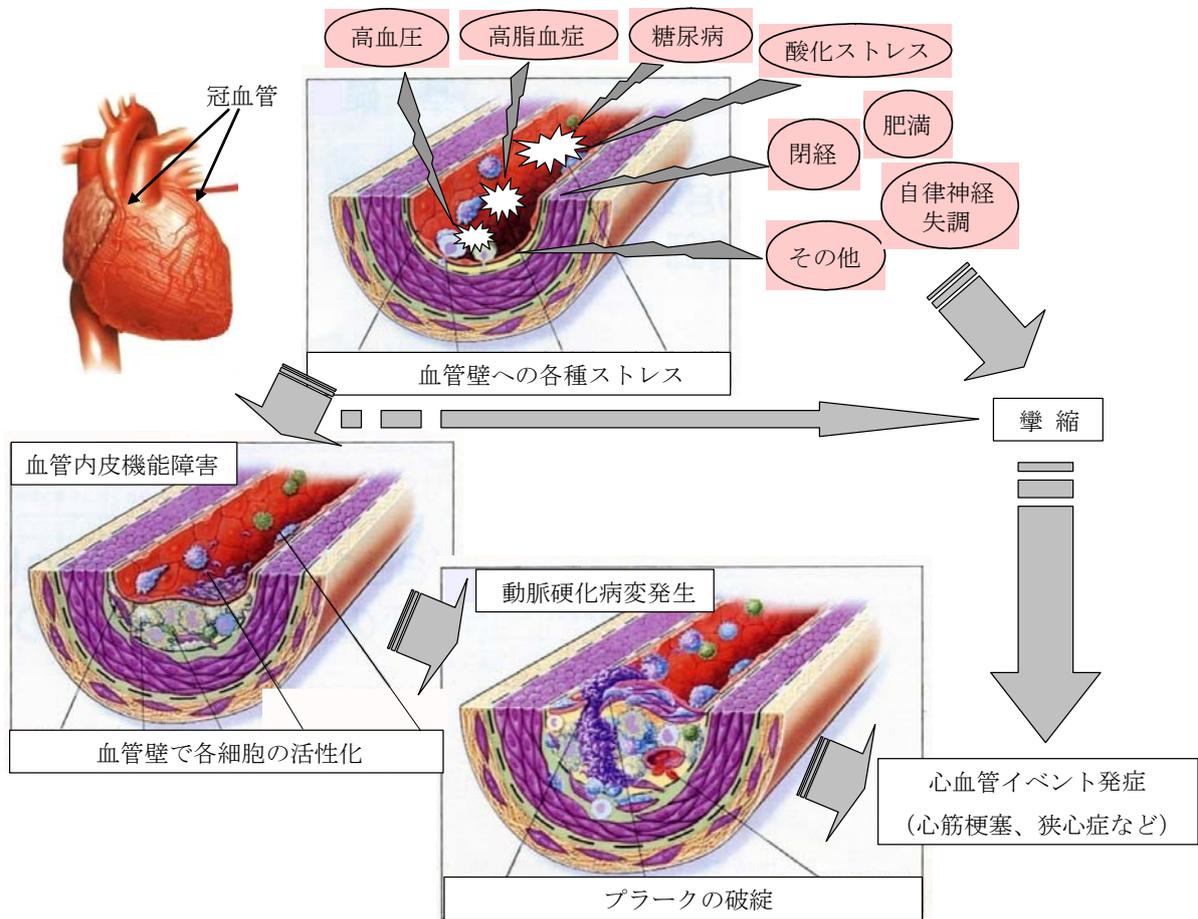


Figure 1-2. 心血管イベント発症機序

従って、心血管イベント発症予防には、これらの生活習慣病、酸化ストレス、交感神経亢進ならびに閉経等の危険因子の単独あるいは複数の軽減が有用と推察される（Figure 1-3）。この事は逆に、心血管イベントの発症予防を最終治療目標にしている生活習慣病や狭心症の治療薬には、これらの複数の危険因子の軽減作用が望まれる事を示している。

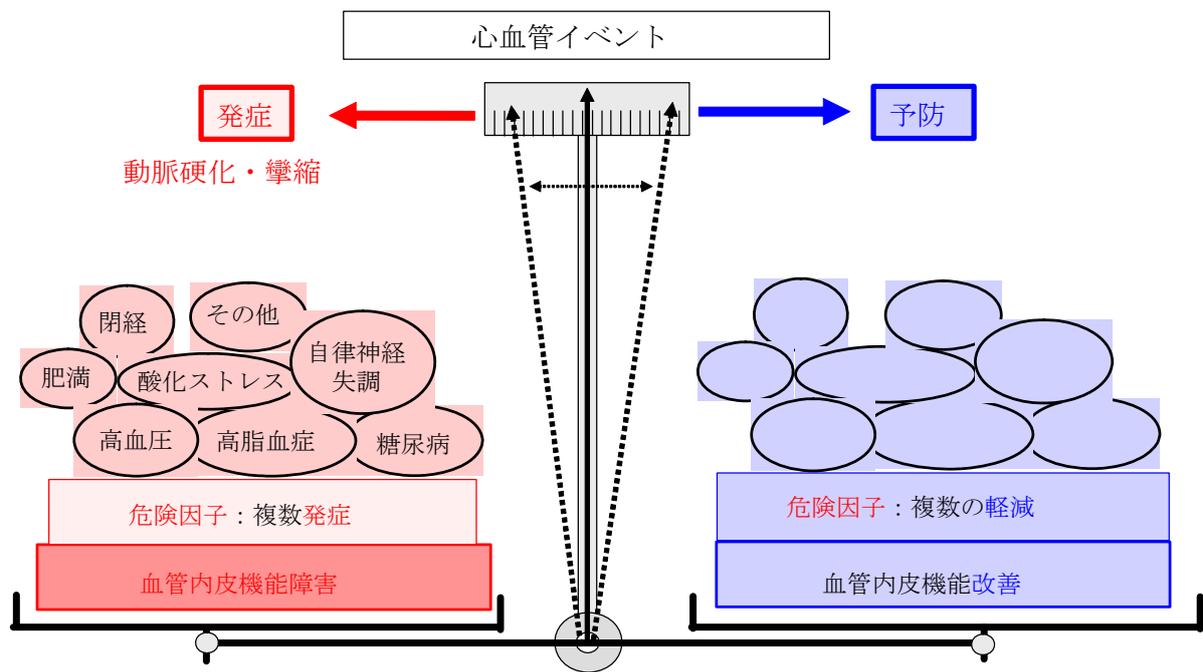


Figure 1-3. 心血管イベントの発症と予防

生活習慣病の一つである高血圧症の治療薬である降圧剤は、これまでにヒト臨床大規模試験において心血管イベント発症の抑制を示す事が報告されている (10, 11)。しかし、現在一般的に広く第一線で使用されているCa拮抗性ならびにレニン・アンジオテンシン系降圧剤において、より強い心血管イベント発症予防を目的に、複数の危険因子軽減作用を有する降圧剤は見出されていない (Table 1-1)。

Table 1-1. 既存の降圧剤と心血管イベント発症の危険因子

降圧剤	主作用	危険因子			
		高血圧	高脂血症	糖尿病 酸化ストレス	
主流	Ca拮抗薬	○	—	—	—~○
	ACE阻害薬 ^{#1}	○	—	—	—
	ARB ^{#2}	○	—	—	—
	レニン阻害薬	○	—	—	—
	α1受容体遮断薬	○	○	—	—
	α+β受容体遮断薬	○	—~○	—	—~○
	β受容体遮断薬	○	—~○	—	—

#1 : アンジオテンシン変換酵素阻害薬
 #2 : アンジオテンシン2 受容体阻害薬

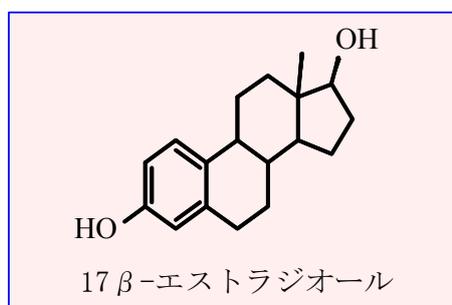
○ : 改善、— : 作用なし

一方、心血管イベントの一つである攣縮性狭心症における治療薬であるエストラジオールは、心血管イベントの発症予防を目的に、先に示した危険因子に対し複数の軽減作用とともに血管保護（血管機能改善）作用を有するが、副作用として性ホルモン作用を有し決して高い満足度に到達していない（Table 1-2）（12, 13）。

Table 1-2. エストラジオールのプロフィール

主作用	危険因子		その他
狭心発作 (内皮機能障害)	血中コレステロール	自律神経失調	子宮重量 (性ホルモン作用)
○	○	○	増加

○：改善



従って両疾患は、治療薬が心血管イベント発症に対し抑制効果を示すものの、複数の危険因子の軽減作用や副作用面から、さらなる発展が期待される領域である。このような事から、本研究では、より高い満足度を示す心血管イベント発症予防薬を目指し、生活習慣病の中でも先に示した高血圧症ならびに狭心症の一つである攣縮性狭心症に着目した。

高血圧治療における主たる最終目標は、単に血圧調節のみならず動脈硬化性心血管イベントの発症予防である。高血圧治療薬には、様々なメカニズムを有する降圧剤が存在するが、古くから現在まで第一次選択薬として使用され実績のある降圧剤としてCa拮抗薬がある。血管は、細胞の興奮によって開くCaチャンネルを介し細胞外から細胞内へCaを流入させ収縮する。Ca拮抗薬は、このチャンネルの開口をブロックする事により、細胞内へのCa流入を抑制し、血管を弛緩させる（Figure 1-4）（14）。しかし、既存のCa拮抗薬には、先に述べたように主作用である高血圧の改善（降圧）作用以外に複数の危険因子を軽減する薬剤は未だ存在しない。また、一部の薬剤には顕著な心拍数変動という副作用も認められる（Table 1-3）（15, 16）。

攣縮性狭心症は、閉経後の狭心症患者に多く認められるが、本疾患におけるエストラジオールの補充療法は、有効である (17)。エストラジオールは、先に述べたように血管機能保護作用とともに交感神経改善作用ならびにコレステロール低下作用などの複数の危険因子軽減作用を有するが、副作用である性ホルモン作用も伴うのが現状である (Table 1-2) (18, 19)。

そこで、より強い心血管イベントの発症抑制作用と副作用の減少を求めて、一つの危険因子の軽減作用を有する単剤における複数の組合せ処方が考えられる。しかし、本処方には、以下の3点の欠点が存在する。つまり1) 心血管イベント発症予防を目的とする患者は、高年齢で他の疾患を合併するケースが多く、服薬する際は他の疾患治療薬も含めた多くの錠剤を一度に服薬しなければならず、決してコンプライアンス面において高い満足度でない。2) 重大な副作用の出現頻度の増加 (20)、つまり臨床において心血管イベントの危険因子である高脂血症の治療を目的に、コレステロール低下薬であるスタチン系と中性脂肪低下薬のフィブラート系を併用すると重度な副作用である横紋筋融解症の出現が増加し製品回収にまで至ったケースが報告されている。3) 薬剤の吸収、代謝ならびに排泄過程において薬剤同士による相互作用が発現し、血中動態あるいは薬効 (薬の効果) に影響を及ぼす事が考えられる。実際の臨床の現場においても、心血管イベントの治療薬であるクロピドグレルと危険因子である高脂血症の治療薬であるアトルバスタチンを併用するとクロピドグレルの薬効である血小板凝集抑制作用が減弱する事が報告されている (Figure 1-5) (21)。

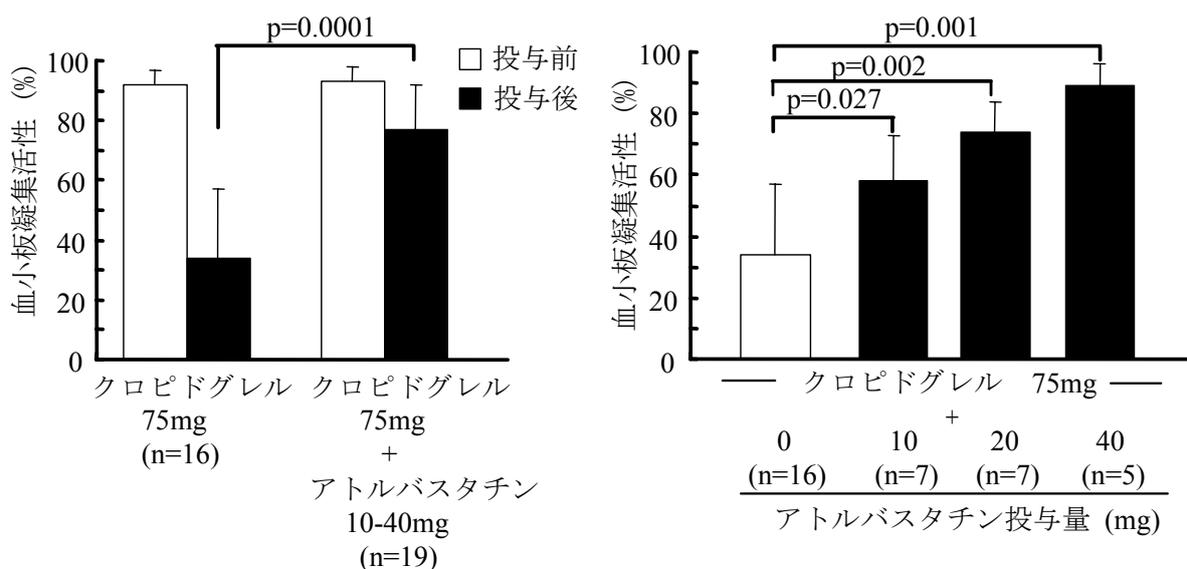


Figure 1-5. 併用による薬物相互作用

本作用は、クロピドグレルの活性代謝物が薬物代謝酵素 CYP3A4 を介し生成されるが、併用剤であるアトルバスタチンの代謝も同酵素 CYP3A4 を介するため、両剤で同じ薬物代謝酵素である CYP3A4 を共有したためこのような好ましくない作用が発現したと考えられる (Figure 1-6)。

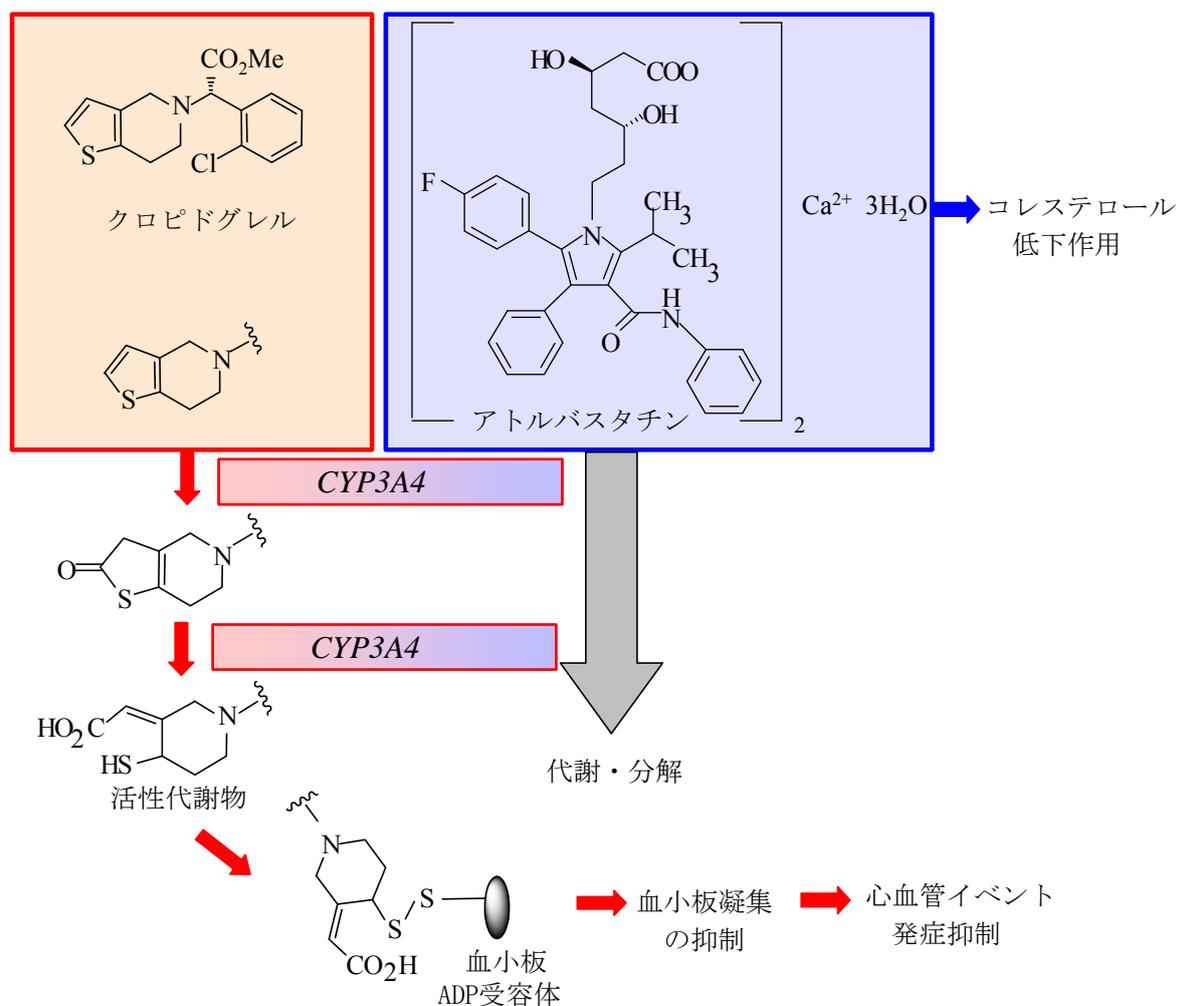


Figure 1-6. クロピドグレルによる薬物相互作用メカニズム

このような治療対象となる患者は、24 時間中心血管イベント発症のリスクを軽減する必要がある事から、本報告例のような薬効の減弱は極めて重大な問題と考えられる。このような背景の下、本論文では心血管イベント発症に対し、副作用面も含め満足した治療薬の創製を目的に、「先行剤の副作用を改善し、心血管イベント発症の危険因子に対し複数の軽減作用を有する単剤」というキーワードを基本とし、Ca 拮抗性の降圧剤ならびに攣縮性狭心症治療薬の新規創製を試みた。

まず、目的に適した Ca 拮抗性降圧剤の創製にあたり、降圧作用以外の危険因子として高脂血症ならびに酸化ストレスに着目した。血中の脂質代謝は、外因性と内因性に

よって制御されており、 $\alpha 1$ 受容体遮断薬はリポ蛋白リパーゼと肝臓 LDL 受容体の活性を増加する事によって、血中の脂質代謝を改善する事が報告されている (Figure 1-7) (22)。

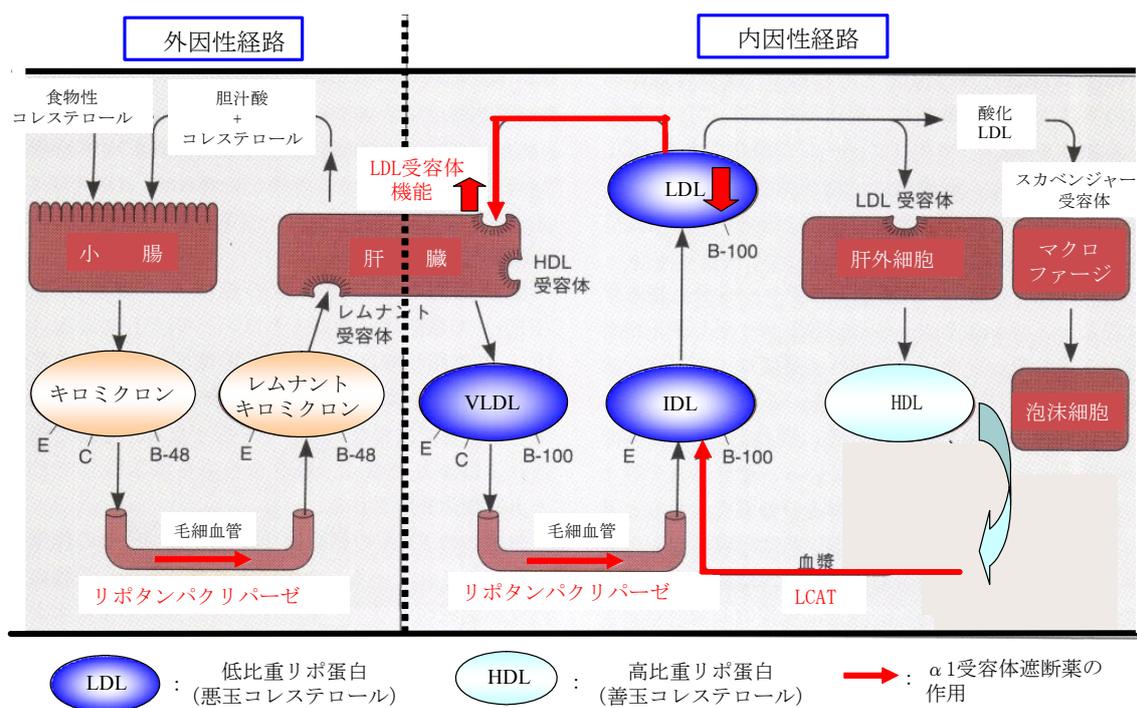


Figure 1-7. 脂質代謝と $\alpha 1$ 受容体遮断作用

そこで、降圧剤において必須である血管拡張作用と脂質代謝制御に関与する $\alpha 1$ 受容体遮断作用を有する cyclohexylaralkylamine を出発点とし、既存の Ca 拮抗薬であるジルチアゼムならびにフルナリジンを参考にした結果、octahydrodibenzo(b, e)thiepin 誘導体の中から、側鎖の methylene 鎖数が 3、piperazine の置換基が 4-fluorophenyl 基を有する N-[(trans(6a-H, 10a-H)-cis(10a-H, 11-H)-6, 6a, 7, 8, 9, 10, 10a, 11-octahydrodibenzo[b, e]thiepin-11-yl)-4-(4-fluorophenyl)-1-piperazinebutanamide]が黒川ら (23-25) によって見出された (Figure 1-8, 9)。本化合物は強い Ca 拮抗作用とともに $\alpha 1$ 受容体遮断作用も有したが、降圧作用の持続性は短かった。

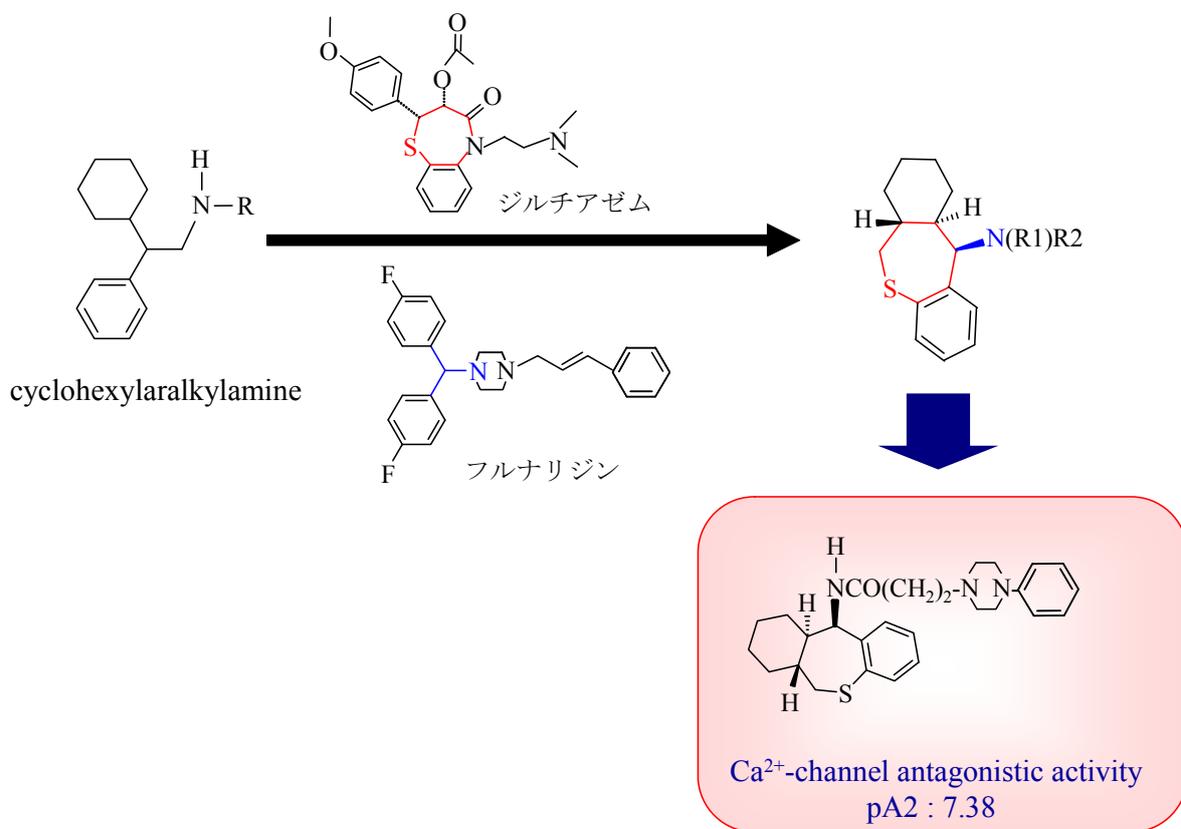


Figure 1-8. 複数の危険因子を軽減する Ca 拮抗性降圧剤の創製-1 (黒川氏博士論文より引用²³⁾)

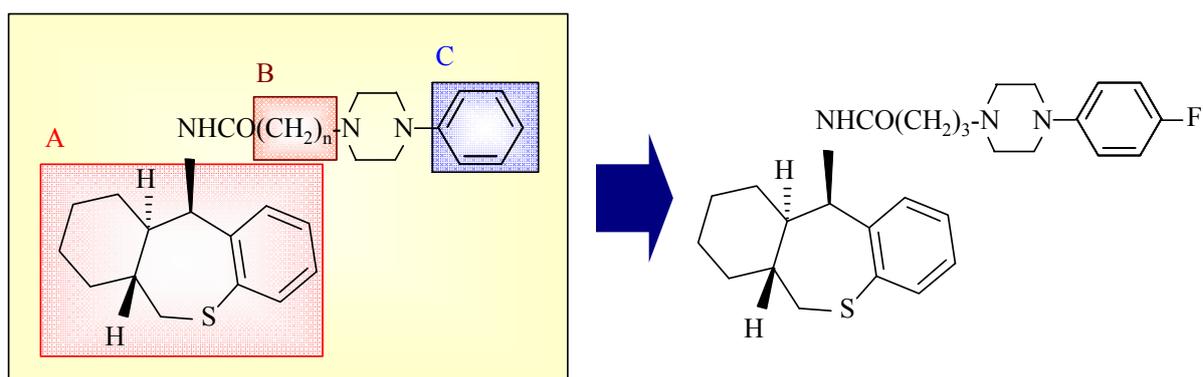
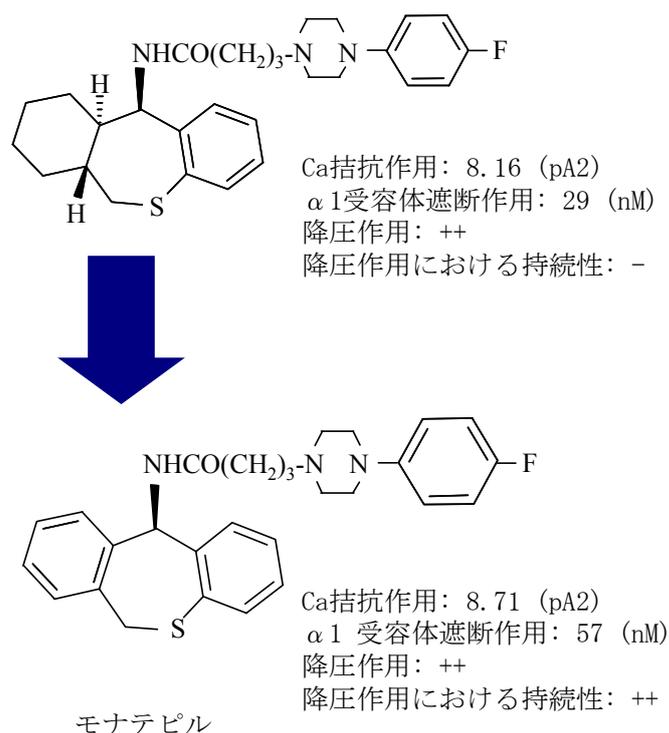


Figure 1-9. 複数の危険因子を軽減する Ca 拮抗性降圧剤の創製-2 (黒川氏博士論文より引用²³⁾)

さらに降圧作用の増強とその持続作用の伸長を目的に、母核の cyclohexane 環を benzenze 環に変換した結果、強く持続的な降圧作用を示すモナテピルが黒川ら (23-25) の努力により見出された (Figure 1-10)。モナテピルは、既存の Ca 拮抗性降圧剤と構造を全く異にしていた。

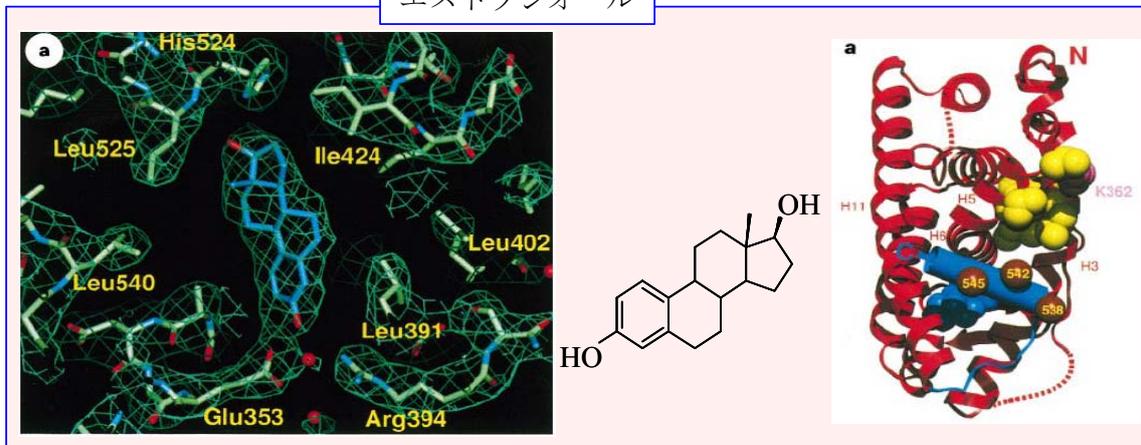


[(±)-N-(6, 11-dihydrodibenzo[b, e]thiepin-11-yl)-4-(4-fluorophenyl)-1-piperazinebutanamide maleate]

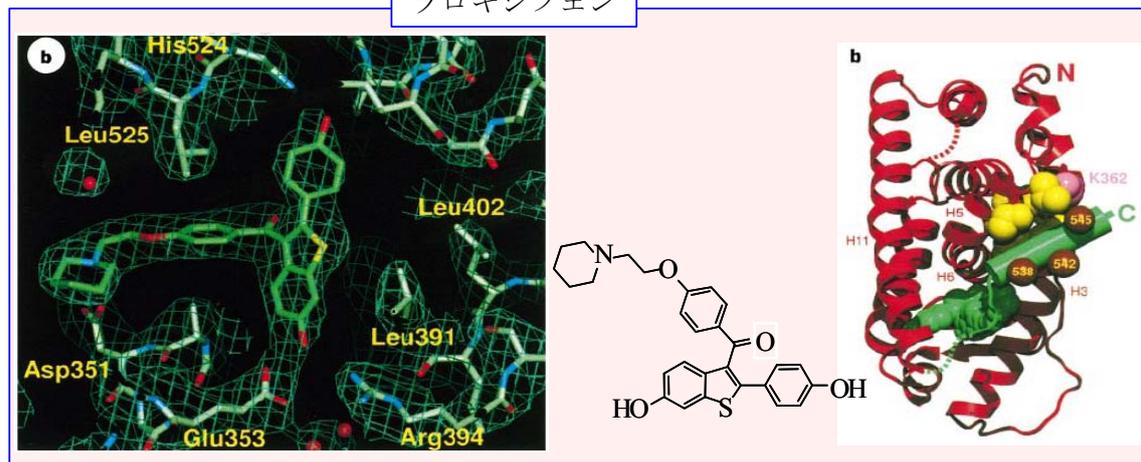
Figure 1-10. 複数の危険因子を軽減する Ca 拮抗性降圧剤の創製-3 (黒川氏博士論文より引用²³⁾)

次に、目的に適した攣縮性狭心症治療薬の創製には、エストロゲン受容体に作用するエストラジオールが本疾患に有効である事より、選択的エストロゲン受容体モジュレータ (SERM) の概念 (26) を基本とした (Figure 1-11)。結果、 17β -エストラジオールならびに Benzestrol を参考に、1, 1'-spirobiindane を有する非ステロイド性の選択的エストロゲン受容体モジュレータである OS-0689 を見出した (Figure 1-12)。

エストラジオール

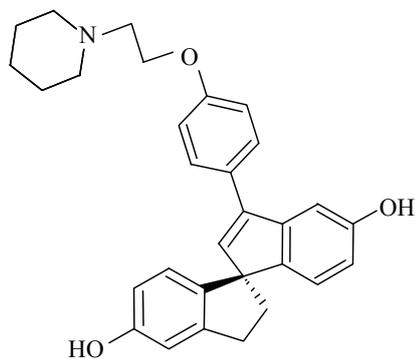


ラロキシフェン



	閉経後の各症状			組織
	血中コレステロール増加	骨粗鬆症	ホットフラッシュ	性ホルモン作用
エストラジオール	低下	改善	改善	刺激
ラロキシフェン	低下	改善	増悪	抑制

Figure 1-11. 選択的エストロゲン受容体作動薬 (SERM) の受容体結合様式と薬理的プロファイル



OS-0544

OS-0689((R)-enantiomer of OS-0544)

(+)-3-[4-(1-piperidionoethoxy)phenyl]spiro [indene-1,1'-indane]-5, 5'-diol hydrochloride

Figure 1-12. OS-0689 の構造式

以上の事から、第2章ではこれまでに未検討であったモナテピルの詳細な薬理作用、つまり先行剤に対する副作用の改善作用ならびに複数の危険因子の軽減作用とそれに伴う抗動脈硬化作用の検証結果を、本抗動脈硬化作用については報告例の少ないヒト類似モデルであるサルを用いた (27-30)。第3章では SERM である OS-0689 の合成展開、複数の危険因子の軽減ならびに血管機能保護作用と弱い性ホルモン作用の検証結果を報告する。また、第4章では、第2ならびに3章の内容を総括し、結語、さらに第5章では、本研究のテーマである「心血管イベントの発症予防に向けた薬剤開発に関する薬理学的研究」の成果からの今後の展開について報告する。

【参考文献】

1. 厚生労働省人口動態統計（平成 18 年度）
2. Ross R., Atherosclerosis-An inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 340, 115-26 (1999)
3. Yasue H., Touyama M., Shimamoto M., Kato H., and Tanaka S., Role of autonomic nervous system in the pathogenesis of Prinzmetal's variant form of angina. *Circulation* 50, 534-539 (1974)
4. Yasue H., Horio Y., Nakamura N., Fujii H., Imoto N., Sonoda R., Kugiyama K., Obata K., Morikami Y., and Kimura T., Induction of coronary artery spasm by acetylcholine in patients with variant angina: possible role of the parasympathetic nervous system in the pathogenesis of coronary artery spasm. *Circulation* 74, 955-963 (1986)
5. Ignarro LJ., Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation Research* 65, 1-21 (1989)
6. Bassenge E., Endothelium-mediated regulation of coronary tone. *Basic Research in Cardiology* 86, 69-76 (1991)
7. Kugiyama K., Murohara T., Yasue H., Kimura T., Sakaino N., Ohgushi M., Sugiyama S., and Okumura K., Increased constrictor response to acetylcholine of the isolated coronary arteries from patients with variant angina. *International Journal of Cardiology* 52, 223-233 (1995)
8. Shimokawa H., Cellular and molecular mechanisms of coronary artery spasm. *Japanese Circulation Journal* 64, 1-12 (2000)
9. Tan B.H., Shimizu H., Hiromoto K., Fukukawa Y., Ohyanagi M., and Iwasaki T., Wavelet transform analysis of heart rate variability to assess the autonomic changes associated with spontaneous coronary spasm of variant angina. *Journal of Electrocardiology* 36, 117-124 (2003)
10. Dahlöf B., Sever P.S., Poulter N.R., Wedel H., Beevers D.G., Caulfield M., Collins R., Kjeldsen S.E., Kristinsson A., McInnes G.T., Mehlsen J., Nieminen M., O'Brien E., Ostergren J.; ASCOT Investigators. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 366, 895-906 (2005)
11. Ibrahim M.M., RAS inhibition in hypertension. *Journal of Human Hypertension* 20, 101-108 (2006)
12. Seibel M. M., Treating hot flushes without hormone replacement therapy. *The Journal of Family Practice* 52, 291-296 (2003)

13. Plouffe L. Jr., Selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 7(1 Suppl), S38-46 (2000)
14. NEW 薬理学 (1989 年)
15. Aoki K., Kondo S., Mochizuki A., Yoshida T., Kato S., Kato K., and Takikawa K., Antihypertensive effect of cardiovascular Ca²⁺-antagonist in hypertensive patients in the absence and presence of beta-adrenergic blockade. *American Heart Journal* 96, 218-226 (1978)
16. Sato M., Murata S., Narita H., Tomita M., Yamashita K., and Yamaguchi I., Hypotensive effects of diltiazem hydrochloride in the normotensive, spontaneously hypertensive and renal hypertensive rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 75, 99-106 (1979)
17. Kawano H., Motoyama T., Hirai N., Kugiyama K., Ogawa H., and Yasue H., Estradiol supplementation suppresses hyperventilation-induced attacks in postmenopausal women with variant angina. *Journal of the American College of Cardiology* 37, 735-740 (2001)
18. Seibel M. M., Treating hot flashes without hormone replacement therapy. *The Journal of Family Practice* 52, 291-296 (2003)
19. Plouffe L. Jr., Selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 7(1 Suppl), S38-46 (2000)
20. 薬事・食品衛生審議会医薬品等安全対策部会, HMG-CoA 還元酵素阻害剤の安全対策資料 (2001 年)
21. Lau W.C., Waskell L.A., Watkins P.B., Neer C.J., Horowitz K., Hopp A.S., Tait A.R., Carville D.G., Guyer K.E., and Bates E.R., Atorvastatin Reduces the Ability of Clopidogrel to Inhibit Platelet Aggregation: A New Drug-Drug Interaction. *Circulation* 107, 32-37 (2003)
22. ギャノン生理学 第 21 版
23. 黒川美貴雄, 新規カルシウム拮抗薬としてのジベンゾチエピン誘導体の合成研究, 博士論文, 京都薬科大学 (1993 年)
24. Kurokawa M., Sato F., Hatano N., Honda Y., and Uno H., A new class of calcium antagonists. Synthesis and biological activity of 11-[(omega-aminoalkanoyl)amino]-6,6a,7,8,9,10,10a,11-octahydrodibenzo [b,e]thiepin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 34, 593-599 (1991)
25. Kurokawa M., Sato F., Fujiwara I., Hatano N., Honda Y., Yoshida T., Naruto S., Matsumoto J., and Uno H., A new class of calcium antagonists. 2. Synthesis and biological activity of 11-[[4-[4-(4-fluorophenyl)-1-piperazinyl]butyryl]amino]-6,11-dihydrodibenzo[b,e]-thiepin maleate and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 34, 927-934 (1991)
26. Brzozowski A.M., Pike A. C., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engström O., Ohman L.,

- Greene G. L., Gustafsson J. A., and Carlquist M., Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758 (1997)
27. Prathap K. Diet-induced aortic atherosclerosis in Malaysian long-tailed monkeys (*Macaca irus*). *The Journal of Pathology* 115, 163-174 (1975)
 28. Malinow M.R., McLaughlin O., Papworth L., Naito H.K., Lewis L., McNulty W.P., A model for therapeutic interventions on established coronary atherosclerosis in a nonhuman primate. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 67, 3-31 (1976)
 29. Williams JK, Anthony MS, Clarkson TB. Coronary heart disease in rhesus monkeys with diet-induced coronary artery atherosclerosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 115, 784-790 (1991)
 30. Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 4, 341-356 (1984)

第2章 複数の危険因子を軽減する Ca 拮抗性降圧剤の薬理特性

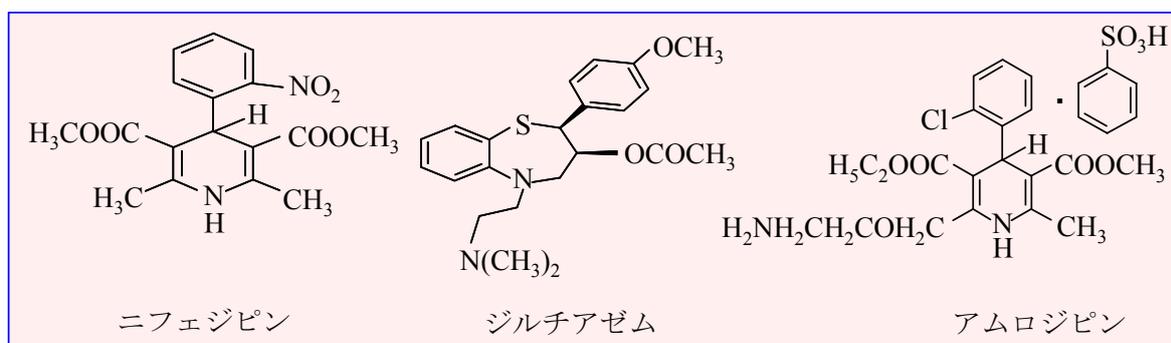
序論

これまでに、心血管イベント発症における危険因子に対し、複数の軽減作用を有し、心拍数変動の少ない Ca 拮抗性の降圧剤は見出されていなかった (Table 2-1)。

Table 2-1. 既存の Ca 拮抗性降圧剤のプロファイル

主作用	副作用	危険因子			
		高脂血症	糖尿病	肥満	酸化ストレス
高血圧	心拍数				
○	顕著な増加	—	—	—	○

○ : 改善、— : 作用なし



そこで、その新規創製を目的に、黒川らは (1-3) 降圧作用以外の危険因子として高脂血症ならびに酸化ストレスに着目した探索合成を開始した。すなわち Figure 2-1 に示したように、降圧剤において必須である血管拡張作用と脂質代謝制御に関与する $\alpha 1$ 受容体遮断作用の両方を弱いながら併せ持つ cyclohexylaralkylamine (4) を出発点とし、既存の Ca 拮抗薬であるジルチアゼムの -CH₂S-bridge ならびにフルナリジンの benzyl を参考にし octahydrodibenzo[b, e]thiepin 環を母核とした。Figure 2-2 に母核と側鎖の最適化の結果を示す。つまり、母核の三環系を基本とし、酸素原子の導入も試みたが、硫黄原子を含む octahydrodibenzo[b, e]thiepin 環が強い Ca 拮抗作用を示した。本母核を基本とし、側鎖の methylene 鎖数が 3、piperazine の置換基が 4-fluorophenyl 基を有する 4-fluorophenyl-1-piperazinebutanamide の側鎖を有する化合物が、強い Ca 拮抗ならびに $\alpha 1$ 受容体遮断作用を有する化合物である事が見出された。しかし、本化合物は主作用である降圧作用の持続性が短かった事から、さらなる最適化を行った。結果 Figure 2-3 に示したように、母核の cyclohexane 環を benzene 環に変換後母核の両端の角度が重要である事が判明した。つまり、両端の benzene 環の角度の大きい化合物 99 は Ca 拮抗

作用が弱い、角度の小さい化合物 96 は非常に強い Ca 拮抗作用を示し、benzene 環の角度と Ca 拮抗作用に一定の関係が得られた。最終的に強い Ca 拮抗ならびに $\alpha 1$ 受容体遮断作用を有し、持続的な降圧作用を示す化合物 93 であるモナテピル[(±)-N-(6, 11-dihydrodibenzo[b, e]thiepin-11-yl)-4-(4-fluorophenyl)-1-piperazinebutanamide maleate]が見出された。

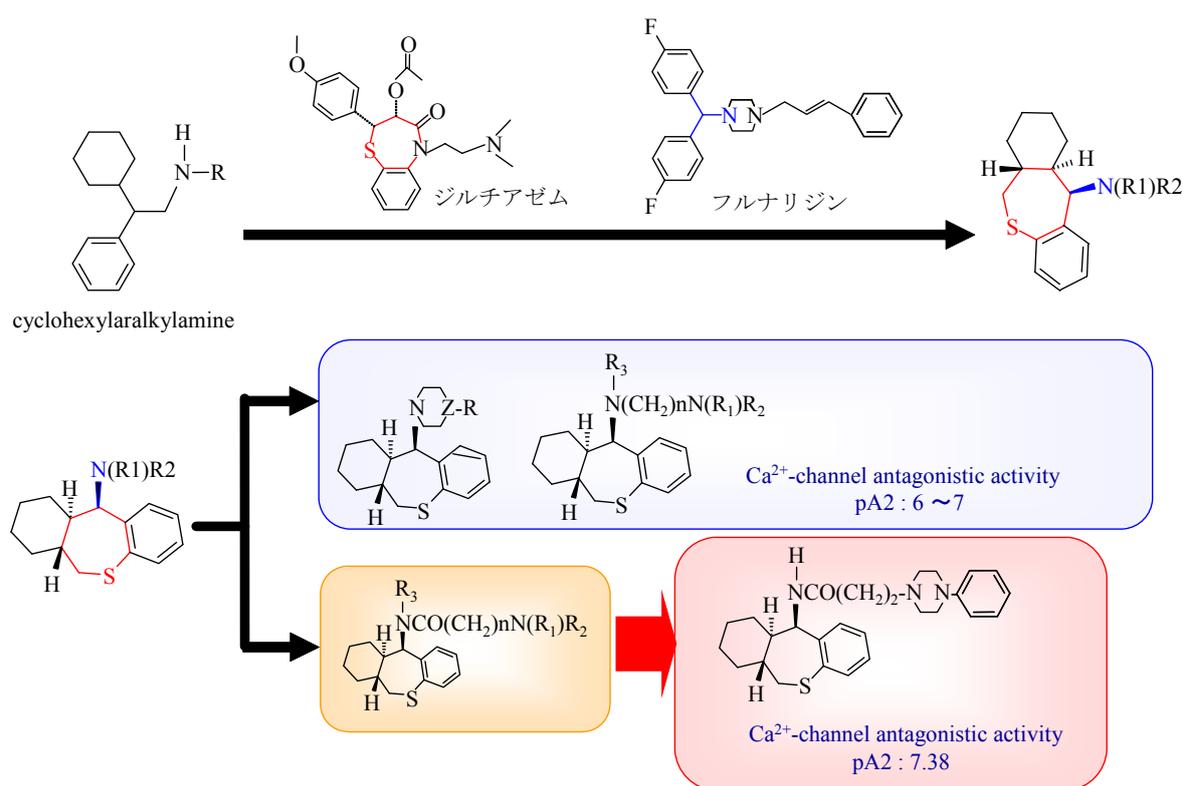


Figure 2-1. 複数の危険因子を軽減する Ca 拮抗性降圧剤の創製-1 (黒川氏博士論文より引用¹⁾)

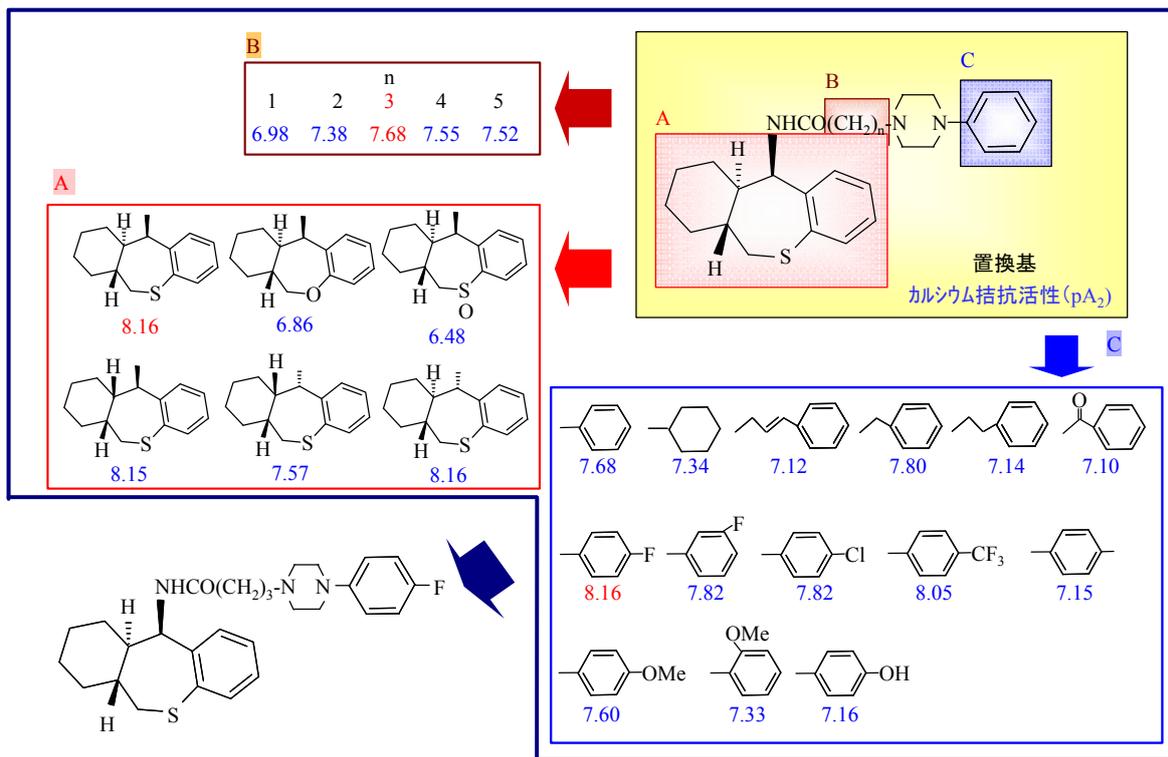


Figure 2-2. 複数の危険因子を軽減する Ca 拮抗性降圧剤の創製-2 (黒川氏博士論文より引用¹⁾)

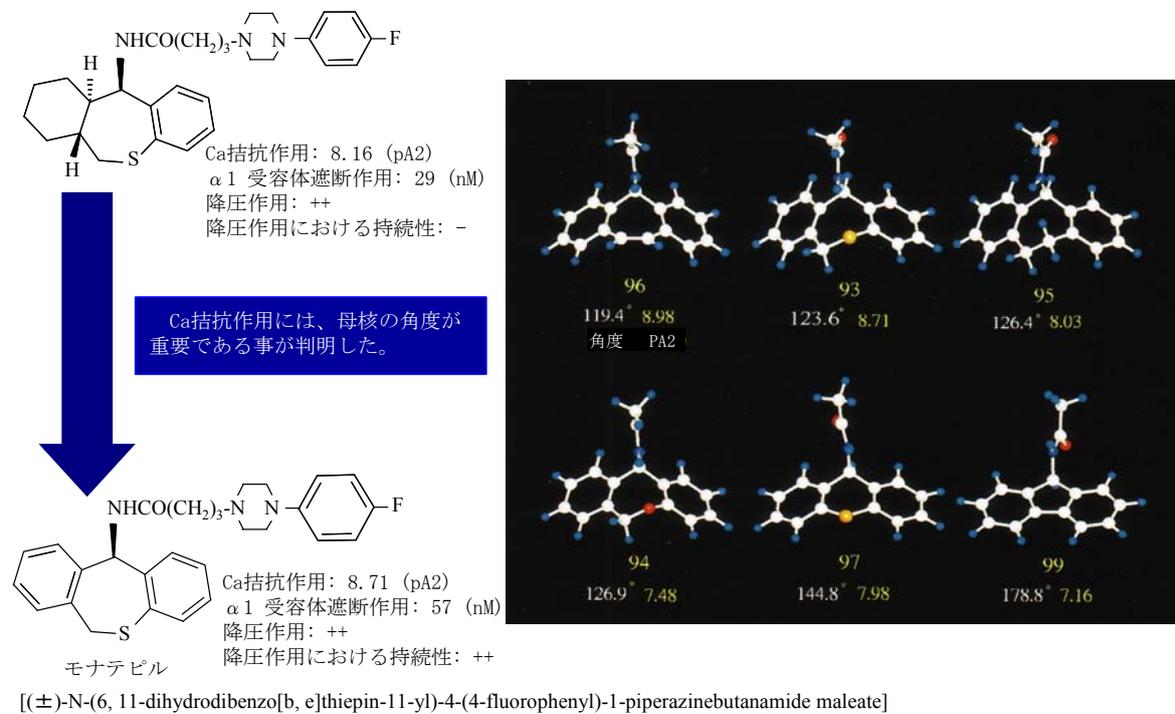


Figure 2-3. 複数の危険因子を軽減する Ca 拮抗性降圧剤の創製-3 (黒川氏博士論文より引用¹⁾)

本研究では、黒川ら（1-3）によって見出されたモナテピルの詳細な薬理作用を調べた。つまり、モナテピルが、先行剤の副作用に対し改善作用を有する事ならびに心血管イベント発症における危険因子に対し、複数の軽減作用を有し、それに伴う抗動脈硬化作用も有する Ca 拮抗性の降圧剤であることを示した薬理的検証結果を調べた。

第1節 高血圧モデルにおける降圧ならびに心拍数変動作用

第1項 実験方法

1-1) 高血圧動物の作製

1-1-1) 高血圧自然発症ラット (以下 SHR と省略)

雄性 SHR は、旧大日本製薬 (株) の研究所にて繁殖した動物を用いた。生後 16-24 週令の SHR で、収縮期血圧が 180mmHg 以上に達した動物を実験に使用した。実験期間中、飼料としてラット用標準飼料 (CE2、クレア) を、飲料水として水道水を自由に与えた。

1-1-2) 腎性高血圧イヌ (以下 RHDog と省略)

0.5%ハロタンを含む酸素と亜酸化窒素の 1:1 混合ガスの吸入麻酔下で、ビーグルイヌ両側腎動脈を、銀製クリップにて狭窄した。クリップの狭窄は腎動脈の外径の約 1/3 に設定した (5-6)。狭窄手術 3~4 ヶ月後、収縮期血圧が 150mmHg 以上の動物を実験に使用した。実験期間中、飼料としてイヌ用標準飼料 (CD1、クレア) を、飲料水として水道水を自由に与えた。

1-2) 血圧測定法

1-2-1) 直接法における血圧ならびに心拍数の測定

SHR においては、エーテル麻酔下で Weeks と Jones の方法 (7) に準じ、ヘパリン (100U/ml) を充填したポリエチレンカテーテル (SP-31、夏目、東京) を左腸骨動脈へ挿入し、他端を背側皮下へ通して背側頸部へ導出した。背側頸部へ導出した動脈カテーテルを、圧トランスデューサー (MP-4T、日本光電) に接続した。更に圧トランスデューサーの信号をアンプ (AP621G、日本光電) を介し、コンピュータに取り込み、血圧測定解析ソフト (フラクレット、大日本住友製薬) を用い算出した (8)。

RHDog においては、0.5%ハロタンを含む酸素と亜酸化窒素の 1:1 混合ガスの吸入麻酔下で右総頸動脈に、動脈カニューレ (シリコン製チューブ) を挿入し、他端を頸背部に露出・固定した。カニューレ内の血液凝固を防止するために、ヘパリンを含む生理食塩水にて隔日にフラッシュした。血圧測定時には頸背部に露出したカニューレの先端を圧トランスデューサー (MP-45T 型、日本光電) に接続し、SHR と同様直接法にて収縮期血圧および拡張期血圧を無麻酔下で測定し、平均血圧を常法の次式より算出した。

$$\text{平均血圧} = \text{拡張期血圧} + (\text{収縮期血圧} - \text{拡張期血圧}) / 3$$

1-2-2) 間接法における血圧ならびに心拍数の測定

間接法においては、前腕にカフを巻きつけデジタル血圧計（日本光電、BP-203NP）を用い無麻酔半拘束下で行った。心拍数は、標準第Ⅱ誘導から心電計（ECG-5201、日本光電）を用いて計測した。

1-3) 薬物の調整

モナテピルは旧大日本製薬株式会社、総合研究所にて合成した。対照薬は、ヘルベッサー錠（ジルチアゼム、田辺三菱製薬）ならびにアダラートカプセル（ニフェジピン、バイエル薬品）から抽出した。経口投与においては、0.5%トラガント液にて懸濁し、経口投与針（SHR）あるいは経口ゾンテ（RHDog）を用いて体重 1kg あたりそれぞれ 3.0ml（SHR）あるいは 2.0ml（RHDog）の用量を胃内に強制投与した。

1-4) 実験結果の検定

実験結果は、各パラメータの投与前値に対する変化の平均値±標準誤差にて表示した。単回ならびに反復投与実験において、vehicle（溶媒投与）群と薬物投与群の間の有意差を LSD 法にて検定した。P 値が、0.05 以下の場合に統計上有意と判定した。

第2項 実験結果

2-1) SHR

2-1-1) 単回経口投与

SHR に単回経口投与すると、Figure 2-4 に示すように、モナテピル (10-100mg/kg) は発現が緩徐で用量依存的な降圧作用を示した。その作用の最大効果は投与後 5 時間以降に認められ、持続的な作用であった。一方、既存の Ca 拮抗薬であるニフェジピンならびにジルチアゼムは、用量依存的な降圧作用を示したが、その作用は発現が急峻で持続も短かった。心拍数においては、モナテピルは投与直後わずかな増加 (40 beats/min) 作用を示したが、既存の Ca 拮抗薬であるニフェジピンは著しい増加 (100 beats/min) 作用を示した。

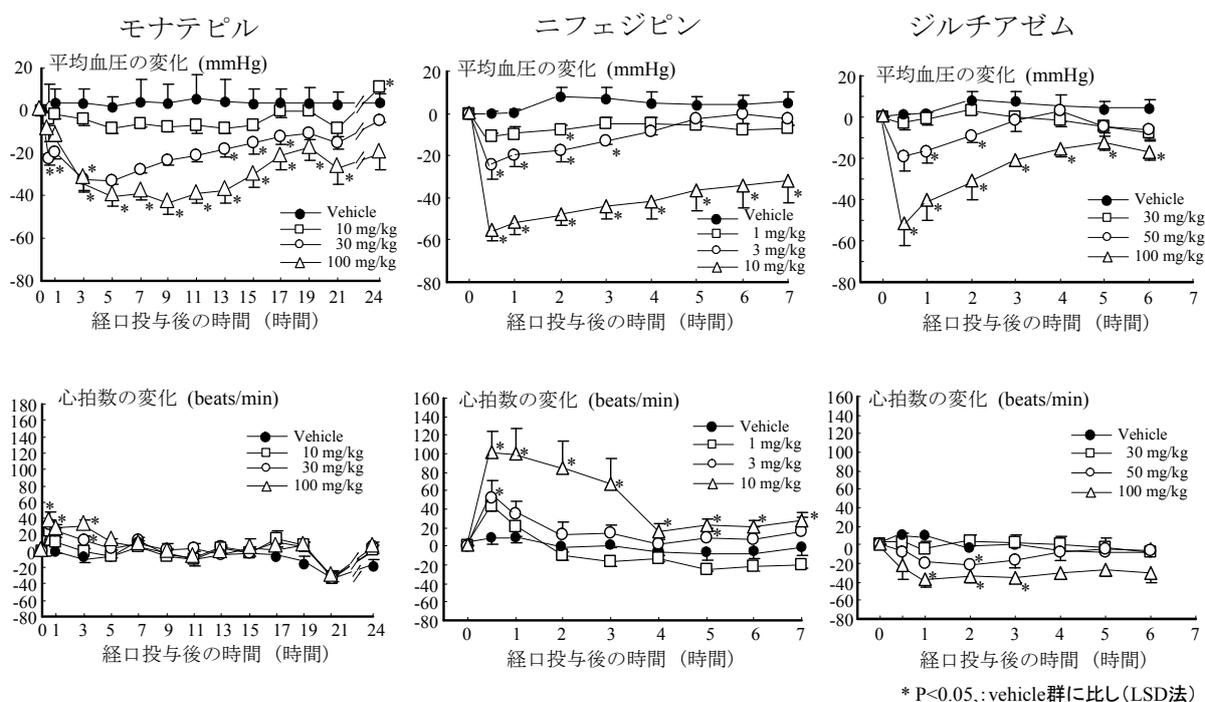


Figure 2-4. SHR における単回投与後の降圧作用

2-2) RHDog

2-2-1) 単回経口投与

RHDog に単回経口投与すると、Figure 2-5 に示すようにモナテピルは、緩徐で用量依存的な降圧作用を示し、その最大効果は投与 3-7 時間後に認められた。一方、既存の Ca 拮抗薬であるニフェジピンならびにジルチアゼムは用量依存的な降圧作用を示したが、その最大効果は投与 1 時間以内に認められ、急峻かつ短い持続性であった。心拍数においては、モナテピルは顕著な作用を示さなかった。一方、既存の Ca 拮抗薬は急峻な降圧作用に対応した顕著な心拍数増加作用を示した。

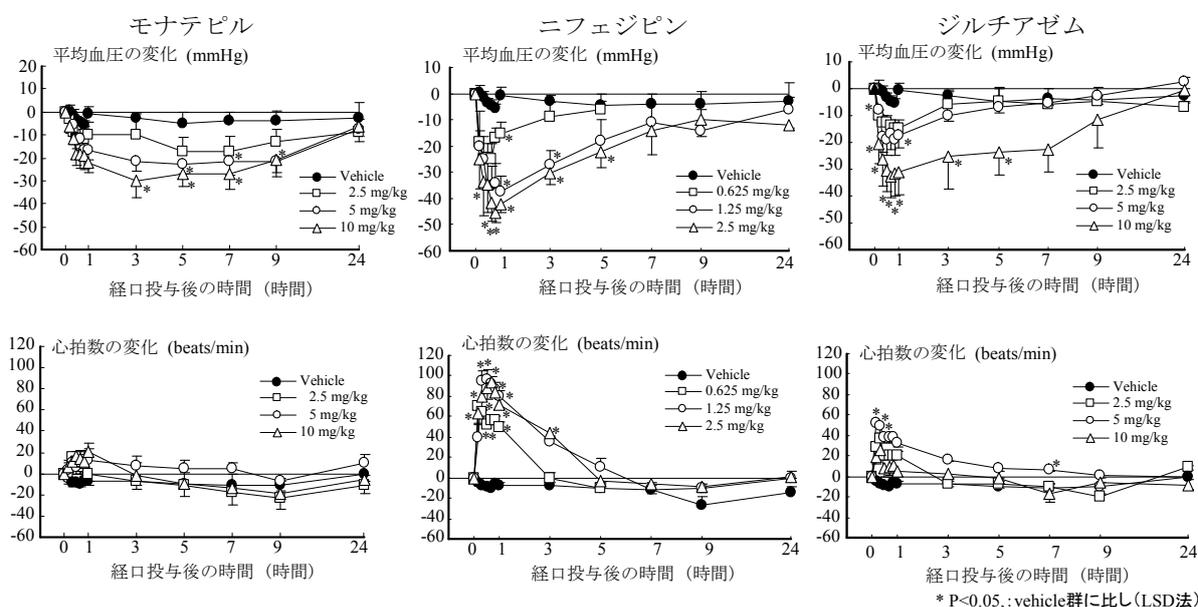


Figure 2-5. RHDog における単回投与後の降圧作用

2-2-2) 最大降圧作用と心拍数変動の比較

RHDog のモナテピルと既存の Ca 拮抗薬の降圧作用と心拍数変動作用を比較したところ、同程度の降圧作用時におけるモナテピルの心拍数変動作用は、ジルチアゼムならびにニフェジピンに比較し明らかに弱い事が示された (Figure 2-6)。

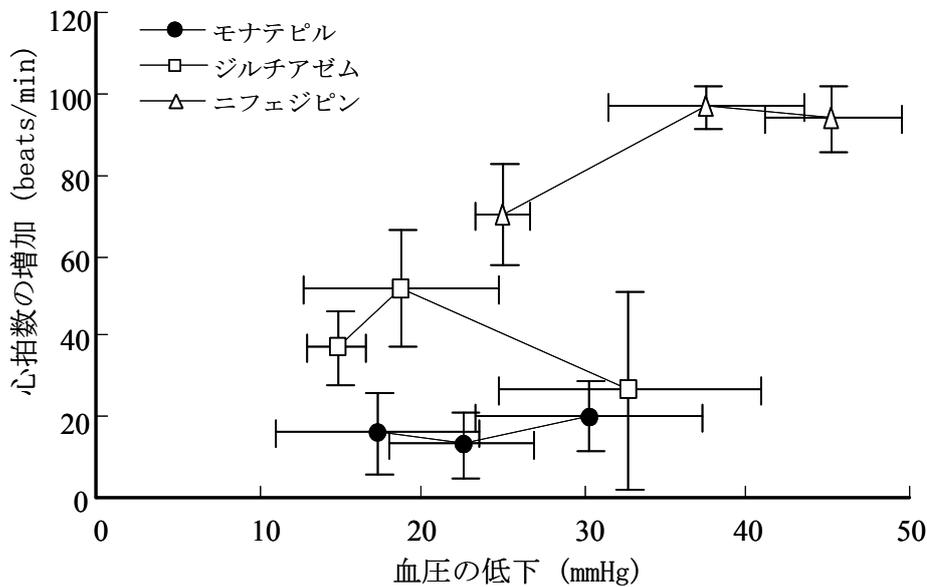


Figure 2-6. RHDog における降圧作用と心拍数増加の関係

2-2-3) 反復経口投与

RHDog に 1 日 1 回 29 日間モナテピルを 10mg/kg 反復経口投与すると、Figure 2-7 に示すように、投与 4 日目より投与前値（前日投与の 24 時間値）ならびに投与後 1 および 5 時間の血圧を有意に低下させ、以後 29 日間安定した血圧低下を示した。また低下した血圧は、投与中止（最終投与終了）6 日後に投与前値まで回復し、リバウンド現象も示さなかった。心拍数においては、投与期間中顕著な変動を示さなかった。

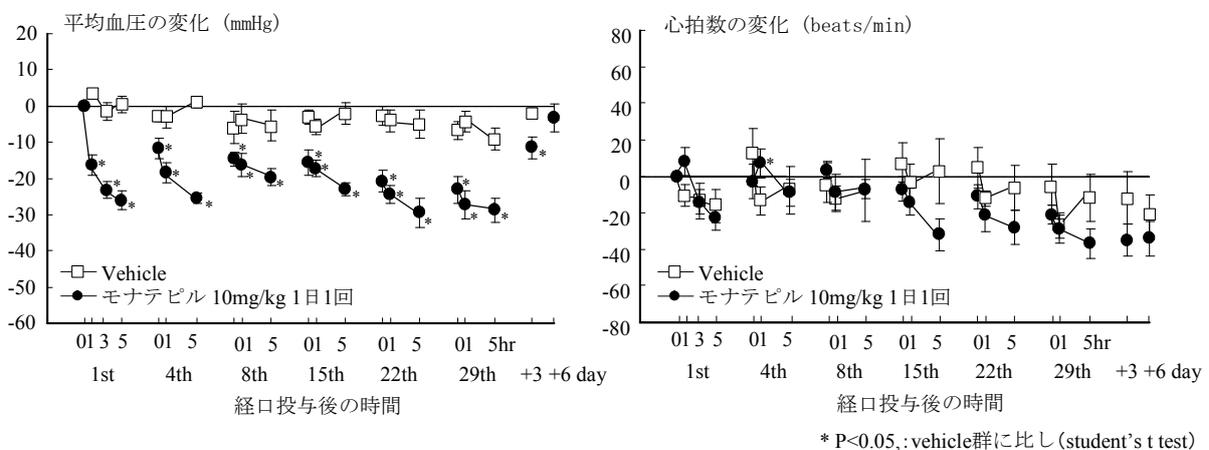


Figure 2-7. RHDog における反復投与後の降圧作用

第3項 考察

種々の高血圧動物でヒトでの有効性を予測するにふさわしい SHR および RHDog において、モナテピルは単回ならびに連続経口投与により既存の Ca 拮抗薬に比し顕著な心拍数の変動も少なく緩徐で持続的ならびに日内変動の少ない安定した降圧作用を示した。このようなモナテピルの心拍数の変動が小さく、緩徐で持続的な降圧作用はなぜ生じたのかを以下に考察した。他の持続型 Ca 拮抗薬である Lacidipine は脂質膜に存在しやすく、また持続的に結合部位に活性体を供給すると報告されている (9)。これらの情報をもとにモナテピルの血管収縮抑制作用と反応時間との関係を *in vitro* で検討したところ、モナテピルの血管収縮抑制作用は反応時間依存性であり、反応液洗浄後も持続する事が報告された (10)。また、モナテピルは物性面においても $pK_a : 6.7$ 、生理的条件下で非解離が 83% 存在ならびに脂溶性の性質である (11) とともに、モナテピル投与後の最大血中濃度は投与 3 時間後に認められ、以後半減期 5.2 時間で消失する持続的なパターンである (12) 事が報告されている。さらに、モナテピルの母核がベンゼン環を有する事より、Ca チャネルに対するスタッキング作用 (13, 14) も推察される。以上の事より、モナテピルは緩徐で持続的な降圧作用を示したと考えられる。

一方、生体は急峻な血圧低下に対し、圧受容体を介し反射性交感神経増加にともなう心拍数増加で対応することが報告されている (15)。既存の Ca 拮抗薬は、最大降圧作用を投与 1 時間以内に示すという急峻な降圧作用を示した事より、顕著な反射性の心拍数増加作用を示したと考えられる。事実、既存の Ca 拮抗薬における心拍数増加作用は、交感神経抑制剤で抑制される (16) 事が報告されている。一部、ジルチアゼムは SHR において心拍数の減少を示した。これはジルチアゼムの心臓特異的な作用が発現したためと考えられる。しかし、モナテピルは最大降圧作用を投与 3 時間以降に示す緩徐な降圧作用を示したことより、顕著な心拍数増加作用を示さなかったと考えられた。また、心拍数の低下作用も示さなかった事から、血管特異的に作用したと考えられる。

第4項 小括

各種高血圧モデルである SHR ならびに RHDog を用いてモナテピルの降圧作用を検証したところ、以下の結果が得られた。

- ①モナテピルの降圧作用は、緩徐に発現し、その最大効果は投与後 3 時間以降に認められたのに対し、既存の Ca 拮抗薬の降圧作用は急峻に発現し、その最大効果は 1 時間以内に認められた。降圧作用の持続時間においても明らかな違いが単回経口投与時に認められ、モナテピルの降圧作用の持続性は 1 日 1 回の反復経口投与試験でも反映され、日内変動の小さい安定した降圧作用が認められた。
- ②モナテピルの心拍数変動作用は、既存の Ca 拮抗薬に比し明らかに小さかったことから、先行剤の副作用に対し改善作用を有する事がわかった。

第2節 高脂血症モデルにおける脂質代謝改善作用

第1項 実験方法

1-1) 高脂血症ウサギならびにサルにおける血中脂質に対する試験

1-1-1) 高コレステロール食負荷高脂血症ウサギ

Naito ら (17) の方法に準じ、生後 10 週令の雄性日本白色ウサギに 1%コレステロールと 6%ココナツオイルを含む高コレステロール食を 2-3 週間与え、異常行動ならびに残餌を示さなかった動物の中から血漿中コレステロール値が 1000mg/dl 以上を示したウサギを実験に使用した。0.5%トラガント水溶液にモナテピルならびにプラゾシンを懸濁し、それぞれ 30mg/kg 1 日 1 回ならびに 3mg/kg 1 日 2 回を 9 週間連続強制経口投与した。薬剤投与後に、高コレステロール食を給餌した。実験期間中、飼料として上記の高コレステロール食および飲料水として水道水を自由に与えた。

1-1-2) ホモ渡辺高脂血症 (WHHL) ウサギ

生後 10 週令の雄性 WHHL ウサギにウサギ用標準飼料 (RC4、オリエンタル酵母) を 2 週間与え、異常行動を示さなかった動物を実験に使用した。0.5%トラガント水溶液ならびにモナテピル (30mg/kg 1 日 1 回) をそれぞれ 6 ヶ月間連続強制経口投与した。

1-1-3) 高コレステロール食負荷高脂血症サル

行動ならびに血液生化学的項目において、異常を示さない雌雄日本ザル (4~7kg、4~7 才) を実験に使用した。実験期間中、通常サル飼料 (PS biscuit、オリエンタル酵母) あるいはそれにコレステロールならびにコーンオイルを負荷した高コレステロール食 (最終含量: コレステロール 2%、コーンオイル 6%) を 6 ヶ月間給餌 (150g/日) した。0.5%トラガント水溶液にモナテピルならびにプラゾシンを懸濁し、それぞれ 30mg/kg 1 日 1 回ならびに 2mg/kg 1 日 2 回を 6 ヶ月間連続強制経鼻投与した。飲料水として、水道水を自由に与えた。

1-1-4) 血中脂質の測定

血漿中の脂質代謝を測定するために、薬物投与前および投与後に耳介動脈 (ウサギ試験) あるいは上腕静脈 (サル試験) よりヘパリン入り注射筒にて血液を採取し、遠心分離後血漿を得た。血漿中のコレステロール含量は、コレステロールオキシダーゼとパラクロロフェノール法 (18) で測定した。高密度リポ蛋白コレステロール (HDL-C) とベータリポ蛋白 (β -LP) は、それぞれヘパリン・マンガン沈殿法 (19) ならびにヘパリン沈殿法 (20) にて測定した。低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) はヘパリン・カルシウム法 (21) にて測定した。

1-2) 高脂血症ウサギの肝臓におけるコレステロール異化排泄に対する作用

1-2-1) $[1\alpha, 2\alpha(n)\text{-}^3\text{H}]$ -コレステロール含有 LDL の調製

Schwarz らの方法 (22) を参考に調製した。つまり、無処置の高コレステロール食負荷ウサギの血液から超遠心法にて LDL 分画 ($1.019 < d < 1.063$) を分取し、フィルター ($0.22\mu\text{m}$, Flow Laboratories) 処置後、 0.15M NaCl と 0.3mM EDTA (pH 7.4) 含有バッファー溶液にて透析した。次に、LDL 中に $[1\alpha, 2\alpha(n)\text{-}^3\text{H}]$ -コレステロールを取り込む目的に、透析後の LDL 分画 (15mg 蛋白含有 3ml) と $[1\alpha, 2\alpha(n)\text{-}^3\text{H}]$ -コレステロールを含むワットマンフィルター紙 (No.1, Whatman) と 4°C 、48 時間インキュベーション処理をした。その後、再びフィルター処理後 0.15M NaCl と 0.3mM EDTA (pH 7.4) 含有バッファーにて再透析し、 $[1\alpha, 2\alpha(n)\text{-}^3\text{H}]$ -コレステロール含有 LDL ($6.27\mu\text{Ci}/\text{mg protein}$) とした。蛋白含量は、Lowry らの方法 (23) に準じて測定した。

1-2-2) 総頸動脈ならびに胆管カニューレ留置高コレステロール食負荷ウサギの作製

ソムノペンチル (Pitman Moore, Muncleleln, IL, USA) 麻酔下でモナテピルならびに 0.5%トラガントを 9 週間連続経口投与した高コレステロール食負荷ウサギ各 7 羽の総頸動脈ならびに胆管にポリエチレンカニューレを留置した。総頸動脈カニューレ (Hibiki, No.5 ; Kunii, Tokyo) の他端は皮下を通し頸背部に固定した。胆管カニューレ (SP ; 夏目, 東京) の他端は皮下から頸背部を通し、再び胆管小腸結合部であるオッジ括約筋に留置した。次の日、頸背部分の胆管カニューレを切断し、胆汁流量を確認後、新しいカニューレに接続し、1 時間の安定後異化排泄実験に使用した。

1-2-3) 肝臓におけるコレステロール異化排泄実験

1-2-2) で作製した総頸動脈ならびに胆管カニューレを留置した高コレステロール食負荷ウサギに、0.5%トラガントならびにモナテピル投与後、耳介静脈より $[1\alpha, 2\alpha(n)\text{-}^3\text{H}]$ -コレステロール含有 LDL ($4.5\mu\text{Ci}/\text{kg}$) を静脈内投与した。 $[1\alpha, 2\alpha(n)\text{-}^3\text{H}]$ -コレステロール含有 LDL 投与後、経時的に総頸動脈ならびに胆管カニューレよりそれぞれ血液ならびに胆汁を採取した。LDL 血中クリアランスの指標である血中放射活性は、採取した血漿 (50 あるいは $100\mu\text{L}$) を減圧乾固し残渣に蒸留水 (0.5ml) と液体シンチレーションカクテル 15ml (ACS II) を混ぜ液体シンチレーション測定器にて測定した。胆汁中の中性ステロールと胆汁酸は、Imai らの方法 (24) を参考に行った。つまり、1ml の胆汁と 5ml のエタノールを 100°C 、5 分間加熱し氷中冷却後フィルター ($0.22\mu\text{m}$, Flow Laboratories) 処理した。そのろ液を窒素ガスにて乾固後、1ml の蒸留水に再溶解した。その溶液を Extrelut カラム (E, Merck, Darmstadt, Germany) に注入し、10 分後 6ml のジエチルエーテル/石油エーテル (1:1, v/v) にて中性ステロールを溶出した。次にメタノール 6ml を 3 回注入し、胆汁酸を溶出した。溶出した中性ステロ-

ルは、窒素ガスにて乾固後液体シンチレーションカクテル (ACS II) を用いて液体シンチレーション測定器にて測定した。溶出した胆汁酸は、窒素ガスにて乾固後、オートクレーブ内で 3ml の 1.25N-NaOH を用いて 120°C、10 時間にて加水分解し、4N-HCl にて酸性化 (pH 1) 後 4ml の酢酸エチルにて抽出した。次にその抽出液を窒素ガスにて乾固後、1ml のメタノールで再溶解後、一定量を液体シンチレーションカクテル (ACS II) と混ぜ液体シンチレーション測定器にて測定した。さらに、残りのメタノール再溶解液の一定量を薄層クロマトグラフィー (Silica Gel 60 Plate, E. Merck) に塗布し、イソオクタン/酢酸エチル/酢酸 (10:10:2, v/v) で展開後 10% molybdophosphoric acid thanol 溶液をスプレーし、コール酸部分 (コール酸とデオキシコール酸) とケノデオキシコール酸 (ヒドロキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、リトコール酸) ならびにその他の部分のシリカゲルをかきとり、1 ml のメタノールと液体シンチレーションカクテル (ACS II) と混ぜ液体シンチレーション測定器にて測定した。尚、各胆汁酸を同定するため、各胆汁酸標準物質も同時に展開した。

1-3) 高コレステロール食負荷サルにおけるフェニレフリン昇圧反応の検討

高コレステロール食負荷サル試験において、ケタミン麻酔下 (ケタラル、第一三共) において、下肢動脈にサーフローカテーテル (テルモ、東京) を挿入し、トランスデューサー (MP-4T、日本光電) ならびにタコメータ (AT601G、日本光電) を介し、血圧ならびに心拍数を測定した。フェニレフリンは、上腕静脈内に投与した。

1-4) 薬物の調製

モナテピルは、第1節、1-3) に準じて用意した。プラゾシンは、ファイザー製薬から購入し使用した。経口ならびに経鼻投与においては、0.5%トラガント溶液に懸濁し、経口ゾンテを用いて体重 1kg あたり 1ml の用量を胃内に強制投与した。

1-5) 実験結果の検定

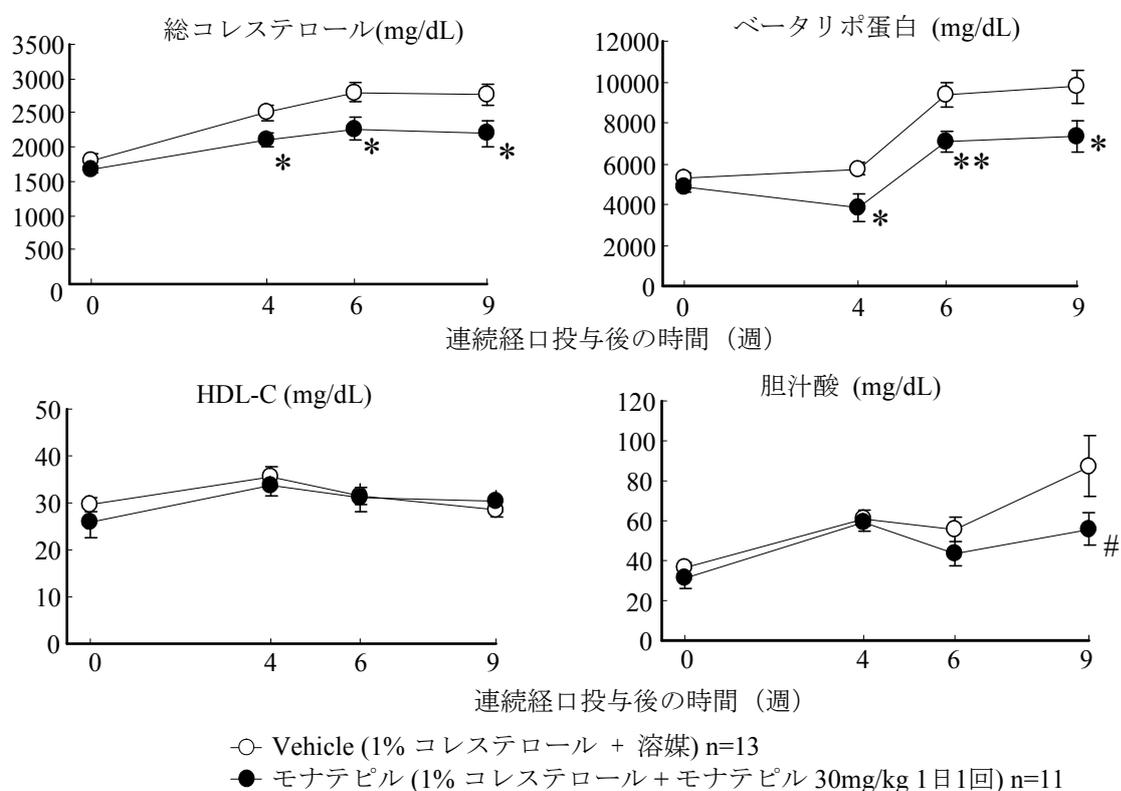
実験結果は、各パラメータの平均値±標準誤差にて表示した。検定は、vehicle (溶媒投与) 群と薬物投与群の間で student-*t* 検定あるいは LSD 法にて検定した。P 値が、0.05 以下の場合に統計上有意と判定した

第2項 実験結果

2-1) 高脂血症ウサギならびにサルにおける血中脂質に対する作用

2-1-1) 高コレステロール食負荷ウサギ

高コレステロール食負荷高脂血症ウサギにモナテピルを9週間連続経口投与すると、Figure 2-8 に示すように投与4週間後より有意な血漿中総コレステロールならびに β -LP低下作用を示した。しかし、モナテピルはHDL-Cに対し著明な変化を示さなかった。一方、プラゾシンは投与2週後に血漿中総コレステロールの低下作用を示したが、投与期間中有意な低下作用を示さなかった (Figure 2-9)。



P<0.10, * P<0.05, ** P<0.01: vehicle群に比し (student's t test)

Figure 2-8. 高コレステロール食負荷ウサギにおけるモナテピルの血中脂質代謝に対する作用

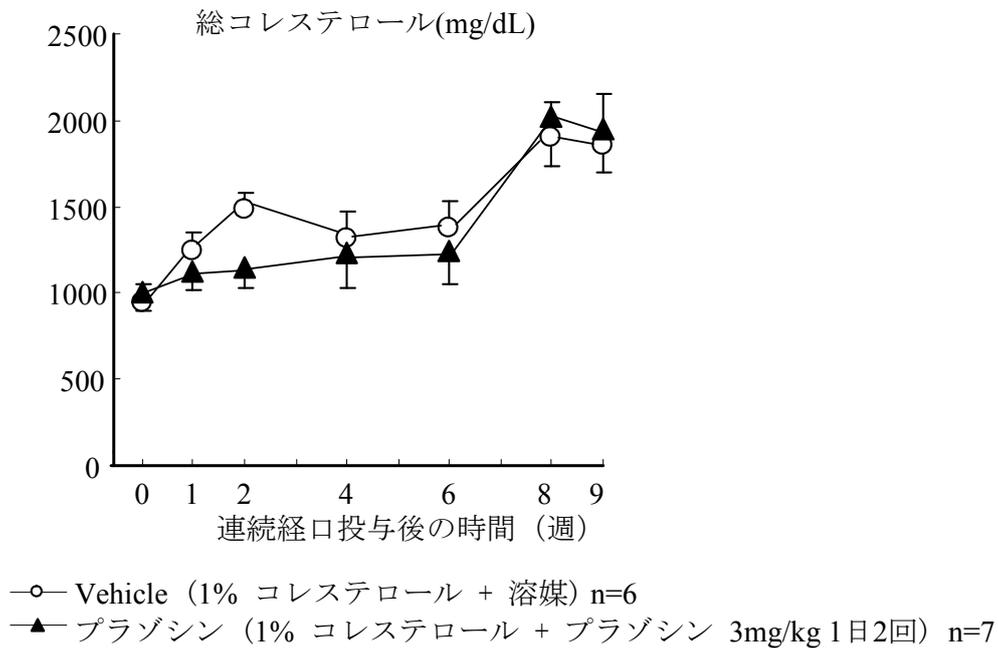


Figure 2-9. 高コレステロール食負荷ウサギにおける $\alpha 1$ 受容体遮断剤であるプラゾシンの血中コレステロールに対する作用

2-1-2) WHHL ウサギ

WHHL ウサギにモナテピルを 30mg/kg 1日1回6ヵ月間連続経口投与したが、Figure 2-10 に示すように有意な総コレステロールの低下作用を示さなかった。

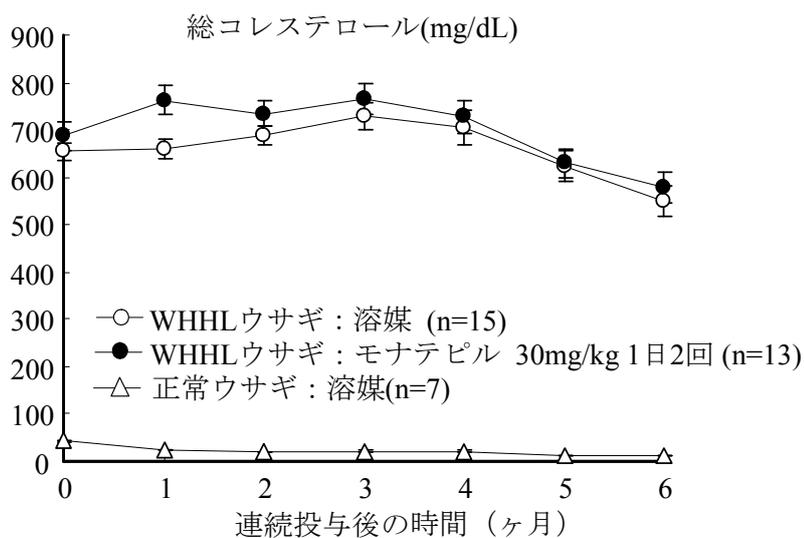


Figure 2-10. WHHL ウサギにおけるモナテピルの血中コレステロールに対する作用

2-1-3) 高コレステロール食負荷サル

Figure 2-11 に示すように、サルに高コレステロール食を負荷する事により、血中 TC ならびに LDL の著明な増加および HDL-C の低下が認められた。モナテピルは、投与期間中持続的に有意な血中 LDL の低下ならびに HDL-C の増加作用を示した。また、プラゾシンも投与 1、4 ならびに 5 ヶ月目に血中 LDL の有意な低下作用あるいは低下傾向を示した。

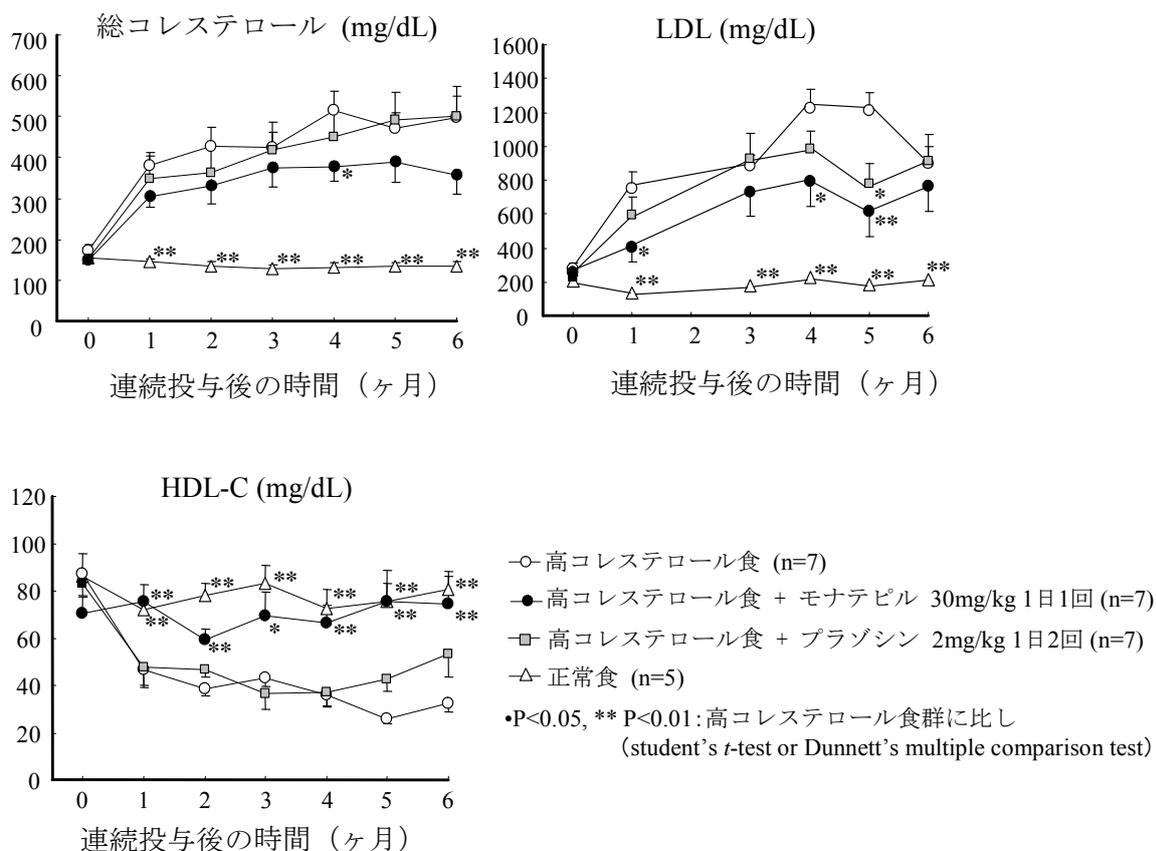
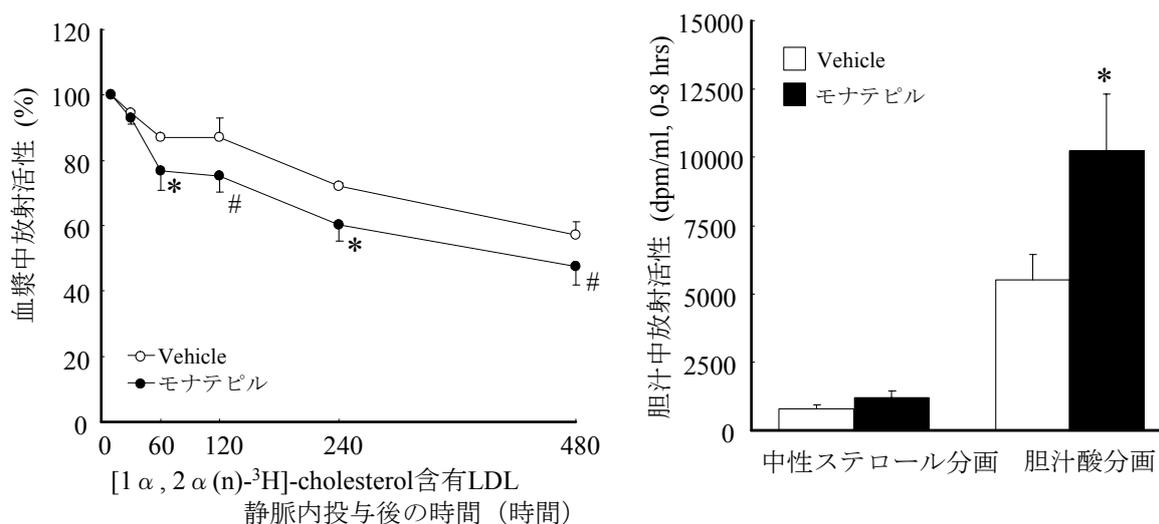


Figure 2-11. 高コレステロール食負荷サルにおけるモナテピルの血中脂質代謝に対する作用

2-2) 高脂血症ウサギの肝臓におけるコレステロール異化排泄に対する作用

モナテピルを9週間連続経口投与した高コレステロール食負荷高脂血症ウサギに、 $[1\alpha, 2\alpha(n)^3\text{H}]$ -コレステロール含有LDLを静脈内投与すると、Figure 2-12に示すように著明な血中放射活性の低下ならびに胆汁中胆汁酸分画における放射活性の増加が認められた。しかし、Table 2-2に示すように胆汁酸組成の変化は認められなかった。



P<0.10, * P<0.05: vehicle群に比し (student's t-test)

Figure 2-12. モナテピル処置高コレステロール食負荷ウサギにおける $[1\alpha, 2\alpha(n)^3\text{H}]$ -コレステロール含有LDL静脈内投与後の血中ならびに胆汁中放射活性

Table 2-2. モナテピル処置高コレステロール食負荷ウサギにおける $[1\alpha, 2\alpha(n)^3\text{H}]$ -コレステロール含有LDL静脈内投与後の胆汁中胆汁酸分画の放射活性

時間 (時間)	群	各胆汁酸分画中における放射活性			
		原点	コール酸分画	ケノデオキシコール酸分画	その他
0-8	Vehicle	23.2±7.0	35.6±7.0	16.8±2.2	24.4±3.2
	モノテピル	17.4±3.0	37.3±2.2	18.6±0.8	26.7±3.3

2-3) 高コレステロール食負荷サルにおけるフェニレフリン昇圧反応

高コレステロール食負荷サルにおけるモナテピルならびにプラゾシン投与5ヶ月後の5時間において、麻酔下でフェニレフリンの昇圧反応を検討したところ、vehicle群に比し、モノテピルならびにプラゾシンは、それぞれ39.4%ならびに55.5%抑制した。

第3項 考察

モナテピルの心血管イベント発症における複数の危険因子軽減作用の1つとして α 1受容体遮断作用に伴う血中脂質低下作用を3種の高脂血症モデルを用いて検証した。モナテピルは高コレステロール食ウサギにおいて、有意な血中脂質低下作用を示したが、 α 1受容体遮断剤であるプラゾシンは有意な低下作用を示さなかった。Lerenらは、本試験と同様な高コレステロール食負荷ウサギにおいて、 α 1受容体遮断剤であるドキサゾシンが、血中コレステロール含量の低下作用を示すが、有意でなかった(25)と報告し、本試験のプラゾシンと同様な結果を示している。Lerenらは、この有意でない結果について薬剤の投与期間ならびに例数が影響したものと考察している。しかし、本試験における薬剤の投与期間は長期間に相当する9週間であることから、投与期間の問題については否定できると考えられる。例数については、6~13例であることから十分でなかった点については否定できない。これらのことから、高コレステロール食負荷ウサギのモナテピルの血中脂質代謝改善作用における α 1受容体の関与は明らかでないと考えられる。

従って、次にプラゾシンの脂質代謝改善作用が報告されている高コレステロール食負荷サルモデル(26)で検証した。モナテピルは先の高コレステロール食負荷ウサギと同様、投与期間中有意な血中LDLの低下作用を示した。 α 1受容体遮断剤であるプラゾシンも血中LDLに対し、有意なあるいは低下傾向を示した。投与期間中のモナテピルならびにプラゾシンの α 1受容体遮断作用をフェニレフリンの昇圧反応抑制を指標に用いて確認したところ、両剤ともに α 1受容体遮断作用を示しており、その作用はそれぞれ39.4%と55.5%であり、プラゾシンの方が強かった。つまり、モナテピルは、プラゾシンに比し α 1受容体遮断作用がやや弱いにもかかわらず、血中LDL低下作用が強かったことから、モナテピルの血中脂質代謝改善作用には、 α 1受容体遮断作用とそれ以外の作用が関与しているものと考えられる。

血中の脂質は、外因性の食事由来成分と内因性の肝臓からの分泌・再取り込み成分によって制御されている。高脂血症の病態発症において、特に重要なのは内因性に由来する脂質であり、肝臓より中性脂肪が豊富なVLDLが血中に分泌され、IDLをへてコレステロール含量の多いLDLが肝臓LDL受容体機能の低下によって取り込まれない事が重要と考えられている(Figure 2-13)(27)。

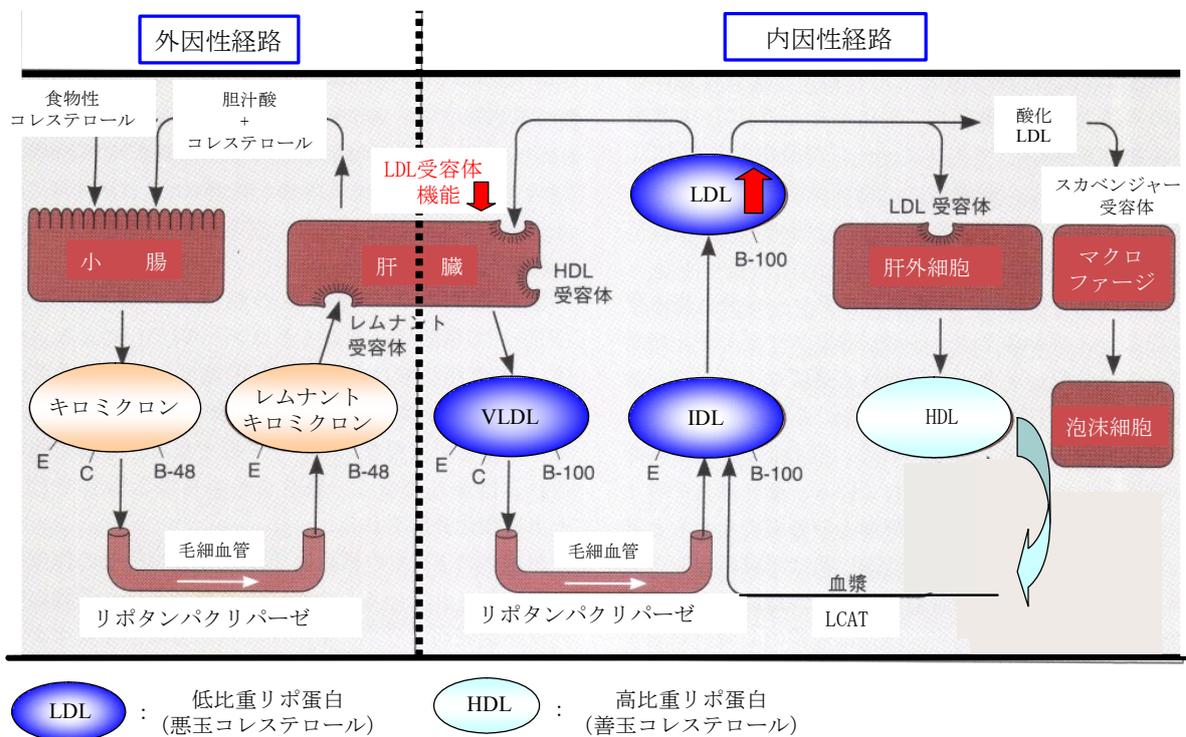


Figure 2-13. 血中脂質代謝と高脂血症

従って、本試験ではモナテピルの血中脂質代謝改善作用における肝臓 LDL 受容体の関与を検証する目的で、 ^3H -コレステロールを用いた異化排泄実験を実施した。モナテピル処置薬効発現ウサギに、 $[1\alpha, 2\alpha(n)-^3\text{H}]$ -コレステロール含有 LDL を静脈内投与したところ、血中からの $[1\alpha, 2\alpha(n)-^3\text{H}]$ -コレステロール含有 LDL のクリアランスの亢進ならびに胆汁中放射活性の増加が認められた (Figure 2-14)。

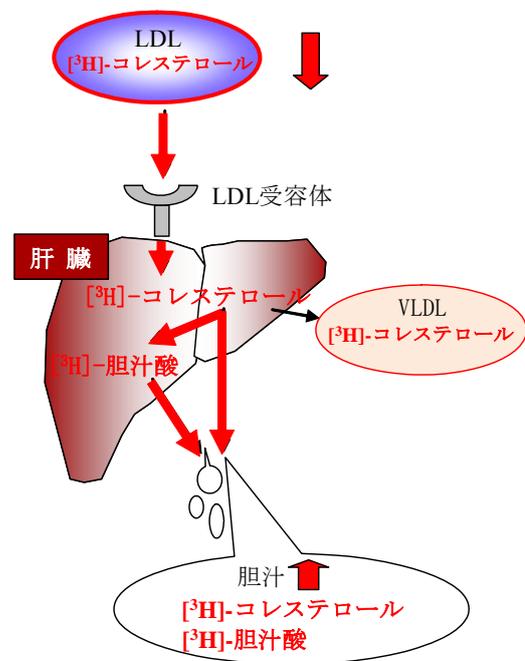


Figure 2-14. モナテピルの $[1\alpha, 2\alpha(n)-^3\text{H}]$ -コレステロール含有 LDL 静脈内投与後の異化排泄亢進作用

また、モナテピルは肝臓 LDL 受容体機能障害を有する高脂血症モデルである WHHL ウサギ (28-31) の血中脂質を低下させなかった。野竹ら (32) は、モナテピルが高コレステロール食負荷サルにおける肝臓 LDL 受容体 mRNA を増加させる事、また D' Elleto らは $\alpha 1$ 受容体遮断薬には肝臓 LDL 受容体 mRNA 発現増加作用を有する (33) 事を報告している。しかし、既存の Ca 拮抗薬にはそのような作用は報告されていない。これらの結果は、モナテピルの脂質低下作用には $\alpha 1$ 受容体遮断作用に基づく肝臓 LDL 受容体の発現増強が強く関与する事を示唆するものである。

第4項 小括

血中脂質代謝制御に重要な肝臓 LDL 受容体機能障害モデルを含む3種の高脂血症モデルにおいて、モナテピルの血中脂質代謝に対する作用を検討したところ、以下の結果が得られた。

- ①モナテピルは肝臓 LDL 受容体機能を有する高コレステロール食負荷ウサギならびにサルの血中脂質代謝を改善した。
- ②モナテピルは肝臓 LDL 受容体機能障害を有する WHHL ウサギの血中脂質代謝を改善しなかった。
- ③モナテピルの血中脂質代謝改善作用には、血中[$1\alpha, 2\alpha(n)^3\text{H}$]-コレステロール含有 LDL のクリアランスの亢進と胆汁排泄の増加がともなっていた。
- ④モナテピルの血中脂質代謝改善作用には、 $\alpha 1$ 受容体遮断ならびにそれ以外の作用に基づく肝臓 LDL 受容体の関与が重要である事が明らかとなった。

これらの事より、モナテピルは心血管イベント発症の危険因子である脂質代謝異常に対し改善作用を有すると考えられる。

第3節 抗酸化作用

第1項 実験方法

1-1) ミトコンドリア分画の調製

Ozawa らの方法 (34) に準じて、雄性 Wistar ラット (250 ~ 350g) の心臓よりミトコンドリア分画を調製した。つまり、0.3M マンニトールで心臓をホモジナイズし、600g、10 分間遠心後上清をさらに 10000g、10 分間遠心し、沈渣を 0.3M マンニトールで再懸濁し、5000 g、10 分間遠心した。沈渣のミトコンドリアは、175mM KCl を含む 25mM Tris-HCl バッファー (pH 7.4) にて再懸濁し、10000g、10 分間遠心した。沈渣をバッファーで再懸濁し、実験に使用した。

1-2) 抗酸化作用

1-1) で調製したミトコンドリア分画 (0.25mg protein / ml) とモナテピルあるいは他剤を 50 μ M アスコルビン酸と 20 μ M 硫酸鉄とともに 30°C で反応させ遠心後、上清をチオバルビツール酸溶液 (5mg / ml in 50% 酢酸) とともに 100°C、15 分煮沸した。分光光度計 (150-20、HITACHI) にて吸光度 (532nm) を測定した。スタンダードには、1, 1, 3, 3tetraethoxypropane を用いた。

1-3) 薬物の調製

モナテピルならびにジルチアゼムは、第1節、1-3) に準じて用意し使用した。プラゾシンは、第2節、1-4) に準じて用意し使用した。プロブコールならびにビタミン E は、第一三共ならびに和光純薬から購入し使用した。

1-4) 実験結果の解析

50%阻害濃度 (IC50) は、ロジットモデルへの当てはめを非線形回帰にて行った。

第2項 実験結果

モナテピルは、Table 2-3 に示すように、アスコルビン酸と硫酸鉄を含むミトコンドリア分画中のマロンジアルデヒド (MDA) 生成を強く抑制した。その 50%阻害濃度は 23.9 μ M であり、抗酸化剤であるプロブコール (6.5 μ M) とビタミン E (41 μ M) との間であった。一方、既存の Ca 拮抗薬であるジルチアゼムや α 1 受容体遮断剤であるプラゾシンは MDA 生成の抑制作用を示さなかった。

Table 2-3. ラット心臓ミトコンドリアの脂質過酸化に対するモナテピルの作用

Drugs	IC ₅₀ (μ M)
モナテピル	23.9
プラゾシン	>100
ジルチアゼム	>100
プロブコール	6.5
ビタミンE	41.0

第3項 考察

モナテピルの心血管イベント発症における複数の危険因子軽減作用の2つ目として抗酸化作用を検証した。心血管イベント発症における酸化ストレスとして、直接的な酸化ストレスの細胞刺激作用ならびに動脈硬化病変形成過程に関与する悪玉コレステロールの酸化などが考えられる。本試験において、モナテピルはミトコンドリアの過酸化を強く抑制し、その作用の強さはプロブコールとビタミンEの間であった。また同様な結果は、林らによって報告されている(35)。つまり、ヒトLDLを硫酸銅と反応させた後に生じる脂質過酸化をモナテピルは抑制し、その作用には母核のdihydrodibenzothiepineの関与を推察している。従って、モナテピルの母核における硫黄(S)原子が、発生したラジカルをトラップしたと考えられる。本試験ならびに林らの結果および動脈硬化病変形成における酸化LDLの寄与(36,37)が存在することから、モナテピルは抗酸化作用を介した動脈硬化病変形成抑制作用が期待できると考えられる。

第4項 小括

心血管イベント発症の原因である動脈硬化病変における危険因子である酸化ストレスに対するモナテピルの作用を検証したところ、以下の結果が得られた。

- ①モナテピルは、ミトコンドリアの過酸化に対して抗酸化作用を示し、その作用の強さは抗酸化剤であるプロブコールとビタミンEとの間であった。
- ②モナテピルの抗酸化作用には母核のS原子が関与すると推察される。

これらの事より、モナテピルは心血管イベント発症の原因である動脈硬化病変に対し、抑制作用を有する事が期待できる。

第4節 動脈硬化モデルにおける抗動脈硬化作用

序論

第1節では、各種高血圧動物においてモナテピルの降圧作用が既存のCa拮抗薬より、緩徐に発現し持続的であり、著明な心拍数の変動を示さない事が明らかにされた。第2節では、モナテピルは血中LDLの異化排泄の亢進にともなう脂質低下作用を示すことが明らかにされた。また、本作用は肝臓LDL受容体の発現増強作用によることが示唆された。第3節では、モナテピルの抗酸化作用が明らかにされ、その作用の強さは他の抗酸化剤であるプロブコールとビタミンEの間である事が示された。

心血管イベント発症には、動脈内膜に発生する動脈硬化病変が主たる原因であると考えられている(38)。この動脈硬化病変発生に、高血圧、高脂血症ならびに酸化ストレスが重要な役割をはたしている(38)。

以上より、モナテピルは心血管イベント発症の危険因子に対し、降圧作用以外に2因子(脂質低下ならびに抗酸化作用)に対し軽減作用を有する事から、心血管イベント発症を強く抑制する事が推定された。心血管イベント発症抑制を予測するには、ヒトの動脈硬化病変に類似するモデルを用いなければならない。高コレステロール食負荷サルモデルは、技術等の難易度が高いため報告例は少ないが、ヒトの動脈硬化病変類似モデルとして報告されている(39-42)。そこで、モナテピルの心血管イベント発症に対する作用を本モデルを用いて検証した。

第1項 実験方法

1-1) 動脈硬化モデルの作製

第2節1-1-3) に準ずる。

1-2) 薬物の投与

0.5%トラガント水溶液にモナテピルならびにプラゾシンを懸濁し、それぞれ30mg/kg 1日1回ならびに2mg/kg 1日2回を6ヶ月間連続強制経鼻投与した。

1-3) 血圧の測定

第2節1-3) に準ずる。

1-4) 血中脂質ならびにリポ蛋白の測定

第2節1-1-4) に準ずる。

1-5) 動脈硬化病変の評価

最終投与終了後、ケタミン麻酔(10mg/kg i.m.) 下において、心臓、胸部ならびに腹部大動脈をすみやかに摘出し、結合組織を剥離後血管を縦切りした。片側をコレステロール含量測定用に、もう片方を動脈硬化(脂肪沈着:ズダンIV陽性)面積測定用とした。心臓ならびに血管の一部を10%ホルマリンにて固定し、パラフィン切片作製後ヘマトキシン・エオジン染色を行い病理解析用とした。

1-5-1) 血管中コレステロール含量の測定

Folchらの方法(43)に準じ、血管を氷上で細片に切り分けた後、クロロホルム:メタノール(2:1)でホモジナイズし、遠心(3000rpm、5分、4°C)上清を採取した。本操作を計3回行い、採取した上清を遠心エバポレータにて乾固し、メタノールにて再溶解後、第2節、1-2)の方法に準じ測定した。

1-5-2) ズダンIV陽性面積測定

Holmanらの方法(44)を参考に行った。つまり、1-5)で得られた腹部大動脈の縦切り片側を一晩10%ホルマリンにて固定し、Herxheimer's溶液(ズダンIV 5gを70%エタノール500ml + アセトン500mlで溶解後濾過)で染色し、80%アルコールで20分リンス後、1時間流水しズダンIV陽性面積用とした。

1-6) モナテピルの血中濃度

モナテピル投与後、1日目ならびに1、3および6ヶ月目における1.5、6ならびに24時間後に上腕静脈から採血し、黒野らの方法(45)に従って液体クロマトグラフィーを用いて、血漿中モナテピル濃度を測定した。

1-7) 薬物の調製

モナテピルならびにプラゾシンは、第3節、1-3) に準じて用意し使用した。

1-8) 実験結果の検定

実験結果は、平均値±標準誤差にて表示した。高コレステロール食群と薬物投与群の間の有意差をLSD法にて検定した。P値が、0.05以下の場合に統計上有意と判定した。

第2項 実験結果

2-1) 血圧に対する作用

Figure 2-15 に示すように、実験期間中、高コレステロール食負荷することにより、血圧の著明な変動は認められなかった。また、モナテピルならびにプラゾシンは、著明な血圧の変動を示さなかった。

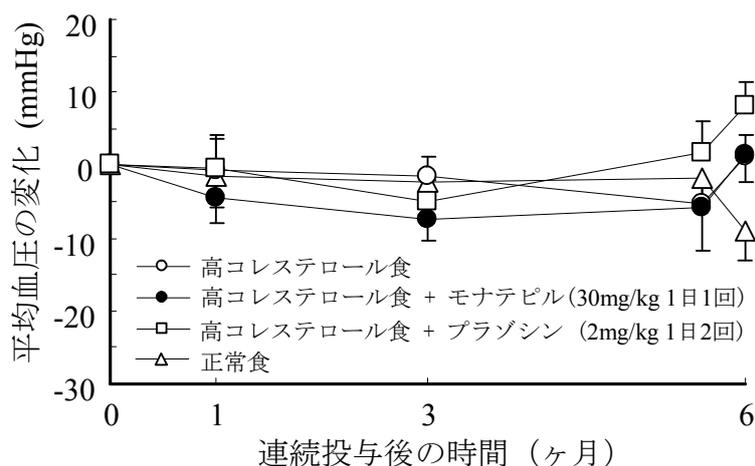


Figure 2-15. 血圧に対する作用

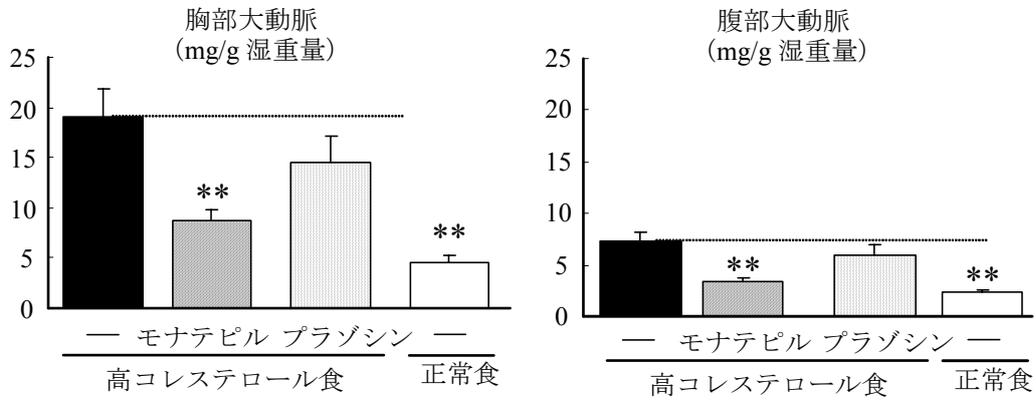
2-2) 血中脂質代謝に対する作用

第2節2-1-3) 高コレステロール食負荷サル試験を参照 (Figure 2-11)。つまり、モナテピルは、投与期間中持続的に有意な血中 LDL の低下ならびに HDL-C の増加作用を示した。また、プラゾシンも投与 1、4 ならびに 5 ヶ月目に血中 LDL の有意な低下作用あるいは低下傾向を示した。

2-3) 動脈硬化病変に対する作用

2-3-1) 血管コレステロール含量に対する作用

Figure 2-16 に示すように、高コレステロール食 6 ヶ月間の負荷により、胸部ならびに腹部大動脈コレステロール含量は著明に増加した。これに対し、モナテピルは両血管中のコレステロール含量を有意に低下させた。プラゾシンでは、有意ではないが低下傾向を示した。



** P<0.01: 高コレステロール群に比し (student's *t*-test or Dunnett's multiple comparison test)

Figure 2-16. 大動脈中コレステロール含量に対する作用

2-3-2) ズダンIV陽性面積に対する作用

Figure 2-17 ならびに Table 2-4 に示すように、高コレステロール食 6 ヶ月間負荷により腹部大動脈内面のズダンIV陽性面積は著明に増加した。一方、モノテピルは高コレステロール食負荷により増加したズダンIV陽性面積を有意に抑制した (67%)。また、プラゾシンも同様に有意に抑制した (46%)。

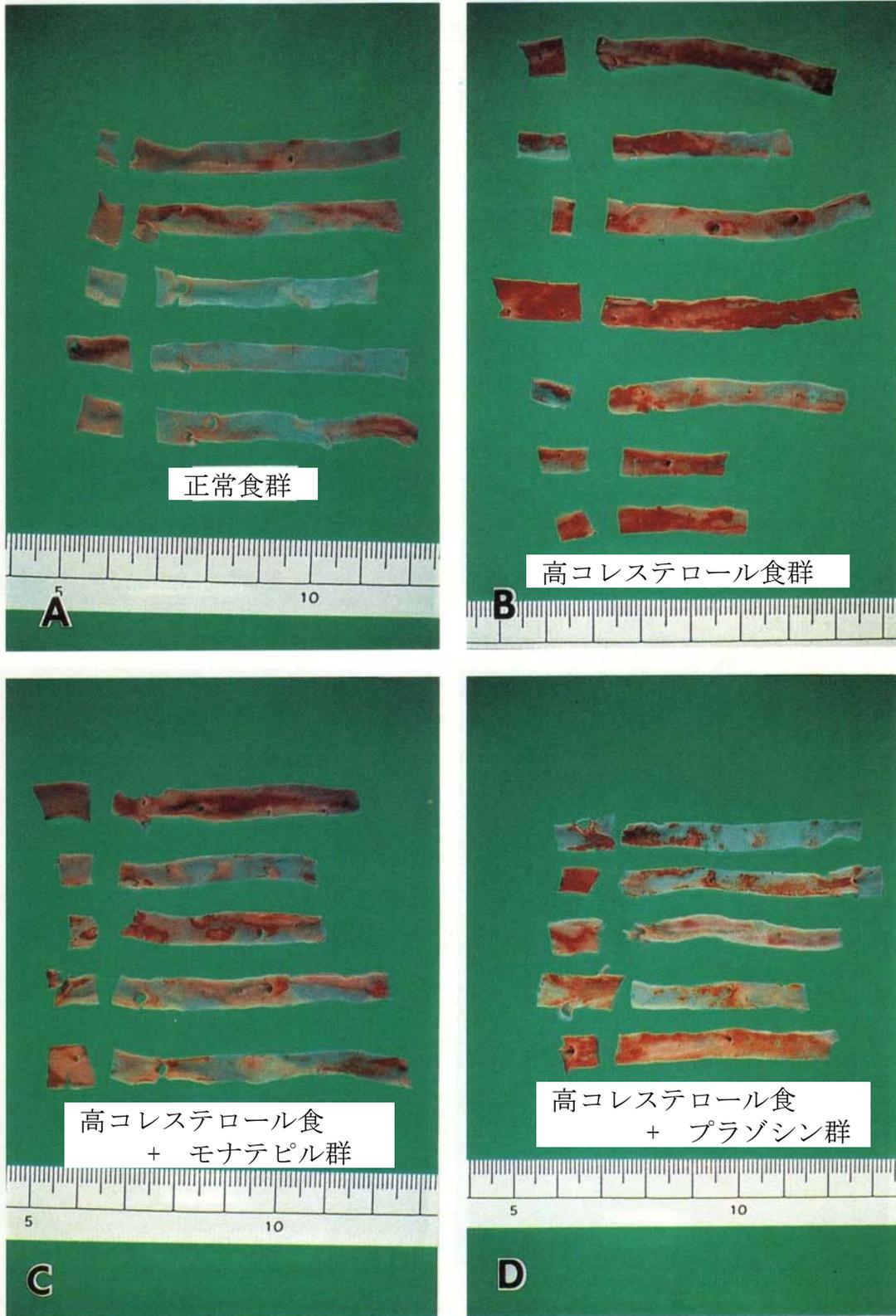


Figure 2-17. 各群におけるズダンIV陽性血管

Table 2-4. ズダンIV陽性面積に対する作用

群	ズダン染色面積 (%)
高コレステロール食	62.5±7.0
高コレステロール食+モナテピル	33.7±3.3 **
高コレステロール食+プラゾシン	43.0±6.5 *
正常食	19.7±1.6 **

高コレステロール食：2%コレステロール6ヶ月間給餌

モナテピル：30mg/kg 1日1回6ヶ月間経鼻投与

プラゾシン：2mg/kg 1日2回6ヶ月間経鼻投与

** P<0.01, * P<0.05 :高コレステロール食群に比し

(student's *t*-test or Dunnett's multiple comparison test)

2-3-3) 病理解析

心臓の冠血管を連続輪切り切片にて評価すると、Figure 2-18 ならびに Table2-5 に示したように、高コレステロール食6ヶ月間負荷により、冠血管内の動脈硬化病変の発現が7例中4例に認められた。一方、モナテピル投与群では5例全ての冠血管において動脈硬化病変の発現を示さなかった。プラゾシン投与群では5例中3例に病変を示した。

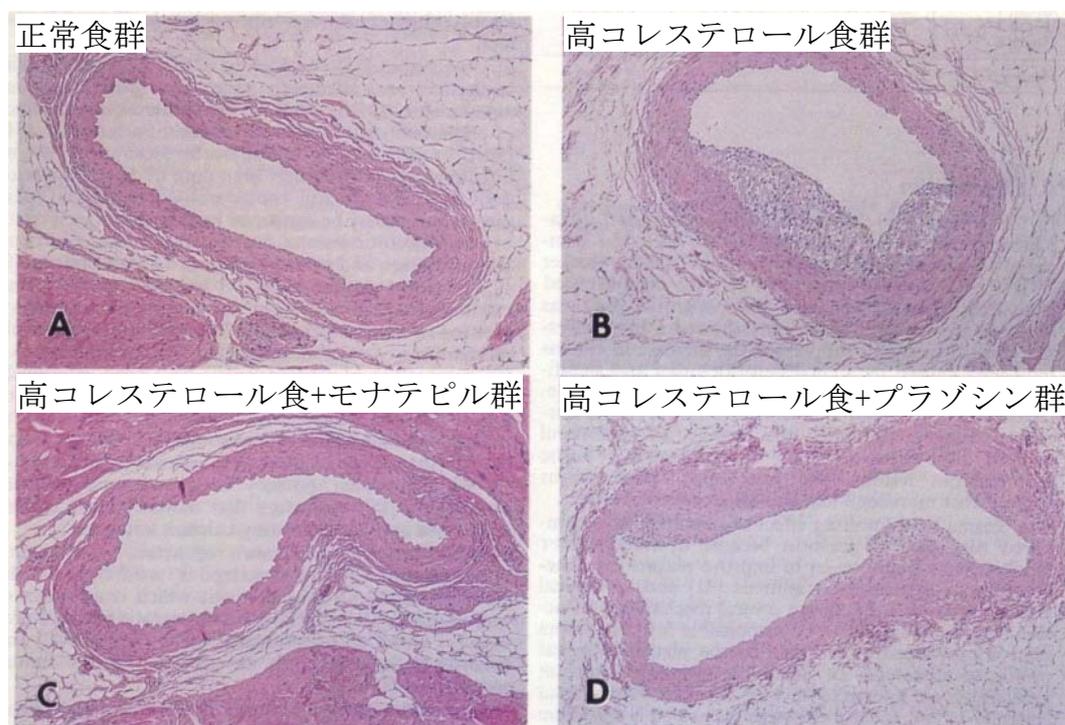


Figure 2-18. 冠動脈内における動脈硬化病変

Table 2-5. 冠動脈内における動脈硬化病変発現頻度に対する作用

群	動脈硬化病変を有する動物数 / 群における動物数
高コレステロール食	4 / 7
高コレステロール食+モナテピル	0 / 5 *
高コレステロール食+プラゾシン	3 / 5
正常食	0 / 5 *

高コレステロール食：2%コレステロール6ヶ月間給餌

モナテピル：30mg/kg 1日1回6ヶ月間経鼻投与

プラゾシン：2mg/kg 1日2回6ヶ月間経鼻投与

* P<0.05 :高コレステロール食群に比し (χ^2 -test)

Figure 2-19 に示したように、腹部大動脈病変をヘマトキシリン・エオジン染色にて評価すると高コレステロール食6ヶ月間の負荷により、腹部大動脈病変内に泡沫細胞が高頻度に認められた。一方、モナテピル投与群の腹部大動脈病変内には、泡沫細胞がわずかしか認められなかった。プラゾシン投与群の泡沫細胞の病変頻度は、モナテピルと vehicle 群との間であった。

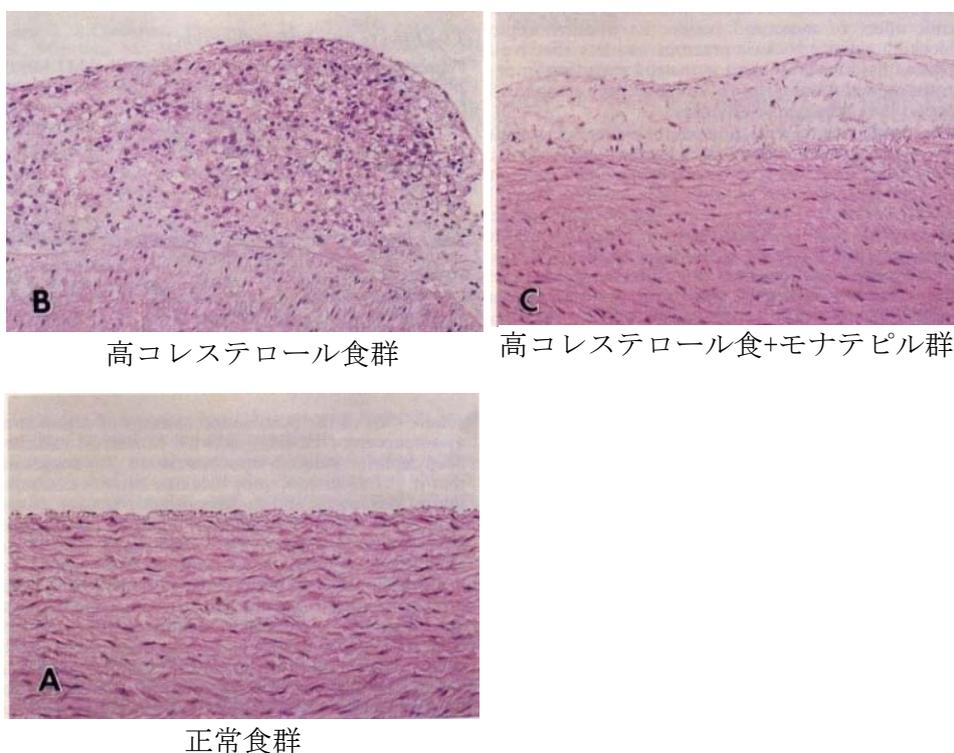


Figure 2-19. 大動脈内における動脈硬化病変

2-4) モナテピルの血漿中濃度

投与期間中におけるモナテピルの最大血漿中濃度は、Table 2-6 に示すように 67-91ng/ml を示した。

Table 2-6. 高コレステロール食負荷サルにおけるモナテピルの血漿中濃度

時間	モナテピルの血漿中濃度 (ng/ml)		
	1.5	6	24時間後
1 日目	7.7±2.4	10.4±2.6	4.1±2.9
1 カ月後	35.6±18.5	71.5±16.8	3.2±1.1
3 カ月後	38.0±12.7	91.2±34.8	7.2±3.6
6 カ月後	67.2±28.8	51.2±10.8	7.7±2.4

第3項 考察

これまでの結果より、モナテピルが心血管イベント発症の危険因子である高血圧、高脂血症ならびに酸化ストレスを改善することが明らかとなった。従って、本節では心血管イベント発症の直接原因である動脈硬化病変に対するモナテピルの作用をヒトの動脈硬化病変類似モデル (39-42) である高コレステロール食負荷サルを用いて検証した。高コレステロール食を負荷する事により、動脈硬化病変発症に密接に関与する血中のコレステロールならびに悪玉リポ蛋白である LDL 含量が著明に増加し、一方善玉リポ蛋白である HDL-C は著明に減少した。6 ヶ月後の大動脈では泡沫細胞由来の脂肪沈着が広範囲に認められ、血管壁中のコレステロール含量も著明に増加した。また、冠動脈においても動脈硬化病変が認められた。本結果は、Ross らの報告 (46) と同様、高コレステロール血症が血管内皮機能を低下させ血中 LDL ならびにマクロファージを内皮下に進入させ、何らかの原因で変性した LDL (たとえば酸化 LDL) をマクロファージが取り込んで泡沫化したと考えられる。モナテピルは、本モデルにおいてヒトの臨床治験で認められた血漿中濃度 (12) とほぼ同等な濃度を示し、大動脈中の動脈硬化病変面積ならびにコレステロール含量を有意に低下させた。モナテピルの抗動脈硬化作用のメカニズムに Ca 拮抗作用の関与も考えられるが、Ca 拮抗薬におけるヒト動脈硬化類似モデルである高コレステロール食負荷サルを用いた抗動脈硬化作用については、両報告がある。つまり、高コレステロール食負荷サルの動脈硬化病変に対し、Lichtor ら (47) ならびに Kramsch ら (48) は、ニフェジピンならびにランタン (La^{3+}) が抑制作用を示すと報告しているが、Ferrer ら (49) は、高用量のニフェジピンが抑制作用を示さなかったと報告している。また、Takai ら (50) は、アムロジピンが抗動脈硬化作用を示すものの有意ではなかったと報告している。これらの作用における相違は、用いたコレステロール含量ならびに薬剤の投与期間の違いなどによると考えられる。従って、本試験におけるモナテピルの抗動脈硬化作用のメカニズムについて、Ca 拮抗作用の関与は明確でない。一方、病変部の泡沫細胞の顕著な減少、血中 LDL の有意な低下ならびに動脈硬化病変発症に密接に関与する酸化 LDL 生成のモナテピルによる抑制の報告 (35) より、モナテピルの抗動脈硬化作用として脂質代謝改善ならびに抗酸化作用の関与が示唆される。

本試験において、心血管イベント発症の直接原因である動脈硬化病変に対し、その危険因子の複数軽減作用を有するモナテピルが有効である事が検証された。

第4項 小括

第1節、2節ならびに3節の検証結果より、モナテピルの心血管イベント発症の直接原因である動脈硬化病変に対する作用を高コレステロール食負荷サルを用いて検証した。

- ①モナテピルは高コレステロール食負荷により、増加した血中コレステロールならびにLDLおよび低下したHDL-Cを有意に改善した。
- ②モナテピルは高コレステロール食負荷により、形成された動脈硬化病変面積ならびに増加した血管中コレステロール含量を有意に減少させた。
- ③モナテピルは高コレステロール食負荷により、発現した動脈硬化病変内の泡沫細胞数の増加を著明に抑制した。
- ④これらの事より、モナテピルが心血管イベント発症の直接原因である動脈硬化病変に対して、抑制作用を有する事が明らかとなった。

第5節 まとめ

モナテピルは、先行剤の副作用である顕著な心拍数変動に対し、弱い事がわかった。また、モナテピルが心血管イベント発症の危険因子に対し、複数の軽減作用を有し、それに伴う抗動脈硬化作用を示す事が明らかとなった。これらの結果から、モナテピルが、現在主流の降圧剤であるCa拮抗性ならびにレニン・アンジオテンシン系の降圧剤に比し、優れていることもわかった (Table 2-6)。さらに、これまで不明であった分子構造と薬理活性の関係が本研究で明らかとなった (Table 2-6)。一方、それぞれの薬理活性におけるCa拮抗作用や α 1受容体遮断作用の寄与率は、不明である。また、モナテピルの分子中に含まれるフェニルペラジン (α 1受容体遮断に寄与) の中枢における他の受容体への親和性は、モナテピル処置下で異常な行動ならびに観察が認められなかった事から、懸念は少ないと考えられる。

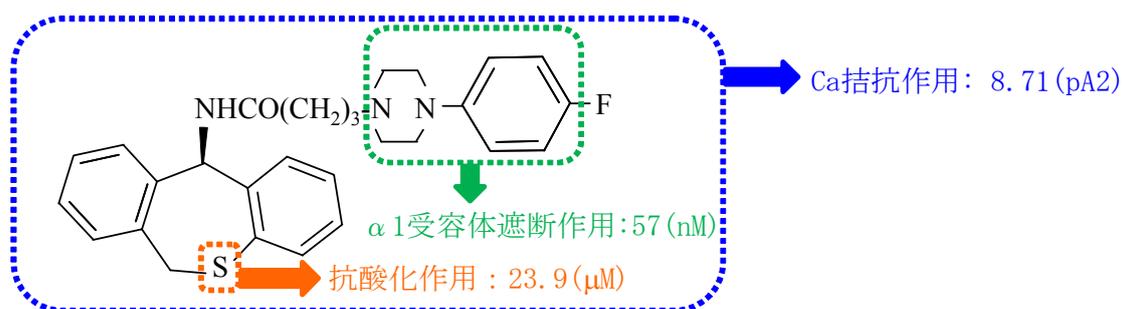
Table 2-6. 既存の降圧剤とモナテピルの比較

降圧剤	主作用	危険因子		
	高血圧	高脂血症	糖尿病	酸化ストレス
モナテピル	○	○	—	○
主流	Ca拮抗薬	○	—	—
	ACE阻害薬 ^{#1}	○	—	—
	ARB ^{#2}	○	—	—
	レニン阻害薬	○	—	—
	α1受容体遮断薬	○	○	—
	α+β受容体遮断薬	○	—~○	—
	β受容体遮断薬	○	—~○	—

#1 : アンジオテンシン変換酵素阻害薬

○ : 改善、— : 作用なし

#2 : アンジオテンシン2受容体阻害薬



モナテピル

[(±)-N-(6, 11-dihydrodibenzo[b, e]thiepin-11-yl)-4-(4-fluorophenyl)-1-piperazinebutanamide maleate]

【参考文献】

1. 黒川美貴雄, 新規カルシウム拮抗薬としてのジベンゾチエピン誘導体の合成研究, 博士論文, 京都薬科大学 (1993 年)
2. Kurokawa M., Sato F., Hatano N., Honda Y., and Uno H., A new class of calcium antagonists. Synthesis and biological activity of 11-[(omega-aminoalkanoyl)amino]-6,6a,7,8,9,10,10a,11-octahydrodibenzo [b,e]thiepin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 34, 593-599 (1991)
3. M. Kurokawa, F. Sato, I. Fujiwara, N. Hatano, Y. Honda, T. Yoshida, S. Narruto, J. Matsumoto, and H. Uno, A new class of calcium antagonists. 2. Synthesis and biological activity of 11-[[4-[4-(4-fluorophenyl)-1-piperazinyl]butyryl]amino]-6,11-dihydrodibenzo[b, e]- thiepin maleate and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 34, 927-934 (1991)
4. G. Leclerc, N. Decker, and J. Schwartz, Synthesis and cardiovascular activity of a new series of cyclohexylaralkylamine derivatives related to perhexiline *Journal of Medicinal Chemistry* 25, 709 (1982)
5. Gutmann F. D., Tagawa H., Haber E., and Barger A.C., Renal arterial pressure, rennin secretion, and blood pressure control in trained dogs. *The American Journal of Physiology* 224, 66 (1973)
6. Lupu A. N., Maxwell M. H., Kaufman J. J. and White F. N., Experimental unilateral renal artery constriction in the dogs. *Circulation Research* 30, 567-574 (1972)
7. Weeks R. J., and Jones J. A., Routine direct measurement of arterial pressure in unanesthetized rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 104, 646-648 (1960)
8. Nagai R., Nagata S., Fukuya F., Higaki J., Rakugi H., Ogihara T., Changes in autonomic activity and baroreflex sensitivity with the hypertension process and age in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 30, 419-425 (2003)
9. Micheli D., Collodel A., Semeraro C., Gaviraghi G, Carpi C., A calcium antagonist with potent and long-lasting antihypertensive effects in animal studies. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 15, 666-675 (1990)
10. Okamura H., Fujitani B., Furukawa K., Une T., Nukuda T., Komiya M., and Kurokawa M., Pharmacologic properties of a novel Ca²⁺ entry blocker, AJ-2615, in vitro. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 22, 804-809 (1993)
11. 高木ら, 旧大日本製薬 (株) 社内研究報告書
12. モナテピル治験概要書, 旧大日本製薬 (株)
13. LaLonde J.M., Zhao B., Smith W.W., Janson C.A., DesJarlais R.L., Tomaszek T.A., Carr

- T.J., Thompson S.K., Oh H.J., Yamashita D.S., Veber D.F., Abdel-Meguid S.S., Use of papain as a model for the structure-based design of cathepsin K inhibitors: crystal structures of two papain-inhibitor complexes demonstrate binding to S'-subsites. *Journal of Medicinal Chemistry* 41, 4567-4576 (1998)
14. McAllister S.D., Rizvi G., Anavi-Goffer S., Hurst D.P., Barnett-Norris J., Lynch D.L., Reggio P.H., Abood ME. An aromatic microdomain at the cannabinoid CB(1) receptor constitutes an agonist/inverse agonist binding region. *Journal of Medicinal Chemistry* 46, 5139-5152 (2003)
 15. 循環の調節機序, ギャノン生理学, 原書 21 版, 丸善株式会社
 16. Aoki K., Kondo S., Mochizuki A., Yoshida T., Kato S., Kato K., and Takikawa K., Antihypertensive effect of cardiovascular Ca²⁺-antagonist in hypertensive patients in the absence and presence of beta-adrenergic blockade. *American Heart Journal* 96, 218-226 (1978)
 17. Naito, M., Kuzuya F., Asai K., Shibata K., and N. Yoshimura, Ineffectiveness of Ca²⁺-antagonists nicardipine and diltiazem on experimental atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 51, 343 (1984)
 18. Allain C. C., Poon L. S., Chan C. S. G., Richmond W., and Fu P. C., Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry* 20, 470-475 (1974)
 19. Burstein M., Scholnick H. R., and Morfin R., Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *Journal Lipid Research* 11, 583-595 (1970)
 20. Fried R., and Hoeflmayr J., Eine einfache indirect Bestimmungsmethode der β -lipoproteide. *Klinische Wochenschrift* 41, 246 (1963)
 21. Sasaki T., Tanemura K., and Kubota N., *Rinsyou Byouri* 25, 931 (1977)
 22. Schwarz C. C., Halloran L. G., Vlahcevic Z. R., Gregory D. H., and Swell L., Preferential utilization of free cholesterol from high density lipoproteins for biliary secretion in man. *Science* 7, 62-64 (1978)
 23. Lowry O. H., Rosebrough N. J. Farr A. L., and Randall R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275 (1951)
 24. Imai Y., Kawata S., Inada M., Miyoshi S., Minami Y., Matsuzawa Y., Uchida K., and Tarui S., Effect of cholestyramine on bile acid metabolism in conventional rats. *Lipid* 22, 513-516 (1987)
 25. Leren T.P., Berg K., Studies of serum lipids in hypercholesterolaemic rabbits treated with doxazosin. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory investigation* 48, 313-317 (1988)
 26. William, H., Karge III., Edward J., Weiner E.J., Kowala M.C., Graham R.M., Nicolosi R.J.,

- The American Journal of Medicine 86(Suppl. IB), 19 (1989)
27. Brown M. S., and Goldstein J. L., A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-37 (1986)
 28. Schneider W. J., Brown M. S., and Goldstein J. L., Kinetic defects in the processing of the low density lipoprotein receptor in fibroblasts from WHHL rabbits and a family with familial hypercholesterolemia. *Molecular biology & Medicine* 1, 353-367 (1983)
 29. Shimada Y., Tanzawa K., Kuroda M., Tsujita Y., Arai M., and Watanabe Y., Biochemical characterization of skin fibroblasts derived from WHHL-rabbit, a notable animal model for familial hypercholesterolemia. *European Journal of Biochemistry* 118, 557-564 (1981)
 30. Shiomi M., Ito T., and Watanabe Y., Increase in hepatic low-density lipoprotein receptor activity during pregnancy in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits; an animal model for familial hypercholesterolemia. *Biochimica et Biophysica Acta* 917, 92-100 (1987)
 31. Tanzawa K., Shimada Y., Kuroda M., Tsujita Y., Arai M., and Watanabe Y., WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS Letters* 118, 81-84 (1980)
 32. Notake M, Kondo Y, Nomura H, Nakano K, Hosoki K, and Miyazaki M., Up-regulation of hepatic LDL receptor gene expression by monatepil, a novel calcium antagonist, in high cholesterol diet-fed Japanese monkeys. *American Journal of Hypertension* 7, 1026-1030 (1994)
 33. D'Elleto R. D., Javitt N. B., Effect of doxazosin on cholesterol synthesis in cell culture. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 13 (Suppl. 2), S1-4 (1989)
 34. Ozawa K., Seta K., Takeda H., Ando K., Handa H., and Araki C., On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. *Journal of Biochemistry* 56, 501-510 (1966)
 35. Hayashi K., Kuga Y., Nomura S., Okura Y., Tanaka K., Yasunobu Y., Nomura K., Shingu T., Kuwashima J., and Kajiyama G, Inhibition of lipid hydroperoxidation of low density lipoprotein by the Ca²⁺-channel and α 1-adrenoceptor antagonist monatepil maleate. *Arzneimittel-Forschung* 46, 378-381 (1996)
 36. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England Journal of Medicine* 320, 915-924 (1989)
 37. Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annual Review of Medicine* 43, 219-225 (1992)
 38. Ross R., Atherosclerosis-An inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 340, 115-26 (1999)
 39. Prathap K. Diet-induced aortic atherosclerosis in Malaysian long-tailed monkeys (*Macaca*

- irus). *The Journal of Pathology* 115, 163-174 (1975)
40. Malinow M.R., McLaughlin O., Papworth L., Naito H.K., Lewis L., McNulty W.P., A model for therapeutic interventions on established coronary atherosclerosis in a nonhuman primate. *Advances in experimental medicine and biology* 67, 3-31 (1976)
 41. Williams JK, Anthony MS, Clarkson TB. Coronary heart disease in rhesus monkeys with diet-induced coronary artery atherosclerosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 115, 784-790 (1991)
 42. Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 4, 341-356 (1984)
 43. Folch J, Lees M., and Stanley G. H. S., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509 (1957)
 44. Holman R. L., McGill Jr. H. C., Strong J. P. and Geer J. C., Technics for studying atherosclerotic lesions. *Laboratory Investigation* 7, 42-47 (1958)
 45. Kurono M., Yoshida K., Arakawa S., Naruto S., Determination of a novel calcium entry blocker, AJ-2615, in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* 532,175-180 (1990)
 46. Ross R., Atherosclerosis-An inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 340, 115-26 (1999)
 47. Lichter T., Davis H. R., Vesselinovitch D., Wissler R. W., and Mullan S., Suppression of atherogenesis by nifedipine in the cholesterol-fed rhesus monkey. *Applied Pathology* 7, 8-18 (1989)
 48. Kramsch D. M., Aspen A. J., and Rozler L. J., Atherosclerosis: prevention by agents not affecting abnormal levels of blood lipids. *Science* 213, 1511-1512 (1981)
 49. Ferrer P., and Aberg G., Progression of atherosclerosis in cholesterol-fed cynomolgus monkeys during treatment with nifedipine. *Atherosclerosis. FASEB L.* 4, A1151 (1990)
 50. Takai S., JIN D., Sakaguchi M., Muramatsu M., Ishii K., Kirimura K., Sakonjo H., and Miyazaki M., *Hypertension Research* 27, 517-522 (2004)

第3章 複数の危険因子を軽減し、血管保護作用を有する副作用（性ホルモン作用）の減弱した選択的エストロゲン受容体作動薬の創製

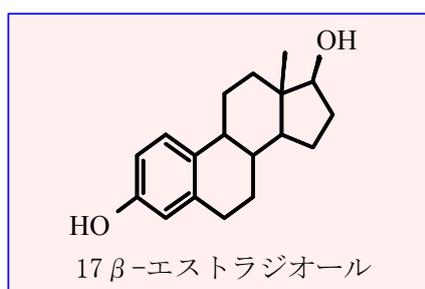
序論

エストラジオールは、生体における内因性の卵巣ホルモンであるが、閉経後の攣縮性狭心症患者に対するエストラジオールの補充療法は有効(1)と報告されている。攣縮性狭心症は心血管イベント発症の主たる疾患であり、血管内皮機能障害が原因(2-8)と考えられている。エストラジオールには、心血管イベント発症の原因ならびにその危険因子の改善作用、すなわち閉経後に伴う血中脂質代謝異常、自律神経失調ならびに血管内皮機能障害に対する改善作用が知られており(1, 9-16)、これらの作用が閉経後の攣縮性狭心症治療効果に関与していると考えられる。しかし、エストラジオールは、不正出血や子宮頸がんに関与するかもしれない子宮重量増加ならびに乳癌細胞刺激といった性ホルモン作用も有する(17, 18)事(Table 3-1)から、決して満足度の高いレベルに達していないと考えられる。

Table 3-1. エストラジオールのプロファイル

主作用	危険因子		その他
狭心発作 (内皮機能障害)	血中コレステロール	自律神経失調	子宮重量 (性ホルモン作用)
○	○	○	増加

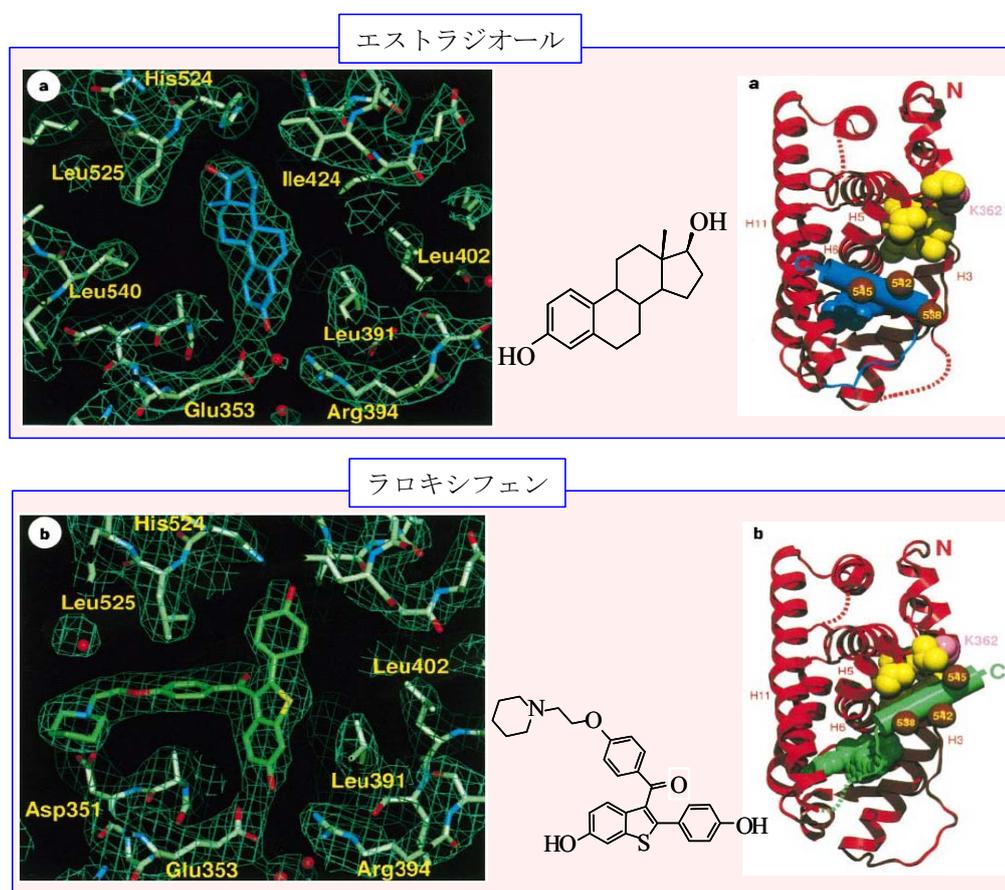
○ : 改善



そこで、二つ目の研究課題として、心血管イベント発症の危険因子に対し複数の軽減作用を有し、血管内皮機能保護作用を有する性ホルモン作用の減弱した選択的エストロゲン受容体作動薬の創製を設定した。

目的を達成するために、Figure 3-1 に示すように選択的エストロゲン受容体モジュレータの概念(19)を参考にした。つまり、エストロゲン受容体に結合する既存薬としてエストラジオールならびにラロキシフェン等が存在する。両薬剤の薬理学的プロフ

ファイルは、組織特異的に異なる。このメカニズムには、両薬剤とエストロゲン受容体の立体的結合の違いが重要と考えられている。つまり、エストロゲン受容体に対し、エストラジオールは、水酸基が受容体のグルタミン酸 353 とアルギニン 394 の間に、他方の水酸基がヒスチジン 524 近くに配置しているが、ラロキシフェンは母核であるベンゾチオフェンがエストラジオールと同様に配置しているが、側鎖であるピペリンがアスパラギン酸 351 近くに配置している。このような違いから、受容体ヘリックス 12 の傾きとリクルートされるコファクターが異なると考えられている。しかし、リクルートされるコファクターの存在は組織特異的に異なり、数多く存在すると考えられている事から、目的化合物の創製には古典的な薬理試験方法（受容体結合試験、*in vivo* 試験）と受容体とのドッキングスタディを組み合わせ行う事とし、その結果を以下に述べる。



	閉経後の各症状			組織
	血中コレステロール増加	骨粗鬆症	ホットフラッシュ	性ホルモン作用
エストラジオール	低下	改善	改善	刺激
ラロキシフェン	低下	改善	増悪	抑制

Figure 3-1. 選択的エストロゲン受容体作動薬 (SERM) の受容体結合様式と薬理的プロファイル

第1節 コレステロール低下作用を有する性ホルモン作用の減弱した選択的エストロゲン受容体作動薬の創製

第1項 実験方法

1-1) 化合物の合成

文献既知物質であるケトン **1** を出発原料として **3** の合成を行った。即ち、対応するブロモ体から調製したアリルリチウム **2** と **1** を低温下テトラヒドロフラン中で反応させ、生成した付加体を単離することなく酸触媒条件下で脱水した。引き続き、Ph₂PLi(リチウムジフェニルフォスフィン)を用いて脱メチル化反応を行い、目的物 **3** を通算収率 32~56%で合成した (Figure 3-2)。

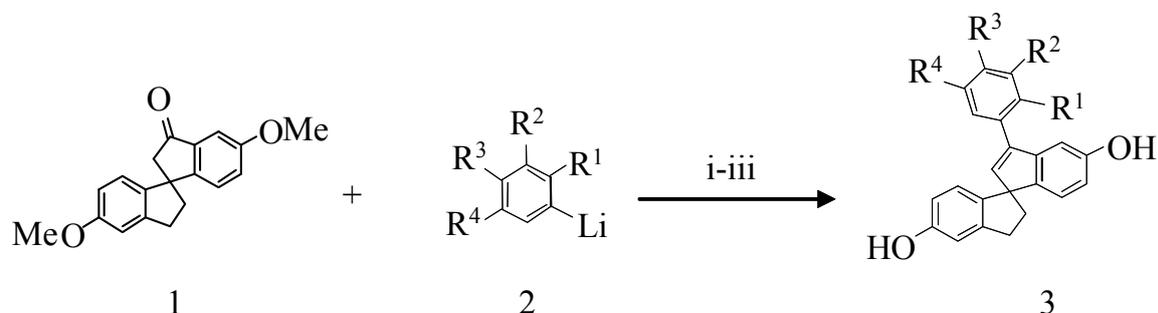


Figure 3-2. 化合物の合成

1-2) エストロゲン受容体活性の測定

Thomas らの方法 (20) を参考に、受容体分画の調製ならびに受容体結合活性を測定した。つまり、ヒト乳がん細胞 (MCF-7) を dextran-coated charcoal 処理した FBS 10% 含むフェノールレッド不含の D-MEM で 37°C、5%CO₂ インキュベータ内で培養した。コンフルエント直前の細胞をトリプシン処理後回収し、TEDG バッファー (10mM Tris HCl pH 7.5, 10% glycerol, 0.5mM dithiothreitol and 1.5mM EDTA) で 3 回洗浄した後、30ml の TEDG バッファーで再懸濁し、-80°C で保存した。再び解凍した後、Ultrasonic disrupter で細胞を破壊した (20 秒、3 回)。遠心 (38000rpm, 1hr) 後、上清を 0.45μm フィルターでろ過し、受容体分画 (MCF-7 cytosol) とした。

エストロゲン受容体結合活性は、[³H]-estradiol (GE ヘルスケアバイオサイエンス (株)、日本) を用いて測定した。つまり、MCF-7 cytosol と 0.24nM [³H]-estradiol ならびに各化合物を含む 0.1ml を 96 穴プレート中で一晩、4°C にて反応させた。次に、1% dextran-coated charcoal を 0.1ml 加え、4°C にて 15 分放置後、ろ過した。ろ液の 0.15ml を液体シンチレーションカクテル ACS II 10ml と混ぜ、液体シンチレーション測定器に

て放射活性を測定した。尚、溶媒である DMSO 単独ならびにコールドの 25 μ M 17 β -estradiol を加えた場合をそれぞれ 100%ならびに 0%として、エストロゲン受容体に対する放射性リガンドの結合率を算出した。

1-3) コレステロール低下活性の測定

生後 6~8 週令の雌性 Sprague-Dawley (SD) ラットをエーテル麻酔下で卵巣摘出した後、エストロゲン様物質を取り除いた NIH 変型飼料 (クレア、日本) にて飼育した。1 週間以上経過後、10%ヒドロキシデキストリン溶液に溶解した各化合物を 1-10mg/kg/日を 4 日間連続経口投与した。最終投与後、一晩絶食して翌日無麻酔下で尾部より採血し、遠心 (3000rpm, 4 $^{\circ}$ C) 後血漿を得た。コレステロールの測定は、第 2 節、第 1 項 1-2) の方法に準じて、行った。

1-4) 子宮に対する作用

以下の 2 種類のモデルを用いた。(1): 生後 14 週令の雌性 SD ラットをエーテル麻酔下で卵巣摘出した後、エストロゲン様物質を取り除いた NIH 変型飼料 (クレア、日本) にて飼育した。1 週間以上経過後、10%ヒドロキシデキストリン溶液に溶解した各化合物を 1-10mg/kg/日を 4 あるいは 14 日間連続経口投与した。最終投与 24 時間後、エーテル麻酔下で子宮を摘出し、重量を測定した。(2): 生後 3 週令の雌性 SD ラットに、10%ヒドロキシデキストリン溶液に溶解した各化合物を 1-10mg/kg/日 4 日間連続経口投与した。最終投与翌日、エーテル麻酔下で子宮を摘出し、重量を測定した。

1-5) エストロゲン受容体とのドッキングスタディー

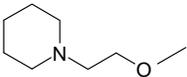
エストロゲン受容体のリガンド結合部位にラロキシフェンが結合した複合体 X 線構造 (PDB ID: 1err21) をドッキング解析に用いた。蛋白質構造は RCSB Protein Data Bank より得た。結晶構造より水分子は全て削除し、水素原子は Schrödinger 社のソフトウェア Maestro を用いて付加した。水素付加に際して、全ての Asp, Glu, Arg, Lys は解離型とした。結晶構造のひずみを解消するために、Maestro の Protein Preparation モジュールを用い、エネルギー最小化計算を行い、ドッキング解析用の蛋白質構造とした。また、リガンドである OS-0689 の三次元構造は、Ligprep (Schrödinger 社) を用いて作成した。得られた蛋白質構造に対して OS-0689 を Induced fit docking のプロトコール (21) を用いて、ドッキング解析を行った。

第2項 実験結果

2-1) OS-0544 とその分割体 OS-0689

Table 3-2 に示すように、側鎖の R1,R2 ならに R4 部位を水素原子で固定し、R₃ 部位に既存の SERM のラロキシフェンと同様ピペリジノエトキシ基を導入した化合物 1 (OS-0544) は、受容体結合活性 ($K_i = 25.3\text{nM}$) とコレステロール低下活性を示した。本化合物 1 (OS-0544) の分割体である(+)-OS-0689 (以後 OS-0689 と省略) と(-)-OS-0690 (以後 OS-0690 と省略) を比較すると、受容体結合活性ならびにコレステロール低下活性共に OS-0689 の方がより強く、OS-0690 はコレステロール低下活性を示さなかった (Table 3-3)。化合物 1 (OS-0544) の光学活性体である OS-0689 をエストロゲン受容体とのドッキングスタディーを行ったところ、母核のスピロ骨格の水酸基と側鎖のピペリジン環の窒素原子が、受容体の 353 番のグルタミン酸と 351 番のアスパラギン酸にそれぞれ結合していた (Figure 3-3)。

Table 3-2. スピロ骨格とピペリジノエトキシ

化合物	R1	R2	R3	R4	受容体結合活性	コレステロール低下活性 (%)
1 (OS-0544)	H	H		H	$k_i = 25.3\text{nM}$	44 (1mg/kg)

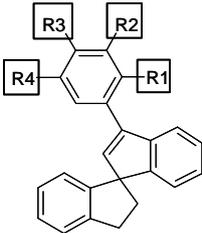


Table3-3. 化合物 1(OS-0544)とその分割体(+)-OS-0689, (-)-OS-0690

	OS-0690	OS-0544	OS-0689
受容体活性 ($IC_{50}:\text{nM}$)	915	420	201
コレステロール低下活性 (%)	3	—	65

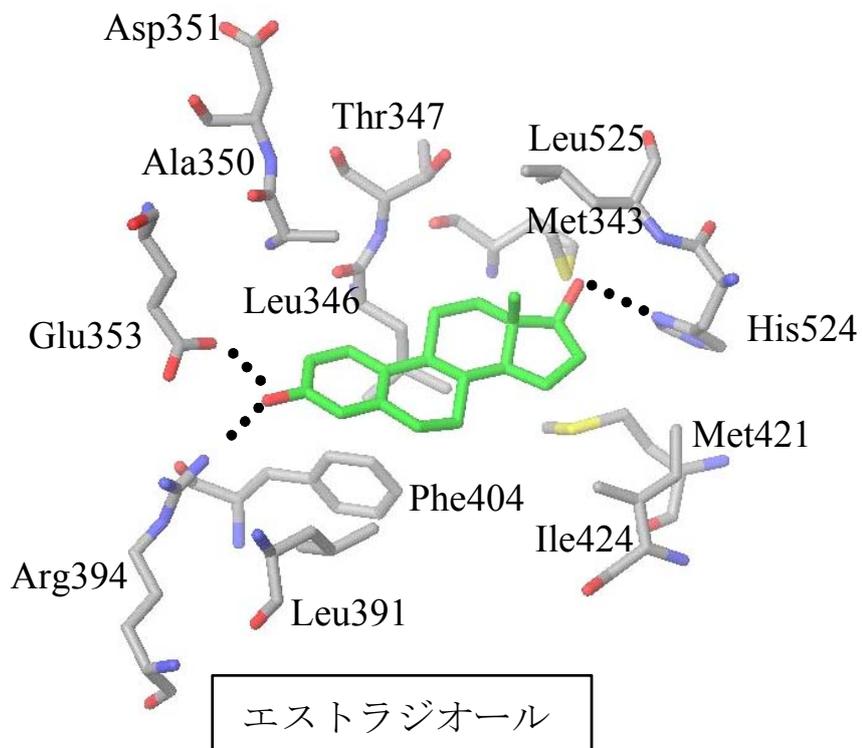
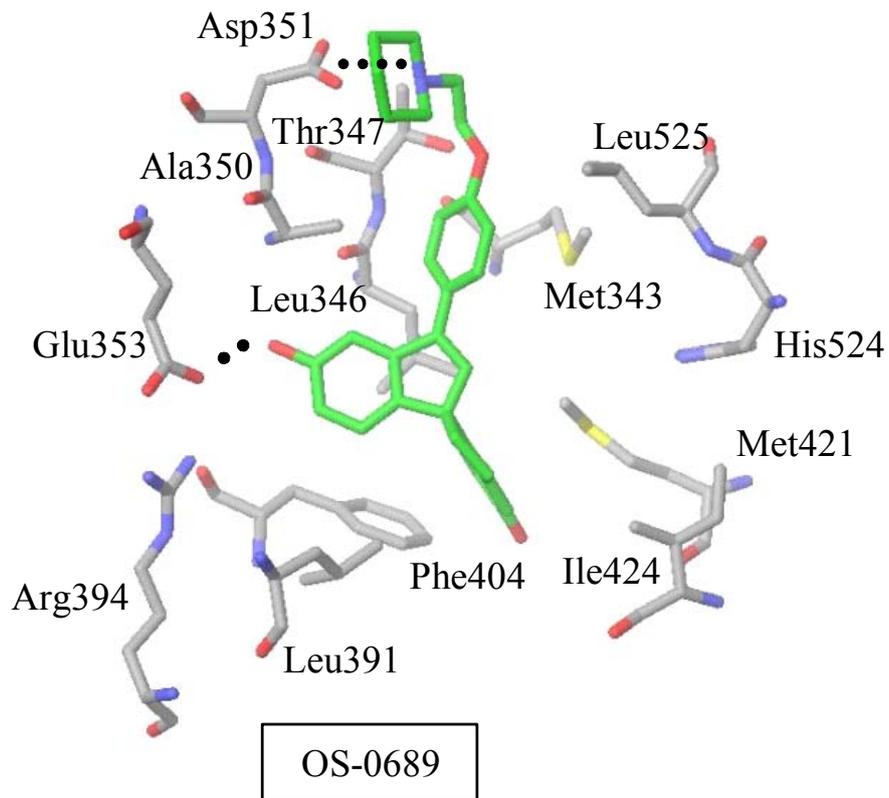
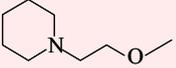
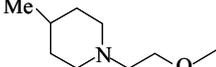
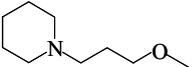
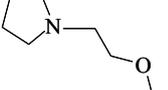
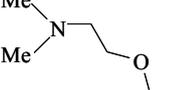
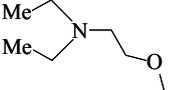
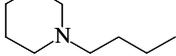


Figure 3-3. エストロゲン受容体と OS-0689 ならびにエストラジオールのドッキングスタディ

2-2) ピペリジン誘導体

Figure 3-4 に示したように、R3 部位のメチレン鎖数の増加 (4b) ならびにピペリジン環へのメチル基の導入 (4a) は、著明に受容体結合活性が向上したが、コレステロール低下活性は減弱した。また、ピペリジン環から非環状への変換 (4d, 4e) は、著明な受容体活性の向上は認められず、コレステロール低下活性も弱かった。Figure 3-5 に示すように、化合物 1 (OS-0544) の R1, R2 ならに R4 部位におけるメチル基の導入 (4g-i) は、受容体結合活性ならびにコレステロール低下活性共に向上しなかったが、R2 部位におけるフッ素原子の導入 (4j) は、約 2.5 倍受容体活性の向上が認められた。また、ピペリジン環側鎖の R2 部位への変換体は受容体結合活性の向上を示さなかった。

化合物	R1	R2	R3	R4	受容体 結合活性	コレステロール 低下活性(%)
1 (OS-0544)	H	H		H	100	44
4a	H	H		H	428	18
4b	H	H		H	460	8.5
4c	H	H		H	118	17
4d	H	H		H	85	6.0
4e	H	H		H	153	18
4f	H	H		H	95	6.0

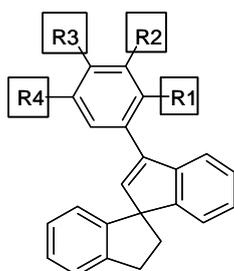
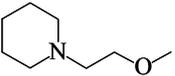
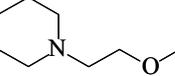
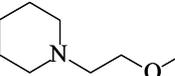
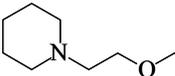
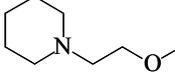


Figure 3-4. ピペリジン誘導体における活性-1

化合物	R1	R2	R3	R4	受容体 結合活性	コレステロール 低下活性(%)
4g	H	Me		H	122	4.5
4h	Me	H		H	70	-12
4i	H	Me		Me	22	-9.1
4j	H	F		H	247	16
4k	H		H	H	47	NT

NT: 未実施

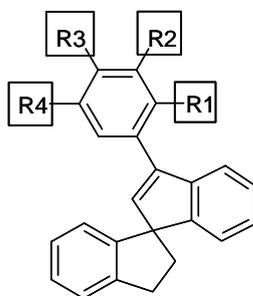
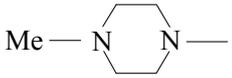
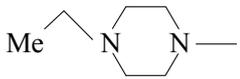
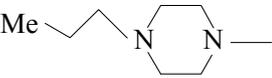
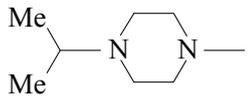
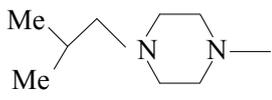
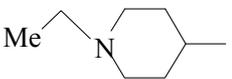
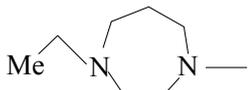


Figure 3-5. ピペリジン誘導体における活性-2

2-3) ピペラジン誘導体

Figure 3-6 に示したように、側鎖の R1,R2 ならに R4 部位を水素原子で固定し、R3 部位にピペラジンを導入したところ、受容体結合活性 (4l) あるいはコレステロール低下活性 (4p-q) の向上または両活性 (4m-n) の向上が認められた。

化合物	R3	受容体 結合活性	コレステロール 低下活性(%)
4l		207	NT
4m		181	52
4n		186	55
4o		103	21
4p		42	87
4q		125	51
4r		387	32

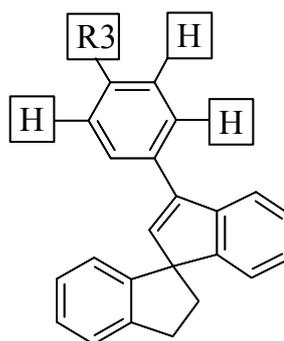


Figure 3-6. ピペラジン誘導体における活性-2

2-4) ピペリジン環とピペラジン誘導体の比較

Table 3-4 に示すように、ピペリジン環を有する化合物 1 (OS-0544)の分割体 OS-0689 とピペラジン誘導体化合物をコレステロール低下活性における用量反応性の有無ならびに幼若子宮モデルで比較したところ、OS-0689 に比しピペラジン誘導体はコレステロール低下活性の用量反応性を有さずあるいは高用量において子宮に対する作用が強かった。

Table 3-4. 化合物 1 (OS-0544)とピペラジン誘導体

	コレステロール低下活性 用量反応性の有無	子宮			培養細胞 (E2への拮抗)
		卵巣摘出モデル		幼若モデル	
		4日間投与	2週間投与	4日間投与	
OS-0689	有り	弱い	弱い	弱い	強い
ピペラジン誘導体					
4m	有り	弱い	強い	弱い	
4n	有り	弱い		弱い	弱い
4r	無し	弱い		弱い	

第3項 考察

本研究課題の一つである心血管イベント発症に対し、複数の危険因子を軽減し血管機能保護作用を有する副作用（性ホルモン）の減弱したエストロゲン受容体作動薬の創製を目的に、受容体とリガンドの結合状態を基本としてリクルートされるコファクターが重要であると考えられている **SERM** の概念 (19) を参考にした (Figure 3-1)。

まず目的化合物を得るために、エストラジオール受容体に親和性を示す 17β -estradiol と **Benzestrol** を参考に、基本骨格にスピロ骨格を導入した (Figure 3-7)。

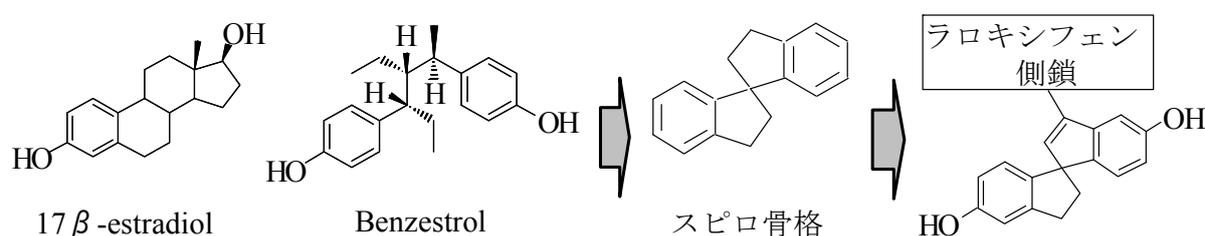


Figure 3-7. スピロ骨格の導入と側鎖

次に側鎖の導入と評価項目にあたっては、以下の情報より **SERM** の一つであるラロキシフェンのフェノキシエチルピペリジン側鎖を利用し、簡便なコレステロール低下活性を用いた。1) **SERM** の薬理作用には、リガンドと受容体との結合時に認められるヘリックス 12 の傾きと、リクルートされるコファクターが関与し、受容体とリガンドの母核ならびに側鎖の関係が重要 (19) (Figure 3-1)、2) **SERM** の中でもラロキシフェンの性ホルモン作用は、極めて弱い (22) 3) その性ホルモン作用の弱いラロキシフェン誘導体では、受容体結合活性とコレステロール低下活性が相関する (23) これらの事から、スピロ骨格にラロキシフェンの側鎖を導入した化合物 1 (OS-0544) は、受容体結合活性とコレステロール低下活性を示した。またその分割体は OS-0689 であり、受容体 351 番のアスパラギン酸にラロキシフェンと同様結合していることがわかった (Figure 3-3)。これらの情報をもとに、ピペリジン誘導体の側鎖を種々変換したところ受容体結合活性は向上するもののコレステロール低下活性は減弱した。また、1-ピペリジノエトキシ基側鎖の結合部位における変換ならびに最小分子であるメチル基の導入を行ったが、受容体結合活性は低下した。本結果は、ピペリジン環の窒素原子と受容体 351 番のアスパラギン酸の間には、ある程度の許容が存在するが、スピロ骨格を母核としたピペリジン側鎖誘導体は血中動態面に影響を及ぼしやすい事、1-ピペリジノエトキシ基側鎖の傾きの重要性、そしてその結合部位であるベンゼン環周辺における低い許容性を示唆するものである。また、ピペラジン誘導体における側鎖の種々変換は、薬理作用の用量反応性や高用量における子宮に対する作用面において決して

満足度の高い化合物でない事も示唆された。一方で、化合物 1 (OS-0544)やその分割体である OS-0689 は、コレステロール低下活性を有し、性ホルモン作用の弱いバランスのとれたエストロゲン受容体作動薬であることが示唆された。

以上の事から、化合物 1 (OS-0544)やその分割体である OS-0689 は、本研究課題にふさわしい化合物である事が示唆された。

第4項 小括

スピロ骨格を母核とし、コレステロール低下作用を有する性ホルモン作用の減弱した選択的エストロゲン受容体作動薬の創製を検討したところ、以下の結果が得られた。

- ①ピペリジン誘導体は、側鎖の結合部位が重要であり、強い受容体結合活性を示すが、その結合活性とコレステロール低下活性が相関しなかった。これは、血中動態による影響と考えられた。
- ②ピペリジン誘導体と受容体との結合において、ピペリジンの窒素原子と受容体 351 番のアスパラギン酸が結合し、本結合部位はある程度の許容が存在すると考えられた。一方、1-ピペリジノエトキシ基側鎖の結合部位であるベンゼン環周辺においては、許容性が制限されていると考えられた。
- ③ピペラジン誘導体は、受容体結合活性を示すとともに、強いコレステロール低下活性を示した。しかし、コレステロール低下活性に用量反応性を有さずあるいは高用量において強い性ホルモン作用を示した。
- ④ピペリジン誘導体である化合物 1 (OS-0544) やその分割体である OS-0689 は、エストロゲン受容体結合活性を示し、コレステロール低下活性ならびに性ホルモン作用の弱いバランスのとれた SERM の薬理作用を示した。

第2節 OS-0689 の子宮重量に対する作用

序論

第1節において、スピロ骨格を母核としフェノキシエチルピペリジンを側鎖に有する OS-0689 (OS-0544)が、コレステロール低下作用を有する性ホルモン作用の減弱した SERM である可能性が明らかになった。

従って、以下に子宮重量に対する作用を閉経後の攣縮性狭心症に有効なエストラジオールならびに性ホルモン作用の弱い SERM であるラロキシフェンと比較検討した。

第1項 実験方法

1-1) 子宮に対する作用

生後9週令の雌性 SD ラットをエーテル麻酔下で卵巣摘出した後、エストロゲン様物質を取り除いた NIH 変型飼料 (クレア、日本) にて飼育した。卵巣摘出翌日より、10%ヒドロキシデキストリン溶液に溶解した OS-0689、エストラジオールならびにラロキシフェンを 0.01-3mg/kg/日で4週間連続経口投与した。最終投与24時間後、エーテル麻酔下で子宮を摘出し、重量を測定した。尚、卵巣摘出ならびに偽手術コントロールである vehicle 群ならびに sham 群には、10%ヒドロキシデキストリン溶液を経口投与した。

1-2) 薬物の調製

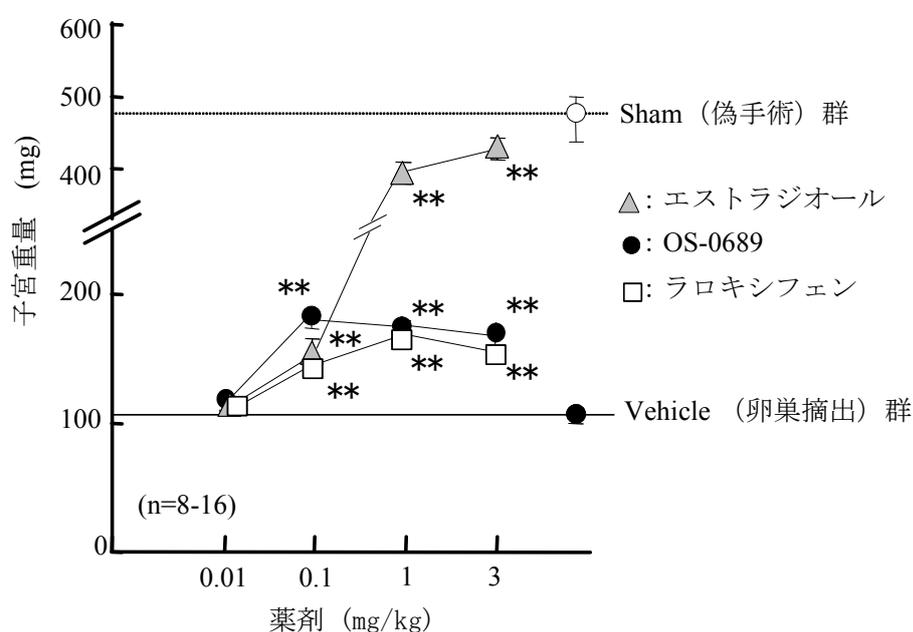
OS-0689 ならびに OS-0544 は、旧大日本製薬株式会社、総合研究所にて合成した。エストラジオールは、シグマアルドリッチジャパンより購入した。ラロキシフェンは、エビスタ錠 (リリー) から抽出した。各化合物は、10%ヒドロキシデキストリン溶液に溶解した。

1-3) 実験結果の検定

実験結果は、平均値±標準誤差にて表示した。検定は、卵巣摘出した Vehicle 群との間で、ダネット多重比較あるいはスチューデント *t*-テストにて行った。P 値が、0.05 以下の場合に統計上有意と判定した。

第2項 実験結果

Figure 3-8 に示すように、卵巣摘出4週間後の vehicle 群では、偽手術の sham 群に比較し、子宮が委縮し著明に子宮重量が低下していた。このような変化に対し、エストラジオールは、用量依存的に子宮重量の増加作用を示し、卵巣摘出による子宮重量の変化を100%とした場合、高用量の3mg/kg では88%増加させ sham 群レベルに近かった。一方、ラロキシフェンはわずかな子宮重量の増加作用を示し、1mg/kg で最大であり18%の増加であった。OS-0689は0.1mg/kg より有意に子宮重量を増加させたが、その作用は0.1mg/kg の用量で最大であり、21%の増加にとどまった。OS-0689 の子宮重量増加作用は、エストラジオールに比較し、極めて弱いものであった。



** P<0.01 : vehicle群に比し (student's *t*-test or Dunnett's multiple comparison test)

Figure 3-8. 子宮重量に対する作用

第3項 考察

生体において、子宮は視床下部、下垂体、卵巣、子宮という一連の流れの中で機能し、卵巣から分泌されるエストロゲンを含む卵巣ホルモンによって制御されている。ヒトにおける外科的な卵巣摘出は、閉経後と同様な更年期症状や著明な子宮の萎縮等が発生し、その後のエストロゲン補充は、これらの症状を改善する事が報告されている(24)。従って、本試験において雌性ラットの卵巣摘出後における子宮重量の変化は、卵巣由来のエストロゲンの減少に伴うもので、またエストラジオールによる用量依存的な子宮重量増加は子宮に対する直接作用が反映した結果と考えられる。このような事から、本試験は化合物の子宮に対する直接作用を評価する方法として、ふさわしいと考えられ SERM の性ホルモン作用を評価する目的で広く用いられている(25)。

OS-0689 ならびにエストラジオールは、エストロゲン受容体に結合するが、本試験における子宮重量増加作用に対し、全く異なる結果を示した。すなわち、エストラジオールは、用量依存的に子宮重量を著明に増加させ、フルアゴニスト的なプロファイルを示したのに対し、OS-0689 は子宮重量をわずかに増加させ、パーシャルアゴニスト的なプロファイルを示した。これまでに、エストロゲン受容体に結合する SERM のラロキシフェンとタモキシフェンにおいて、組織特異的な薬理作用とコファクターについての関係が明らかにされている。ラロキシフェンは、乳房ならびに子宮の両組織に対しほとんど刺激作用を示さず、むしろ抑制作用を示すが、一方タモキシフェンは乳房に対し刺激作用を示さず抑制的な作用を示すが、子宮に対しては刺激作用を示す。これらの相違とコファクターの関係を上記の組織を反映する培養細胞にて検討したところ、ラロキシフェンは MCF-7 細胞(乳癌細胞株)と Ishikawa 細胞(子宮癌細胞株)において、転写抑制型のコファクターを誘導するが、タモキシフェンは Ishikawa 細胞では転写促進型のコファクターを誘導すると報告されている(26)。さらに、両薬剤の受容体との結合時における立体的な配置が異なる事より(21)、誘導されるコファクターが入り込む空間が異なる事が考えられる。このような結果から、SERM の組織特異的な薬理作用は、少なくとも一部は、エストロゲン受容体の構造変化によって組織特異的に誘導されるコファクターの違いによって生じていると考えられる。従って、本試験における OS-0689 とエストラジオールの子宮重量に対する作用の相違は、エストロゲン受容体における構造変化に基づく誘導されるコファクターの相違が考えられる。事実、本試験における両薬剤のエストロゲン受容体に対するドッキングスタディにおいて、受容体との結合時における立体配置が異なる事が明らかとなっている(Figure 3-4)。エストラジオールの水酸基は、受容体のグルタミン酸 353 とアルギニン 394 に、他方の水酸基はヒスチジン 524 に結合しているのに対し、OS-0689 のスピロ骨格の水酸基はグルタミン酸 353 に結合しているが、他方の水酸基は何れのアミノ酸にも結合していない。また、側鎖のピペリジン環の窒素原子はラロキシフェンと同様アスパラギン酸 351 に結合していた。

OS-0689 の子宮重量増加作用は、エストラジオールより著しく弱く、ラロキシフェンに比し、同等あるいはわずかに強かった。しかし、臨床におけるラロキシフェンの子宮に対する作用は、問題になっていない (22) 事から、OS-0689 の子宮に対する作用の懸念は少ない事が示唆される。

第4項 小括

OS-0689 の性ホルモン作用である子宮重量増加作用を卵巣摘出ラットを用いて検討した。

- ①OS-0689 は、卵巣摘出ラットにおける子宮重量をわずかに増加させた。その作用は、エストラジオールに比し著明に弱く、ラロキシフェンとほぼ同等であった事から、臨床における子宮に対する刺激作用の懸念は少ない事が示唆された。
- ②エストラジオールに比し、OS-0689 の弱い子宮重量増加作用は、受容体との結合配置の違いによる事が考えられた。

第3節 OS-0689の心血管イベント発症のリスクファクターに対する作用

序論

第1節ならびに第2節において、OS-0689がSERMであり、子宮組織に対する刺激作用がエストラジオールに比し極めて弱く、ラロキシフェンとほぼ同等である事がわかった。

次に、心血管イベント発症のリスクファクターに対する作用を検討した。

第1項 実験方法

1-1) 血中コレステロールに対する作用

生後9週令の雌性SDラットをエーテル麻酔下で卵巣摘出した後、エストロゲン様物質を取り除いたNIH変型飼料(クレア、日本)にて飼育した。卵巣摘出翌日より、10%ヒドロキシデキストリン溶液に溶解したOS-0544ならびにエストラジオールを0.01-1.0mg/kg/日で4週間連続経口投与した。最終投与24時間後、エーテル麻酔下で腹部大静脈より採血し、遠心(4°C, 3000rpm)後、血漿を得た。コレステロールの測定は、第2節、第1項1-2)の方法に準じて、行った。尚、卵巣摘出ならびに偽手術コントロールであるvehicle群ならびにsham群には、10%ヒドロキシデキストリン溶液を経口投与した。

1-2) 自律神経に対する作用

生後13週令の雌性SDラットをエーテル麻酔下で卵巣摘出した後、エストロゲン様物質を取り除いたNIH変型飼料(クレア、日本)にて飼育した。卵巣摘出2週間後より、10%ヒドロキシデキストリン溶液に溶解したOS-0689ならびにエストラジオールを3mg/kg/日で10日間連続経口投与した。投与9日目に、エーテル麻酔下において腸骨動脈にポリエチレンカニューレ(SP-31:夏目、東京)を留置し、カニューレの他端を皮下を介し頸背部に導き固定した。翌日の最終投与後、カニューレを血圧測定装置に接続した圧トランスデューサに接続し、無麻酔下で血圧測定を行った。交感神経活性は、永井ら(27)によって報告されたフラクレットソフトウェアを用いて血圧波形から解析した。つまり、無麻酔下の血圧波形をリアルタイムに取り込み、ノイズ除去後、低周波数成分(0.28-0.74Hz)を解析した。

1－3) 薬物の調製

OS-0689、OS-0544 ならびにエストラジオールの各投与液の調製は、第2節、1－2) に準じて行った。

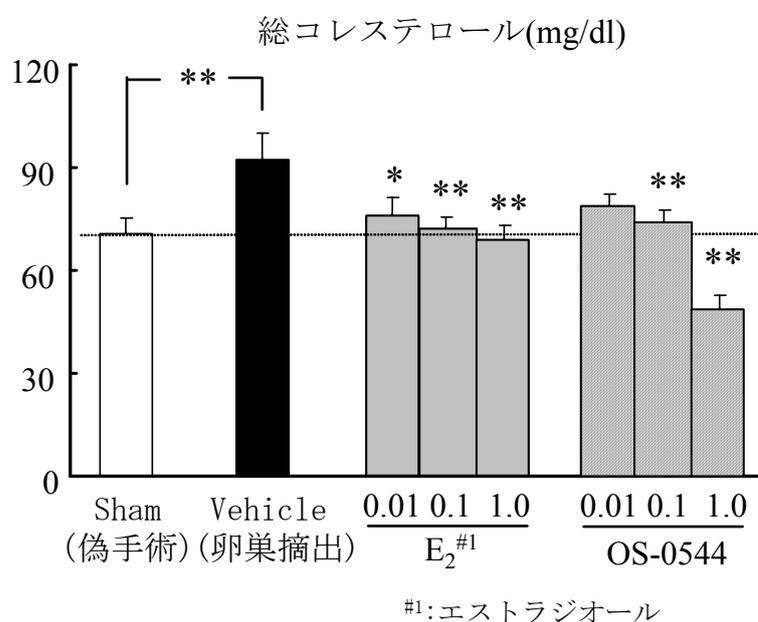
1－4) 実験結果の検定

実験結果の検定は、第2節、1－3) に準じて行った。

第2項 実験結果

2-1) 血中コレステロールに対する作用

Figure 3-9 に示すように、卵巣摘出4週間後の vehicle 群は、偽手術の sham 群に比較し、血中コレステロールが有意に増加した (93 ± 7 mg/dl vs. 71 ± 4 mg/dl)。このような変化に対し、エストラジオールは、 0.01 mg/kg から用量依存的に血中コレステロールの有意な低下作用を示した。OS-0544 はエストラジオールと同様用量依存的な血中コレステロールの低下作用を示した。しかし、その作用は 0.1 mg/kg より有意であったが、 1.0 mg/kg ではエストラジオールより強かった。



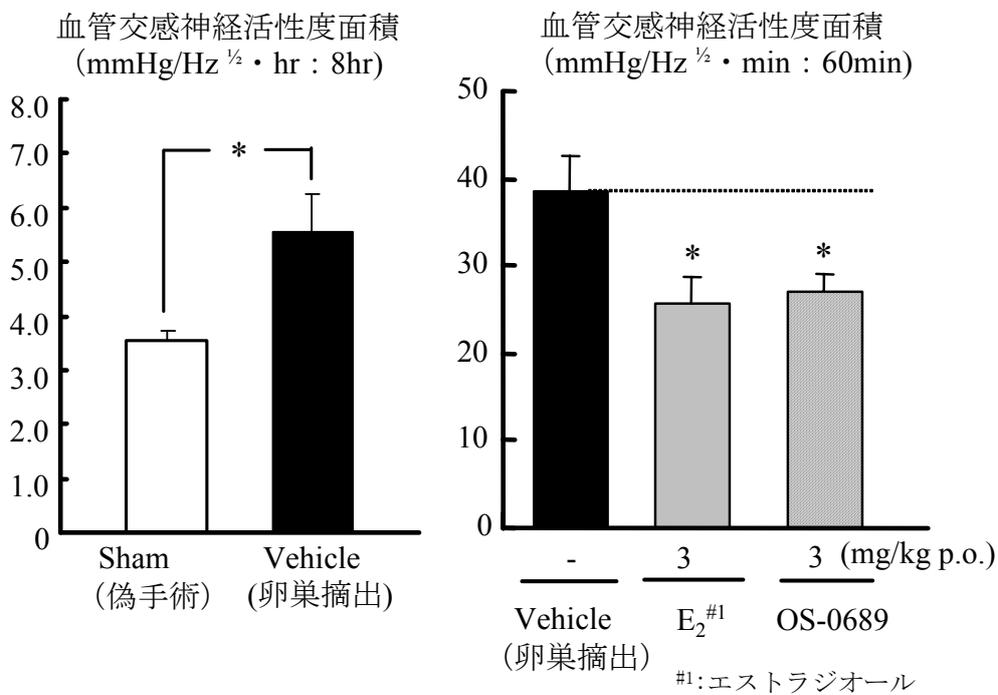
#1: エストラジオール

** P<0.01, * P<0.05 : vehicle群に比し
(student's *t*-test or Dunnett's multiple comparison test)

Figure 3-9. 血中コレステロールに対する作用

2-2) 自律神経に対する作用

Figure 3-10 に示すように、卵巣摘出2週間後の vehicle 群は、偽手術の sham 群に比較し、有意な交感神経活性の増加 (1.57 倍) を示した。このような変化に対し、エストラジオールならびに OS-0689 の 3mg/kg は、交感神経活性の増加を有意に抑制した。



* P<0.05 : vehicle群に比し (student's *t*-test or Dunnett's multiple comparison test)

Figure 3-10. 交感神経活性に対する作用

第3項 考察

スピロ骨格を母核とし、フェノキシエチルピペリジン側鎖を有する OS-0689 (OS-0544) が、攣縮発生に重要な血管内皮細胞機能低下における危険因子に対し複数の軽減作用を有するかを閉経後の攣縮性狭心症に有効なエストラジオールと比較検討した。

血中コレステロール含量の増加は、血管の内皮機能障害に密接に関与する事が報告されている (28-31)。また多くの試験結果は、エストラジオールが血中コレステロール含量の低下作用を有する (13, 14) 事を示し、そのメカニズムには肝臓における LDL 受容体の発現増強ならびに血中からの LDL クリアランスの亢進に関与する事が報告されている (32, 33)。事実、本試験においてもエストラジオールは卵巣摘出後の血中コレステロール含量の増加を有意に改善した。このようなモデルにおいて、OS-0544 はエストラジオールと同様、卵巣摘出翌日からの投与により卵巣摘出後の血中コレステロール含量の増加を有意に改善した。これらの結果は、OS-0544 がエストラジオールと同様なメカニズムにより、血中コレステロール低下作用を示した事が推察される。交感神経活性の増加は、冠血管における攣縮に関与する事が報告されている (2, 3, 8)。エストロゲン受容体は、自律神経の調節に関与する中枢神経系にも存在し、卵巣摘出ラットにおけるエストラジオールの中枢内投与は、交感神経活性の低下作用を示す事が示されている (34)。また、エストロゲン α 受容体のノックアウトマウスは、交感神経の発現増加を示す事も報告されている (35)。これらの事実は、エストロゲンが交感神経活性を調節する事を示唆するものである。交感神経活性を測定した多くの研究では、麻酔下における組織からの遠心性神経活性を測定している。しかし、これらの試験系は、交感神経活性が麻酔による影響を受けている可能性がある事から、正常な生体における神経活性を測定されていない可能性がある。一方、永井ら (27) は無麻酔ラットを使用し、収縮期血圧の変動における低周波数成分 (0.28 – 0.74 Hz) の強さは、プラゾシン ($\alpha 1$ 受容体遮断薬) 感受性成分であると報告している。従って、本試験においては永井らの方法 (27) に準じて、無麻酔下で検討した。今回使用した卵巣摘出後の週令は、閉経後のホットフラッシュモデルで用いられた卵巣摘出3週間後である。本モデルにおいて、卵巣摘出した vehicle 群における無麻酔下ラットの交感神経活性は、偽手術ラットである sham 群に比し有意に亢進していた。OS-0544 の分割体である OS-0689 は、エストラジオールと同様、卵巣摘出後の無麻酔ラットにおける交感神経活性の亢進を有意に改善した。OS-0689 の本作用が、中枢を介するかは不明であり、今後 OS-0689 の直接的な中枢内投与が必要であろう。

以上、OS-0689 あるいは OS-0544 が血中コレステロール低下ならびに亢進した交感神経活性の改善作用を有する事から、OS-0689 あるいは OS-0544 は、心血管イベント発症において重要な血管内皮機能低下に対し、改善作用を有する事が期待できると考えられる。

第4項 小括

スピロ骨格を母核とし、フェノキシエチルピペリジンを側鎖に有する OS-0689 (OS-0544) が、血管内皮機能低下につながる危険因子に対し複数の軽減作用を有するかを閉経後の攣縮性狭心症に有効なエストラジオールと比較検討した。

①OS-0689 (OS-0544) は、卵巣摘出後の血中コレステロールの増加に対し、抑制作用を示した。

②OS-0689 (OS-0544) は、卵巣摘出後の交感神経活性の増加に対し、抑制作用を示した。

第4節 OS-0689の血管保護作用

序論

第2節ならびに第3節において、OS-0689（あるいはOS-0544）が、閉経後の攣縮性狭心症に有効性を示すエストラジオールに比し、著明に性ホルモン（子宮）作用が弱く、卵巣摘出後の血中コレステロールならびに交感神経活性の増加に対し、有意な改善作用を有する事が明らかとなった。

心血管イベント発症には、冠血管における動脈硬化とともに攣縮も原因であると考えられている（2-8, 36）。この攣縮発生には、血管内皮細胞機能が重要であり、この機能低下に高血圧や高脂血症などとともに交感神経活性の亢進や閉経も重要な役割を果たしていると考えられている（2-8, 36）。

OS-0689（あるいはOS-0544）は攣縮発生に重要な血管内皮細胞機能低下の危険因子に対し、複数の軽減作用（コレステロール低下ならびに亢進した交感神経活性の改善作用）を有する事から、血管内皮細胞機能障害を改善する事が推定された。本検討には、ヒトの閉経後を想定し、卵巣摘出後の血管内皮機能低下モデルを用いた。

第1項 実験方法

1-1) *in vivo*における血管保護作用の検証

生後9週令の雌性SDラットをエーテル麻酔下で卵巣摘出した後、エストロゲン様物質を取り除いたNIH変型飼料（クレア、日本）にて飼育した。卵巣摘出翌日より、10%ヒドロキシデキストリン溶液に溶解したOS-0544を3mg/kg/日4週間連続経口投与した。最終投与後、 α 受容体拮抗薬であるフェノキシベンザミン（シグマアルドリッチジャパン、日本）10mg/kgを腹腔内投与し、ソムノペンチル（Pitman Moore, Munclele, IL, USA）麻酔下で総頸動脈にポリエチレンカニューレ（SP-31：夏目、東京）を留置し、カニューレの他端を血圧測定装置に接続した圧トランスデューサに接続し、血圧測定を行った。安定した血圧を確認後、アルギニン-バソプレシン（シグマアルドリッチジャパン、日本）0.02-0.06 μ g/kg静脈内投与した。アルギニン-バソプレシン投与前ならびに投与後の最大平均血圧の差（mmHg）を血圧上昇度（反応）とし、これを血管機能の指標とした。

1-2) *ex vivo*における血管内皮機能の検証

生後4週令の雌性SDラットをエーテル麻酔下で卵巣摘出した後、エストロゲン様物質を取り除いたNIH変型飼料（クレア、日本）にて飼育した。卵巣摘出6週間後より、10%ヒドロキシデキストリン溶液に溶解したOS-0544を0.3、3mg/kg/日1週間連続経口投与した。最終投与24時間後、ソムノペンチル（Pitman Moore, Munclele, IL, USA）麻酔下で胸部大動脈を摘出し、結合組織を剥離後5mmの血管をインドメタシン

(10 μ M) 含有 Krebs バッファー中で血管張力測定装置に 1g 張力でセットした。セット中は、37 $^{\circ}$ Cならびに 95%酸素ガスと 5%炭酸ガスの通気を維持し、20 分ごとに新鮮なバッファーに交換した。Krebs バッファーの組成は、NaCl (118mM) , KCl (4.8mM) , CaCl₂ (1.6mM) , KH₂PO₄ (1.2mM) , NaHCO₃ (25mM) , MgSO₄ (1.2mM) , EDTA (0.107mM) ならびに glucose (11.5mM) である。血管の等尺性が安定した後、血管内皮依存性ならびに内皮非依存性の機能試験を行った。内皮依存性ならびに内皮非依存性機能試験には、1-ノルアドレナリン 0.3-1 μ M (シグマアルドリッチジャパン、日本) 添加後、アセチルコリン (1-1000nM) ならびにニトロプルシッド (1-1000nM) をそれぞれ使用した。血管の拡張反応は、1-ノルアドレナリンの最大収縮を 100%とし、アセチルコリンならびにニトロプルシッドの弛緩を%表示した。

1-3) 薬物の調製

第2節、1-2) に準じて、行った。

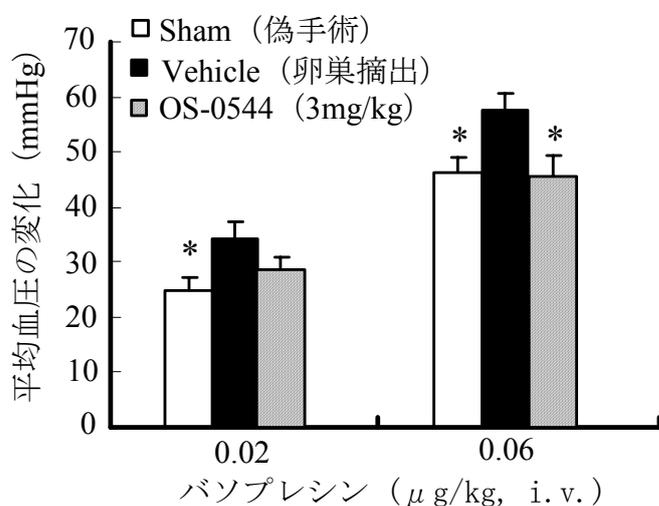
1-4) 実験結果の検定

第2節、1-3) に準じて、行った。

第2項 実験結果

2-1) *in vivo*における血管保護作用の検証

Figure 3-11 に示すように、アルギニン-バソプレシン (0.02 – 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の静脈内投与は、卵巣摘出した vehicle 群ならびに偽手術の sham 群共に、用量依存的な血圧上昇を示した。Vehicle 群におけるこの上昇は、sham 群に比較し、有意に高かった (アルギニン-バソプレシン 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 34 versus 25 mmHg, 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 57 versus 46 mmHg)。OS-0544 は、卵巣摘出によりアルギニン-バソプレシン 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の増加した血圧上昇を有意でないが、抑制 (62%) 傾向を示した。一方、OS-0544 は、アルギニン-バソプレシン 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ により増加した血圧上昇を偽手術群レベルにまで有意に抑制した。



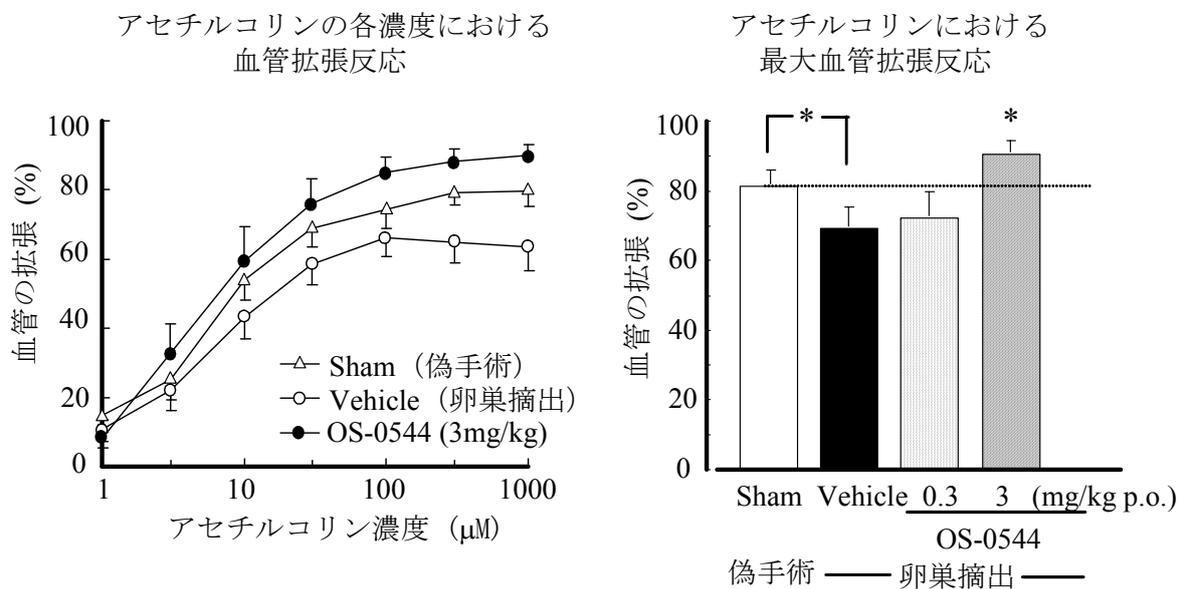
* $P < 0.05$: vehicle群に比し (student's *t*-test)

Figure 3-11. *In vivo*におけるバソプレシン昇圧反応に対する作用

2-2) *ex vivo*における血管内皮機能の検証

Figure 3-12 に示すように、7週間の卵巣摘出は、偽手術の sham 群に比較し、内皮依存性拡張反応のアセチルコリンにおける濃度反応曲線を左にシフトさせた。その EC_{50} (50%の拡張反応を示す濃度) は、卵巣摘出した vehicle 群 (14.7 μM) において偽手術の sham 群 (8.78 μM) に比しより高かった。そして、アセチルコリン誘発内皮依存性最大拡張反応は、sham 群に比較し vehicle 群において有意に弱かった。一方、内皮非依存性のニトロプルシッド拡張反応は、両群間で有意な差はなかった (データ非表示)。OS-0544 は、内皮依存性のアセチルコリンの濃度反応曲線を左にシフトさせ、その EC_{50} を低下させた (OVX : 14.7 vs OS-0544 : 6.72 μM)。また、OS-0544 はアセチルコリンの最大拡張反応を sham 群レベルまで回復させた。しかし、OS-0544 はニトロプルシッド

による拡張反応に対し作用を示さなかった。



* P<0.05 : vehicle群に比し (student's *t*-test or Dunnett's multiple comparison test)

Figure 3-12. *Ex vivo*におけるアセチルコリンの血管拡張反応に対する作用

第3項 考察

まず、最初に心血管イベント発症における直接的な原因である血管内皮機能障害の評価に、Pávó らの方法 (37) に準じて *in vivo* におけるバソプレシン昇圧反応を行った。Pávó らは、卵巣摘出後のバソプレシンの昇圧反応性の増加は、血管内皮に存在する一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の低下が寄与し、この反応性増加はエストラジオールならびに SERM であるラロキシフェンで抑制されると報告している。また、臨床においても健常閉経前女性の血管内皮機能は、血中エストラジオール濃度の変動に密接に関与していると報告されている (9-11)。これらの結果は、エストラジオールが血管内皮機能を調節している事を示唆するものである。事実、本試験において卵巣摘出後における vehicle 群のバソプレシン昇圧反応は、Pávó らの報告と同様、偽手術の sham 群に比し有意に増加した。これらの変化に対し、OS-0544 は卵巣摘出翌日からの投与により、卵巣摘出後に生じたバソプレシン昇圧反応の増加を有意に抑制した。これらの結果は、OS-0544 が *in vivo* において卵巣摘出後に生じた血管内皮機能障害を改善した事を示唆する。

次に、先の試験で認められた *in vivo* における卵巣摘出後に生じたバソプレシン昇圧反応の増加が、実際に血管内皮機能障害に基づくか、ならびに OS-0544 がその障害を直接改善したかを卵巣摘出ならびに OS-0544 処置した動物から血管を取り出して直接評価するという *ex vivo* 法において検証した。血管は胸部大動脈を使用し、内皮機能の指標として内皮依存性の拡張反応を示すと報告されているアセチルコリンを用いた。これまでの報告によると、卵巣摘出ラットの摘出血管におけるアセチルコリンの拡張反応は、偽手術ラットのそれに比し、有意に弱い事が報告されている (38-40)。しかし、内皮非依存性の拡張反応を示すニトロプロシッドは、卵巣摘出ならびに偽手術ラット間で有意な差がない事も認められている。本試験では、先ず卵巣摘出後の週令 (時間) と血管内皮機能障害を検討したところ、卵巣摘出後 4 週における摘出血管のアセチルコリンの拡張反応は有意に減弱していなかった (未発表データ) が、卵巣摘出後 7 週におけるその拡張反応は、最大反応では有意に減弱したが、ED₅₀ 値では有意でなかった。本結果は閉経後女性に認められる血管内皮機能障害と類似し、病態的にマイルドな障害を示唆するものである。従って、本研究では、後者の条件を用いた。このようなマイルドな内皮機能障害モデルにおいて、OS-0544 は卵巣摘出ラットの摘出血管におけるニトロプロシッドの拡張反応には影響を与えず、アセチルコリンによる拡張反応の減弱を有意に改善した。また、卵巣摘出ラットにおけるエストラジオールの補充は、摘出血管におけるアセチルコリンによる拡張反応減弱を改善すると示されている (40)。これらの結果は、OS-0544 が卵巣摘出ラットにおいて血管保護作用を示す事を示唆するものであり、摘出血管におけるアセチルコリンの拡張反応には eNOS が寄与する (41) 事から、そのメカニズムに eNOS の関与が含まれている事が考えられる。しかし、本試験において eNOS の活性や蛋白発現を検討していない事から、さら

なる検討が必要と思われる。

近年、エストラジオールを含むホルモン補充療法が、心血管イベントの発症を抑制あるいは増加するという両報告がある (42, 43)。このような相違について、Mattar らは治療開始時期、つまり投与タイミングが重要であるかもしれないと報告している (44)。本試験において、OS-0544 の卵巣摘出初期からの投与は、血管内皮機能における重要な危険因子を軽減した (第3節 心血管イベント発症のリスクファクターに対する作用結果より)。また、OS-0544 はマイルドな血管内皮機能障害を改善した。これらの結果は、OS-0544 の早期からの処置は、卵巣摘出後に生じる様々な変化に対し有効性を示す事を示唆するものである。一方、エストロゲン受容体モジュレータである SERM では、心血管イベント発症に対し、抑制あるいは効果なしと報告され、増加作用は認められていない (45-48)。従って、SERM である OS-0544 は、心血管イベント発症に対し、増加させる事はないと考えられる。

以上の事から、OS-0544 は卵巣摘出後に生じる内皮機能障害を改善する事が示唆された。

第4項 小括

攣縮発生に重要な血管内皮細胞機能低下における危険因子に対し、複数の軽減作用を有する OS-0544 (OS-0689) の血管内皮機能障害の改善作用を検証したところ、以下の結果が得られた。

OS-0544 (OS-0689) は、卵巣摘出後に生じる血管内皮細胞機能障害に対し有意な改善作用を示した。

第5節 まとめ

OS-0689 は、エストラジオールと同様、複数の危険因子の軽減作用を有するとともに、卵巣摘出後による血管機能障害を改善した。また、先行剤であるエストラジオールの副作用である性ホルモン作用 (子宮重量増加作用) に対し、極めて弱い作用を示した。その作用は、臨床において子宮重量増加作用の問題になっていないラロキシフェンよりわずかに強い程度であった。

【参考文献】

1. Kawano H., Motoyama T., Hirai N., Kugiyama K., Ogawa H., and Yasue H., Estradiol supplementation suppresses hyperventilation-induced attacks in postmenopausal women with variant angina. *Journal of the American College of Cardiology* 37, 735-740 (2001)
2. Yasue H., Touyama M., Shimamoto M., Kato H., and Tanaka S., Role of autonomic nervous system in the pathogenesis of Prinzmetal's variant form of angina. *Circulation* 50, 534-539 (1974)
3. Yasue H., Horio Y., Nakamura N., Fujii H., Imoto N., Sonoda R., Kugiyama K., Obata K., Morikami Y., and Kimura T., Induction of coronary artery spasm by acetylcholine in patients with variant angina: possible role of the parasympathetic nervous system in the pathogenesis of coronary artery spasm. *Circulation* 74, 955-963 (1986)
4. Ignarro LJ., Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation Research* 65, 1-21 (1989)
5. Bassenge E., Endothelium-mediated regulation of coronary tone. *Basic Research in Cardiology* 86, 69-76 (1991)
6. Kugiyama K., Murohara T., Yasue H., Kimura T., Sakaino N., Ohgushi M., Sugiyama S., and Okumura K., Increased constrictor response to acetylcholine of the isolated coronary arteries from patients with variant angina. *International Journal of Cardiology* 52, 223-233 (1995)
7. Shimokawa H., Cellular and molecular mechanisms of coronary artery spasm. *Japanese Circulation Journal* 64, 1-12 (2000)
8. Tan B.H., Shimizu H., Hiromoto K., Fukukawa Y., Ohyanagi M., and Iwasaki T., Wavelet transform analysis of heart rate variability to assess the autonomic changes associated with spontaneous coronary spasm of variant angina. *Journal of Electrocardiology* 36, 117-124 (2003)
9. Hashimoto M., Akishita M., Eto M., Ishikawa M., Kozaki K., Toba K., Sagara Y., Taketani Y., Orimo H., and Ouchi Y., Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 92, 3431-3435 (1995)
10. Kawano H., Motoyama T., Kugiyama K., Hirashima O., Ohgushi M., Yoshimura M., Ogawa H., Okumura K., and Yasue H., Menstrual cyclic variation of endothelium-dependent vasodilation of the brachial artery: possible role of estrogen and nitric oxide. *Proceedings of the Association of American Physicians* 108, 473-480 (1996)
11. English JL., Jacobs LO., Green G., and Andrew TC., Effect of the menstrual cycle on endothelium-dependent vasodilation of the brachial artery in normal young women. *The American Journal of Cardiology* 15, 256-258 (1998)

12. Kawano H., Motoyama T., Ohgushi M., Kugiyama K., Ogawa H., and Yasue H., Menstrual cyclic variation of myocardial ischemia in premenopausal women with variant angina. *Annals of Internal Medicine* 135, 977-981 (2001)
13. Walsh B.W., Schiff I., Rosner B., Greenberg L., Ravnikar V., and Sacks F., Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *The New England Journal of Medicine* 325, 1196-1204 (1991)
14. Anderson PW., Cox DA., Sashegyi A., Paul S., Silfen SL., and Walsh BW., Effects of raloxifene and hormone replacement therapy on markers of serum atherogenicity in healthy postmenopausal women. *Maturitas* 39, 71-77 (2001)
15. Vongpatanasin W., Tuncel M., Mansour Y., Arbique D., and Victor R.G., Transdermal estrogen replacement therapy decreases sympathetic activity in postmenopausal women. *Circulation* 103, 2903-2908 (2001)
16. Weitz G., Elam M., Born J., Fehm H.L., and Dodt C., Postmenopausal estrogen administration suppresses muscle sympathetic nerve activity. *The Journal of Clinical endocrinology and metabolism* 86, 344-348 (2001)
17. Seibel M. M., Treating hot flashes without hormone replacement therapy. *The Journal of Family Practice* 52, 291-296 (2003)
18. Plouffe L. Jr., Selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice. *Journal of the Society Gynecologic Investigation* 7(1 Suppl), S38-46 (2000)
19. Brzozowski A.M., Pike A. C., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engström O., Ohman L., Greene G. L., Gustafsson J. A., and Carlquist M., Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758 (1997)
20. Thomas T. Y. W., Neeraja S., and James M. P., Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis* 17, 271-275 (1996)
21. Sherman W., Day T., Jacobson M.P., Friesner R.A., Farid R., Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 534-553 (2006)
22. Delmas P. D., Bjarnason N. H., Mitlak B. H., Ravoux A. C., Shah A. S., Huster W. J., Draper M., and Christiansen C., Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine* 337, 1641-1646 (1997)
23. Kauffman R. F., Bensch W. R., Roudebush, R. E., Cole H. M., Bean J. S., Phillips D. L., Monroe A., Cullinan G. J., Glasebrook A. L., and Bryant H. U., Hypocholesterolemic activity of raloxifene (LY139481): pharmacological characterization as a selective estrogen receptor modulator. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 280,146 (1997)

24. Shanafelt T. D., Barton D. L., Adjei A., and Loprinzi, C. L., Pathophysiology and treatment of hot flashes. *Mayo Clinic Proceedings* 77, 1207-1218 (2002)
25. Qu Q., Zheng H., Dahllund J., Laine A., Cockcroft N., Peng Z., Koskinen M., Hemminki K., Kangas L., Väänänen K., and Härkönen P., Selective estrogenic effects of a novel triphenylethylene compound, FC1271a, on bone, cholesterol level, and reproductive tissues in intact and ovariectomized rats. *Endocrinology* 141, 809-820 (2000)
26. Shang Y., Brown M., Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295(5564), 2465-8 (2002)
27. Nagai R., Nagata S., Fukuya F., Higaki J., Rakugi H., and Ogihara T., Change in autonomic activity and baroreflex sensitivity with the hypertension process and age in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 30, 419-425 (2003)
28. Andrews H. E., Bruckdorfer K. R., Dunn R. C., and Jacobs M., Low-density lipoproteins inhibit endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Nature* 327, 237-239 (1987)
29. Tamai O., Matsuoka H., Itabe H., Wada Y., Kohno K., and Imaiizumi T., Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 95, 76-82 (1997)
30. Kon K. K., Yeal A. J., Hwan H. S., Kyu J. D., Sik K. H., Cheon L. K., Kyun S. E., and Sakuma I., Effects of fenofibrate on lipoproteins, vasomotor function, and serological markers of inflammation, plaque stabilization, and hemostasis. *Atherosclerosis* 174, 379-383 (2004)
31. Kharbanda R. K., Wallace S., Walton B., Donald A., Cross JM., and Deanfield J., Systemic Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibition reduces inflammation and improves vascular function in hypercholesterolemia. *Circulation* 111, 804-807 (2005)
32. Chao Y., Windler E. H., Chen G. C., and Havel R. J., Hepatic catabolism of rat and human lipoproteins in rats treated with 17 α -ethinyl estradiol. *The Journal of Biological Chemistry* 254, 11360-11366 (1979)
33. Ma P. T. S., Yamamoto T., Goldstein J. L., and Brown M. S., Increased mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of rabbits treated with 17 α -ethinyl estradiol. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 83, 792-796 (1986)
34. Saleh M. C., Connell B. J., and Saleh T. M., Autonomic and cardiovascular reflex response to central estrogen injection in ovariectomized female rats. *Brain Research* 879, 105-114 (2000)
35. Zoubina E. V., and Smith P. G., Sympathetic hyperinnervation of the uterus in the estrogen receptor alpha knock-out mouse. *Neuroscience* 103, 237-244 (2001)

36. Ross R., Atherosclerosis-An inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 340, 115-26 (1999)
37. Pávó I., Laszlo F., Morschl E., Nemcsik J., Berko A., Cox D.A., and Laszlo F.A., Raloxifene, an oestrogen-receptor modulator, prevents decreased constitutive nitric oxide and vasoconstriction in ovariectomized rats. *European Journal of Pharmacology* 410, 101-104 (2000)
38. Squadrito F., Altavilla D., Squadrito G., Saitta A., Cucinotta D., Minutoli L., Deodato B., Ferlito M., Campo G. M., Bova A., and Caputi A. P. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovascular Research* 45, 454-462 (2000)
39. González-Pérez J., and Crespo M. J., Chronic effects of toremifene on the vasculature of menopause-induced rats. *Vascular Pharmacology* 40, 261-268 (2004)
40. Xu X., Xiao J. C., Luo L. F., Wang S., Zhang J. P., Huang J. J., Liu M. L., Liu C. G., Xu K. Q., Li Y. J., and Song H. P., Effects of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. *International Journal of Cardiology* 14 (2007)
41. Huang P. L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K. D., Moskowitz M. A., Bevan J. A., and Fishman M. C., Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239-242 (1995)
42. Colditz G.A., Stampfer M.J., Willett W.C., Rosner B., Speizer F.E., Hennekens C.H., A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women. *American Journal of Epidemiology* 123, 48-58 (1986)
43. Rossouw J.E., Anderson G.L., Prentice R.L., LaCroix A.Z., Kooperberg C., Stefanick M.L., Jackson R.D., Beresford S.A., Howard B.V., Johnson K.C., Kotchen J.M., Ockene J: Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-333 (2002)
44. Mattar C.N., Harharah L., Su L.L., Agarwal A.A., Wong P.C., Choolani M., Menopause, hormone therapy and cardiovascular and cerebrovascular disease. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 37, 54-62 (2008)
45. Barrett-Connor E., Grady D., Sashegyi A., Anderson P.W., Cox D.A., Hozowski K., Rautaharju P., Harper K.D.; MORE Investigators (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation). Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: four-year results from the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) randomized trial. *JAMA* 287, 847-857 (2002)
46. Barrett-Connor E., Mosca L., Collins P., Geiger M.J., Grady D., Kornitzer M., McNabb

- M.A., Wenger N.K.; Raloxifene Use for The Heart (RUSH) Trial Investigators. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine* 355, 125-137 (2006)
47. Bradbury B.D., Lash T.L., Kaye J.A., Jick S.S., Tamoxifen-treated breast carcinoma patients and the risk of acute myocardial infarction and newly-diagnosed angina. *Cancer* 103, 1114-1121 (2005)
 48. Keech C.A., Sashegyi A., Barrett-Connor E., Year-by-year analysis of cardiovascular events in the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) trial. *Current Medical Research and Opinion* 21, 135-140 (2005)

第4章 結語

Ca拮抗性降圧剤は、高血圧治療における第一次選択薬であるが、心血管イベント発症の危険因子に対し、主作用の降圧作用以外に複数の軽減作用を有する薬剤は存在しない。攣縮性狭心症は、閉経後によく見られエストロオールが有効である(1)。エストロオールは、心血管イベント発症の危険因子に対し、複数の軽減作用を有するが、性ホルモン作用の副作用を有し、決して高い満足度に達していない(1, 2)。このような背景のもと、本研究の課題を「先行剤の副作用を改善し、心血管イベント発症の危険因子に対し複数の軽減作用を有する単剤」とし、新規なCa拮抗性の降圧剤ならびに攣縮性狭心症治療薬の創製を行った。以下に本研究の成果を統括する。

(1) 複数の危険因子の軽減作用を有し、副作用の減弱したCa拮抗性の降圧剤の検証

黒川ら(4-6)は、高血圧以外の危険因子として、高脂血症ならびに酸化ストレスに着目し、血管拡張作用と脂質代謝制御に関与する $\alpha 1$ 受容体遮断作用を有するcyclohexylaralkylamineを出発点とし、既存のCa拮抗薬であるジルチアゼムならびにフルナリジンを参考にし、既存のCa拮抗性降圧剤と構造を全く異にするモナテピルを見出した。本研究では、モナテピルが、複数の危険因子の軽減作用を有し、副作用の少ない薬理学的プロファイルを有するか検証した。モナテピルは、主作用の高血圧に対し各種高血圧モデルにおいて、心拍数の変動の少ない緩徐で持続的な降圧作用を示した。また、連続投与においても良好な安定した血圧コントロールを示した。次に、1つ目の危険因子の軽減として、高脂血症の改善作用を高コレステロール食負荷ウサギならびにサルモデルで検討したところ、血中コレステロールならびに悪玉コレステロールであるLDL(β リポ蛋白)増加の改善作用が認められた。本作用には、血中コレステロールの肝臓LDL受容体を介した異化排泄亢進作用の関与が示唆された。2つ目の危険因子軽減作用として、酸化ストレスに対する抗酸化作用をミトコンドリアの過酸化評価系で検討したところ、抗酸化作用が認められた。これらの複数の危険因子軽減(高脂血症ならびに酸化ストレス改善作用)作用より、心血管イベントの直接原因である動脈硬化病変に対する作用をヒト類似モデルである高コレステロール食負荷サルモデルで検討した(7-10)。モナテピルは、高コレステロール食負荷により増加した血中悪玉コレステロールであるLDLを改善した。また、動脈硬化病変に対する指標である血管中コレステロール含量ならびにズダンIV染色陽性面積も著明に改善した。さらに、冠血管の連続切片における動脈硬化病変の発現頻度を評価したところ、コレステロール食負荷群で4/7例であったが、モナテピル群は5例全例に病変を認めなかった。動脈硬化病変の病理像において、モナテピルは著明な泡沫細胞の減少を示し、抗酸化作用を推察するものであった。以上の事から、複数の危険因子軽減作用を有するCa拮抗性降圧剤は、心血管イベント発症の直接原因である動脈硬化病変形成抑制に有効であり、モナテピルがそれにふさわしい薬剤である事を新たに見出した。

(2) 複数の危険因子の軽減作用を有し、副作用の減弱した SERM の創製

エストロゲン受容体活性を目的に、 17β -エストラジオールならびに **Benzestrol** を参考にスピロ骨格を母核に導入し、側鎖には性ホルモン作用の弱いラロキシフェンの側鎖であるフェノキシエチルピペリジンならびにピペラジン誘導体を導入した。結果、側鎖のピペリジン環の窒素 (N) 原子がエストロゲン受容体の 351 番目のアスパラギン酸に結合し、本結合部位は比較的許容範囲が大きいことが、薬物動態面において影響を及ぼしやすいことがわかった。また、ピペラジン誘導体においては、受容体活性とともに強いコレステロール低下作用も認められたが、コレステロール低下試験における用量反応性を有さず、高用量での子宮に対する強い作用などを有していた。これらの構造活性相関の結果から、**OS-0689** が本研究課題にふさわしい化合物として示唆された。まず第 1 に、**OS-0689** のエストラジオールに比較した子宮に対する作用を検討したところ、極めて弱く、ラロキシフェンとほぼ同等であることがわかった。ラロキシフェンのヒトにおける子宮に対する作用が問題になっていない事より、本結果は **OS-0689** のヒトにおける子宮に対する作用の懸念は少ない事を示唆する。次に、**OS-0689** の複数の危険因子の軽減作用に対し、卵巣摘出モデルで検討したところ、血中コレステロールならびに増加した交感神経活性の改善作用が認められた。これらの複数の危険因子軽減（高コレステロール血症ならびに交感神経活性改善作用）作用より、心血管イベントの直接原因である攣縮に寄与する血管内皮機能障害に対する作用を卵巣摘出モデルで検討した。**OS-0689** は、卵巣摘出により生じた血管内皮機能障害を *in vivo* ならびに *ex vitro* 評価法において有意に改善した。以上の事から、**OS-0689** は複数の危険因子軽減作用を有し、性ホルモン（子宮重量増加）作用の少ない SERM であり、攣縮性狭心症に対し有効性を示す期待できる薬剤である事を見出した。

心血管イベント発症予防を目的とした複数の危険因子の軽減作用が、そのイベント発症における直接原因である動脈硬化病変の形成抑制ならびに攣縮に寄与する血管内皮機能障害の改善に結び付くことから、心血管イベント発症予防に向けた複数の危険因子軽減は意義がある事が立証できた。また、複数の危険因子の軽減作用を単剤で達成した事についても、医薬品開発としての高い価値を示すものである。

【参考文献】

1. Kawano H., Motoyama T., Hirai N., Kugiyama K., Ogawa H., and Yasue H., Estradiol supplementation suppresses hyperventilation-induced attacks in postmenopausal women with variant angina. *Journal of the American College of Cardiology* 37, 735-740 (2001)
2. Seibel M. M., Treating hot flushes without hormone replacement therapy. *The Journal of Family Practice* 52, 291-296 (2003)
3. Plouffe L. Jr., Selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 7(1 Suppl), S38-46 (2000)
4. 黒川美貴雄, 新規カルシウム拮抗薬としてのジベンゾチエピン誘導体の合成研究, 博士論文, 京都薬科大学 (1993 年)
5. Kurokawa M., Sato F., Hatano N., Honda Y., and Uno H., A new class of calcium antagonists. Synthesis and biological activity of 11-[(omega-aminoalkanoyl)amino]-6,6a,7,8,9,10,10a,11-octahydrodibenzo [b,e]thiepin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 34, 593-599 (1991)
6. Kurokawa M., Sato F., Fujiwara I., Hatano N., Honda Y., Yoshida T., Naruto S., Matsumoto J., and Uno H., A new class of calcium antagonists. 2. Synthesis and biological activity of 11-[[4-[4-(4-fluorophenyl)-1-piperazinyl]butyryl]amino]-6,11-dihydrodibenzo[b,e]-thiepin maleate and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 34, 927-934 (1991)
7. Prathap K. Diet-induced aortic atherosclerosis in Malaysian long-tailed monkeys (*Macaca irus*). *The Journal of Pathology* 115, 163-174 (1975)
8. Malinow M.R., McLaughlin O., Papworth L., Naito H.K., Lewis L., McNulty W.P., A model for therapeutic interventions on established coronary atherosclerosis in a nonhuman primate. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 67, 3-31 (1976)
9. Williams J.K, Anthony M.S, Clarkson T.B. Coronary heart disease in rhesus monkeys with diet-induced coronary artery atherosclerosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 115, 784-790 (1991)
10. Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 4, 341-356 (1984)

第5章 今後の展開

心血管イベント発症の予防を目的に、そのイベント発症の危険因子に対し、一つの危険因子を軽減する単剤の組み合わせ処方、コンプライアンスの低下、副作用ならびに薬効の増減のリスクを伴う中、複数の危険因子の軽減作用を有する単剤が、動脈硬化病変改善あるいは血管機能改善作用を示した事は、今後単剤でさらなる多くの危険因子を軽減できる薬剤開発に進むものと思われる。

Ca拮抗性降圧剤における複数の危険因子軽減は、モナテピルがヒト臨床治験において降圧作用ならびに脂質代謝改善作用を示している(1,2)事から、本研究と同様、ヒトにおける動脈硬化病変改善作用に伴う心血管イベントの発症予防が期待できる。今後心血管イベント発症における医療費の圧迫を軽減する事が期待され、さらにモナテピルよりも多くの危険因子軽減作用を有する薬剤の開発を促進するものと考えられる。また、モナテピルはラセミ体である事から、今後分割体での検討を行う事により、さらなる強い薬理活性が期待できる。

複数の危険因子の軽減作用を有し、性ホルモン作用の弱いSERMであるOS-0689は、エストラジオールより満足度の高い治療薬になる事が期待できる。OS-0689は、性ホルモン作用においてエストラジオールと異なるプロファイルを有し、また閉経後のホットフラッシュに対しラロキシフェンとも異なる薬理的プロファイルを有する事も報告されている(3)。本試験においても、受容体との結合時における立体配置が異なる事も認められている(Figure 5-1)。これらの結果は、新たな第3世代SERMの開発を促進するものと考えられる。また、受容体とリガンドの結合関係のみならず第3の主役であるコファクターの同定も含めたコファクターからのアプローチする新しいSERMの開発ならびに核内受容体の発展が期待できると考えられる。

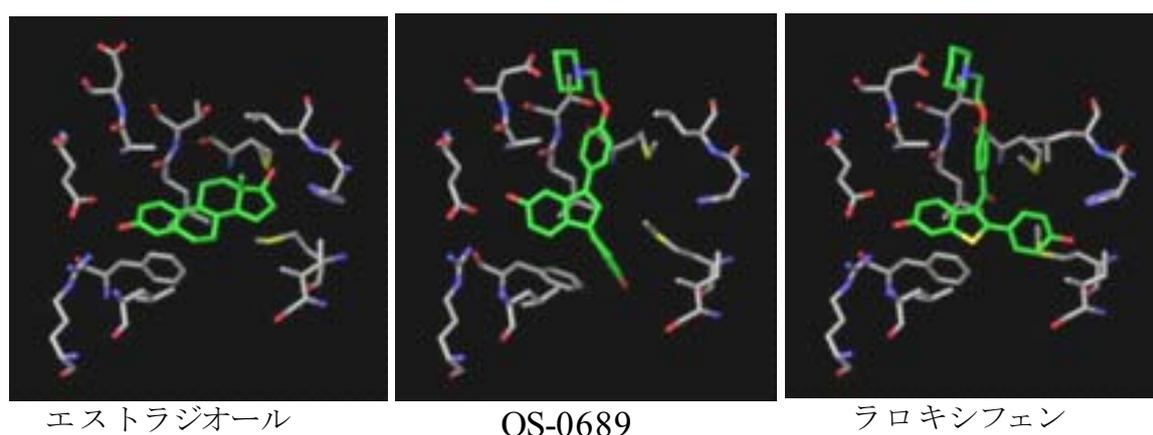


Figure 5-1. エストラジオール受容体とのドッキングスタディ

【参考文献】

1. Tsusima M., Koh H., Suzuki M., Kyotani S., Waki M., Nishioeda Y., Harano Y., and Omae T., Noninvasive quantitative evaluation of early atherosclerosis and the effect of Monatepil, a new antihypertensive agent: an interim report. *American Journal of Hypertension* 7(10 Pt2), 161S-166S (1994)
2. Ishii M., Imura O., Yoshinaga K., Abe K., Inagaki Y., Yagi S., Kuramoto K., Kajiwara N., Saruta T., Kuramochi M., Mizuno Y., Takeda R., Takeda T., Ogihara T., Matsuoka H., Kajiyama G., Hiwada K., Arakawa K., Fujishima M., and Fukiyama K.,. The efficacy of monatepil, a new calcium antagonist, in the treatment of essential hypertension. *American Journal of Hypertension* 7(10 Pt 2), 141S-145S (1994)
3. Watanabe N., Ikeno A., Minato H., Nakagawa H., Kohayakawa C., Tsuji J., Discovery and preclinical characterization of (+)-3-[4-(1- piperidinoethoxy)phenyl]spiro[indene-1,1'-indane]-5,5'-diol hydrochloride: a promising nonsteroidal estrogen receptor agonist for hot flush. *Journal of Medicinal Chemistry* 46, 3961-3964 (2003)

謝辞

本論文を結ぶにあたり、終始厳しく懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 垣内喜代三教授に深甚なる感謝をし、心からのお礼を申し上げます。

また、本論文をまとめるに際し、詳細な御検討と貴重な御助言を賜りました、奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 廣田俊教授、谷原正夫教授、青野浩之教授、森本積准教授に濃厚な感謝をいたします。

元大阪医科大学 薬理学教室 宮崎瑞夫教授には、第2章におけるモナテピルの高コレステロール食負荷サルにおける抗動脈硬化試験を通して、多大なる御助言と御指導を賜りました。謹んで感謝申し上げます。

滋賀医科大学 動物生命科学研究センター 鳥居隆三教授には、第2章における高コレステロール食負荷サル試験を通して、御指導と御協力を頂くとともに、誠に温かい励ましを頂戴いたしました。ここに深く感謝いたします。

元大日本住友製薬（株）細木和博士には、第2章におけるモナテピルの薬理試験を通して、終始厳しく懇切なる御指導と御助言を賜りました。また、私の研究者としての基礎を築いて頂きました。謹んで感謝申し上げます。

大日本住友製薬（株）薬理研究所 辻淳一氏には、第3章における OS-0689 の創製と薬理試験において多大なる御助言と御指導を賜りました。謹んでお礼を申し上げます。

元大日本住友製薬（株） 渡邊信英博士には、第3章における OS-0689 の創製において、多大なる御助言と御指導を賜りました。謹んでお礼を申し上げます。

大日本住友製薬（株）元研究所本部長 横山雄一博士、副本部長および薬理研究所長 金岡昌治博士、元薬理第1研究部長 泰地睦夫博士には、奈良先端科学技術大学院大学の博士課程に入学する機会を与えて頂き、心から感謝いたします。

本研究にあたり、終始有益な御指導ならびに多くの御助言と御協力を賜った、元大日本住友製薬（株）、武山邦彦博士、藤谷武一博士、唐沢忠彦博士、増田義信博士、黒川美貴雄博士ならびに大日本住友製薬（株）湊久夫氏、安場正氏、黒野益夫博士に心より感謝いたします。

本研究にあたり、実験に御協力をして頂きました、大日本住友製薬（株）小早川千衣氏、加藤浩博士、中川拓士博士、富永幸雄博士ならびに元大日本住友製薬（株）隅谷俊紀氏、山田知子氏、岡崎欣正氏に心より感謝いたします。

最後に、惜しみない協力をしてくれた妻純子ならびに子供達の早智、真由、友理に感謝し、謝辞の結びとします。

研究業績リスト

以下に、本論文に関連する論文、学会発表、特許についてまとめる。

【学位に用いた学術雑誌掲載論文リスト】

1. A. Ikeno, I. Nose, F. Fukuya, H. Minato, K. Takeyama, K. Hosoki, T. Karasawa, Antihypertensive Effects of AJ-2615, a New Calcium Antagonist with α 1-Adrenergic Blocking Activity in Experimental Hypertensive Animals, *Journal Cardiovascular Pharmacology* 21, 815-821 (1993).
2. H. Minato, A. Ikeno, T. Yamada, H. Kato, K. Zushi, M. Kurokawa, Y. Masuda, K. Hosoki, T. Karasawa, Inhibitory Effect of the New Calcium Antagonist AJ-2615 on Progression of Atherosclerosis in Cholesterol-fed Rabbits, *Journal Cardiovascular Pharmacology* 21, 663-669 (1993).
3. M. Miyazaki, K. Hosoki, H. Okunishi, K. Ishii, A. Ikeno, Y. Okazaki, Anti-atherosclerotic and Plasma Lipid Lowering Effects of the Novel Calcium Blocker with α 1-Adrenoceptor Antagonistic Activity, Monatepil, in High Cholesterol Diet-fed Japanese Macaca fuscata Monkeys, *Arzneimittel- Forschung/Drug Research* 44(I), 3, 288-297 (1994).
4. A. Ikeno, T. Sumiya, H. Minato, B. Fujitani, Y. Masuda, K. Hosoki, M. Kurono, M. Yasuba, Effects of Monatepil Maleate, a New Ca^{2+} Channel Antagonist With α 1-Adrenoceptor Antagonistic Activity, on Cholesterol Absorption and Catabolism in High Cholesterol Diet-Fed Rabbits, *Japanese Journal of Pharmacology* 78, 303-312 (1998).
5. N. Watanabe, A. Ikeno, H. Minato, H. Nakagawa, C. Kohayakawa, J. Tsuji, Discovery and Preclinical Characterization of (+)-3-[4-(1-Piperidinoethoxy) phenyl]spiro[indene-1, 1'-indane]-5,5'-diol hydro-chloride: A Promising Nonsteroidal Estrogen Receptor Agonist for Hot Flush, *Journal of Medicinal Chemistry* 46, 3961-3964 (2003).
6. N. Watanabe, H. Nakagawa, A. Ikeno, H. Minato, C. Kohayakawa, J. Tsuji, 4-(4-Alkylpiperazin-1-yl)phenyl Group : A Novel Class of Basic Side Chains for Selective Estrogen Receptor Modulators, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 4317-4320 (2003).
7. A. Ikeno, H. Minato, C. Kohayakawa, J. Tsuji. Effect of OS-0544, a selective estrogen receptor modulator, on endothelial function and increased sympathetic activity in ovariectomized rats, *Vascular Pharmacology*, in press, (2008)

【参考とする学術雑誌掲載論文リスト】

1. K. Takeyama, H. Minato, A. Ikeno, K. Hosoki, T. Kadokawa, Antihypertensive mechanism of alacepril: effect on norepinephrine-induced vasoconstrictive response in vitro and in vivo, *Arzneimittelforschung* 36(1):74-77 (1986)
2. K. Takeyama, A. Ikeno, H. Minato, F. Fukuya, S. Nishimura, K. Hosoki, T. Kadokawa Cadralazine in Experimental Hypertensive Rats, *Archives internationals de Pharmacodynamie et de Therapie* 291, 163-174 (1988)
3. I. Nose, T. Kataoka, Y. Honda, T. Yamada, A. Ikeno, F. Fukuya, H. Minato, K. Takeyama, K. Hosoki, T. Kadokawa In vitro and in vivo Electrocardiographic Evaluation of the Novel Calcium Antagonist Monatepil on Cardiac Conduction System, *Arzneimittel-Forschung/Drug Reseach* 43 (II), 7, 722-728 (1993).
4. T. Sumiya, A. Ikeno, H. Kato, B. Fujitani, Y. Masuda, K. Hosoki, M. Miyazaki, Inhibitory Effect of Monatepil Maleate on Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase Activity in the Liver of Cholesterol-Fed Japanese monkeys, *Arzneimittel-Forschung/Drug Reseach* 43 (II), 7, 722-728 (1993)
5. M. Hisao, A. Ikeno, N. Watanabe, J. Tsuji, Effect of OS-0689, a novel SERM, on periarterial nerve function in tail arteries of ovariectomized rats, *Maturitas*, 51, 434-441 (2005)

【学会発表】

1. 池野明久、隅谷俊紀、湊久夫、藤谷武一、増田義信、細木和、「高コレステロール食負荷ウサギにおけるコレステロール吸収ならびに異化排泄に対する monatepil の作用」、第 68 回日本薬理学会年会 1995/03/25 開催 (名古屋)
2. A. Ikeno, H. Minato, C. Kohayakawa, N. Watanabe, H. Nakagawa, J. Tsuji, OS-0689: A novel selective estrogen receptor modulator with unique biological profiles in hot flush models, ACS National Meetings (2003/09/07-11, New York)
3. N. Watanabe, A. Ikeno, H. Minato, C. Kohayakawa, J. Tsuji, K. Chiba, Spiro[indene-1, 1'-indane]-5, 5'-diols : A Novel Class of Selective Estrogen Receptor Modulators, ACS National Meetings (2003/09/07-11, New York)

【特許】

1. 増田義信、湊久夫、池野明久、武山邦彦、細木和、血中脂質代謝改善薬、
2. 渡邊信英、中川拓士、辻淳一、湊久夫、池野明久、小早川千衣、スピロ化合物、それを含有する医薬品組成物及び該化合物の中間体、