

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15319

研究課題名(和文) 選択的BRAF阻害剤のポドサイト保護・毒性作用を決定付ける真の標的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of the molecules that determine the renoprotective and nephrotoxic effects of BRAF inhibitors.

研究代表者

真川 明将 (Sanagawa, Akimasa)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：20827670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、BRAFに対する分子標的薬が腎保護作用から腎毒性作用まで多様な作用を示すことから、その作用に直接寄与する分子を特定することを目的としました。腎保護作用を示すBRAF阻害薬GDC-0879については適した実験評価系が構築できませんでした。その一方で、腎毒性を示すBRAF阻害剤ベムラフェニブについては、尿細管上皮細胞で細胞毒性を確認できました。また、ベムラフェニブ誘導体を合成し、腎毒性を維持したリンカー付加化合物を取得することができました。この化合物からベムラフェニブ固定化ナノ磁気ビーズを作成し、標的分子の特定を試みました。その結果、いくつかの標的候補分子を得ることができました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、BRAF阻害剤ベムラフェニブがヒト腎由来尿細管上皮細胞に対して細胞毒性を示すことを明らかにすることができました。また、ベムラフェニブにリンカーを付加した化合物を取得し、それが腎毒性を維持していることも確認できました。この化合物からベムラフェニブ固定化ナノ磁気ビーズを作成し、ベムラフェニブの腎毒性に関わる標的分子の候補をいくつか取得することができました。今後、これらの標的分子の候補に着目した研究を進めることで、安全ながん分子標的薬の開発に貢献する情報が得られる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the various effects of BRAF inhibitors, ranging from renoprotective to nephrotoxic effect. Therefore, the aim is to identify the molecules that directly contribute to these effects. The suitable experimental evaluation system for renoprotective BRAF inhibitor GDC-0879, was not constructed eventually. On the other hand, we evaluated the nephrotoxic effect of vemurafenib. Additionally, we obtained the linker-added vemurafenib derivative that maintained nephrotoxicity. we prepared vemurafenib-binding beads by using this compound, and conducted the chemical pull-down assay. As the results, we obtained some candidates of vemurafenib-binding molecules.

研究分野：医療系薬学

キーワード：薬剤性腎障害 ケミカルバイオロジー 構造活性相関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ポドサイトは、糸球体ろ過バリア機能を構成する重要な役割を担うが、最終分化細胞であるために再生しない腎細胞といわれており、ポドサイト障害が進むと不可逆的な糸球体硬化が生じる。従来薬に糸球体硬化を改善する効果を有するものはなく、慢性腎臓病の患者の増加を抑えるため、ポドサイトを標的とする薬の保護・毒性作用に関わる因子の特定およびその分子機構の解明が望まれる。海外の研究チームからは、選択的 BRAF 阻害剤 GDC-0879 は Thapsigargin の小胞体ストレスによるポドサイト障害から保護する作用を有することが報告された (Sieber J, et al. *Cell Chemical Biology* 2018; 25 (2): 175-184)。しかしながら、同じ選択的 BRAF 阻害剤であるベムラフェニブでは臨床において腎障害を引き起こすことが知られており、このポドサイト保護作用には BRAF 以外の標的分子に関わる可能性があるのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

先行研究で報じられたポドサイトにおける選択的 BRAF 阻害剤 GDC-0879 の保護作用につながる真の標的分子をインビトロ実験系から同定することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

ヒト腎由来ポドサイト初代培養細胞 GEpC は Cell Applications 社からを購入した。アドリアマイシン (ADR) によるポドサイト細胞の傷害を引き起こし、GDC-0879 が先行研究と同様の細胞保護作用を示すか検討をおこなった。

## 4. 研究成果

### BRAF 阻害剤 GDC-0879 の腎保護作用の検討

選択的 BRAF 阻害剤ベムラフェニブとダブラフェニブと GDC-0879 を GEpC に作用させるとベムラフェニブと GDC-0879 は細胞生存率を低下させた。その一方で、ダブラフェニブは細胞生存率を低下させなかった。また、ADR による GEpC の細胞生存率低下を GDC-0879 は改善することはできなかった。これらの結果は、先行研究と全く異なる結果を示している。その理由として、先行研究ではマウスの温度感受性不死化ポドサイト細胞株を使用しており、本研究で使用しているポドサイトの培養細胞とは異なる細胞を使用していることが影響していると考えられた。

以上、先行研究と同じ不死化ポドサイト細胞を培養するための設備を整えることができないため、GDC-0879 のポドサイト保護作用 (および毒性作用) につながる標的を同定する当初の計画を継続できなくなってしまった。そのため、もう一方で進めていた BRAF 阻害剤の腎毒性についての計画を進めることになった。

## BRAF 阻害剤ベムラフェニブの腎毒性作用の検討

本計画と並行して申請者は、選択的 BRAF 阻害剤のベムラフェニブの種々のヒト腎由来培養細胞 RPTEC への細胞毒性作用を検討していた際に、ベムラフェニブは強い尿細管細胞毒性を有することを見出していた。他の BRAF 阻害剤であるダブラフェニブについても腎毒性評価をおこなったところ、ダブラフェニブには各種腎細胞に毒性を示さないことも明らかになった。そこで、この報告を *Anti-Cancer Drugs* 誌に報告したところ受理された (Sanagawa A, et al. *Anti-Cancer Drugs* 2020; 31 (2): 183-189)。この論文を発表した同時期に、海外の研究チームからベムラフェニブの尿細管毒性には BRAF の阻害作用は関わらず、フェロキラーゼの阻害作用が関わることが報告された (Bai Y, et al. *Kidney Int.* 2020; 100 (6): 1214-1226)。しかしながら、この尿細管毒性作用はフェロキラーゼ阻害作用のみでは説明が付かないため、尿細管毒性に直接関与する未知標的分子の存在が疑われた (図 1)。そのため、BRAF 阻害剤ベムラフェニブの尿細管毒性に関わる未知標的分子を特定する計画を進めることにした。

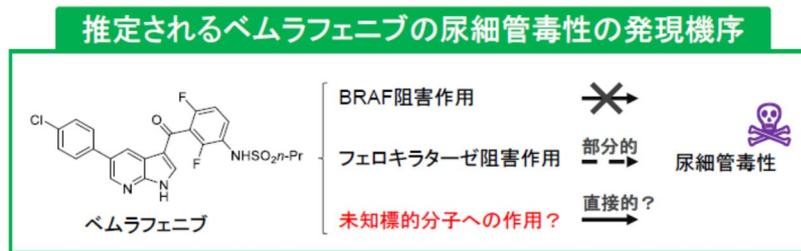


図 1. BRAF 阻害剤ベムラフェニブの尿細管毒性の発現機序に関する仮説

ベムラフェニブの誘導体を合成し、それらを尿細管上皮細胞に曝露させ、細胞生存率と細胞傷害性を指標として細胞毒性評価をおこなった。その結果、ベムラフェニブのクロロフェニル側にリンカーを付加した化合物 V-2 では、ベムラフェニブと同等の尿細管毒性が維持されることが明らかになった。そこで、V-2 から保護基を外した V-3 と NHS 修飾ナノ磁気ビーズを反応させ、ベムラフェニブ固定化ナノ磁気ビーズ (VEM ビーズ) を取得した。VEM ビーズをもちいて尿細管上皮細胞の抽出液から化学的免疫沈降をおこない、電気泳動・銀染色で確認すると、膜/オルガネラ画分において 3 つのバンドが確認された。質量分析法によるプロテオーム解析からこれらのバンドのうち 2 つはミトコンドリア局在蛋白で、1 つは調節因子であることが明らかになった (図 2)。現在、ミトコンドリアの傷害や機能変化に着目しながら、VEM の尿細管毒性の発現機序についてさらなる検討を進めている。

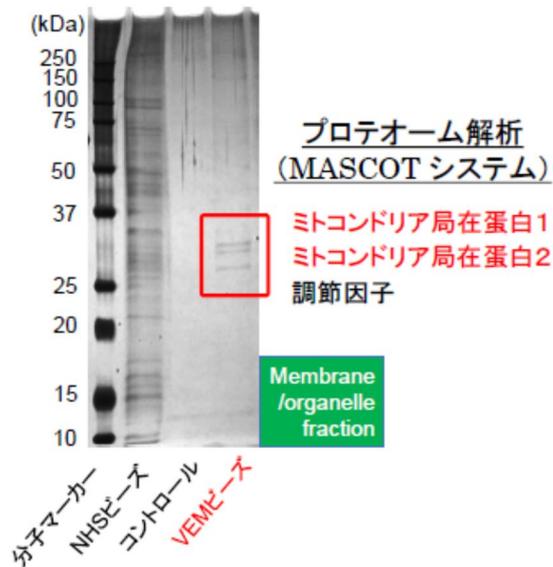


図 2. ベムラフェニブの尿細管毒性に関わる標的候補分子

ベムラフェニブの腎毒性に關与する標的分子の特定とは別に、ベムラフェニブの腎毒性の性質を評価するための検討についても進めている。RPTEC にベムラフェニブを曝露し 24 時間後にアポトーシス・ネクローシス・生細胞アッセイ (7-ADD・Apopxin・Cytocalcein による染色) をおこなった。この結果に関しては、一部の細胞ではアポトーシス・ネクローシス様の染色がみられるが、多くの細胞は Cytocalcein で染まるため 24 時間の時点では生存していることが明らかになった。光学顕微鏡を用いた 24 時間のタイムラプス観察においては、多くの細胞の運動や増殖が抑制されている様子が観察された。細胞死については、奇妙な細胞形態の細胞があらわれるため、この細胞の詳細についても解析を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tomita Natsumi, Hotta Yuji, Naiki-Ito Aya, Sanagawa Akimasa, Kataoka Tomoya, Furukawa-Hibi Yoko, Takahashi Satoru, Kimura Kazunori	4. 巻 149
2. 論文標題 Protective effects of tadalafil on damaged podocytes in an adriamycin-induced nephrotic syndrome model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 53 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpsh.2022.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kataoka Tomoya, Hidaka Junya, Suzuki Jun, Mori Taiki, Nakamura Daigaku, Hotta Yuji, Sanagawa Akimasa, Maeda Yasuhiro, Furukawa-Hibi Yoko, Kimura Kazunori	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluating the Effects of Low Carbohydrate and High Protein Diet on Erectile Function in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sexual Medicine	6. 最初と最後の頁 100500 ~ 100500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.esxm.2022.100500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kataoka Tomoya, Kawaki Yuto, Kito Yohei, Suzuki Jun, Mori Taiki, Hotta Yuji, Sanagawa Akimasa, Kawade Yoshihiro, Maeda Yasuhiro, Furukawa-Hibi Yoko, Kimura Kazunori	4. 巻 10
2. 論文標題 Gosha-Jinki-Gan Improved Erectile Dysfunction Caused by Anti-Cancer Agent Oxaliplatin by Decreasing Transcriptional Expression of Phosphodiesterase-5 in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sexual Medicine	6. 最初と最後の頁 100484 ~ 100484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.esxm.2021.100484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kataoka Tomoya, Sanagawa Akimasa, Suzuki Jun, Muto Tatsuya, Hotta Yuji, Kawade Yoshihiro, Maeda Yasuhiro, Tohkin Masahiro, Kimura Kazunori	4. 巻 10
2. 論文標題 Influence of anticancer agents on sexual function: An in vivo study based on the US FDA Adverse Event Reporting System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 166 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.13094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sanagawa Akimasa, Hotta Yuji, Mori Nanaka, Tomita Natsumi, Kataoka Tomoya, Tohkin Masahiro, Kimura Kazunori	4. 巻 32
2. 論文標題 BRAF/MEK inhibitor-associated nephrotoxicity in a real-world setting and human kidney cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anti-Cancer Drugs	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CAD.0000000000001106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 野田 みすず, 富田 なつみ, 真川 明将, 片岡 智哉, 日比 陽子, 堀田 祐志, 木村 和哲
2. 発表標題 Phosphodiesterase-5阻害剤tadalafilの腎線維化抑制効果のメカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片岡智哉, 真川明将, 堀田祐志, 日比陽子, 木村和哲
2. 発表標題 テストステロン補充療法は抗炎症 作用を介して抗がん剤ドキシソルピシンに伴う性機能障害を改善させる
3. 学会等名 第95回日本薬理 学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片岡智哉, 真川明将, 堀田祐志, 日比陽子, 木村和哲
2. 発表標題 ピンクリスチン投与に伴う男性 性機能障害に対する新規治療法の探求-ラットを用いたDPP-4阻害薬の効果の薬理学的 アプローチ-
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真川明将, 富田なつみ, 瀬崎らら, 堀田祐志, 木村和哲
2. 発表標題 シスプラチン腎障害時における 老化尿細管細胞の役割解明
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2021/第29回クリニカルファーマシー シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hotta Y, Tomita N, Yamamoto Y, Naiki-Ito A, Sanagawa A, Kondo M, Kataoka T, Takahashi S, Kimura K
2. 発表標題 Serum trace metal changes could potentially indicate kidney damage in rats with cisplatin- induced kidney injury
3. 学会等名 American Society of Nephrology 2021 Kidney Week. 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------