

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08457

研究課題名(和文)血管新生阻害薬によるたん白尿発現メカニズム解明と副作用回避法の研究

研究課題名(英文)Elucidation of proteinuria expression mechanism by angiogenesis inhibitors and research on adverse effect avoidance

研究代表者

工藤 賢三 (KUDO, Kenzo)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：30275531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん薬物療法においてvascular endothelial growth factor (VEGF)-Aを標的とした抗体医薬品であるベバシズマブは、代表的な有害事象であるたん白尿の発現によって治療中断や重篤な腎障害を引き起こすことがある。ベバシズマブ投与によるたん白尿発現メカニズムを、ヒト腎系球体内皮細胞をモデルとして用い、腎障害の重要な因子であるエンドセリンに着目し、評価した。研究によりベバシズマブはエンドセリン産生を促進することを見出した。このエンドセリンが糸球体機能に影響を与え、たん白尿を発現させていることが示唆された。本研究の成果により、たん白尿回避のための更なる発展が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん薬物療法において、血管新生阻害薬といわれるVEGFを標的としたモノクローナル抗体(抗VEGF抗体)やVEGF受容体型チロシンキナーゼ阻害薬(VEGFR-TKI)では、副作用としてたん白尿が高頻度でみられ、重篤な場合には治療の継続が困難になる場合もある。ベバシズマブが糸球体機能にエンドセリン産生促進を介して障害を及ぼしていることが示唆されたことにより、VEGF阻害薬の効果を減弱させることなく副作用を軽減させる方法の確立につながり、臨床において分子標的薬による抗がん剤治療の継続・完遂による治療成績の向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bevacizumab, an antibody drug that blocks angiogenesis by inhibiting vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, causes treatment interruption and serious renal damage due to the expression of proteinuria as a typical adverse event in cancer chemotherapy. The mechanism of proteinuria expression by bevacizumab administration was evaluated by focusing on endothelin, which is an important factor of renal injury, using human renal glomerular endothelial cells as a model. Our studies have found that bevacizumab promotes endothelin production. It was suggested that this endothelin affects glomerular function and expresses proteinuria. The research results can lead to further development for avoiding proteinuria.

研究分野：臨床薬学

キーワード：血管新生阻害薬 ベバシズマブ VEGF たん白尿 エンドセリン ヒト腎系球体内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は、血管新生や血管形成に関与している。VEGF は、主に血管内皮細胞表面にある VEGFR にリガンドとして結合し、血管内皮細胞の増殖・生存、透過性亢進、管腔形成促進、内皮細胞からの活性物質産生誘導などを引き起こす。増殖する腫瘍細胞は、間質液中に拡散する栄養だけでは不十分であるため、腫瘍細胞より VEGF を産生して血管を腫瘍中に引き込み、栄養や酸素を取り込み、腫瘍壊死を回避する (文献 1)。さらに、VEGF の過剰発現は腫瘍の血管増生や転移と関連し、また腫瘍の進行や予後不良と相関することが様々ながん種で報告され、VEGF を標的にした分子標的薬が数多く登場している (文献 2)。

この VEGF シグナリングの阻害薬は、ベバシズマブやラムシルマブなどの抗 VEGF 抗体、スニチニブやアキシチニブなどの VEGF 受容体型チロシンキナーゼ阻害薬 (VEGFR-TKI) があり、がん治療において重要な役割を担っている。しかし、これら VEGF 阻害薬の使用では、たん白尿や高血圧といった従来の殺細胞性の抗がん剤にはなかった副作用が問題となるようになった。この副作用は、正常血管内皮細胞の生存と維持に必須である VEGF シグナルが遮断されることによる主に正常血管に対する傷害から起こると考えられている。たん白尿は、VEGF 阻害薬を使用した患者の 10~40% でみられ、高頻度に起きる副作用の一つである (文献 3)。また、頻度は低いがネフローゼ症候群のような重篤な腎障害をきたす場合もある。高度のたん白尿は、従来の抗がん剤治療にベバシズマブを併用することで、併用しない場合の約 5 倍に増加することも報告されている (文献 4)。高度のたん白尿が認められた場合には、VEGF 阻害薬の投与を中止するなど適切な処置が必要となり、治療の継続が困難になる場合もある。そのため、VEGF 阻害薬の投与期間中は、定期的に尿たん白を腎障害の指標とし、モニタリングすることが推奨されているが (文献 5) 用量制限因子となるたん白尿を軽減させる有効な方法は確立していないのが現状である。当該研究では、研究期間内に VEGF 阻害薬によるたん白尿の増悪因子を見だし、VEGF 阻害薬の効果を減弱させることなく副作用を軽減させる方法を確立することを目的とする。そして、がん治療における分子標的薬の副作用低減により継続・完遂によるがん治療成績の向上に寄与したい。

2. 研究の目的

近年のがん薬物療法では、分子標的薬による治療が中心になりつつあり、従来の殺細胞性の抗がん剤治療でみられる副作用は減少したが、これまでにはなかった分子標的薬特有の副作用がみられるようになった。血管新生阻害薬といわれる VEGF を標的としたモノクローナル抗体 (抗 VEGF 抗体) や VEGF 受容体型チロシンキナーゼ阻害薬 (VEGFR-TKI) では、副作用としてたん白尿が高頻度でみられ、重篤な場合には治療の継続が困難になる場合もある。しかし、これら VEGF 阻害薬によるたん白尿は、いかなる機序で発生するのか詳細な機序は明らかになっておらず、有効な対処法も確立していない。当該研究においては、VEGF 阻害薬によるたん白尿の増悪因子を見だし、VEGF 阻害薬の効果を減弱させることなく副作用を軽減させる方法の確立し、分子標的薬による抗がん剤治療の継続・完遂による治療成績の向上を目指す。

3. 研究の方法

たん白尿は、腎臓の糸球体ろ過障壁に障害が起きることによって生じるため、腎障害鑑別の重要な所見となる。また、たん白尿自体が腎障害を起こし、たん白尿が多いと腎不全の進行が早いこと知られている (文献 6)。糸球体ろ過は、内皮細胞、基底膜、足細胞で形成されたろ過障壁を通して行われる。糸球体ろ過障壁の正常機能およびシステム修復には、足細胞より産生される VEGF と内皮細胞にある VEGF 受容体 (VEGFR) との相互作用が不可欠である (文献 7)。VEGF 阻害薬により VEGF シグナルが遮断されると、糸球体内圧の上昇、足細胞の障害、内皮細胞の障害、血栓性微小血管障害が起こり、結果としてたん白尿を生じると考えられている (文献 8)。一方で、腎組織におけるエンドセリンの発現は、糸球体や尿細管で顕著であり、水とナトリウムの排泄、および酸-塩基バランスを調節する働きをしている (文献 9)。腎病理生理学的におけるエンドセリンシステムの亢進は、肥大、炎症、細胞外マトリックスの蓄積を促進し、様々な腎疾患の進行と関連する (文献 10, 11)。そこで、糸球体を構成するヒト腎糸球体内皮細胞を用い、腎障害と関連するエンドセリン産生を評価した。

(1) 初代培養細胞であるヒト腎糸球体内皮細胞を用いた。細胞は、Attachment Factor でコーティングした 60mm ディッシュにコンフルエントとなる $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$ で播種した。5~9 継代の細胞を使用し、37℃、5%CO₂ の条件で培養した。細胞播種の 24 時間後に無血清培地に交換し、次いでその 24 時間後に各試験薬で処理した。

(2) 細胞内のタンパク質発現量はウエスタンブロッティング法で評価した。また、培養上清中のエンドセリン濃度は ELISA キットにより測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト腎糸球体内皮細胞のエンドセリンに対する VEGF-A の影響

まず初めに、ヒト腎糸球体内皮細胞のエンドセリン発現に対する VEGF-A の影響を調べるために、VEGF-A (50ng/mL) を添加し、6、12、24 時間培養し、培養細胞中のエンドセリンタンパクをウエスタンブロッティング法で評価した。VEGF-A の存在により、細胞中のエンドセリンが減少することが認められた (図 1)。この VEGF-A の存在によるエンドセリン産生抑制は培養上清中のエン

ドセリンでも認められ、VEGF-A の濃度依存性に抑制されることも明らかとなった。

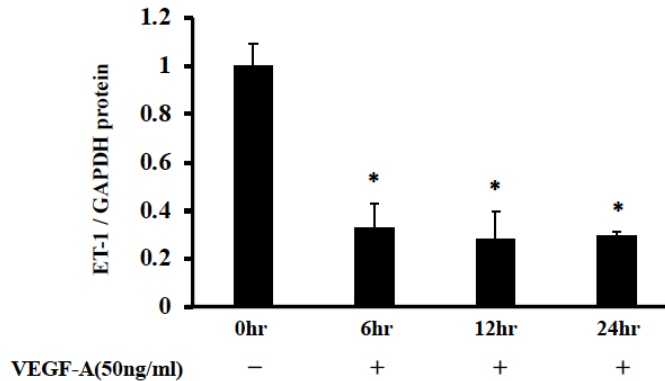


図 1 ヒト腎系球体内皮細胞のエンドセリンに対する VEGF-A の影響

(2) ヒト腎系球体内皮細胞のエンドセリンに対するベバシズマブの影響

次に、ヒト腎系球体内皮細胞のエンドセリン発現に対する抗 VEGF 抗体であるベバシズマブの影響を調べた。そのためには VEGF-A (50ng/mL) の存在下、ベバシズマブ (50 μg/mL) を添加し、6 時間培養し、培養細胞中のエンドセリンタンパクをウエスタンブロッティング法で評価した。ベバシズマブの存在により、エンドセリンが増加することが認められた (図 2)。この VEGF-A の存在下にベバシズマブ (50 μg/mL) の添加によるエンドセリンの増加は、培養上清中のエンドセリンでも認められ、この増加はベバシズマブの濃度依存性に促進されることも明らかとなった。これらの結果から、ヒト腎系球体内皮細胞において、VEGF-A はエンドセリン産生に抑制的に作用しており、抗 VEGF 抗体であるベバシズマブは培養液中の VEGF-A を中和することで、エンドセリン産生を促進的に作用していることが考えられた。

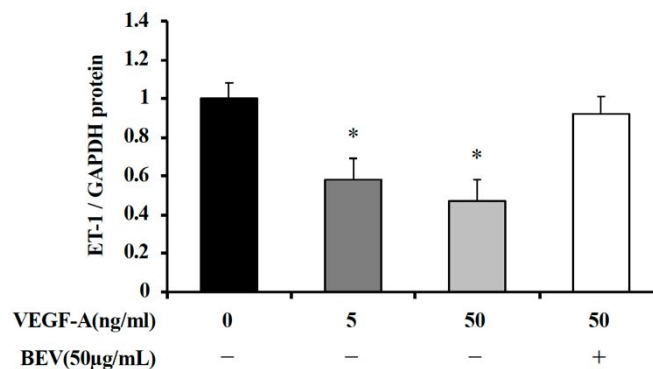


図 2 ヒト腎系球体内皮細胞のエンドセリンに対するベバシズマブの影響

(3) エンドセリン産生に対する VEGF-A の細胞内シグナル伝達経路の解明

エンドセリン産生を制御する重要な転写因子である FOXO1 は、リン酸化を受けると不活性型となりエンドセリン産生を抑制する。一方、FOXO1 の脱リン酸化は活性型となりエンドセリン産生を促進する。このエンドセリン産生を制御する転写因子である FOXO1 のリン酸化がどのようなシグナル伝達系で制御されているかを検討した。

VEGF-A は、受容体である VEGFR2 のリン酸化を介して PI3K/Akt 経路を活性化させることが知られている (文献 12)。転写因子 FOXO1 は、PI3K/Akt 経路によるリン酸化を受けて不活性型となる。そこで、FOXO1 のリン酸化に対する VEGF-A の影響を調べるために、ヒト腎系球体内皮細胞の p-VEGFR2、p-Akt、p-FOXO1 のタンパク質発現量をウエスタンブロッティング法で評価し検討した。VEGFR2、Akt、FOXO1 のリン酸化タンパクのレベルは、VEGF-A の存在によっていずれも有意に増加し、VEGFR2、Akt、FOXO1 にシグナルが伝達されていることが認められた。一方、VEGF-A の存在下、ベバシズマブの添加により VEGF-A の刺激がなくなると、p-VEGFR2、p-Akt、p-FOXO1 の増加はコントロールレベルまで戻ることが認められた。

さらに、VEGF-A による VEGFR2 の活性化が PI3K/Akt 経路を介してエンドセリン産生を促進させているのかを確認するために、PI3K/Akt 経路を抑制する LY294002 を用いて検討した。エンドセリン産生に対する LY294002 の影響を調べるために、VEGF-A 存在下 LY294002 を添加し、培養細胞中のエンドセリンタンパクをウエスタンブロッティング法で評価した。VEGF-A 存在下にもかかわらず、濃度依存性にエンドセリン産生が増加することが認められた。また、FOXO1 活性化に対する LY294002 の影響を調べるために、p-VEGFR2、p-Akt、p-FOXO1 のタンパク質発現量をウ

エスタンプロッキング法で検討した。LY294002 の存在によっても VEGFR2 のリン酸化は変化しないものの、Akt のリン酸化は強く抑制された。また、FOXO1 のリン酸化も強く抑制された。

(4) 研究成果のまとめ

たん白尿は腎機能障害、特に糸球体の障害によって起こる。そこで、ヒト腎系球体内皮細胞を糸球体のモデルとして用い、腎障害惹起の指標と考えるエンドセリンを評価した。本研究によって、ヒト腎系球体内皮細胞で VEGF-A はエンドセリン産生を抑制していること、一方、ベバシズマブにより VEGF-A が中和され受容体刺激がなくなるとエンドセリン産生が促進されることを初めて明らかとした。また、VEGF-A の刺激は、受容体である VEGFR2 のリン酸化から PI3K/Akt 経路を活性化し、エンドセリン産生を制御する重要な転写因子である FOXO1 のリン酸化というシグナル伝達で、エンドセリン産生が調節される可能性を明らかにした (図 3)。

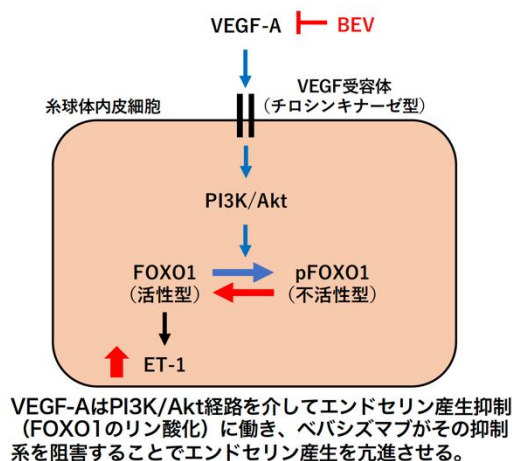


図 3 ベバシズマブによるエンドセリン産生機構

これらの結果より、VEGF-A を標的とした抗体医薬品であるベバシズマブ及び VEGFR に対する小分子受容体チロシナーゼ阻害剤は、VEGF のシグナルを抑制することにより、ヒト腎系球体内皮細胞からのエンドセリン産生を促進していることが示唆された。糸球体の恒常性は、ポドサイトから分泌される VEGF-A が糸球体内皮細胞にパラクラインに作用することによって正常に維持されている (文献 13)。分泌された VEGF-A は内皮細胞膜上に発現する VEGFR 1 や VEGFR2 のリガンドとなり、シグナル伝達をし、エンドセリン産生を減少させる。VEGF-A からのシグナルの遮断により、促進したエンドセリン産生は、ポドサイト損傷を誘発し糸球体機能を破綻させている可能性が明らかになった。

がん薬物療法において、VEGF を標的とした薬剤の使用は、副作用としてたん白尿が高頻度でみられ、重篤な場合には治療の継続が困難になる場合もある。これら VEGF 阻害薬がエンドセリン産生促進を介して傷害を及ぼしている可能性が明らかになったことにより、エンドセリン産生のコントロールは VEGF 阻害薬の効果を減弱させることなく副作用を軽減させる方法の確立に繋がるものと考えられる。更なる研究の進展は、臨床における分子標的薬による抗がん剤治療の継続・完遂による治療成績の向上に寄与するものと考えられる。

引用文献

- Shweiki D, et al.: Nature 359: 843-845, 1992
- Kampen KR.: Anticancer Drugs 23: 347-354, 2012
- Crinò L, et al.: Lancet 11: 733-740, 2010
- Wu S, et al. J Am Soc Nephrol 21: 1381-1389, 2010
- 薬剤性腎障害の診療ガイドライン作成委員会.: 日腎会誌 58: 477-555, 2016
- Iseki K, et al.: Kidney Int, 63:1468-1474, 2003
- Eremina V, et al.: Nephron Physiol 106:32-37, 2007
- Izzedine H, et al.: Eur J Cancer 46:439-448, 2010
- Kohan DE, et al.: Physiol Rev 91(1): 1-77, 2011
- Barton M.: Nat Clin Pract Nephrol 4(9): 490-501, 2008
- Ortmann J1, et al.: Hypertension 44(6): 974-981, 2004
- Feliers D, et al.: Kidney Int 68(4): 1648-59, 2005
- Morigi M, et al.: Am J Pathol 169(6): 1965-75, 2006

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nihei Satoru, Sato Junya, Harada Toshiyuki, Kuyama Shoichi, Suzuki Toshiro, Waga Nobutsugu, Saito Yoshitaka, Kisara Shigeki, Yokota Atsuko, Okada Kouji, Tsuchiya Masami, Terui Kazufumi, Tadokoro Yumiko, Chiba Takeshi, Kudo Kenzo, Oizumi Satoshi, Inoue Akira, Morikawa Naoto	4. 巻 81
2. 論文標題 Antiproteinuric effects of renin?angiotensin inhibitors in lung cancer patients receiving bevacizumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1051 ~ 1059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-018-3580-1	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 -

1. 著者名 Chiba Takeshi, Nihei Satoru, Komatsu Hideaki, Obara Mami, Ishigaki Yasushi, Sasaki Akira, Kudo Kenzo	4. 巻 41
2. 論文標題 Deterioration of Glycemic Control Contributes to the Prevalence of Proteinuria among Bevacizumab-Treated Cancer Patients with Type 2 Diabetes Mellitus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1722 ~ 1726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00493	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 -

1. 著者名 二瓶 哲, 千葉 健史, 後藤 慎平, 高橋 宏彰, 木村 聡元, 工藤 賢三	4. 巻 54
2. 論文標題 ペバシズマブ誘発性高血圧の適正管理に向けた薬剤師の取り組み	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本病院薬剤師会雑誌	6. 最初と最後の頁 1532-1537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二瓶哲、千葉健史、平船寛彦、工藤賢三
2. 発表標題 ペバシズマブは腎系球体内皮細胞におけるVEGF-Aシグナルの抑制によりエンドセリン-1分泌を増加させる
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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
研究協力者	二瓶 哲 (NIHEI Satoru)		