

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07207

研究課題名(和文) 妊娠高血圧腎症の治療薬はベバシズマブの薬効を減弱するか？

研究課題名(英文) Do anti-preeclamptic drugs diminish efficacy of bevacizumab?

研究代表者

恩田 健二 (Onda, Kenji)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：50318185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、複数の研究手法(試験管内で3次的に培養したヒトミニ腫瘍共培養モデル、担癌マウスモデル、大規模自発報告有害事象データベース(FAERS))を用いた統合的な解析により、妊娠高血圧腎症の治療薬候補として報告されている複数の薬物が、癌治療に用いられる血管新生阻害薬(ベバシズマブやアフリベルセプト等)の抗腫瘍効果や、副作用としての高血圧を減弱する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種々の基礎的検討(3次的に作製したミニ腫瘍共培養モデルや、担癌マウスでの解析)により、特定の既存薬が、血管新生阻害薬の抗腫瘍効果や副作用が減弱する可能性を示した。さらに大規模自発報告有害事象データベースの解析により、結果にかかる臨床的な裏付けが一部なされた。これらの結果は、癌に併存する疾患の治療に用いられる治療薬が、一部の癌治療に用いられる薬物の抗腫瘍効果に影響する可能性を示すものである。本研究が結果がもたらす影響について臨床研究の蓄積が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, an integrated analysis using multiple research methods (in vitro three-dimensional human mini-tumor co-culture model, tumor-bearing mouse model, and a large spontaneously reported adverse event database (FAERS)) showed that several drugs reported as drug candidates for the treatment or prevention of preeclampsia attenuate the anti-tumor effects and hypertension due to angiogenesis inhibitors such as bevacizumab and aflibercept.

研究分野：医療薬学

キーワード：血管新生阻害薬 妊娠高血圧腎症 抗腫瘍効果 高血圧

1. 研究開始当初の背景

妊娠高血圧腎症 (PE) は、全妊婦の 5~8%程度にみられる産科領域の疾患であり、根本的な治療法は胎盤の摘出 (妊娠の終了) のみである。臨床では妊婦に安全な降圧薬による対症療法が行われるが、PE の病態に即した治療法は未だ開発されていない。PE 患者の胎盤組織では可溶性 fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) などの血管新生阻害因子が過剰発現している。sFlt-1 は、別名が可溶性血管内皮成長因子受容体-1 型 (sVEGFR-1) とも呼ばれ、血中に存在している血管内皮成長因子 (VEGF) や胎盤成長因子 (PLGF) と結合し、そのおとり受容体として作用し、血管内皮障害や高血圧、タンパク尿をもたらすことから、PE の重要な病態惹起因子である。

癌治療の領域では、ベバシズマブに代表される VEGF を標的とした分子標的治療薬 (VEGFi) は大腸癌、肺癌、卵巣癌などの治療薬として広く使用されている。ベバシズマブは、腫瘍組織や血中に存在する VEGF を阻害することで、抗腫瘍効果を発揮するが、有害事象として高血圧やタンパク尿が見られる。すなわち、この副作用は、PE でみられる高血圧やタンパク尿と同様の機序で起きており、VEGFi による Preeclampsia-like syndrome として理解されている。

こうした中、申請者を含む国内外の研究者による PE の治療・予防薬の探索研究から、プロトンポンプ阻害薬、スタチン類、ホスホジエステラーゼ 5 阻害薬などが新たに提案されている (以下、抗 PE 薬と呼ぶ)。これらの薬物は、sFlt-1 を過剰発現させて PE 症状を持たせた妊娠マウスに対して、降圧効果や抗タンパク尿効果を有することが示されている。換言すれば、これらの抗 PE 薬は、胎盤由来の内因性のベバシズマブともいふべき sFlt-1 の作用に拮抗することで、抗 PE 作用を発揮しているといえる。このことから、抗 PE 薬が、sFlt-1 と同様の作用機序を持つベバシズマブに対しても影響を与え、その結果ベバシズマブの作用の減弱に繋がるという仮説が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「抗 PE 薬が、ベバシズマブなどの VEGFi で治療中の患者に併用されていると、VEGFi の抗腫瘍効果、有害事象の発現 (高血圧、タンパク尿) を減弱するのか？」を明らかにすることである。本申請では、仮説の基礎的検証を通じて、臨床研究への橋渡しとなるための基盤情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 3次元ヒトミニ腫瘍に対する VEGFi と抗 PE 薬の影響

3次元培養法は、生体環境に近いモデルとして近年注目されているが、癌組織のヘテロな環境をより反映させるために、ヒト癌細胞、内皮細胞、線維芽細胞を共培養するミニ腫瘍モデルが提唱されている。本研究では、懸垂培養法により 3次元形成した共培養スフェロイド (ヒト癌細胞、HUVEC、正常線維芽細胞) をコラーゲンなどの細胞外基質内において 3次元構造を維持したまま培養し、ベバシズマブ存在下にミニ腫瘍を培養し、腫瘍の増殖や血管新生 (スプラウト増殖) の阻害作用に対して、抗 PE 薬がどの程度腫瘍増殖や血管新生能に影響するか測定した。抗 PE 薬として、既存薬のエソメプラゾール¹、プラバスタチン²、シルデナフィル³、ニコチナミド⁴、メトホルミン⁵、ニコランジル⁶等を用いた。これらの医薬品は sFlt-1 を過剰発現したマウス等において高血圧等の PE 症状を改善することが示されている。解析にはハイコンテンツ画像解析装置 (Operetta CLS; パーキンエルマー社) を用い、上記の共培養ヒトミニ腫瘍を 96 ウェルフォーマットで撮像し、画像解析ソフト (ImageJ; U. S. National Institutes of Health) でミニ腫瘍の面積を定量解析した。また蛍光色素 (CFSE) で細胞を標識し、細胞種毎にコラーゲン内浸潤や薬物への反応性を評価した。

(2) 担癌マウスにおける VEGFi による抗腫瘍効果と Preeclampsia-like Syndrome に及ぼす抗 PE 薬の *in vivo* 解析

in vivo の解析として、ヒトの乳癌細胞 (ルシフェラーゼ遺伝子を発現する (MDA-MB-231-Luc 細胞、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクから分与)) を免疫不全マウスに皮下投与して担癌マウスを作製し、VEGFi としてアフリベルセプト (10 mg/kg) を皮下投与し (週 2 回) さらに上記 (1) の検討で用いた抗 PE 薬を投与した際の腫瘍の縮小効果と血圧を評価した。ベバシズマブは、種差によりマウスに対し高血圧を誘発しないことが想定されるため、VEGFi であるアフリベルセプトを使用した。腫瘍の大きさに対する薬物の評価には、ノギスによる腫瘍径測定に加え、ルシフェラーゼ発光に基づく *in vivo* イメージングシステム IVIS-Lumina III (パーキンエルマー社) を用いることで、高感度かつ低侵襲の測定を経時的に行った。

薬物投与は、コントロール群、アフリベルセプト群、抗 PE 薬群、及び アフリベルセ

プト + 抗 PE 薬群で比較した。

(3) 大規模自発報告有害事象データベースを用いた解析

米国 FDA が提供する有害事象の大規模自発報告データベースである FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) を用いて、ベバシズマブ使用症例において高血圧または蛋白尿を有害事象とする際の報告オッズ比に及ぼす併用薬の影響を不均衡解析により集計した。FAERS データとして一般財団法人日本医薬情報センターの JAPIC AERS を用いた。

4. 研究成果

(1) 3次元共培養ヒトミニ腫瘍モデルでの解析

ヒト血管内皮細胞、ヒト正常線維芽細胞、およびヒト乳癌細胞 (MDA-MB-231) または肺癌細胞株 (A549) を懸垂培養により共培養して得たミニ腫瘍をコラーゲンゲルに埋設し浸潤能を評価した。抗 PE 薬 (プラバスタチン、エソメプラゾール、シルデナフィル、ニコチナミド、メトホルミン、ニコランジルの内、ニコランジルがミニ腫瘍の浸潤を有意に促進し、さらに同時添加したベバシズマブによる浸潤抑制効果を減弱することを見出した。ATP 感受性 K (KATP) チャネル阻害薬グリベンクラミドの併用でニコランジルの作用が消失したことから、KATP チャネルを介していることが明らかとなった。細胞毎に CFSE により蛍光染色した後で作製したミニ腫瘍の浸潤を評価したところ、構成細胞のうち MDA-MB-231 細胞の浸潤がニコランジルにより促進していることが明らかとなった⁷。

(2) 担癌マウスモデルでの *in vivo* 評価

MDA-MB231-Luc 細胞を皮下移植した 6 週齢メスヌードマウス (BALB-c nu/nu) に、VEGFi のアフリベルセプト (s.c.) (10 mg/kg) およびニコランジル (p.o.) (10 mg/kg/日) をそれぞれ単独及び併用投与し、腫瘍体積、血圧を経時的に評価した。アフリベルセプトの投与は、腫瘍体積を減少させ、血圧 (収縮期、拡張期、平均動脈圧) を有意に増加させた一方、ニコランジルの併用投与は、アフリベルセプトによる血圧上昇と抗腫瘍効果を減弱した。

同様に、エソメプラゾール (p.o.) (10 mg/kg/日) をそれぞれ単独及びアフリベルセプトに併用投与し、腫瘍体積、血圧を経時的に評価した。アフリベルセプトの投与により、収縮期、拡張期血圧及び、平均動脈圧は有意に上昇したが、エソメプラゾールの併用投与は血圧を低下させた。さらに、接種した腫瘍細胞に基づくルシフェラーゼの発光強度は、アフリベルセプトの投与により有意に低下したが、エソメプラゾールの併用群ではアフリベルセプト単独群に比べ高値であった。以上の結果から、ニコランジルまたはエソメプラゾールは、アフリベルセプトによる血圧上昇効果と抗腫瘍効果を減弱することが示された。

(3) 大規模自発報告有害事象データベースの解析

FAERS データ (1997 年第 4 四半期 ~ 2019 年第 1 四半期のデータ) に基づく眼科的使用を除くベバシズマブ使用報告例は 61,369 例であり、そのうちニコランジルとの併用症例は 23 例であった。その中で高血圧の報告症例は存在せず、低血圧の有害事象報告例が複数認められた。またベバシズマブとプロトンポンプ阻害薬を併用した症例では、高血圧とタンパク尿の報告オッズ比が有意に低下していることを見出した。対照としたヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬にはそのような影響は見られなかった。

以上、3次元共培養ミニ腫瘍、担癌マウス、大規模自発報告データの解析の中で、ニコランジル、エソメプラゾールなどの抗 PE 薬は、VEGFi の効果を減弱する結果が示された。癌治療において、本研究により得た知見がもたらす影響について、臨床研究による検証の蓄積が必要である。

5. 引用文献

1. Onda, K. *et al.* Proton Pump Inhibitors Decrease Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1 and Soluble Endoglin Secretion, Decrease Hypertension, and Rescue Endothelial Dysfunction. *Hypertension* **69**, 457-468 (2017).
2. Kumasawa, K. *et al.* Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1451-5 (2011).
3. Burke, S. D. *et al.* Soluble fms-like tyrosine kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. *J Clin Invest* **126**, 2561-74 (2016).
4. Li, F. *et al.* Nicotinamide benefits both mothers and pups in two contrasting mouse models of preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 13450-13455 (2016).
5. Brownfoot, F. C. *et al.* Metformin as a prevention and treatment for preeclampsia: effects on soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin secretion and endothelial dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* **214**, 356 e1-356 e15 (2016).

6. Stupakova, E. G. *et al.* L-NAME-induced Preeclampsia: correction of functional disorders of the hemostasis system with Resveratrol and Nicorandil. *Res. Results Pharmacol.* **5(2)**, 1-12 (2019).
7. Pan, C., Onda, K. & Hirano, T. Bevacizumab Versus Anti-preeclamptic Drugs: Evaluation With Three-dimensionally Co-cultured Human Mini Tumors. *Anticancer Res* **39**, 3543-3551 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 PAN CHEN, ONDA KENJI, HIRANO TOSHIHIKO	4. 巻 39
2. 論文標題 Bevacizumab Versus Anti-preeclamptic Drugs: Evaluation With Three-dimensionally Co-cultured Human Mini Tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3543 ~ 3551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13500	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 潘 辰、恩田 健二、平野 俊彦
2. 発表標題 Evaluation of Anti-preeclamptic Drugs in Combination with Bevacizumab on Sprout Growth from 3D Co-cultured Human Mini-tumors
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横澤 芽依、恩田 健二、川上 真理子、海老名 一樹、潘 辰、平野 俊彦
2. 発表標題 血管新生阻害薬による有害事象報告に及ぼす併用薬の影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海老名 一樹、恩田 健二、潘 辰、川上 真理子、横澤 芽依、平野 俊彦
2. 発表標題 血管新生阻害薬による高血圧と抗腫瘍効果に対するニコランジルの減弱作用
3. 学会等名 第30回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 恩田 健二、太田 和寛、潘 辰、海老名 一樹、横澤 芽依、川上 真理子、平野 俊彦
2. 発表標題 Preeclampsia-like syndromeに対するプロトンポンプ阻害薬の影響に関する検討
3. 学会等名 第29回日本胎盤学会学術集会
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