

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16417

研究課題名(和文) 分子標的薬の腎障害メカニズムの解明 大規模データから検出された新規リスクの検討

研究課題名(英文) Renal toxicities of small molecular agents

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：米国の大規模副作用データベースから腎障害リスクと関連性の高いがん分子標的薬を絞り込むことができました。さらに、ヒト腎臓由来の培養細胞を用いてそれらの薬剤の細胞毒性を評価しました。その結果、BRAV600Eという変異をもつ悪性黒色腫の治療薬であるベムラフェニブは尿細管細胞と糸球体上皮細胞に対して強い細胞毒性を有することがわかりました。一方、第二世代のBRAV600E変異を標的とする薬剤のダブラフェニブは、ベムラフェニブと比べると細胞毒性が低いことも明らかになりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果の学術的意義：ベムラフェニブとダブラフェニブは同じBRAFを標的とする薬剤でありながら、腎毒性には大きな差が生じました。この差にはBRAF以外の分子が関与している可能性が強く疑われます。この分子と化合物の構造をつなぐ知見が明らかになれば、がん治療の安全性を向上させることができると考えられます。

社会的意義：ベムラフェニブは承認当初は腎毒性はそれほど危惧されていなかった薬剤であり、適応がん種は限定されていました。しかしながら、近年ベムラフェニブは悪性黒色腫以外のBRAF変異を有するがんにおいて大規模試験がおこなわれています。臨床の使用時には腎障害の発症に特に注意を払うべきであると考えます。

研究成果の概要(英文)：This study assesses the occurrence of acute kidney injury (AKI) in association with combination therapy drugs that are presently used to treat melanoma with a rapidly accelerated fibrosarcoma kinase B (BRAF) mutant. Specifically, we were focused on the potential nephrotoxicity of two BRAF inhibitors, vemurafenib and dabrafenib in real-world setting and human kidney cells. The real-world data were retrieved from the Food and Drug Administration Adverse Events Reporting System database. We found that the AKI risk values associated with vemurafenib were higher than those associated with dabrafenib and trametinib. Vemurafenib also lowered the cell viability and increased cell death in renal tubular epithelial cells and glomerular epithelial cells. This finding means that careful monitoring for clinical signs of kidney injury is recommended in patients treated with vemurafenib.

研究分野：医療薬学

キーワード：薬剤性腎障害 データベース 低分子化合物 キナーゼ阻害剤 細胞毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤性腎障害は進行性の腎機能低下と死亡につながる重篤な有害事象である。近年、がん領域における薬剤性腎障害が注目されている。特に、全身がん化学治療中の薬剤性腎障害は治療を困難にするため、患者の予後を著しく低下させる。分子標的薬は、がん細胞に特異的に作用するため、全身の化学療法に比べて副作用の発現は少ないとされている。しかし、一部の症例では腎障害により治療継続が困難となることを経験する。

我々は先行研究として、FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) という公開された副作用データベースをもちいて、急性腎障害のリスクを上昇させるがん分子標的薬を統計的シグナル検出法で導出した。その結果、世界で承認されている 75 種類のがん分子標的薬 (本邦未承認を含む) のうち 54 種類に急性腎障害リスクを上昇させる可能性を見出し、そのなかでも特にリスク順位が上位に位置付けられた 5 種類の薬剤 (PI3K 阻害剤 Copanlisib、BRAF 阻害剤 Vemurafenib、MEK 阻害剤 Cobimetinib、c-MET 阻害剤 Crizotinib、mTOR 阻害剤 Everolimus) について腎臓由来の培養細胞を用いた毒性評価をおこなうこととした。

2. 研究の目的

大規模副作用データベース (FAERS) の解析結果から、腎障害リスクが特に高く判定された 5 つの分子標的薬の尿管障害のメカニズムを明らかにし、得られた知見を社会に還元することで医薬品のリスク最小化につなげることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) FAERS データベースをもちいた統計的シグナル検出

FAERS のウェブサイトからデータを取得し、欠損データと重複データを除外した。対象薬剤の承認日、ネームバリエーションの情報は、DrugBank データベースから取得した。有害事象名は、MedDRA/J version 21.0 の PT コードを使用した。急性腎障害の定義に関しては、既に報告されている文献から、MEDDRA 標準検索式の “Acute Renal Failure” の狭義および広義の用語グループをもちいた。これらの情報を SAS 9.4 をもちいて解析した。統計的シグナル検出のアルゴリズムには、報告オッズ (ROR) をもちいた。対象薬剤の使用の有無と有害事象の報告の有無により 2 × 2 分割表を作成し、ROR を計算した。シグナル検出の判定は、ROR の 95% 信頼区間の下限値が 1 以上のときとした。

(2) 細胞培養

ヒト正常腎由来の初代培養細胞である、近位尿管上皮細胞 (Renal Proximal Tubule Epithelial Cells; RPTEC)、糸球体内皮細胞 (Glomerular Endothelial Cells; GEnC)、糸球体上皮細胞 (ポドサイト) (Glomerular Epithelial Cells; GEpC) を用いた。

(3) がん分子標的薬の濃度

Vemurafenib、Dabrafenib、Cobimetinib、Trametinib、Crizotinib、Everolimus はジメチルスルホキシドに溶解させたものを原液とした。薬剤の原液はすべて、1000 倍に希釈されるように培地に添加した。各薬剤の最終濃度と臨床における定常状態最高血中濃度 (C_{max, ss}) は以下の通りである。

表 1. 網羅的シグナル検出から急性腎障害リスクのシグナルが検出されたがん分子標的薬の毒性評価にもちいた濃度および臨床における最大血中濃度

Drug name	Final concentration		C _{max, ss}
Vemurafenib	0, 0.1, 1, 5, 10	μM	115.7 μM
Dabrafenib	0, 0.1, 1, 5, 10	μM	2.4 μM
Cobimetinib	0, 0.1, 1, 5, 10	μM	0.5 μM
Trametinib	0, 1, 10, 100, 200	nM	32.0 nM
Crizotinib	0, 0.1, 1, 5, 10	μM	1.1 μM
Everolimus	0, 1, 10, 100, 200	nM	58.8 nM

(4) 細胞生存率の検討

細胞生存率の検討には Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を用いた。96well プレートに細胞を播種し 24 時間培養した。そして薬剤を添加し、さらに 22 時間培養した。その後、2 セット作成した最

終濃度 0 M の細胞のうち 1 セットに Lysis buffer を添加し、30 分間インキュベートすることで High Control 群を作成した。すべての well に CCK-8 を添加し、2 時間インキュベートした後に多機能プレートリーダーを用いて吸光度を測定した。最終濃度 0 M の群における細胞生存率を 100%、High Control 群における細胞生存率を 0% として、これらに対する比率を算出した。

(5) 死細胞率 (Lactate dehydrogenase; LDH 放出量) の検討

死細胞の評価として、細胞中から放出された LDH の量を測定した。96well プレートに細胞を播種し 24 時間培養した。そして薬剤を添加し、さらに 22 時間培養した。その後、前述と同様に High Control 群を作成した。すべての well から上清の一部を別の 96well プレートに移し取ったのちに反応させ、多機能プレートリーダーを用いて吸光度を測定した。最終濃度 0 M の群における死細胞率を 0%、High Control 群における死細胞率を 100% として、これらに対する比率を算出した。

4 . 研究成果

5 種類のうち 4 種類の分子標的薬は濃度依存的に近位尿細管上皮細胞の増殖・生存率を低下させた。そのなかの 3 種類は臨床における最大血中濃度と同程度で有意な近位尿細管上皮細胞の増殖・生存率の低下を示した。なかでも Vemurafenib は臨床における最大血中濃度の約 1/50 の濃度で有意な近位尿細管上皮細胞の増殖・生存率の低下を示したが、糸球体内皮細胞においては同様の濃度で増殖・生存率の低下を示さなかった。

ベムラフェニブのインタビューフォームを確認したところ非臨床試験の結果に腎に関する記載はなく、承認当初は腎毒性が問題になっていなかったことがわかった。一方で、文献検索データベースの検索では、市販後に腎障害に関する症例報告が散見された。症例報告の病理所見には尿細管上皮細胞障害の記載がみられ、今回の in vitro 毒性評価の結果と類似する。腎毒性発現のメカニズムについては報告がないため、さらなる検討が必要であった。

上記の検討から、BRAF 阻害剤と臨床用 BRAF 阻害剤と併用される MEK 阻害剤の腎毒性発現についてさらなる検討をおこなうこととした。

(1) BRAF および MEK 阻害剤の急性腎障害に関するシグナル検出

上述した先行研究における網羅的シグナル検出では、FDA 承認日の情報は加味されていなかったため、BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤に薬剤を限定して再度シグナル検出をおこなった。対象薬は BRAF 阻害剤である Vemurafenib と Dabrafenib、MEK 阻害剤である Cobimetinib と Trametinib とした。図 1 にシグナル検出の結果および FAERS データベースから取得したデータクレンジングおよび薬剤毎の急性腎障害の報告数および報告オッズ比を示した。

薬剤名	観察期間	急性腎障害関連イベント					
		狭義の範囲用語			広義の範囲用語		
		症例数	ROR値	95%信頼区間	症例数	ROR値	95%信頼区間
ベムラフェニブ	2011年第三四半期～ 2018年第一四半期	288	3.28	2.91-3.69*	397	2.35	2.13-2.60*
ダブラフェニブ	2013年第二四半期～ 2018年第一四半期	140	1.35	1.15-1.60*	182	1.34	1.16-1.56*
コピメチニブ	2015年第三四半期～ 2018年第一四半期	90	4.40	3.55-5.45*	120	4.65	3.85-5.62*
トラメチニブ	2013年第二四半期～ 2018年第一四半期	139	1.32	1.11-1.56*	181	1.31	1.13-1.52*

図 1 . BRAF/MEK 阻害剤に関連した急性腎障害関連イベントの報告数と報告オッズ比

(2) ヒト腎臓由来培養細胞を用いた BRAF 及び MEK 阻害剤の毒性

FAERS データベースの BRAF/MEK 阻害剤の腎毒性プロファイルが、ヒト腎臓由来の培養細胞(近位尿細管上皮細胞 [RPTEC]、糸球体血管内皮細胞 [GEnC]、糸球体上皮細胞 [GEpC]) をもちいたインビトロ評価系においても一致するか検討した。

図 2 に示すように、ベムラフェニブは RPTEC および GEpC の細胞生存率を濃度依存的に低下させた。一方で、GEnC では細胞生存率の低下はみられなかった。ベムラフェニブとは対照的にダブラフェニブはいずれの細胞の細胞生存率もわずかに低下させる程度で、強い細胞毒性はみら

れなかった。MEK 阻害剤はコビメチニブおよびトラメチニブともにいずれの細胞においても濃度依存的に細胞生存率を低下させた（図示なし）。

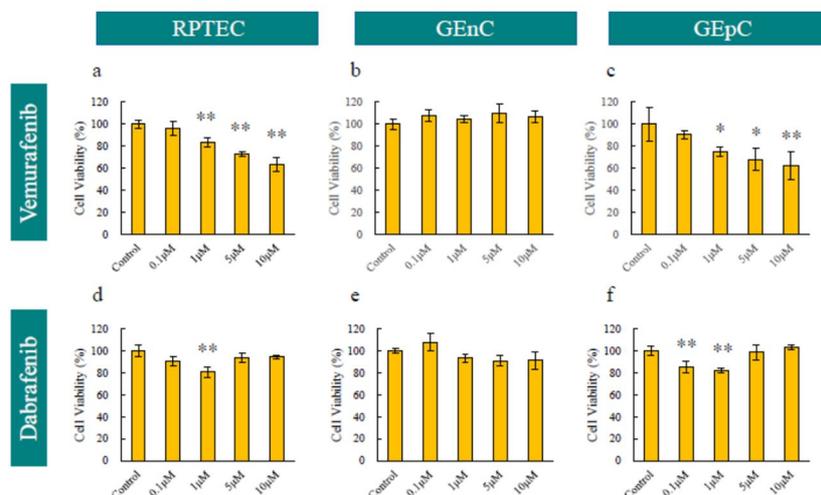


図 2 . BRAF 阻害剤の各種ヒト腎臓由来培養細胞の生存率への影響

図 3 に、各薬剤の LDH 放出アッセイによる細胞障害性を示した。無刺激の細胞をリススバッファで溶解した高コントロールを 100% の LDH 放出量として、各薬剤および細胞ごとの LDH 放出量を算出している。ベムラフェニブは 10 μM で RPTEC および GEpC の LDH 放出量が有意に上昇した。一方で、ダブラフェニブでは LDH 放出量の増加はみられなかった（図示なし）。また、コビメチニブにおいては、10 μM で GEpC の LDH 放出量を有意に増加させた。一方、トラメチニブでは LDH 放出量の増加はみられなかった（図示なし）。

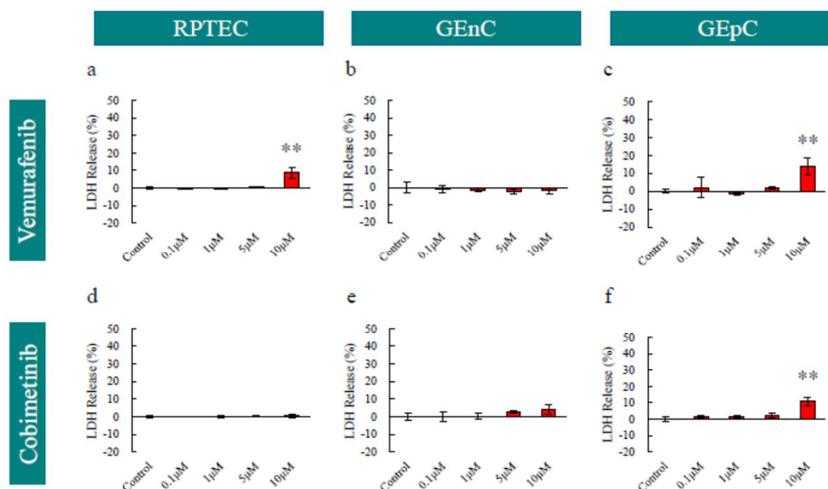


図 3 . ベムラフェニブおよびコビメチニブの細胞障害性の評価

以上の研究成果より、FAERS データベースから検出された急性腎障害リスクと関連のある BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤はヒト腎臓由来の培養細胞で毒性を示すことが明らかとなった。特に、BRAF 阻害剤のベムラフェニブは、同じ BRAF 阻害剤のダブラフェニブと比較して強い腎毒性を有していた。また、MEK 阻害剤のコビメチニブも高濃度で細胞傷害性を有しており、MEK 阻害剤のトラメチニブと比して強い腎毒性を発現する可能性がある。臨床においては、ベムラフェニブ使用時は、ダブラフェニブと比べてより注意深い腎障害のモニタリングが必要であると考えられる。MEK 阻害剤の併用が BRAF 阻害剤に関連した腎障害にどのような影響をあたえるかはより詳細な検討が必要である。

また、本研究においてはこれらの薬剤の腎毒性の発現メカニズムの特定には至らなかったものの、同じシグナル経路の BRAF/MEK を標的とする低分子化合物間で差異が生じていることから、BRAF/MEK/ERK 経路以外の薬剤標的因子がベムラフェニブの腎毒性に関与している可能性が高いことが推察される。この点については、メカニズムを特定する上での今後の検討課題である。

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 1件）

1. 著者名 Kondo M, Hotta Y, Yamauchi K, Sanagawa A, Komatsu H, Iida S, Kimura K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Bortezomib administration is a risk factor associated with the development of tumor lysis syndrome in male patients with multiple myeloma: a retrospective study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-020-07592-9.	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, Kondo Masahiro, Nishikawa Ryohei, Tohkin Masahiro, Kimura Kazunori	4. 巻 31
2. 論文標題 Tumor lysis syndrome associated with bortezomib: A post hoc analysis after signal detection using the United States Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anti-Cancer Drugs	6. 最初と最後の頁 183 ~ 189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/CAD.0000000000000862	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 Sanagawa Akimasa, Shiraishi Nao, Sekiguchi Fumino, Akechi Tatsuo, Kimura Kazunori	4. 巻 39
2. 論文標題 Successful Use of Brexpiprazole for Parkinson's Disease Psychosis Without Adverse Effects: A Case Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Psychopharmacology	6. 最初と最後の頁 685 ~ 687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/JCP.0000000000001127	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8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真川明将, 森菜々香, 富田なつみ, 堀田祐志, 木村和哲
2. 発表標題 BRAF阻害薬ベムラフェニブの尿細管毒性のin vitro評価
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 真川明将, 早川智章, 森悠香梨, 須藤遥, 近藤勝弘, 堀田祐志, 木村和哲
2. 発表標題 肥満・過体重はベキサロテンによる高トリグリセリド血症の重症化因子である
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡智哉, 真川明将, 鈴木純, 中島晃, 堀田祐志, 前田康博, 木村和哲
2. 発表標題 抗がん剤治療がラットの性腺機能へ及ぼす影響-男性性機能低下を及ぼす薬剤投与後の男性ホルモン濃度の検討
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅沼恵美, 真川明将, 白石直, 外ノ池文乃, 明智龍男, 木村和哲
2. 発表標題 プレクスピラゾールが奏功したパーキンソン精神病の一症例
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡智哉, 真川明将, 堀田祐志, 前田康博, 木村和哲
2. 発表標題 小児期における抗がん剤治療が将来の男性性機能へ及ぼす影響 ラットを用いた薬理学的検討
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019/第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真川明将, 早川智章, 須藤遥, 森悠香梨, 近藤勝弘, 堀田祐志, 木村和哲
2. 発表標題 肥満・過体重が皮膚T細胞リンパ腫治療薬ベキサロテンの治療忍容性に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019/第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川晴香, 白石直, 沢田光代, 石川貴康, 真川明将, 関口文乃, 明智龍男
2. 発表標題 父子関係への家族介入後、急激なうつ病の改善と宗教観の変化を示したキリスト教牧師の一例
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内歌恋, 近藤勝弘, 堀田祐志, 真川明将, 小松弘和, 飯田真介, 木村和哲
2. 発表標題 ボルテゾミブは多発性骨髄腫における腫瘍崩壊症候群の発生リスクを上昇させる
3. 学会等名 日本医療薬学会 第3回フレッシューズカンファランス
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学病院薬剤部HP
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/pharmacy/index.html>

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
---------	---------