

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16437

研究課題名(和文)シクロオキシゲナーゼ2選択的阻害薬がシスプラチン起因性腎障害に与える影響の検討

研究課題名(英文)Evaluation of impact of cyclooxygenase-2 inhibitors on cisplatin-induced nephrotoxicity

研究代表者

齋藤 佳敬 (Saito, Yoshitaka)

北海道大学・大学病院・薬剤師

研究者番号：00835001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では抗悪性腫瘍薬シスプラチン(CDDP)起因性腎障害(CIN)に非ステロイド性消炎鎮痛薬(NSAIDs)が与える影響について検討した。

まず、メタアナリシスによりNSAIDsの併用がCIN発症のリスク因子となることを明らかにした。続いて各NSAIDsがCDDPの細胞障害性に与える影響をin vivo, in vitroで検討し、セレコキシブによるCDDPの細胞障害軽減作用、フルルビプロフェンによる障害増強作用を解明した。さらに詳細な検討により、セレコキシブは酸化ストレスに対する抵抗性ならびにオートファジー活性の亢進作用で細胞障害を軽減し、これがセレコキシブ特有の作用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果よりセレコキシブ特有のCIN予防・軽減作用が示された。本研究はCINマネジメントの観点からCDDPと併用可能なNSAIDsを細分化により探索したものであり、その新規性から学術的意義及び社会的意義は大きいと思われる。さらに、我々のグループはNSAIDsがCDDPの抗腫瘍効果に与える影響も検討しており、その結果も踏まえCDDP投与時のNSAIDsの適正使用に貢献すべくさらなる検討を継続したい。

研究成果の概要(英文)：Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are suggested as a risk factor for cisplatin-induced nephrotoxicity (CIN). In this research, we have minutely evaluated the influence of NSAIDs, particularly inhibition manner of cyclooxygenase, on CIN development. First, we assessed the impact of NSAIDs co-administration on CIN development using meta-analysis, suggesting that NSAIDs co-administration can worsen CIN. Second, we assessed the influence of each NSAIDs on CDDP-induced cytotoxicity in vivo and in vitro, revealing that celecoxib significantly attenuated and flurbiprofen markedly enhanced renal toxicity by CDDP. In addition, celecoxib attenuated cytotoxicity by reducing oxidative stress and increasing autophagy activation.

In conclusion, we have evaluated NSAIDs influence on CIN, and revealed that celecoxib attenuates CIN by regulating oxidative stress and autophagy activation.

研究分野：医療薬学

キーワード：シスプラチン 腎障害 非ステロイド性消炎鎮痛薬 セレコキシブ

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗悪性腫瘍薬シスプラチン(CDDP)の代表的な有害事象である CDDP 起因性腎障害(CDDP-induced nephrotoxicity; CIN)は約 30%と高頻度で出現する用量制限毒性である。申請者らは CDDP 投与時の非ステロイド性消炎鎮痛薬(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; NSAIDs)の併用が CIN 出現のリスク因子となることを過去の臨床研究で明らかにした。NSAIDs はがん患者の解熱・鎮痛に汎用される最重要薬剤の一つであり, CDDP との併用回避目的の中止は鎮痛・解熱コントロール不良に直結する。しかしながら NSAIDs による CIN 悪化機序や NSAIDs の種類, 特にシクロオキシゲナーゼ(COX)の阻害様式の違いが CIN に与える影響については不明であった。

2. 研究の目的

本研究では NSAIDs が CIN に与える影響を COX の阻害様式に着目して評価し, NSAIDs 投与患者における安全な CDDP の投与に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NSAIDs が CIN に与える影響の評価

NSAIDs が CIN 発症に与える影響についてメタアナリシスを用いて評価した。PubMed, Google Scholar, Web of Science において NSAIDs と CIN との関連を評価した英語臨床論文を抽出した。その後 2 次スクリーニングを行い, CDDP の投与量, 薬物療法の施行コース数, CIN の定義, CIN 発症率, NSAIDs 服用率のデータを抽出した。NSAIDs 内服患者群における CIN 発症のオッズ比 (odds ratio; OR) と 95%信頼区間 (95% confidence interval; 95% CI) を評価した。

(2) COX-2 選択的 NSAIDs が CIN に与える影響の評価 (基礎研究)

In vitro ではラット正常腎上皮細胞株である NRK-52E 細胞を用いた。CDDP (10 μ M) および各 NSAIDs (10-200 μ M) を添加, 48 時間培養し, MTT assay により IC₅₀ を算出した。加えて腎障害マーカーである Clusterin も用いて障害を評価した。酸化ストレスの評価には Heme oxygenase 1 (Ho-1), Superoxide dismutase 1 (Sod1) および NF-E2-related factor 2 (Nrf2) を, オートファジーの評価には Autophagy related gene (Atg) 5, Atg7, Lc 3, および Beclin 1 を用いた。

In vivo では 7 週齢の Wistar ラットに CDDP (5 mg/kg) あるいは生理食塩水を腹腔内投与し, 同日からメチルセルロースで懸濁したセレコキシブ (30 mg/kg/day) あるいはフルルビプロフェン (10 mg/kg/day) を 4 日間経口投与した。体重測定および血液採取を day 1 と day 5 に行い, 腎臓を day 5 に摘出した。

(3) COX-2 選択的 NSAIDs が CIN に与える影響の評価 (臨床研究)

2006年4月1日から2021年12月31日までの間に本研究に参加する施設に通院又は入院し 60 mg/m² 以上の CDDP 含有レジメンによる治療を受けた患者を対象とした。COX 非選択的 NSAIDs 投与群 (コントロール) と COX-2 選択的 NSAIDs 投与群間で CIN の出現率を検討した。プライマリーエンドポイントは grade 2 以上の急性腎障害の発現頻度の比較とした。セカンダリーエンドポイントは治療期間内の血清クレアチニン値 (SCr) およびクレアチニンクリアランス (CCr) の最大変動値の比較, 治療終了時点での上記 2 項目の変動値の比較とした。

4. 研究成果

(1) NSAIDs が CIN に与える影響の評価

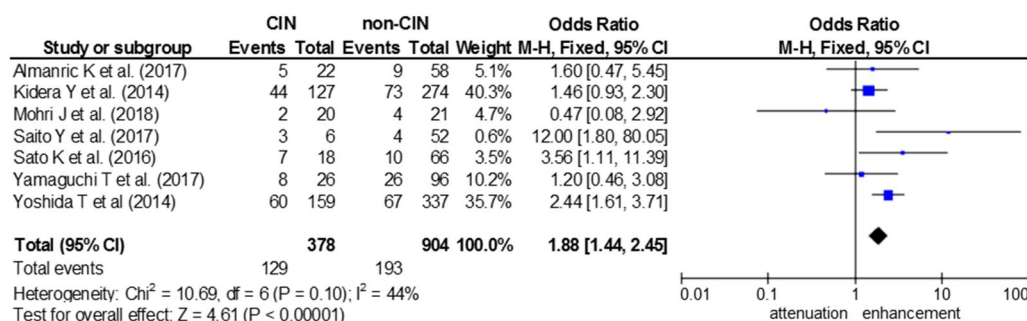


Figure 1. Forest plot of the meta-analysis.

1 次スクリーニングの結果計 935 報の論文が抽出され, 2 次スクリーニングにより最終的に 7 報が候補として選定された。全ての論文がレトロスペクティブ研究であり, NSAIDs と CIN との関連についてはセカンダリーエンドポイントでの評価であった。CIN 発症率は 29.5%, NSAIDs 服用率は 25.1% であった。抽出された論文を用いて forest plot を作成したところ, CIN 発症に関する OR は 1.88, 95% CI は 1.44-2.45 であり, Z 値が P < 0.05 であったため, NSAIDs の併用が

CIN 発症のリスク因子となることが示唆された(Fig. 1) . また , funnel plot , Egger's test , Begg's test により候補論文間での公表バイアスの可能性が低いことも示された . サブグループ解析において初回コースでは有意ではないものの NSAIDs 併用による CIN の悪化傾向が示され , 全治療コースでは NSAIDs の併用と CIN 発症の有意な関連性が確認された . これらの結果から , NSAIDs の併用が CIN 発症の明らかなリスク因子となることが示された .

(2) COX-2 選択的 NSAIDs が CIN に与える影響の評価 (基礎研究)

NRK-52E 細胞に CDDP と各 NSAIDs を同時添加した際の IC₅₀ 値と CDDP 単独添加時の IC₅₀ 値の比を算出した(Fig. 2A) . その結果 , セレコキシブ(50 μM)による細胞障害の軽減作用 , フルルビプロフェン(200 μM)による障害増強作用が明らかとなった . 加えて , CDDP 添加による Clusterin の上昇が , セレコキシブ添加で減少し , フルルビプロフェン添加で増大することも示された(Fig. 2B, C) . 一方 , COX-2 選択的 NSAIDs であるロフェコキシブ(25 μM) , エトドラク(200 μM) , メロキシカム(80 μM)の添加が CDDP による細胞障害に影響しなかったため , セレコキシブによる障害軽減作用は COX の阻害様式に因らないことが示された .

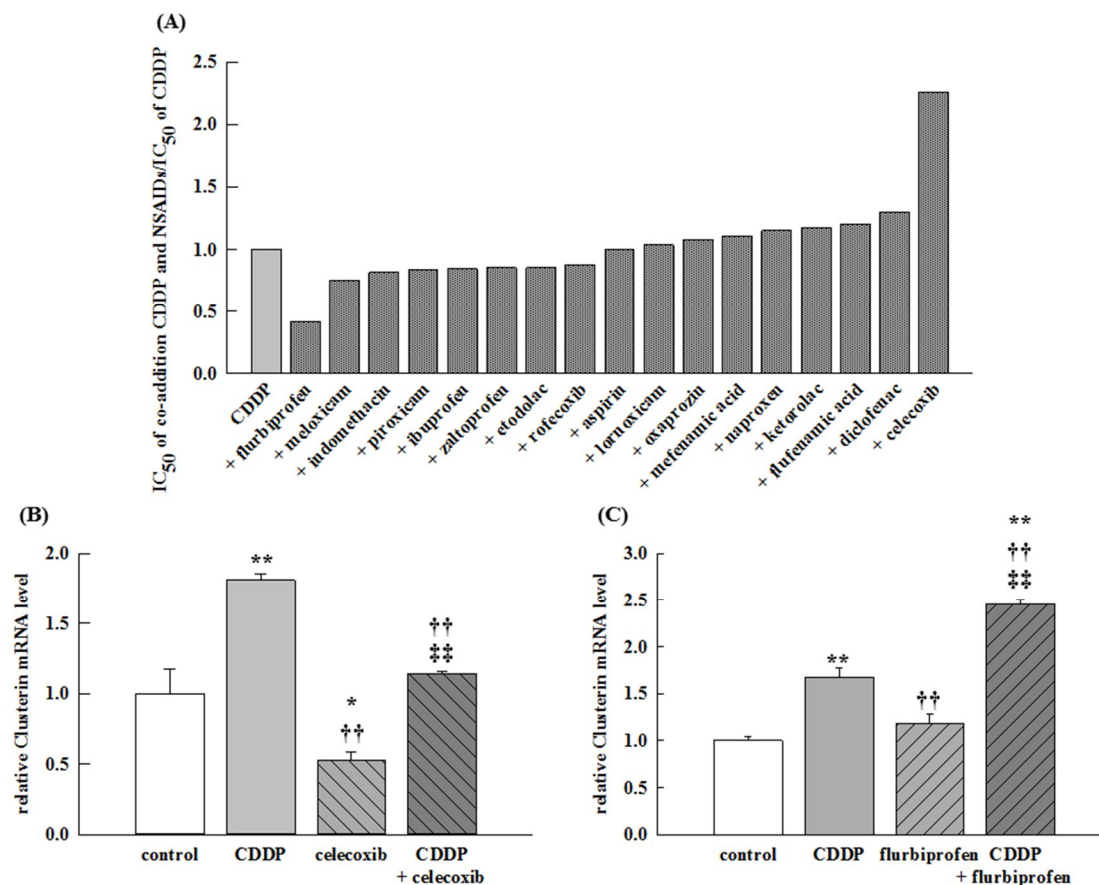


Figure 2. Effect of NSAIDs on CDDP-induced cytotoxicity and Clusterin mRNA levels in CDDP-treated NRK-52E cells.

*P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the control group, ††P < 0.01 compared with the CDDP group, †††P < 0.01 compared with the celecoxib or flurbiprofen group.

続いて , セレコキシブによる CIN 軽減メカニズムの評価として CIN 発症機序の一つである酸化ストレスに着目した(Fig. 3) . その結果 , 酸化ストレスマーカーである Ho-1 , Sod1 , Nrf2 はセレコキシブ同時添加により mRNA 量が増大し , 細胞生存率の結果と相関関係を示した . 一方 , NSAIDs が持つスーパーオキシド消去能を評価したが , 全ての NSAIDs はスーパーオキシド消去能を有さなかった(データは示さない) .

さらに , オートファジー活性の亢進による CIN 軽減も報告されていることから , セレコキシブのオートファジーへの影響を検討した . オートファジーマーカーである Atg5 , Atg7 , Lc3 , Beclin 1 の mRNA 量 を評価したところ , セレコキシブの同時添加により CDDP 単独添加時と比較して Atg5 , Atg7 , 及び Lc3 の mRNA 量が有意に増大し(Fig. 4) , セレコキシブによるオートファジー活性の亢進作用が確認された .

上記から , セレコキシブは酸化ストレスに対する抵抗性ならびにオートファジー活性の亢進作用により CDDP の細胞障害を軽減することが示唆された .

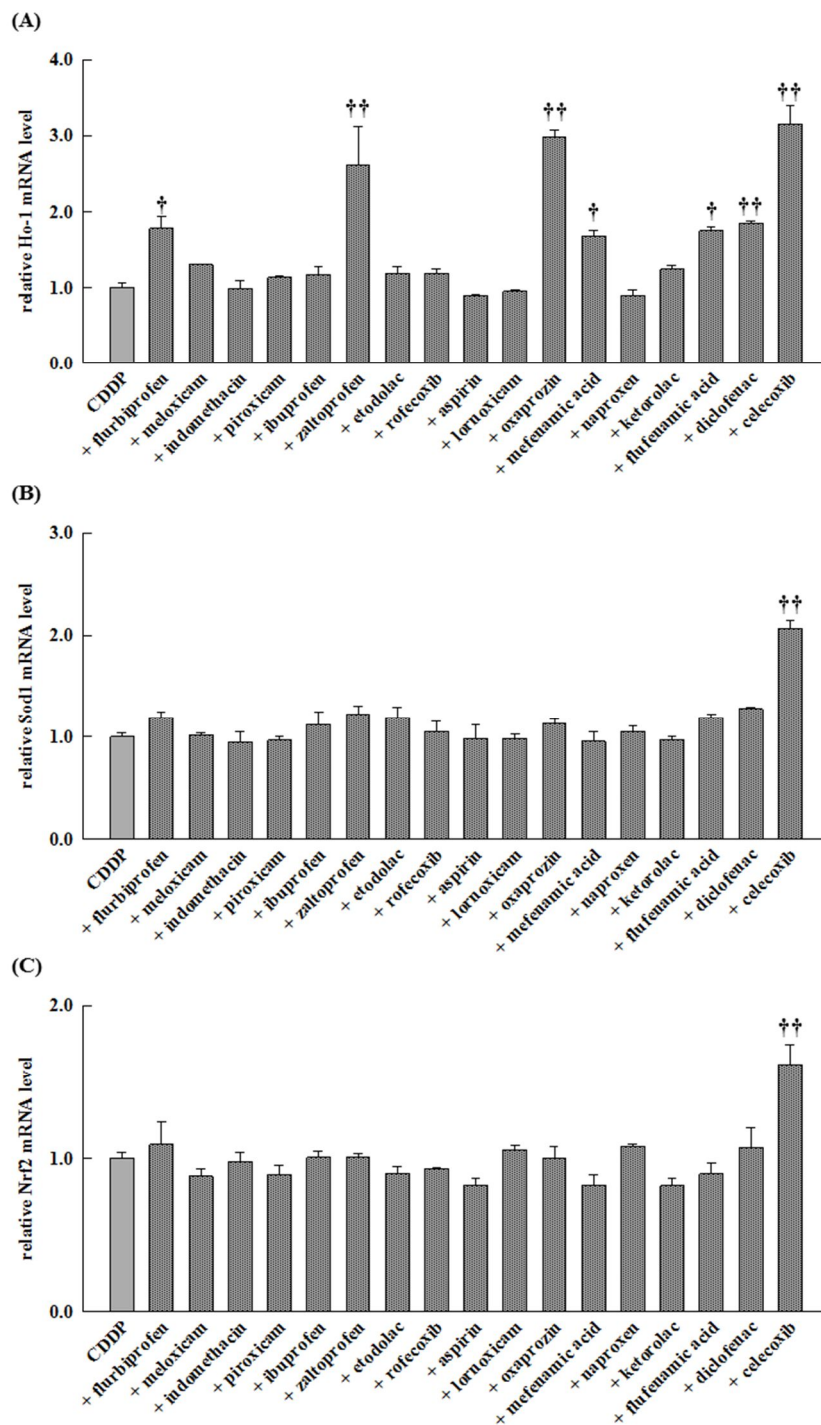


Figure 3. Effect of NSAIDs on mRNA levels of antioxidant markers in CDDP-treated NRK-52E cells.

†P < 0.05 and ††P < 0.01 compared with the CDDP group.

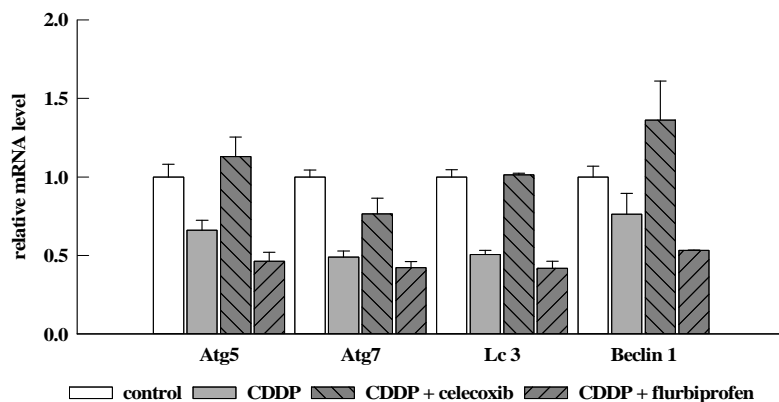


Figure 4. Effect of NSAIDs on mRNA levels of autophagy markers in CDDP-treated NRK-52E cells.

†P < 0.05 and ††P < 0.01 compared with the CDDP group, ‡P < 0.05 and ‡†P < 0.01 compared with the CDDP + celecoxib group.

先述の結果の再現性についてラットを用いて評価したところ、CDDPの投与によりSCrおよび腎障害マーカーKidney injury molecule 1 (Kim-1)のmRNA発現が上昇したが、セレコキシブがその上昇を抑制した(Fig. 5)。一方、フルルビプロフェンの併用によりKim-1は増大した。以上の結果より、セレコキシブのCIN軽減作用ならびにフルルビプロフェンのCIN悪化作用が*in vivo*でも確認された。

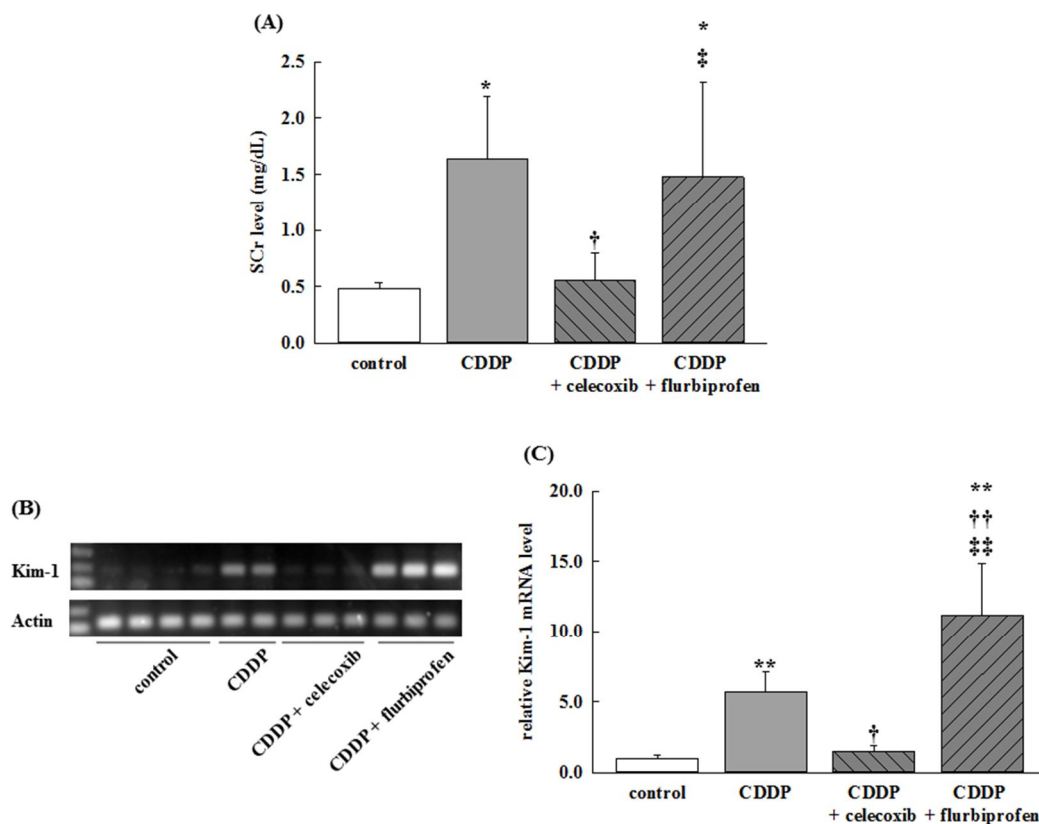


Figure 5. Effect of celecoxib and flurbiprofen on rats with nephrotoxicity by CDDP.

*P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the control group, †P < 0.05 and ††P < 0.01 compared with the CDDP group, ‡P < 0.05 and ‡‡P < 0.01 compared with the CDDP + celecoxib group,

(3) COX-2 選択的 NSAIDs が CIN に与える影響の評価 (臨床研究)

現在コントロール群21例,セレコキシブを含むCOX-2選択的NSAIDs投与群12例が集積できている。CDDPの投与量はコントロール群 $70.6 \pm 9.7 \text{ mg/m}^2$, COX-2選択的NSAIDs群 $71.5 \pm 8.9 \text{ mg/m}^2$, ベースラインのSCrは $0.64 \pm 0.13 \text{ mg/dL}$ および $0.65 \pm 0.15 \text{ mg/dL}$ であり両群間で差は認められなかった。治療中の最大SCrは各々 $0.78 \pm 0.20 \text{ mg/dL}$ および $0.87 \pm 0.24 \text{ mg/dL}$ であり,ベースラインとの差は各々 $0.14 \pm 0.13 \text{ mg/dL}$, $0.22 \pm 0.17 \text{ mg/dL}$ となり有意な差は認められなかった。また,CCrに関しても両群間で差はなかった。さらに治療終了時とベースラインのSCr,CCrの差も両群間で差は認められなかった。基礎研究の結果からCOXの阻害様式がCINに影響する可能性は低いと考えられるが,臨床での仮説検証のため調査期間の延長および必要症例数の再調整を行い引き続き検討していく予定である。

総括

本研究成果よりセレコキシブ特有のCIN予防・軽減作用が示された。本研究はCINマネジメントの観点からCDDPと併用可能なNSAIDsを細分化により探索したものであり,社会的意義は大きいと思われる。本報告では述べていないが,我々のグループはNSAIDsがCDDPの抗腫瘍効果に与える影響も検討している。その結果も踏まえCDDP投与時のNSAIDsの適正使用に貢献すべくさらなる検討を継続したい。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okamoto Keisuke, Saito Yoshitaka, Narumi Katsuya, Furugen Ayako, Iseki Ken, Kobayashi Masaki	4. 巻 884
2. 論文標題 Comparison of the nephroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cisplatin-induced nephrotoxicity in vitro and in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173339 ~ 173339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.173339	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
1. 著者名 OKAMOTO KEISUKE, SAITO YOSHITAKA, NARUMI KATSUYA, FURUGEN AYAKO, ISEKI KEN, KOBAYASHI MASAKI	4. 巻 40
2. 論文標題 Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Are a Risk Factor for Cisplatin-induced Nephrotoxicity: A Meta-analysis of Retrospective Studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1747 ~ 1751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.14128	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 Keisuke Okamoto, Yoshitaka Saito, Katsuya Narumi, Ayako Furugen, Ken Iseki, Masaki Kobayashi	4. 巻 74
2. 論文標題 Anticancer effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs against cancer cells and cancer stem cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology in vitro	6. 最初と最後の頁 105155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tiv.2021.105155	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 Okamoto K, Ueda H, Saito Y, Narumi K, Furugen A, Kobayashi M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Diclofenac potentiates the antitumor effect of cisplatin in a xenograft mouse model transplanted with cisplatin-resistant cells without enhancing cisplatin-induced nephrotoxicity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet	6. 最初と最後の頁 100417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2021.100417	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 Okamoto K, Kitaichi F, Saito Y, Ueda H, Narumi K, Furugen A, Kobayashi M.	4. 巻 909
2. 論文標題 Antioxidant effect of ascorbic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and P-glycoprotein expression in rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 174395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2021.174395.	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 0件)

1. 発表者名 岡本敬介、齋藤佳敬、小林正紀、古堅彩子、鳴海克哉、井関健
2. 発表標題 リバース・トランスレーショナルリサーチに基づいたシスプラチン起因性腎障害に及ぼすNSAIDsの影響の評価
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 岡本敬介、小林正紀、齋藤佳敬、古堅彩子、鳴海克哉、井関健
2. 発表標題 シスプラチンの抗腫瘍効果を増強させるNSAIDsの探索とシスプラチン起因性腎障害との関連
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 岡本 敬介, 齋藤 佳敬, 上田 一奈太, 古堅 彩子, 鳴海 克哉, 小林 正紀
2. 発表標題 シスプラチンの副作用と耐性化に着目したNSAIDsの効果の検証
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 佳敬
2. 発表標題 薬物治療管理業務を評価する ～より良い治療提供のために～
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 齋藤 佳敬
2. 発表標題 がん専門薬剤師による臨床アウトカムの創出
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
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