

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15300

研究課題名（和文）VEGF阻害薬誘発性腎障害における血管内皮機能障害の機能的意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the functional significance of vascular endothelial dysfunction in VEGF inhibitors-induced nephropathy

研究代表者

二瓶 哲（Nihei, Satoru）

岩手医科大学・薬学部・研究員

研究者番号：30898888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では血管内皮増殖因子（VEGF）阻害薬誘発性腎障害における血管内皮機能障害の機能的意義を明らかにすることを目指した。ヒト腎系球体内皮細胞のin vitro実験では、VEGF-A活性を阻害するベバシズマブ処理により、血管内皮機能障害マーカーのエンドセリン-1（ET-1）発現が亢進することを発見した。ベバシズマブ投与患者では、血漿中ET-1レベルが腎障害発現と関連することが明らかとなった。さらに、血管内皮機能と腎障害の関連性は、血管内皮機能の指標となる反応性充血指数の結果により裏付けられた。すなわち、血管内皮機能障害がVEGF阻害薬誘発性腎障害の発症機序に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベバシズマブなどのVEGF阻害薬は種々のがん疾患に対するキードラッグとして重要な役割を担っているが、蛋白尿や高血圧による腎障害が用量制限毒性となり、投与の中断や減量の原因となる。高血圧は降圧薬の使用によりコントロール可能なことが多いが、蛋白尿に対しては有効な予防法や治療法は存在しない。したがって、腎障害を回避するための新たな治療ターゲットやバイオマーカーの知見が求められており、本研究の成果はVEGF阻害薬に伴う血管内皮機能障害の機能的意義を明らかにするものであり、新規概念を提示するとともに臨床応用の可能性が高いと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to show the functional significance of vascular endothelial dysfunction in vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitors-induced nephrotoxicity. An in vitro model of cultured human glomerular endothelial cells showed that endothelin-1 (ET-1), a marker of vascular endothelial dysfunction, was upregulated by treatment with a humanized anti-VEGF monoclonal antibody (bevacizumab). In the study for patients treated with bevacizumab, we identified that plasma ET-1 levels were associated with the development of nephrotoxicity during bevacizumab treatment. Furthermore, the association between vascular endothelial function and nephrotoxicity was supported by the results of reactive hyperemia index (RHI), a measure of vascular endothelial function. We discovered that vascular endothelial dysfunction is involved in the pathogenesis of VEGF inhibitors-induced nephrotoxicity.

研究分野：医療系薬学

キーワード：VEGF阻害薬 血管内皮機能障害 腎障害 蛋白尿 高血圧 エンドセリン-1（ET-1） ベバシズマブ

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究では、高血圧の既往がベバシズマブで治療された患者の蛋白尿リスクを増大させることが複数報告されており、蛋白尿が動脈性高血圧に伴う糸球体内圧の上昇に起因する可能性を示唆している[1-3]。一方、前臨床研究では、作用機序の異なる降圧薬に対する高血圧と蛋白尿の反応が様々であったことから、これらの副作用は少なくとも部分的には無関係であることが示唆されている[4]。VEGF 阻害薬誘発性腎障害を発症した患者の病理組織学的所見の特徴としては、腎糸球体の血管内皮細胞障害が観察されている[5]。しかし、VEGF 阻害薬投与患者における血管内皮機能障害と腎障害の関連性を検討した報告はなく、血管内皮機能障害の機能的意義は明らかでない。

2. 研究の目的

ベバシズマブ投与患者を対象とした臨床研究を実施し、血管内皮機能障害と腎障害の関連性を明らかにする。また、ベバシズマブが血管内皮機能障害を起こす分子メカニズムを細胞レベルで解明する。これらの解析から、VEGF 阻害薬誘発性腎障害における血管内皮機能障害の機能的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、VEGF 阻害薬誘発性腎障害の発症機序を細胞レベルから生体レベルまで明らかにするために、次の研究を行った。

(1) ヒト腎糸球体内皮細胞を用いたin vitro実験

ヒト腎糸球体内皮細胞を用いて、ベバシズマブが血管内皮機能障害マーカーとして知られる ET-1 の発現を亢進させるのかを検討し、さらに ET-1 発現に関連する分子メカニズムを明らかにした。ヒト腎糸球体内皮細胞の ET-1 発現量については、サンプルから全 mRNA を抽出し、RT-PCR 法により ET-1 mRNA の発現レベルを分析した。細胞外への ET-1 分泌量については、培養液中の ET-1 蛋白質の発現レベルを ELISA 法により分析した。さらに、Akt および FoxO1 蛋白質の発現レベルおよびリン酸化状態の変化をウェスタンブロット法で分析した。

(2) ベバシズマブ投与患者を対象とした前向き観察研究

ベバシズマブを投与した結腸・直腸癌患者を対象に血漿中 ET-1 がベバシズマブ誘発性腎障害の発現と関連することを明らかにした。被験者 40 名から血液サンプルを採取し、血漿中 ET-1 レベルを ELISA 法により分析した。

ベバシズマブを投与した肝細胞癌患者を対象に血管内皮機能がベバシズマブ誘発性腎障害の発現と関連することを明らかにした。被験者 10 名に Endo-PAT2000[®]システムを用いて血管内皮機能検査を実施し、反応性充血指数を指標とした血管内皮機能を分析した。

、 のいずれにおいても、高血圧および蛋白尿については診察時の収縮期血圧/拡張期血圧 (SBP/DBP) および尿蛋白クレアチニン比 (UPC) をデータとして用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト腎糸球体内皮細胞を用いたin vitro実験

ベバシズマブはヒト腎糸球体内皮細胞の ET-1 mRNA および蛋白質の発現レベルを有意かつ

用量依存的に増加させた。ベバシズマブ処理はリン酸化 Akt 蛋白質の発現レベルの減少を誘導した。LY294002 による Akt 活性の阻害は ET-1 発現を亢進させた。また、ベバシズマブ処理は核内の FoxO1 蛋白質の発現レベルの増加も誘導した。AS1842856 による FoxO1 活性の阻害は、ベバシズマブ処理による ET-1 発現の亢進を無効化した (図 1)。ET-1 軸の活性化、Akt 不活性化、および FoxO1 の核局在は、ベバシズマブ誘発性腎毒性の根底にある分子メカニズムに関与している可能性が示唆された。

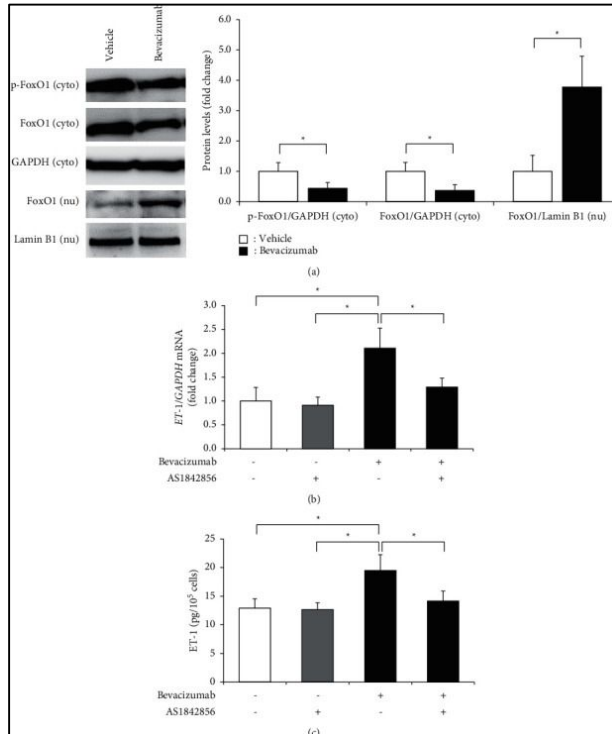


図 1. ベバシズマブで処理したヒト腎系球体内皮細胞の FoxO1 の核局在.

(a) 細胞質 (cyto) および核 (nu) 分画における FoxO1 蛋白質の発現レベル

(b) ET-1 mRNA の発現レベル

(c) ET-1 蛋白質の発現レベル

(2) ベバシズマブ投与患者を対象とした前向き観察研究

Grade2 以上の蛋白尿を認めた患者群では他の群より血漿中 ET-1 レベルが有意に高かった (図 2)。多変量解析では、年齢、収縮期血圧と拡張期血圧、およびベバシズマブ投与後の高血圧について調整後、血漿中 ET-1 レベルが Grade2 以上の蛋白尿発現の唯一の独立した予測因子であることが示された。ROC 解析では、Grade2 以上の蛋白尿を予測するための最適な血漿中 ET-1 レベルのカットオフ値は 1.19pg/mL であり、感度は 80.0%、特異度は 73.3%であることが示された。

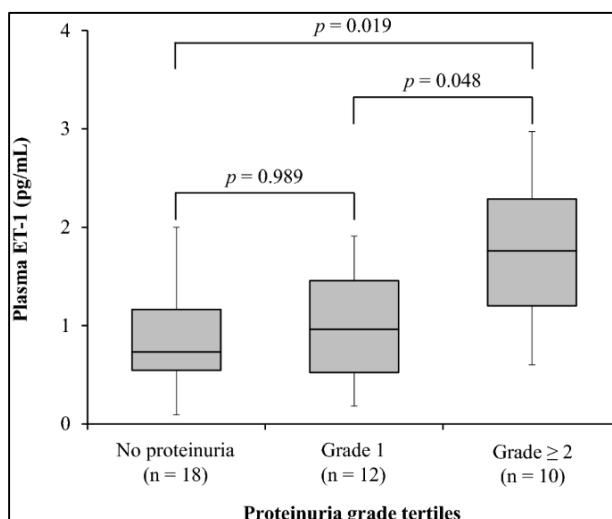


図 2. 蛋白尿 Grade の 3 段階に分類されたグループ間の血漿 ET-1 レベルの比較.

Grade2 以上の高血圧および蛋白尿は、10 例のうち 5 例および 3 例でそれぞれ認められた。

反応性充血指数の異常値は、10 例のうち 5 例で認められた。平均反応性充血指数は、治療前に比べて 1 サイクル終了時点で有意に低下した。SBP および UPC に対する反応性充血指数との相関性については、統計学的な有意差は認められなかったが、いずれも負の相関傾向を認めた。また、反応性充血指数と血漿中 ET-1 レベルは有意な負の相関を示した。

これまでの研究成果からは、ペバシズマブが VEGF 活性を阻害することにより血管内皮機能障害を引き起こすこと、さらには蛋白尿や高血圧を含む腎障害に血管内皮機能障害が関与していることを明らかにした。血管内皮機能障害は VEGF 阻害薬に関連する副作用対策の新しい治療ターゲットやバイオマーカーの候補として期待される。

<引用文献>

- [1] Kanbayashi Y, Ishikawa T, Tabuchi Y, Sakaguchi K, Ouchi Y, Otsuji E, Takayama K, Taguchi T (2020) Predictive factors for the development of proteinuria in cancer patients treated with bevacizumab, ramucirumab, and aflibercept: a single-institution retrospective analysis. *Sci Rep* 10(1):2011.
- [2] Kiyomi A, Koizumi F, Imai S, Yamana H, Horiguchi H, Fushimi K, Sugiura M (2023) Bevacizumab-induced proteinuria and its association with antihypertensive drugs: A retrospective cohort study using a Japanese administrative database. *PLoS One* 18(8):e0289950.
- [3] Nihei S, Sato J, Harada T, Kuyama S, Suzuki T, Waga N, Saito Y, Kisara S, Yokota A, Okada K, Tsuchiya M, Terui K, Tadokoro Y, Chiba T, Kudo K, Oizumi S, Inoue A, Morikawa N (2018) Antiproteinuric effects of renin-angiotensin inhibitors in lung cancer patients receiving bevacizumab. *Cancer Chemother Pharmacol* 81(6):1051-1059.
- [4] Lankhorst S, Kappers MH, van Esch JH, Smedts FM, Sleijfer S, Mathijssen RH, Baelde HJ, Danser AH, van den Meiracker AH (2014) Treatment of hypertension and renal injury induced by the angiogenesis inhibitor sunitinib: preclinical study. *Hypertension* 64(6):1282-1289.
- [5] Ollero M, Sahali D (2015) Inhibition of the VEGF signalling pathway and glomerular disorders. *Nephrol Dial Transplant* 30(9): 1449-1455.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nihei S, Asaka J, Takahashi H, Kudo K.	4. 巻 8381115
2. 論文標題 Bevacizumab Increases Endothelin-1 Production via Forkhead Box Protein O1 in Human Glomerular Microvascular Endothelial Cells In Vitro.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 8 pages
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/8381115.	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 該当する

1. 著者名 Nihei Satoru, Ikeda Tatsuki, Aoki Tomohiko, Murasato Futa, Yaegashi Mizunori, Asahi Koichi, Kudo Kenzo	4. 巻 91
2. 論文標題 Plasma endothelin-1 may predict bevacizumab-induced proteinuria in patients with colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 427 ~ 434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-023-04532-9	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 二瓶 哲、池田 樹生、青木 朋彦、寺長根 大輝、村里 風太、佐藤 文彦、佐々木 章、旭 浩一、工藤 賢三	
2. 発表標題 血漿中エンドセリン-1はベバシズマブ投与 による重度の蛋白尿発症を予測する： 前向き観察研究	
3. 学会等名 第32回日本医療薬学会年会	
4. 発表年 2022年	

1. 発表者名 二瓶 哲、朝賀 純一、高橋 宏彰、氏家 悠貴、青木 朋彦、大坂 紗也佳、村里 風太、佐藤 文彦、佐々木 章、旭 浩一、前門戸 任、工藤 賢三	
2. 発表標題 VEGF阻害薬投与患者の蛋白尿発症に対する適正な血圧管理の臨床的意義に関する後方視的コホート研究	
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 二瓶 哲、高橋 宏彰、朝賀 純一、工藤 賢三
2．発表標題 ヒト腎系球体内皮細胞のET-1産生調節に対するvascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) の役割
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 二瓶哲、朝賀純一、及川隆喜、旭浩一、工藤賢三
2．発表標題 ペバシズマブ投与患者における高血圧および蛋白尿に対する血管内皮機能の臨床的役割：前向きコホート研究
3．学会等名 第34回日本医療薬学会年会
4．発表年 2024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
---------	---------