



Acceleration of Proteinuria without Significant Impact on Renal Function and Its Protection by Angiotensin II Receptor Blocker in Rats Treated with Axitinib

Imai, Satoshi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6868号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006868>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Acceleration of Proteinuria without Significant Impact on Renal Function and Its Protection by Angiotensin II Receptor Blocker in Rats Treated with Axitinib

アキシチニブによる蛋白尿の腎機能への影響とアンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬によるその予防効果

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
腎泌尿器科学
(指導教員：藤澤 正人 教授)

今井 聡士

目的

転移性腎細胞癌に対し、血管内皮成長因子受容体 (VEGFR) を標的としたチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) が広く使用されるようになり、この 10 年足らずのうちに治療戦略が大きく変わった。第二世代 TKI である axitinib が登場したことにより転移性腎細胞癌に対する分子標的薬治療は現在、第二選択薬として各ガイドラインにて推奨されている。

さまざまな癌種に対し、TKI は有効であることが証明されているが、副作用は多彩である。大腸癌に使用する TKI (Bevasizumab) では、蛋白尿は 23-38% の頻度で出現するといわれ、主要な副作用の一つである。腎細胞癌ではその頻度は 64% にのぼり CTCAE の基準で Grade3 以上の蛋白尿は 6.5% に出現するとの報告もある。

蛋白尿は腎機能障害の重要なリスクファクターであるため、それにより休薬や減量を強いられ問題となることがある。

しかしながら蛋白尿出現の機序はいまだ不明であり、その予防策もないのが現状である。そこでわれわれは axitinib の投与による蛋白尿の腎機能に及ぼす影響と、糸球体基底膜の結合タンパクである nephrin と podocin に注目し蛋白尿の機序を解明することを目的とした。

また、アンギオテンシンⅡ受容体遮断薬 (ARB) は nephrin と podocin の結合を安定化させるとの報告もあるため、ARB を併用することにより、蛋白尿を予防する新たな治療法の探究を目的とし本研究を行った。

対象と方法

6 週齢の雄 Sprague-Dawley (SD) ラット計 35 匹を以下の 5 群にランダムに割り付け、4 週間の薬剤経口投与を行った。

A 群 : vehicle、B 群 : candesartan (0.5mg/kg/day) C 群 : axitinib (25 mg/kg/day)、D 群 : axitinib+candesartan、E 群 : axitinib 投与後 2 週間休薬

4 または 6 週の治療終了後に、腎、血液、尿を採取し、血清クレアチニン (Cr)、尿素窒素 (BUN) と尿中蛋白クレアチニン比 (UPC) を LSI Medicine 社に依頼し、測定した。各治療群のラット腎の nephrin と podocin の発現レベルを、免疫蛍光抗体法を用いて評価した。抗体はいずれも Santa Cruz Biotechnology 社のものを使用した。

評価方法は糸球体をランダムに 20 個選択し、発現レベルを弱いものから 5 段階にスコア化し、その平均値にて有意差を求めた。

糸球体の血管内皮障害による構造変化の有無を Cell Signaling Technology 社の CD34 抗体を用いて免疫染色で評価した。

全ての解析は Statview 5.0 software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) を用い、p 値は 0.05 以下を有意差ありとした。

結果

UPC はA,B 群に比較しC 群 (axitinib) が有意に高値であり、D,E 群と比較すると有意に減少した。(Fig. 1) また、血清 Cr と血清 BUN においては、5 群間で有意差を認めなかった。(Fig. 2A、B)

nephrin の発現パターンは、C 群の発現レベルはA、B 群に比較し有意に低下し、D、E 群と比較すると有意に増加した。それは、全治療群を通じ UPC の値に対し反比例して変化していた。Fig. 3) また、podcin の発現パターンも同様の発現傾向を示し、全治療群を通じ UPC の値に対し反比例して変化していた。(Fig. 4)

CD34 免疫染色では 5 群間で糸球体の形態的变化は見られず、発現に差を認めなかった。(Fig. 5)

考察

VEGF は血管内皮細胞に作用する血管増殖因子であり腫瘍増殖の過程で重要な役割を果たす。対して抗 VEGF である分子標的薬の登場により転移性腎細胞癌患者の予後は劇的に改善された。

その一方で、分子標的薬は多彩な副作用を呈すが、特に腎細胞癌において蛋白尿は薬剤投与量依存性に増加する副作用であり、それは VEGFR の不活化によるものと考えられ始めている。しかしながら、機序は明らかにされていないことから我々の研究に意義があると考えられる。

本研究の結果からは、axitinib を使用した C 群の UPC 値が有意に高値を示したが、ARB を併用することにより UPC が有意に低下した。過去には Angiotensin-converting enzyme inhibitor や ARB の使用により UPC を減少させたとの報告があるが、本研究のように抗 VEGF 薬により出現した UPC が ARB を併用することにより優位に減少させたとの報告は初めてである。

またさらには、axitinib を4週間内服した後、2 週間の休薬を設けるだけで UPC が改善したことは、我々が日常診療で遭遇する臨床像と合致する結果となった。また腎機能に関して我々は過去に、転移性腎細胞癌患者に対し axitinib を 12 週間以上投与している 65 人を対象に治療前後の腎機能の調査を行ったが、蛋白尿の有無にかかわらず腎機能に影響は及ぼさなかった、と報告した。

本研究でも 4 週間ではラットの腎機能自体には影響を及ぼさず、臨床データに一致するものであったが、観察期間が短く長期的なデータを観察することは本研究の課題と考える。正常腎において nephrin と podocin は、糸球体基底膜の足突起と足突起に存在し細胞間結合をつかさどり、糸球体濾過に重要な役割を果たすスリット膜蛋白であることが確認された。そして nephrin と podocin は、近年、微小変異型ネフローゼ症候群に関連すると報告され、ARB を使用することにより糸球体基底膜結合タンパクが安定し、蛋白尿が改善した、

と報告された。

それをうけ、本研究でも axitinib による蛋白尿出現の病態が nephrin と podocin の発現と関連していると考えた。

結果は nephrin と podocin の発現は全治療群を通じ UPC の値に対し反比例して変化しており、我々の仮説を支持するものであった。

本研究において ARB を併用することにより蛋白尿が予防されたことから、薬剤中止、減量の回避や、長期間投与が可能になることが期待された。

また、一方で、VEGF 受容体を標的とした分子標的薬が糸球体はい日細胞を傷害し、Thrombotic microangiopathy (TMA) を引き起こし、糸球体、ひいては腎機能に影響を及ぼすとの報告が散見される。われわれは CD34 抗体を用い内皮細胞の障害を評価したが 5 群間で有意差は認めなかった。糸球体にも TMA を示唆する所見は認められなかった。また腎機能には影響を及ぼさないまでも、腎の組織生検を行うと重度の形態的变化が認められる症例も報告されておりより感度の高い検出方法の探究が必要である。

本研究の今後の課題として、まず、4 週間と観察期間が短いため、より長期間の観察により腎機能を評価する必要がある。次に、腎機能障害の因子の一つである高血圧も、薬剤の副作用として頻度が高く、合併することも多いことから高血圧との関連も今後検討する必要がある。また、糸球体の形態変化に対して電子顕微鏡を用いた評価を行うこと、最後にその他の分子標的薬でも同様の研究結果が得られるかどうか評価することが今後の本研究の課題である。

総括

axitinib 投与により、nephrin と podocin の ダウンレギュレーションを来し UPC が有意に増加したものの腎機能自体には影響を及ぼさなかった。

axitinib によって誘発される蛋白尿は、ARB を追加することにより予防でき、axitinib を短期間、休薬することにより可逆的に回復することが示唆された。

糸球体の血管内皮障害による構造変化は認められなかった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2661 号	氏 名	今井 聡士
論文題目 Title of Dissertation	アキシチニブによる蛋白尿の腎機能への影響とアンギオテンシンⅡ受容体拮抗薬によるその予防効果 Acceleration of Proteinuria without Significant Impact on Renal Function and Its Protection by Angiotensin II Receptor Blocker in Rats Treated with Axitinib		
審査委員 Examiner	主 査 南 博 信 Chief Examiner 副 査 中 村 誠 Vice-examiner 副 査 真 庭 謙 昌 Vice-examiner		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

転移性腎細胞癌に対し、血管内皮成長因子受容体（VEGFR）を標的としたチロシンキナーゼ阻害薬（TKI）が広く使用されているが、TKI による多彩な副作用のうち、蛋白尿は高頻度に出現し時に重症化する。長期的な蛋白尿は腎機能障害の重要な要因であるため休薬や減量を要するが、蛋白尿の機序はいまだ不明であり予防策もない。そこで VEGFR を標的とする TKI である axitinib による蛋白尿が腎機能に及ぼす影響と、糸球体基底膜の結合タンパク（nephryn と podocin）に注目し蛋白尿の機序を解明し、かつ、アンギオテンシンⅡ受容体遮断薬（ARB）を併用することにより、蛋白尿を予防する新たな治療法の探究を目的とし本研究を行った。

【対象と方法】

ラット計 35 匹を A 群 (vehicle)、B 群 (candesartan)、C 群 (axitinib)、D 群 (axitinib + candesartan)、E 群 (axitinib 投与後 2 週間休薬) の 5 群に割り付け、4 週間の薬剤投与を行い、治療終了後に腎、血液、尿を採取し、血清クレアチニン (Cr)、尿素窒素 (BUN) と尿中蛋白クレアチニン比 (UPC) を測定した。腎の nephryn と podocin の発現レベルは免疫蛍光抗体法を用いて評価し、糸球体の血管内皮障害による構造変化の有無は CD34 抗体を用いた免疫染色で評価した。

【結果】

UPC は axitinib を投与した C 群が A、B 群より有意に高値であり、candesartan 併用 (D 群) あるいは休薬 (E 群) により有意に減少した。また、血清 Cr と血清 BUN は 5 群間で有意差を認めなかった。Nephryn と podocin の発現パターンは、C 群の発現は A、B 群に比較し有意に低下し、D、E 群と比較すると有意に増加した。それは、全治療群を通じ UPC の値に対し反比例して変化していた。CD34 免疫染色では 5 群間で糸球体の形態的变化は見られず、発現に差を認めなかった。

【考察】

今までも ACE 阻害薬や ARB により UPC が減少するという報告はあるが、本研究ではラットにおいて抗 VEGF 薬による UPC が ARB により有意に減少することを示し、2 週間の休薬で UPC が改善することを示した。この知見は、今後、臨床で蛋白尿の機序を解明し対応策を検討するための基礎情報となりうる。

微小変化型ネフローゼ症候群に対し ARB を使用することで、nephryn と podocin の結合が安定化し蛋白尿が改善するという報告から、これらの分子が axitinib による蛋白尿出現の機序にも関連していると考えられ、本研究の結果はこれを支持するものであった。また、axitinib 投与により nephryn と podocin の発現が低下し、UPC が有意に増加したものの腎機能には影響を及ぼさなかった。VEGFR を標的とする TKI の副作用として高血圧も問題となり、その治療に ARB も使用されるが、本研究では axitinib によって誘発される蛋白尿も ARB により予防できることが示唆された。

【結語】

本研究は VEGFR を標的とする TKI である axitinib による蛋白尿が ARB で予防できる可能性を示唆したものであり、今後の TKI による蛋白尿の予防法を開発する上で貴重な業績であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。