

BRAF 阻害剤ベムラフェニブの腎組織・細胞動態解析

申請者： 名古屋市立大学 大学院医学研究科
臨床薬剤学分野 真川 明将

共同研究者： 名古屋市立大学 大学院医学研究科
臨床薬剤学分野 堀田 祐志
名古屋市立大学 大学院医学研究科
臨床薬剤学分野 日比 陽子
名古屋市立大学 大学院薬学研究科
薬化学分野 家田 直弥
名古屋市立大学 大院薬学研究科
薬化学分野 中川 秀彦

1. 研究の背景・目的

本研究は、がん分子標的薬が数多く臨床で利用されているものの、その副作用の原因が標的分子への作用からは考えられないような副作用が生じていることから着想を得た研究である。ベムラフェニブ (VEM) は BRAF 変異を有するがんの治療薬であるが、腎尿細管に対する毒性を示すことが報告されている^{1,2}。正常な細胞は BRAF 変異を有さないことから、BRAF 以外の分子に対する作用が関わっていることが予想されるものの、情報が不足している¹。本研究課題では、VEM の尿細管毒性を一例として、がん分子標的薬の副作用発現メカニズムにつながる腎組織・細胞内動態をケミカルバイオロジーの手法をもちいて解明することを目的とした。

2. 研究の対象ならびに方法

1) 細胞および試薬

ヒト近位尿細管細胞由来の初代培養細胞 (RPTEC) の 8 継代までのものをもちいた³。ベムラフェニブ、Bafilomycin A1、XJB-5-131 は購入して使用した。その他のベムラフェニブ

ブ誘導体は合成により取得した。毒性評価には CCK-8 をもちいて細胞生存率を算出した。

2) 動物実験

先行研究においては、ベムラフェニブをマウスに経口投与することで腎障害モデルを作成している¹。本研究においては、ラットをもちいてモデル作成が可能かを検討した。使用動物は、8週齢の雄性 Wister/ST ラット 6 匹を 0.5% HMPC で溶解したベムラフェニブを 1 回 20mg/kg、1 日 2 回経口投与するベムラフェニブ群と、0.5% HMPC を経口投与するコントロール群に分け、急性腎障害を呈するか予備検討をおこなった。

採血は、0、7、14 日目に尾静脈を穿刺し、採血をおこなった。15 日目には、セボフルラン麻酔下で腹部を切開し、採血と両腎臓の摘出をおこなった。血液は生化学的検査の受託解析を依頼し、摘出腎はホルマリン固定後にパラフィン切片を作成し、HE 染色をおこなった。その後、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X810 をもちいて腎障害の程度を評価した。

3) VEM-NBD の細胞動態の解析

DMSO で溶解した VEM-NBD 1 を培地添加して 10 μ M とし、VEM-NBD1 を RPTEC に 30~60 分間取り込ませた。その後、培地を HBSS に置き換えて、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X810 をもちいて NBD が発する蛍光を GFP フィルターで検出しながら観察および解析した。

4) VEM-NBD と RPTEC 抽出物との結合アッセイ

ProteoExtract[®] Subculture ProteoExtract kit をもちいて RPTEC の細胞質画分と膜/オルガネラ画分を回収した。それらの画分と VEM-NBD を直接混合し、3 時間インキュベートした。VEM-NBD と結合した標的分子の解析は、12.5%のポリアクリルアミドゲル（プレキャストゲル）をもちいて SDS-PAGE により反応物を分離し、バリアブルイメーシングアナライザー Typhoon 9400 をもちいて緑色蛍光を検出した。その後、CBB 染色をおこない蛍光が確認できたバンドを切り取り、質量分析装置によるプロテオーム解析を実施した。

5) 細胞内微細構造とスーパーオキシドに着目した解析

ミトコンドリアとリソソームの追跡には MitoTracker と LysoTracker、ミトコンドリアのスーパーオキシド産生の測定には mtSOX をもちいた。これらの指示薬を 30 分間 RPTEC に取り込ませた後、ベムラフェニブに 24 時間曝露させ、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X810 により観察および解析した。

3. 研究の結果

1) VEM-NBD の合成

リガンドと結合した O-NBD (ニトロベンゾオキシジアゾール) ユニットは標的分子と結合すると、標的分子に結合するとリシン残基と共有結合を形成し、蛍光基である N-NBD に変換されることが報告されている (Yamaguchi T, et al. Chem Sci. 2014; 5: 1021-9.)。

この報告に基づき、リンカーを付加した VEM に O-NBD を結合させることで Turn-on 型のベムラフェニブ蛍光プローブ分子 VEM-NBD を 2 種類合成取得した。それらをヒト腎臓由来の尿細管上皮細胞 (RPTEC) からタンパクを抽出し反応させたところ、VEM-NBD-1 (図 1) においては、蛍光シグナルの増大を認めた。そのため VEM-NBD-1 をもちいて VEM の標的分子を探索する実験にもちいた。

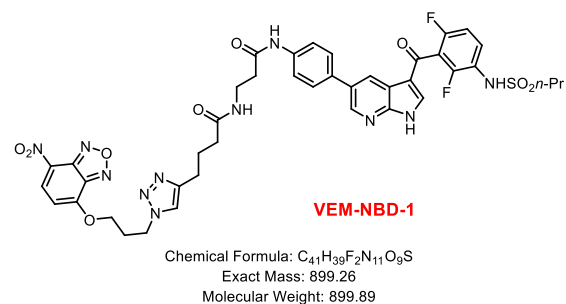


図 1. Turn-on 型蛍光プローブ分子 VEM-NBD-1 の化学構造

2) 細胞内動態の解析

RPTEC を 35mm のガラス底面ディッシュで培養し、VEM-NBD1 を取り込ませて蛍光顕微鏡で解析をおこなったが、いかなる条件においても RPTEC に緑色の蛍光は確認できなかった。したがって、VEM-NBD1 の細胞内動態の解析はできないことが示された。

3) ラットをもちいた予備検討

ラットをもちいてベムラフェニブ腎障害モデルを作成できるか予備検討をおこなったが、コントロール群とベムラフェニブ群の間に血清クレアチニンと尿素窒素の差はみられなかった。摘出した腎臓のパラフィン切片作成後 HE 染色をおこない、組織を観察した。しかしながら、コントロール群とベムラフェニブ群の間で、尿細管が傷害を受けている所見はみられなかった。この条件では、ラットをもちいたベムラフェニブ腎障害モデルを作成できないことが示唆された。

4) RPTEC 抽出物との結合アッセイ

3-2) と 3-3) の実験結果から、VEM-NBD1 をもちいた腎組織・細胞内動態の解析は困難

であることが明らかになった。そこで、RPTEC の抽出物と VEM-NBD1 を直接反応させて結合し、RPTEC 抽出物内に存在する標的分子をプロテオーム解析で明らかにしようと考えた。

RPTEC の細胞質画分と RPTEC の膜/オルガネラ画分に分けてタンパク抽出をおこない、それぞれの画分と VEM-NBD1 を 3 時間反応させて、SDS-PAGE 後にバリアブルイメージングアナライザーで解析した。また、ベムラフェニブ 50 μ M で競合阻害をおこなったサンプルも比較対象として泳動した。その結果、RPTEC の細胞質画分についてはいくつかのバンドが確認され、さらにベムラフェニブ 50 μ M によりバンドの蛍光がやや弱くなっているバンドが確認できた。細胞質

画分に存在する標的分子と

VEM-NBD の結合がベムラフェニブによって競合阻害されていると考えた。膜/オルガネラ画分についても、いくつかのバンドが確認できたがベムラフェニブによる競合阻害の影響は確認できなかった (図 2)。現在、細胞質画分の 29kDa と 32kDa 付近の蛋白質をプロテオーム解析により同定を試みている。

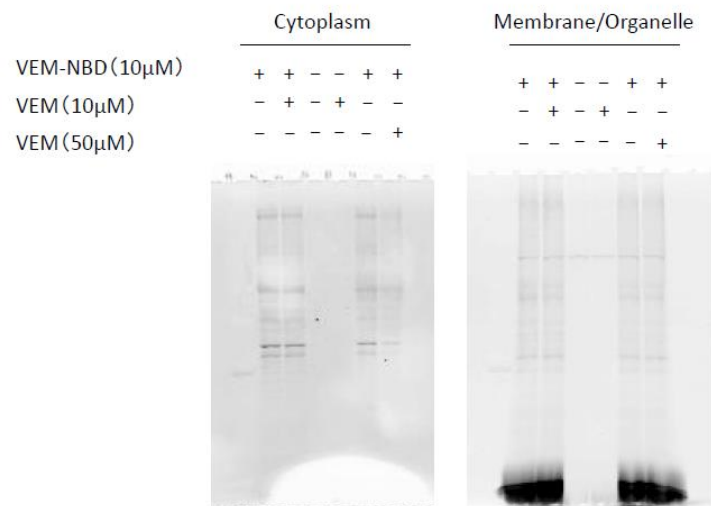


図 2. VEM-NBD と RPTEC 抽出物の結合アッセイ

5) ミトコンドリアに着目した RPTEC における毒性発現機構の解析

ミトコンドリアとリソソームの追跡試薬をもちいた解析結果から、ベムラフェニブによりミトコンドリアの追跡薬の蛍光強度は変化がみられないが、リソソームの追跡試薬の蛍光強度は有意に増加することが明らかになった。これはリソソーム障害が生じていることを示唆している。プロトンポンプ阻害剤 Bafilomycin A1 とベムラフェニブを共処理すると、リソソームの追跡薬の蛍光強度の増加は抑制された。そのため、ベムラフェニブによりリソソームの酸性度が増加し、Bafilomycin A1 により酸性度の増加が抑制されたと考えられた。しかし、ベムラフェニブによる RPTEC の生存率の低下は Bafilomycin A1 により回復がみられなかった。

ミトコンドリア活性酸素種スーパーオキシドの産生を mtSOX で解析した結果から、

mtSOX の蛍光強度はベムラフェニブにより有意に増加することが示された。つまり、ベムラフェニブによりスーパーオキシドの産生が増加することが明らかになった。ミトコンドリア特異的アンチオキシダント XJB-5-131 とベムラフェニブを共処理すると、mtSOX の蛍光強度の増加は有意に抑制された。また、XJB-5-131 は、ベムラフェニブによる RPTEC の生存率の低下を有意に改善させた。

4. 考察

本研究においては、Turn-on 型蛍光プローブ分子 VEM-NBD1 を合成取得し、先行研究で報告されている細胞内の動態解析や組織内動態の解析を試みたが、細胞内動態については蛍光顕微鏡で検出できる感度が得られなかった。組織内動態に関しては、まずマウスのプロトコルを参考にしてラットのベムラフェニブ腎障害モデルの作成を試みたが、作成できなかった。この理由には、投与量や投与期間、種差等のさまざまな原因が考えられるが、ラット摘出腎をもちいてベムラフェニブの薬物動態解析を試みたとしても、先行研究のマウスの結果やヒトにおけるベムラフェニブの動態や毒性発現を反映しない可能性があり、腎組織の動態解析を進めることはできないと判断した。

以上の結果から、本研究の目的であったベムラフェニブの腎組織・細胞内動態解析は実施不可能になってしまったが、RPTEC の抽出物と VEM-NBD1 を直接反応させ、感度の高い測定機器で蛍光を読み取るアプローチで、ベムラフェニブ標的分子の同定を試みた。その結果、細胞質画分にベムラフェニブの標的分子の候補が存在する可能性が示された。

さらに、細胞内微細構造とその機能に着目してベムラフェニブの尿細管毒性の機序の解析をおこなっていたところ、ベムラフェニブにより RPTEC のスーパーオキシド産生が増加していることが明らかになり、その産生増加をミトコンドリア特異的アンチオキシダントの XJB-5-131 で抑制すると、RPTEC の細胞生存率が改善することが確認できた。ベムラフェニブの尿細管毒性には、ヘム合成の最終酵素であるフェロキラーゼの活性阻害作用が部分的に関わることが示されている¹。スーパーオキシドはフェロキラーゼの活性を低下させるという報告も確認でき、本研究で得られた知見は先行研究の結果を補足する結果である可能性がある。

今後は、このベムラフェニブの尿細管毒性にスーパーオキシドが部分的に関わることについて、学会発表と論文執筆を予定している。また、プロテオーム解析による同定を試みているベムラフェニブの新規標的分子の候補については、現在プロテオーム解析により同定を試みており、精製された組み換えタンパク質と VEM-NBD1 を直接反応させる実験を計画している。この研究から、ベムラフェニブを一例として、がん分子標的薬の腎障害発

症の原因となるトリガー分子を特定できればと考えている。

5. 参考文献

- (1) Bai Y, Kim JY, Bisunke B, Jayne LA, Silvaroli JA, Balzer MS, Gandhi M, Huang KM, Sander V, Prosek J, Cianciolo RE, Baker SD, Sparreboom A, Jhaveri KD, Susztak K, Bajwa A, Pabla NS. Kidney toxicity of the BRAF-kinase inhibitor vemurafenib is driven by off-target ferrochelatase inhibition. *Kidney Int.* 2021; 100(6): 1214-1226.
- (2) Sanagawa A, Hotta Y, Mori N, Tomita N, Kataoka T, Tohkin M, Kimura K. BRAF/MEK inhibitor-associated nephrotoxicity in a real-world setting and human kidney cells. *Anticancer Drugs.* 2021; 32(10): 1076-1083.
- (3) Sanagawa A, Hotta Y, Sezaki R, Tomita N, Kataoka T, Furukawa-Hibi Y, Kimura K. Effect of Replicative Senescence on the Expression and Function of Transporters in Human Proximal Renal Tubular Epithelial Cells. *Biol Pharm Bull.* 2022; 45(11): 1636-1643.
- (4) Yu H, Alruwaili N, Kelly MR, Zhang B, Liu A, Wang Y, Sun D, Wolin MS. Endothelin-1 depletion of cartilage oligomeric matrix protein modulates pulmonary artery superoxide and iron metabolism-associated mitochondrial heme biosynthesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2022; 323(4): L400-L409.

6. 論文発表および学会発表

学会発表の予定

- (1) 第34回日本医療薬学会年会 会期：2024年11月2日～11月4日
- (2) 日本薬学会第145年会 会期：2025年3月26日～3月29日