

3. Akihiro Asakawa, Akira Niijima, Naoki Fujitsuka, Tomohisa Hattori, Marie Sameshima, Haruka Amitani, Akio Inui: Gastric ghrelin signaling and autonomic nervous system activity in rats. Digestive Disease Week. New Orleans, USA 2010. 5. 1-5.
4. Mineko Fujimiya, Rumi Tanaka, Koji Ataka, Kaori Atsuchi, Akihiro Asakawa, Akio Inui: New method of manometric measurement of gastroduodenal motility in conscious mice. Digestive Disease Week. New Orleans, USA 2010. 5. 1-5.
5. Akio Inui: Gut Hormonal Basis of Motility Regulation. 20th Australian & New Zealand Obesity Society Annual Scientific Meeting, Sydney, Australia 2010. 10. 21-23.
6. Akio Inui, Akihiro Asakawa, Mineko Fujimiya, Akira Niijima: Ghrelin - a Gut Hormonal Basis of Motility Regulation and FD. The 1st Asian pacific topic conference, Tokyo, Japan 2010. 11. 26-27. 1
7. Akihiro Asakawa, Koji Ataka, Mineko Fujimiya, Akio Inui: Ghrelin family of peptides and gut motility. The 1st Asian pacific topic conference, Tokyo, Japan 2010. 11. 26-27.

発明者：乾明夫、浅川明弘、藤塚直樹
出願番号：特願2010-274339

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
発明の名称：悪液質改善剤 (10P016)

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合研究事業）
分担研究報告書

六君子湯、大建中湯のがん悪液質(特に消化器症状)に対する効果の
ランダムイズドコントロールスタディ

研究分担者 浅香 正博 北海道大学大学院医学研究科消化器内科学分野 教授

研究要旨 六君子湯のがん悪液質に対する効果および抗がん薬による食欲不振に対する効果を明らかにするために、臨床試験プロトコルの作成を行った。また、六君子湯の消化器症候改善効果に対する機序を解明する目的で、動物実験を行った。高齢マウスは若年マウスに比べ、グレリンの反応性が低下し摂餌量が低下していたが、六君子湯はグレリン反応性を改善させることにより高齢マウスの摂餌量を増加させることを明らかにした。

A. 研究目的

我々はこれまでに、六君子湯がグレリンを介して食欲を増進させることを明らかにしてきた(Takeda et al, Gastroenterology 2008)。この結果をふまえ、六君子湯のがん悪液質の進行や、抗がん薬による食欲不振に対して効果があると考え、臨床試験を立案・計画した。

また、①加齢による食欲低下に対する六君子湯の効果およびその作用機序を解明することを目的として、動物実験を行った

B. 研究方法

若齢マウス(6週齢)および高齢マウス(75週齢)のグレリンおよびレプチン血中濃度、食餌摂取量を測定し、六君子湯投与による効果を調べ、またその

機序を解析した。

C. 研究結果

臨床試験プロトコルについては、「膵がん悪液質に対する六君子湯の無作為化第II相比較試験」と題したプロトコルコンセプトが完成し、現在フルプロトコルを作成中である。北海道内15施設の協力を得て、膵がん悪液質の初期段階にある患者を対象とし、体重の変化をプライマリーエンドポイントとした。また、シスプラチン投与による食欲不振に対する効果を検討するために、北海道大学病院の協力を得て現在プロトコルコンセプトを作成中である。これら二つの臨床試験について、すでにデータセンターおよび統計専門家も決定し、北海道大学病院の医師らとの会議も重ねてきた。

動物実験については、若齢マウスでは空腹時にグレリンの空腹時血中濃度が上昇するが、高齢マウスではその変化が認められなかった。また、若齢マウスではグレリンの投与により摂餌量が生理食塩水の投与に比し有意に増加したが、高齢マウスでは摂餌量が増加しなかった。一方、食欲抑制に働くホルモンであるレプチンの血中濃度は、高齢マウスでは若齢マウスに比べ著明に高値であり、絶食にしても低下しないことが明らかとなった。さらに、視床下部のレプチン受容体の下流に存在するphosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) やphosphodiesterase-3 (PDE3)の阻害剤を投与すると、高齢マウスの摂餌量が有意に増加した。六君子湯の各成分のPI3KおよびPDE3に対する阻害活性を検討したところ、PI3Kに対する阻害活性は認められなかったが、flavonoidおよびcoumarinに分類されるいくつかの成分がPDE3の阻害活性を有することが明らかとなった。そこで、六君子湯を高齢マウスに対して投与したところ、摂餌量が有意に増加した。

D. 考察

臨床試験については、これら二つのプロトコールを作成し、フルプロトコールが完成したのちプロトコール審査委員会に諮り、各施設の倫理委員会の承認を得たのち臨床試験が開始される予定である。

動物実験については、高齢マウスでは非常に高濃度のレプチンにより食欲不振に陥っており、そのためグレリンを投与しても、視床下部において高濃度のレプチンがグレリンのシグナルを抑制してしまうために食欲が回復しな

いこと、また六君子湯は視床下部のPDE3を阻害し、高齢マウスの食欲を回復させることが明らかとなった。

E. 結論

六君子湯の二つの臨床試験のプロトコールを作成中である。

高齢者はグレリン反応性の低下により食欲不振になり、六君子湯はPDE阻害作用によりこれを改善させる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeda H, Muto S, Hattori T, Sadakane C, Tsuchiya K, Katsurada T, Ohkawara T, Oridate N, Asaka M. Rikkunshito ameliorates the aging-associated decrease in ghrelin receptor reactivity via phosphodiesterase III inhibition. *Endocrinology*, 151 (1): 244-252, 2010.
2. Hayakawa S, Shiratori S, Yamato H, Kameyama T, Kitatsuji C, Kashigi F, Goto S, Kameoka S, Fujikura D, Yamada T, Mizutani T, Kazumata M, Sato M, Tanaka J, Asaka M, Ohba Y, Miyazaki T, Imamura M, Takaoka A. ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nat Immunol*, Epub ahead of print, 2010.
3. Kato M, Kamada G, Yamamoto K, Nishida U, Imai A, Yoshida T, Ono S, Nakagawa M, Nakagawa S, Shimizu Y, Asaka M. Lafutidine prevents low-dose aspirin and loxoprofen induced gastric injury: a randomized, double-blinded, placebo controlled study. *J Gastroenterol Hepatol*, 25: 1631-1635,

- 2010.
4. Mizutani T, Kondo T, Darmanin S, Tsuda M, Tanaka S, Tobiume M, Asaka M, Ohba Y. A novel FRET-based biosensor for the measurement of BCR-ABL activity and its response to drugs in living cells. Clin Drug Investig, 16 (15): 3964-, 2010.
 5. Yuuki S, Komatsu Y, Fuse N, Kato T, Miyagishima T, Kudo M, Watanabe M, Tateyama M, Kunieda Y, Wakahama O, Sakata Y, Asaka M. Modified-irinotecan/fluorouracil/levoleucovorin therapy as ambulatory treatment for metastatic colorectal cancer: results of phase I and II studies. Clin Drug Investig, 30: 243-249, 2010.
 6. 武田 宏司、武藤 修一、大西 俊介、浅香 正博. 機能性ディスペプシアおよび食欲不振に対する漢方治療. 日本消化器病学会雑誌, 107 (10): 1586-1591, 2010.
2. 学会発表
国内学会：
1. 小松嘉人, 結城敏志, 久須美貴哉, 細川正夫, 高木智史, 畑中一映, 成瀬宏仁, 中積宏之, 竹内啓, 加藤寛士, 横山仁, 細川歩, 目黒高志, 堀田彰一, 浅香正博 切除不能大腸癌に対するBevacizumab使用に関する調査(HGCSG0801) 年齢別の解析 第48回日本癌治療学会学術集会、京都市 (2010年10月)
 2. 中村路夫, 結城敏志, 小林良充, 久須美貴哉, 細川正夫, 渡辺豊, 畑中一映, 上畠寧子, 武藤修一, 宮城島拓人, 西研, 細川歩, 加藤貴司, 浅香正博, 小松嘉人 切除不能大腸癌に対するBevacizumab使用に関する調査(HGCSG0801) 全症例のアップデート 第48回日本癌治療学会学術集会、京都市 (2010年10月)
 3. 曾我部進, 結城敏志, 久須美貴哉, 細川正夫, 渡辺豊, 畑中一映, 中村路夫, 工藤峰生, 山内純, 宮城島拓人, 月岡雄治, 上林実, 福島拓, 浅香正博, 小松嘉人 切除不能大腸癌に対するBevacizumab使用に関する調査(HGCSG0801) 継続使用例の解析 第48回日本癌治療学会学術集会、京都市 (2010年10月)
 4. 藤川幸司, 結城敏志, 小林良充, 辻靖, 畑中一映, 棟方正樹, 高橋康雄, 月岡雄治, 久能健一, 高野眞寿, 上林実, 太田智之, 浅香正博, 小松嘉人 セツキシマブ使用例のレトロスペクティブ調査(HGCSG0901) Cetuximab単剤使用例の解析 第48回日本癌治療学会学術集会、京都市 (2010年10月)
 5. 川本泰之, 土原一哉, 吉野孝之, 小笠原直美, 小嶋基弘, 落合淳志, 坂東英明, 原浩樹, 布施望, 田原信, 土井俊彦, 大津敦, 浅香正博, 江角浩安 大腸癌術後補助FOLFOX療法施行症例における化学療法前後のKRAS遺伝子変異一致率の検討 第48回日本癌治療学会学術集会、京都市 (2010年10月)
 6. 石黒敦, 結城敏志, 曾我部進, 古川孝広, 畑中一映, 宮城島拓人, 武藤修一, 渡辺豊, 腰山達美, 加藤寛士, 奥田博介, 池田慎一郎, 棟方正樹, 浅香正博, 小松嘉人 セツキシマブ使用例のレトロスペクティブ調査(HGCSG0901) CPT-11+ Cetuximab例の解析 第48回日本癌治療学会学術集会、京都市 (2010年10月)

7. 畑中一映, 結城敏志, 中積宏之, 辻靖, 成瀬宏仁, 棟方正樹, 小川浩平, 新谷直昭, 佐藤康史, 加藤貴司, 中村路夫, 伊東重豪, 竹内啓, 浅香正博, 小松嘉人 切除不能結腸直腸癌に対するセツキシマブ使用例のレトロスペクティブ調 (HGCSG0901) 第48回日本癌治療学会学術集会、京都市 (2010年10月)
8. 中積宏之, 結城敏志, 曾我部進, 園田範和, 武藤修一, 高野眞寿, 工藤峰生, 加藤寛土, 小田寿, 宮城島拓人, 上林実, 目黒高志, 浅香正博, 小松嘉人 mFOLFOX6療法時の悪心・嘔吐に対する塩酸インジセトロン錠の至適投与法(HGCSG 0703) 第48回日本癌治療学会学術集会、京都市 (2010年10月)
9. 結城敏志, 小松嘉人, 福島拓, 辻靖, 畑中一映, 棟方正樹, 細川歩, 高橋康雄, 久須美貴哉, 斎藤聡, 舘山美樹, 横山仁, 浅香正博 分子標的治療におけるバイオマーカーの役割 セツキシマブ使用症例のレトロスペクティブ調査(HGCSG0901) KRAS status別の解析 第48回日本癌治療学会学術集会、京都市 (2010年10月)
10. 桂田武彦, 石忠明, 平山剛, 小林和夏, 浅香正博, 武田宏司 消化態流動食(新ペプチャーノ)における官能評価に関する調査 第14回日本病態栄養学会年次集会、横浜市 (2011年1月)
11. 佐藤康史, 結城敏志, 中積宏之, 古川孝広, 成瀬宏仁, 棟方正樹, 梶浦新也, 高橋康雄, 久須美貴哉, 斎藤聡, 舘山美樹, 中村路夫, 伊東重豪, 加藤淳二, 浅香正博, 小松嘉人 切除不能進行結腸直腸癌に対するセツキシマブ使用症例のレトロスペクティブ調査(HGCSG0901) KRAS status別の解析 第96回日本消化器病学会 (2010年4月)
12. 宮城島拓人, 結城敏志, 小林良充, 久須美貴哉, 畑中一映, 渡邊豊, 加藤貴司, 小川浩平, 中村路夫, 武藤修一, 内田多久實, 山内純, 腰山達美, 加藤寛土, 浅香正博, 小松嘉人 切除不能結腸直腸癌に対するBevacizumabの安全性および有用性を検討するレトロスペクティブ調査 レジメン別解析のアップデート報告(HGCSG0801) 第96回日本消化器病学会 (2010年4月)
13. 武藤修一, 武田宏司, 浅香正博 栄養素の違いと血漿グレリン濃度の変動について 第96回日本消化器病学会 (2010年4月)
14. 小野尚子, 加藤元嗣, 浅香正博 H.pyloriと胃癌の基礎と臨床 H.pylori陰性胃癌の臨床病理学的検討 第96回日本消化器病学会 (2010年4月)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合研究事業）
分担研究報告書

抗がん剤による副作用に対する六君子湯、大建中湯の効果の
ランダムマイズドコントロールスタディ

研究分担者 木下 優子 日本大学医学部緩和ケア室 室長

研究要旨 六君子湯を中心とした漢方薬の緩和ケア領域での有用性について検討する。

実際の臨床において、どのような漢方薬が有効かを検討する。また漢方薬の使用において留意する点について検討する。漢方医学の専門家の立場から実際の臨床で使用されている漢方のアンケートの作成に協力する。

A. 研究目的

漢方薬の緩和ケア領域での有用性について検討する。緩和ケアではQOL (Quality of Life) が重要視されるため、それに寄与できることを中心に漢方治療を組み立てる。漢方薬による症状緩和で治療や闘病に関する意欲の維持を目的とする。特に抗がん剤治療では副作用による中断や患者の苦痛による継続拒否が多くみられるため、副作用を軽減することで治療の継続およびQOLの改善をめざす。同時に今後の展望を見据えるために、一般医師の緩和ケアに対する漢方治療の現状を把握する。

B. 研究方法

実際の臨床で個別に行われている治療とその効果に関するデータの蓄積を行う。特に抗がん剤治療の副作用軽減

に有効な漢方薬について、六君子湯を中心に効果を検討する。

また一般医師の緩和ケアに対する漢方治療の現状を把握するために、どのような症状や病名に関する治療が行われているかについてアンケート調査を行う。木下は漢方の専門家として緩和ケアにおける漢方薬の代表的な使用方法を集約し、それが漢方医学的な使用方法に反しないことも確認したうえで、アンケート作成に協力する。

(倫理面への配慮)

研究の匿名性に配慮する。治療自体はすでに確立されており、通常の診療や投薬と変わらないので問題がないと考えられる。

C. 研究結果

症状緩和において漢方薬は有用であり、現疾患自体によるものであれ、抗がん剤の副作用によるものであれ、全身倦怠感に対して十全大補湯は有効であった。大建中湯は麻痺性イレウスの頻用処方であるが、腸管ぜん動を改善する効果があるためオピオイドによる便秘にも有効であった。しかし、エキス製剤の量が15gと多く、ドラッグコンプライアンスには問題があった。抗がん剤治療時の嘔気嘔吐に対する六君子湯は内服可能であれば効果が期待できることがわかったが、エキス製剤であるため内服が困難な場合があった。また漢方薬は本来、随症治療といい、患者一人一人の病態に合わせて処方されるものであるが、そのような使用をしている医師は少なく、病状や病態に対して投与している場合が多いことがわかった。

D. 考察

漢方薬は症状に合わせて使い分けることでQOL向上に寄与できるが、使い分けるといふ概念が一般の医師には困難な側面があると考えられた。また十全大補湯は悪性疾患に使われる漢方薬として、データは不十分ながらも一般に知られており、患者からの依頼で処方したという医師がいることがわかった。六君子湯については、抗がん剤投与後は嘔気が出現し内服困難になるため、投与前の内服が望ましい。同時に今後は氷にして口に含ませるなど、投与方法にも検討が必要であると思われる。副作用については乾燥傾向の強い患者では使用を差し控えるべきであるが、このことが周知されていないこともわかった。

また、一般の医師は病名や病態に対して漢方投与することから、エビデンスがあるもの（十全大補湯、大建中湯など）や、添付文書やレジメンで使用が推奨されているもの（牛車腎気丸や半夏瀉心湯など）使用しやすいと考えられる。

E. 結論

十全大補湯、大建中湯、六君子湯については、広く臨床の現場で使用されている。漢方薬は症状緩和において有効であるが、その使用方法や使用目的に関しては十分確立されたとは言えない。

漢方薬は従来、随症治療という個別の使い分けが推奨されてきたが、今後は疾患や病態ごとにエビデンスの確立をしていくことが、より安全に緩和ケア領域で漢方を使用するために必要なことであると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 木下優子. 緩和ケアにおける漢方治療. 産婦人科漢方研究のあゆみNo 27別刷. 産婦人科漢方研究会編, 診断と治療社, 東京 p1-4 (2010).

2. 学会発表

1. 木下優子. シンポジウム2 緩和医療を多角的に考える 緩和ケアにおける漢方治療の現状と今後. 第4回日本緩和医療薬学会年会 鹿児島市 (2010年9月)

2. 木下優子、上田ゆき子、矢久保修嗣.
漢方医学からみた慢性疼痛. 第40
回慢性疼痛学会 東京都 (2011年2
月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合研究事業）
分担研究報告書

六君子湯、大建中湯のがん悪液質に及ぼす効果の中枢への関与の解析

研究分担者 上田 陽一 産業医科大学 教授

研究要旨 がん悪液質モデル動物および慢性炎症モデル動物を作成し、脳内の特に視床下部における摂食関連ペプチド遺伝子発現の動態を明らかにした。さらに、食思不振モデル動物を作成し、視床下部ニューロン活動を指標として六君子湯、大建中湯の経口投与の効果判定を試みを行った。

A. 研究目的

我々の摂食行動は、末梢からの液性・神経性情報および高次脳機能からの情報が視床下部（摂食中枢および満腹中枢）で統合されることによって調節されている。近年、視床下部ニューロンが種々の摂食促進ペプチド・摂食抑制ペプチド（摂食関連ペプチド）を産生しており、摂食行動・代謝調節に重要であることが明らかになりつつある。そこで、我々はがん悪液質で特徴的な食思不振、体重減少および嘔気・嘔吐を惹起する脳内メカニズムについて主に視床下部で産生される摂食関連ペプチドに焦点を当てて解明すること、さらには、がん悪液質および抗がん剤の副作用に対する六君子湯、大建中湯の効果のメカニズムを視床下部摂食関連ペプチドの動態を指標として脳内神経回路・分子基盤から解明することを目的とした。

B. 研究方法

- ① 人由来大細胞性肺癌株もしくはSEKIメラノーマ細胞株を5週令雄性ヌードラットの皮下に移植し、がん悪液質状態の担がんラットを作成した。また、8週令雄性ウイスターラット尾部皮内に結核死菌(1mg/ラット)投与し、アジュバント関節炎モデルラットを作成した。2種類の癌悪液質ラットおよびアジュバント関節炎モデルラットを断頭後、脳を取り出して凍結切片を作成した。RI(³⁵S)標識したオリゴ合成DNAプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーション法により視床下部摂食促進ペプチド(NPY, AgRP) 遺伝子および摂食抑制ペプチド(POMC, CART, CRH) 遺伝子の発現をフィルムオートラジオグラフィおよび画像解析装置(MCID)により定量化した。
- ② 食思不振モデルラットを摂食抑制ペプチドであるコレシストキニン

(CCK-8) を腹腔内に投与(20 μ g/Kg 体重)して作成した。CCK-8投与前に2回(16時間前および直前)にわたり生理食塩水、六君子湯(300mg/kg)、大建中湯(1g/kg)を経口投与して30分後に断頭した。各群6匹とした。脳を取り出して凍結切片を作成し、RI(³⁵S)標識したオリゴ合成DNAプローブを用いてin situハイブリダイゼーション法により視床下部室傍核ニューロンにおける神経活動の指標である*c-fos* mRNAの発現変化をフィルムオートラジオグラフィーおよび画像解析装置(MCID)により定量化した。

(倫理面への配慮)

産業医科大学動物実験委員会に申請し、承認を得た後に実験を行った。

C. 研究結果

- ① 2種類のがん悪液質モデルラットおよびアジュバント関節炎モデルラットのいずれにも視床下部摂食促進ペプチド遺伝子(NPY, AgRP)発現の有意な増加および摂食抑制ペプチド(POMC, CART, CRH)遺伝子発現の有意な減少が見られた。
- ② ラット腹腔内にCCK-8を投与すると室傍核ニューロンに*c-fos* mRNAが著明に発現した。この増加は、六君子湯、大建中湯の経口投与群では抑制されなかった。

D. 考察

がん悪液質モデルラットと慢性炎症モデルラットの両者で脳内、特に視床

下部摂食関連ペプチド遺伝子発現の動向が類似していたことは興味深い。両者の食思不振を惹起するメカニズムに共通の脳内神経回路が存在することが考えられる。ただし、食思不振であることから視床下部における摂食促進ペプチドの抑制と摂食抑制ペプチドの促進が予想されたが、結果は逆であった。今後、この点について検討する必要がある。

CCK-8の腹腔内投与による摂食抑制作用は嘔吐しない動物であるラットにおいては悪心・嘔気によるものであると考えられている。この反応は、ラットに視床下部-下垂体-副腎軸の賦活化というストレス反応を引き起こすことも知られている。したがって、CCK-8の末梢投与によって惹起された悪心・嘔気は室傍核のCRHニューロンを活性化し、その結果、室傍核の*c-fos* mRNAが著明に増加したと考えられる。今回、六君子湯、大建中湯の経口投与ではこの反応を抑制することが出来なかった。今後、投与量や投与のタイミングなどを検討する必要がある。

E. 結論

がん悪液質モデル動物および慢性炎症モデル動物において視床下部摂食関連ペプチド遺伝子発現は類似の反応を示した。悪心・嘔吐のモデル動物における視床下部性ストレス反応は六君子湯、大建中湯の経口投与では抑制することができなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, H. Hashimoto, H. Kawasaki,

M. Watanabe, M. Otsubo, H. Ishikura, T. Fujihara, H. Ohnishi, H. Onuma, E. Yamada-Okabe, H. Takuwa, Y. Ogata, E. Nakamura, T. & Ueta, Y. Similar changes of hypothalamic feeding-regulating peptides mRNAs and plasma leptin levels in PTHrP-, LIF-secreting tumors-induced cachectic rats and adjuvant arthritic rats. *International Journal of Cancer*, 128: 2215-2223, 2011

2. Yokoyama, T. Ohbuchi, T. Saito, T. Fujihara, H. Minami, K. Nagatomo, T. Uezono, Y. & Ueta, Y. Allyl isothiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats. *European Journal of Pharmacology*, 655: 31-37, 2011.

2. 学会発表

1. 上田 陽一 (2010年5月19-21日) 食思不振-悪液質動物モデルにおける視床下部神経ペプチドの反応、第87回日本生理学会大会シンポジウム、盛岡
2. 藤原 広明、川崎 展、石倉 透、上田 陽一 (2010年6月25-26日) 急性および慢性炎症時のラット下垂体後葉における galanin-like peptide 遺伝子の発現誘導：炎症性サイトカインの関与、第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、北九州
3. 鈴木 仁士、石倉 透、藤原 広明、上田 陽一 (2010年6月25-26日) 関節炎モデルラットおよび担癌ラットにおける視床下部摂食関連ペプチド遺伝子発現についての検討、第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、北九州

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
特記事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合研究事業）
分担研究報告書

がん悪液質モデル動物の構築、並びに悪液質発生機序の解明と治療法の開発

研究分担者 塚田 俊彦 独立行政法人国立がん研究センター研究所
家族性腫瘍研究分野 分野長

研究要旨 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を簡便に検出できる培養細胞系の確立を試みたが、分化を反映する系は得られなかった。一方、神経内分泌培養細胞を用いて、六君子湯抽出物がcAMP応答プロモーターからの遺伝子転写を促進することを明らかにした。マウスの食欲調節脳内ペプチドの簡便な測定系を確立した。

A. 研究目的

がん悪液質治療の候補薬物探索への利用を目的として、脂肪細胞の分化に及ぼす薬物の影響を検出できる培養細胞を用いた測定系を開発する。さらに、がん悪液質に及ぼす六君子湯の効果をサイトカインとの相互作用に注目して細胞レベルで解析する。また、動物の食行動に影響を及ぼす薬剤の食欲中枢への作用を検出するために、食欲調節脳内ペプチドmRNAの測定系を開発する。

B. 研究方法

(1) 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化に影響する因子を簡便に検出できる測定系を開発する。そのために、マウス脂肪前駆細胞の培養細胞3T3-L1細胞に脂肪細胞への分化により発現が増加する遺伝子のプロモーター活性を簡便に測定できる細胞の作製を試みた。

(2) 生理活性物質をスクリーニングする培養細胞系として、ラット褐色細胞腫細胞PC12由来でcAMP応答領域を有する遺伝子プロモーターの活性を簡便に検出できる細胞(PCVG細胞)を用い、六君子湯に含まれる生理活性物質のスクリーニングを行った。

(3) がん悪液質モデルマウスの視床下部中のニューロペプチドmRNAを簡便に定量できる方法としてリアルタイムPCRを応用する方法を開発した。

(倫理面への配慮)

本年度の研究では、ヒト由来の試料等を用いる研究は行わなかった。また、動物由来の組織は既収集試料のみを用い、動物生体は用いなかった。

C. 研究結果

(1) 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化に影響する因子を簡便に検出でき

る測定系の開発

脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を検出する系として、マウス線維芽細胞由来の脂肪前駆細胞3T3-L1をインスリン、イソブチルメチルキサンチン (IBMX) およびデキサメタゾンの3者を用いて分化誘導し、脂肪細胞への分化をオイルレッドOによる脂肪滴染色により判定する系が用いられている。この測定系は、脂肪の蓄積という成熟脂肪細胞の特性を用いるため、脂肪細胞への分化を誤りなく判定できるという利点があるが、判定に主観が入る余地があり、客観性に乏しいという欠点がある。そこで、脂肪細胞で高度に発現する遺伝子のプロモーターにより発現が制御されるレポーター遺伝子を作製し、これを3T3-L1細胞に安定的に導入することにより、脂肪細胞への分化を簡便かつ客観的に検出できる培養細胞系の開発を試みた。成熟した脂肪細胞で発現増加が見られる遺伝子として lipoprotein lipase (LPL) 遺伝子、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 遺伝子、adiponectin (ADIPOQ) 遺伝子を用いた。2種類の出所の異なる3T3-L1細胞 (TEP細胞およびUTP細胞) において、分化誘導に伴うLPL mRNAとPPAR γ mRNAの量をリアルタイムPCRにより測定したところ、TEP細胞では両遺伝子とも発現上昇が認められたが、UTP細胞では全く変化が認められなかった。オイルレッドO染色による分化判定でも、UTP細胞はTEP細胞より分化程度が低いことが判明したため、以後はTEP細胞を用いることとした。遺伝子プロモーターとしてマウスLPL遺伝子、マウスPPAR γ 遺伝子、マウスADIPOQ遺伝子のそれぞれの約2000塩基対領域を用い、レポーター遺

伝子としてtdTomato、EGFP、 β galactosidase (Gal)、及びGalとtdTomatoの融合タンパクを用いた。カナマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドベクターにレポーターを含む融合遺伝子を組み込み、3T3-L1細胞 (TEP細胞) にトランスフェクションした後、G418耐性細胞をクローンとして選択分離した。分化実験における蛍光強度の測定は、96穴プレートで培養した細胞が発する蛍光を蛍光測定装置 (Safire, TECAN) により測定した。基礎検討の結果、レポーター遺伝子として蛍光タンパクtdTomatoを用いたものが最も蛍光が強く、培養プレートのプラスチック由来の蛍光や細胞の自家蛍光とも波長の重なりが少なかったため、以後は主にLPL-tdTomato (LPL細胞) およびPPAR γ -tdTomato (PPAR細胞) を導入した細胞で実験を行った。また、培養液が相当な蛍光を発することやホルムアルデヒドによる固定がtdTomatoの蛍光を極度に減弱させることが判明したため、培養液を除去し、細胞を固定することなく蛍光強度を測定した。分化を阻害する因子として、TNF α やIL-6が知られているため、分化誘導とともにこれらの因子で処理した場合の蛍光強度の変化を検討した。その結果、PPAR細胞では予想と反して分化誘導により蛍光が減弱した。また、分化を誘導しないPPAR細胞では、TNF α やIL-6により蛍光が減弱したが、分化誘導刺激後の細胞は、これらの因子でむしろ蛍光が増加するという結果を得た。LPL細胞でも類似の結果であった。また、PPAR γ 遺伝子プロモーターにEGFPを融合した遺伝子を導入した細胞でも同様の結果を得た。一方、内因性のPPAR γ およびLPL mRNAはTNF α により減少することがリ

リアルタイムPCRで試料RNA中の各々のcDNA量を解析した。解析に用いた総RNA量の不均一性は、同一試料中の β -actin mRNAの発現量に対するNPY mRNAの発現量の比を求めることにより補正した。ヒト悪性黒色腫細胞A375を移植して体重減少を来さないヌードマウスと、ヒト神経上皮腫NAGAIを移植して体重減少を来したヌードマウスの各々の視床下部からRNAを抽出し、oligo dTを用いてcDNAを作製した。このcDNA混合物中のNPY cDNAの β -actin cDNAに対する量の比を求めた結果、A375移植マウスでは1.5、NAGAI移植マウスでは5.6という値を得た。

D. 考察

(1) 脂肪細胞の分化に影響する因子の検出に役立つレポーター遺伝子発現細胞の作製を試みたが、導入遺伝子の発現が内因性の遺伝子発現と必ずしも一致しなかった。しかし、3T3-L1細胞を用いた脂肪細胞分化検出系の作製のための基盤知識と技術を得ることができた。これを生かして、これまでに分離した細胞株における導入遺伝子の発現をさらに解析するとともに、別の遺伝子プロモーターを用いて脂肪細胞分化を簡便にモニターできる分化検出系の開発に発展させる。一方、脂肪染色やLPL酵素活性などの古典的な分化マーカーを指標にして、種々の生理活性物質の脂肪分化に及ぼす影響を検討する必要がある。

(2) 細胞内cAMPの増加を簡便に検出できる培養細胞PCVG細胞を用いて、六君子湯抽出液に含まれる生理活性物質をスクリーニングした。その結果、六君子湯抽出物には神経内分泌細胞にお

けるVIP遺伝子プロモーターからの転写を促進する作用があることが示唆された。また、六君子湯抽出物はTNF α によるGal活性抑制に拮抗することが明らかになった。これらの作用の分子機序は不明であり、今後さらに解明が必要である。

(3) 本研究で考案したリアルタイムPCRによりマウスの食欲調節脳内ペプチドNPYのmRNAを定量した結果は、体重減少を来した動物でNPYが上昇するという現象と一致しており、本測定系が視床下部におけるNPY発現量の定量に役立つ可能性が示唆された。

E. 結論

(1) 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を簡便に検出できる培養細胞系の確立を試みたが、適切な培養細胞を作製できなかった。

(2) 神経内分泌細胞由来の培養細胞PCVGを用いたスクリーニングにより、六君子湯抽出物にcAMP応答性遺伝子プロモーターからの転写を促進する作用があることが明らかになった。

(3) マウスの食欲調節脳内ペプチドの簡便な測定系が確立できた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yu, D., Nagamura, Y., Shimazu, S., Naito, J., Kaji, H., Wada, S., Honda, M., Xu, L., Tsukada, T. Caspase 8 and menin expressions are not correlated in human parathyroid tumors. *Endocr J*, 57: 825-832, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合研究事業）
分担研究報告書

六君子湯、大建中湯のがん悪液質(特に消化器症状)に対する効果の基礎実験

研究分担者 藤宮 峯子 札幌医科大学解剖学第2講座 教授

研究要旨 六君子湯が実験的に惹起した上部消化管運動の異常を改善するかどうかを、無麻酔ラットを用いた実験系で調べた。今回は刺激因子として慢性心理ストレスモデルを用いた。本研究で、六君子湯は実験的に惹起した上部消化管運動の異常を改善することが確認された。また、作用機序を調べるために、視床下部ペプチドのmRNAの発現を定量的RT-PCRで調べた。その結果、この反応には視床下部のウロコルチン3ニューロンが関与していることが示唆された。

A. 研究目的

無麻酔ラットの実験系を用いた消化管運動測定モデルを確立し、種々の原因で起こる消化管運動の異常に対して、六君子湯がどのような効果を発揮するかを調べた。さらに、六君子湯の作用機序を脳腸関連の観点から調べるため、異常消化管運動を引き起こす視床下部ペプチドを分子生物学的に検索し、脳の免疫中和実験で特定のペプチドの発現をブロックした際に、消化管運動が正常化するかどうかを調べた。

B. 研究方法

ラットの胃と十二指腸に内圧測定用のカテーテルを挿入し、リアルタイムで消化管運動を測定した。ラットに

慢性心理ストレスを与え、胃十二指腸の空腹期運動の変化を調べた。胃内カテーテルから六君子湯を投与して、異常消化管運動が正常化するかどうかを調べた。またラット視床下部を単離し、定量的RT-PCRで各種ペプチドのmRNA発現の変化を調べた。さらに、変化したペプチドの中で、上部消化管運動に関連するペプチドの抗体を脳室内投与し、異常消化管運動が正常化するかどうかを調べた。

(倫理面への配慮)

札幌医科大学動物実験委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

慢性心理ストレス負荷で、胃の空腹期運動の抑制が起こり、十二指腸運動

は影響を受けなかった。六君子湯の投与で、ストレスで惹起される胃の空腹期運動の異常が改善された。異常上部消化管運動を示すラットで、視床下部ペプチドのmRNA発現を正常動物と比較したところ、バソプレシン、オキシトシン、ウロコルチン3のmRNA発現が増加し、ウロコルチン1, ウロコルチン2のmRNA発現は減少した。NPY, CRF, Orexin, CART, POMC, AgRPは変化がなかった。このうちウロコルチン3の上昇に注目し、ウロコルチン3抗体を脳室内投与し、免疫中和実験を行った。その結果、ウロコルチン3抗体の脳室内投与で、異常上部消化管運動は抑制された。

D. 考察

六君子湯が異常上部消化管運動を改善するのに、脳の視床下部ペプチドが密接に関連することが判明した。今回の研究で、慢性心理ストレスが原因でおこる胃の空腹期運動の異常が六君子湯の投与で改善されることが判明した。また、このメカニズムとして、視床下部ペプチドであるウロコルチン3が密接に関連していることが明らかになった。

無麻酔ラットを用いたリアルタイム消化管運動の測定系と薬物の脳室内投与、さらには視床下部ペプチドのmRNAの測定を組み合わせることで、六君子湯の効果が脳と末梢のどの神経やホルモンを介して起こるのかを明らかにすることができる。

E. 結論

平成22年度の研究で、六君子湯が実

験的に惹起した上部消化管運動の異常を改善することが明らかになった。今回は刺激因子として慢性心理ストレスをラットに負荷して、ストレス負荷で起こる胃運動の抑制が六君子湯で改善することを明らかにした。このメカニズムとして、視床下部のウロコルチン3ニューロンの関与が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimiya M, et al. Ghrelin, des-acyl ghrelin, and obestatin: regulatory roles on the gastrointestinal motility. *Int J Pept*, (2010) in press.
2. Chen CY, Fujimiya M, et al. Modulation of ingestive behavior and gastrointestinal motility by ghrelin in diabetic animals and humans. *J Chin Med Assoc*, 73: 225-229 (2010).
3. Atsuchi K, Asakawa A, Fujimiya M, et al. Centrally administered neuromedin s inhibits feeding behavior and gastroduodenal motility in mice. *Horm Metab Res*. 42: 535-538 (2010).
4. Asakawa A, Fujimiya M, et al. Parathyroid hormone-related protein has an anorexigenic activity via activation of hypothalamic urocortins 2 and 3. *Psychoneuroendocrinology*, 35; 1178-1186 (2010).
5. Brevet M, Fujimiya M. et al. Chronic foot-shock stress potentiates the influx of bone marrow-derived microglia into hippocampus. *J Neurosci Res*, 88: 1890-1897 (2010).

2. 学会発表

1. 藤宮峯子他「消化管運動と脳腸相関」第16回日本行動医学会 指宿(2010)

年2月)

2. Mineko Fujimiya, et al. "New method of manometric measurement of gastroduodenal motility in conscious mice. DDW 2010, New Orleans, May. 2010
3. 藤宮峯子「視床下部ペプチドと脳腸相関」第14回 GI Cell Biology研究会 千葉(2010年6月)
4. 藤宮峯子「上部消化管運動と脳腸相関」第42回 胃病態機能研究会 札幌 (2010年8月)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
木下 優子	緩和ケアにおける漢方治療	産婦人科漢方研究会	産婦人科漢方研究のあゆみ No27 別刷	診断と治療社	東京	2010	1~4

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Minami K, Sudo Y, Shiraishi S, Seo M, <u>Uezono Y.</u>	Analysis of the effects of anesthetics and ethanol on μ -opioid receptor.	J Pharmacol Sci	112 (4)	424-431	2010
Miyano K, Morioka N, Sugimoto T, Shiraishi S, <u>Uezono Y</u> , Nakata Y.	Activation of the neurokinin-1 receptor in rat spinal astrocytes induces Ca^{2+} release from IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores and extracellular Ca^{2+} influx through TRPC3.	Neurochem Int	57 (8)	923-934	2010
Sudo Y, Matsuo K, Tetsuo T, Tsutsumi S, Okura M, Nakai J, <u>Uezono Y.</u>	Derived (mutated)-types of TRPV6 channels elicit greater Ca^{2+} influx into the cells than ancestral-types of TRPV6: Evidence from <i>Xenopus</i> oocytes and mammalian cell expression system.	J Pharmacol Sci	114 (3)	281-291	2010
鈴木 雅美、 <u>上園 保仁.</u>	鎮痛薬による臓器障害.	ペインクリニック	31 (9)	1177-1183	2010
今井 哲司、成田 年、富安 志郎、的場 元弘、木下 浩之、 <u>上園 保仁.</u> 、葛巻 直子、鈴木 勉.	オピオイドの薬理学.	Mebio	27 (8)	70-78	2010
<u>上園 保仁.</u>	がん疼痛基礎医学研究—経験を科学に—.	がん患者と対症療法	21 (1)	78-79	2010
<u>上園 保仁.</u>	がん対策推進基本計画に基づく緩和ケア推進・研究の今後.	がん患者と対処療法	21 (2)	164-169	2010
Ando Y, Hojo M, Kanaide M, Takada M, Sudo Y, Shiraishi S, Sumikawa K, <u>Uezono Y.</u>	S(+)-ketamine suppresses desensitization of γ -aminobutyric acid type B receptor-mediated signaling by inhibition of the interaction of γ -aminobutyric acid type B receptors with G protein-coupled receptor kinase 4 or 5.	Anesthesiology	114 (2)	401-411	2011
Minami K, Yokoyama T, Ogata J, <u>Uezono Y.</u>	The tramadol metabolite <i>O</i> -Desmethyl tramadol inhibits substance P-receptor functions expressed in <i>Xenopus</i> Oocytes.	J Pharmacol Sci	115 (3)	421-424	2011
Imai S, Sudo Y, Nakamura A, Ozeki A, Asato M, Hojo M, Devi LA, Kuzumaki N, Suzuki T, <u>Uezono Y</u> , Narita M.	Possible involvement of β -endorphin in a loss of the coordinated balance of μ -opioid receptors trafficking processes by fentanyl.	Synapse		Epub ahead of print	2011
Narita M, Imai S, Nakamura A, Ozeki A, Asato M, Sudo Y, Hojo M, <u>Uezono Y</u> , Devi LA,	Possible involvement of prolonging spinal μ -opioid receptor internalization in the development of anti-hyperalgesic tolerance to μ -opioids under a neuropathic pain-like state.	Addict Biol		In press	2011

Kuzumaki N, Suzuki T.					
Yokoyama T, Minami K, Sudo Y, Horishita T, Ogata J, Seo M, <u>Uezono Y.</u>	Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel Nav1.8, Nav1.7 and Nav1.4 expressed in <i>Xenopus</i> oocytes.	J Anesthesia		In press	2011
<u>上園 保仁.</u>	がん患者の症状緩和のために—がん悪液質の予防、症状改善をめざす基礎医学研究—.	がん患者と対症療法	22 (1)	58-63	2011
Asakawa A, <u>Fujimiya M.</u> , Nijima A, Fujino K, Kodama N, Sato Y, Kato I, Nanba H, Laviano A, Meguid MM, <u>Inui A.</u>	Parathyroid hormone-related protein has an anorexigenic activity via activation of hypothalamic urocortins 2 and 3.	Psychoneuroendocrinology	35 (8)	1178-1186	2010
Koyama KI, Yasuhara D, Nakahara T, Harada T, Uehara M, Ushikai M, Asakawa A, <u>Inui A.</u>	Changes in acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, and ratio of acyl ghrelin to total ghrelin with short-term refeeding in female inpatients with restricting-type anorexia nervosa.	Horm Metab Res	42 (8)	595-598	2010
Fetissov SO, Laviano A, Kalra S, <u>Inui A.</u>	Update on ghrelin.	Int J Pept		pii: 963501	2010
Cheng KC, Li YX, Asakawa A, <u>Inui A.</u>	The role of ghrelin in energy homeostasis and its potential clinical relevance (Review).	Int J Mol Med	26 (6)	771-778	2010
Perboni S, <u>Inui A.</u>	Appetite and gastrointestinal motility: role of ghrelin-family peptides.	Clin Nutr	29 (2)	227-234	2010
小木曾 和磨、浅川 明弘、乾 明夫	NPY受容体 摂食調節ペプチドと摂食障害	医学のあゆみ	233 (9)	730-735	2010
小木曾 和磨、鮫島 真理恵、網谷 東方、濱田 聡史、浅川 明弘、乾 明夫	摂食障害、特に神経性食欲不振症の基礎と臨床について	自律神経	47 (2)	66-79	2010
Takeda H, Muto S, Hattori T, Sadakane C, Tsuchiya K, Katsurada T, Ohkawara T, Oridate N, <u>Asaka M.</u>	Rikkunshito ameliorates the aging-associated decrease in ghrelin receptor reactivity via phosphodiesterase III inhibition.	Endocrinology	151 (1)	244-252	2010
Hayakawa S, Shiratori S, Yamato H, Kameyama T, Kitatsuji C, Kashigi F, Goto S, Kameoka S, Fujikura D, Yamada T, Mizutani T, Kazumata M, Sato M, Tanaka J, <u>Asaka M.</u> , Ohba Y, Miyazaki T, Imamura M, Takaoka A.	ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses.	Nat Immunol		Epub ahead of print	2010
Kato M, Kamada G, Yamamoto K, Nishida U, Imai A, Yoshida T, Ono S, Nakagawa M, Nakagawa S, Shimizu Y, <u>Asaka M.</u>	Lafutidine prevents low-dose aspirin and loxoprofen induced gastric injury: a randomized, double-blinded, placebo controlled study.	J Gastroenterol Hepatol	25 (10)	1631-1635	2010