

化管運動の制御と脳腸相関. 第7回
日本消化管学会. 京都市 (2011年2
月).

33. 藤宮 峯子. 視床下部ペプチドと消化管運動の機能相関. 第116回日本解剖学会. 横浜市 (2011年3月 誌上開催).
34. 藤宮 峯子. 視床下部ペプチドと消化管運動. 第15回日本摂食障害学会. 鹿児島市 (2011年9月).
35. 藤宮 峯子. 骨髄由来ミクログリアと脳腸相関. 第13回日本神経消化器病学会. 宇都宮市 (2011年11月).
36. 樋上 賀一, 千葉 卓哉, 下川 功. 長期カロリー制限 (CR) による抗老化・寿命延長作用にはSREBP1cが必要である. 第100回日本病理学会総会. 横浜市 (2011年4月).
37. 福島 麻友美, 小島 由美子, 林田 雄介, 湯口 景子, 沖田 直之, 中村 愛, 戸田 年総, 樋上 賀一. カロリー制限ラットにおけるミトコンドリアバイオジェネシスの経時的変化. 第34回日本基礎老化学会. 東京都 (2011年6月).
38. 樋上 賀一. カロリー制限ラットにおけるミトコンドリアバイオジェネシスの経時的変化. 第33回日本基礎老化学会シンポジウム. 野田市 (2011年10月).

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

- Higami Y, Okita N, Matsushima S.
PCT出願. Method of treating
ischemia/ reperfusion.
PCT/JP2012/052565,
出願日; 2012/01/27.

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

六君子湯、大建中湯が抗がん剤の副作用、がん悪液質の改善にいたる
メカニズムの解明と臨床研究結果の解析

研究代表者 上園 保仁 独立行政法人国立がん研究センター研究所
がん患者病態生理研究分野 分野長

研究要旨 がん悪液質の症状改善に及ぼす漢方薬の効果を解析するため、ヒトのがん悪液質の診断基準を満たすモデル動物を樹立した。ヒト胃がん細胞株MKN45由来85As2細胞接種により作製されたがん悪液質動物モデルに対し、六君子湯は、①がん細胞移植前からの予防的な投与、②悪液質発症後投与という治療的観点を考慮した検討において、いずれにおいても有意な摂食改善効果を示した。食思改善ペプチド、グレリンの血中濃度の測定の結果、グレリン濃度は同悪液質モデルではコントロールに比較し有意に高いことが判明し、本悪液質モデル動物ではグレリン抵抗性が惹起されている可能性が示唆された。

今回の実験により、六君子湯は血中グレリン濃度が高い動物においても摂食改善効果を示したことから、六君子湯はグレリン受容体を介する摂食促進シグナルを増強させることにより摂食改善作用を惹起したことが考えられた。私たちは実際に、六君子湯を構成する8種類の生薬のうちの一つ、蒼朮に含まれるアトラクチロジンにグレリン受容体反応の増強効果があることをグレリン受容体発現細胞を用いたin vitro研究にて明らかにした。

これらの研究より、六君子湯はグレリン投与で摂食促進効果を示しにくいがん悪液質患者などでも摂食を改善し患者のQOLを向上させる可能性が示唆された。本結果を基に、六君子湯の食思改善効果を検討する臨床試験を次年度より開始予定である。

A. 研究目的

平成19年よりがん対策基本法が施行、引き続きがん対策基本計画が策定され、がん患者の生活の質（Quality of Life, QOL）の維持向上のための緩和医療な

らびにその進展のための研究が行われている。その中でも対応が遅れているのが、抗がん剤による悪心嘔吐等の副作用対策、ならびに終末期がん患者に多く見られる「がん悪液質」の症状改善である。これらは、がん患者の生命

予後やQOL向上のために重要であるにも関わらず、治療法や研究法が十分に確立されていない。

近年、漢方薬である六君子湯が抗がん剤による食欲不振改善効果を有すること、また食思改善ペプチドであるグレリンの分泌を促進することが報告され、六君子湯のがん領域における消化器症状改善効果が注目されている。また、抗がん剤の悪心嘔吐、便秘に大建中湯が有効であることもエビデンスを持って示されてきた。

昨年度の研究において、低分化型ヒト胃がん細胞株 (MKN45) 由来のクローン細胞株 (MKN45clone85)、および、その腹膜播種性転移株として樹立された85As2細胞をヌードラットに皮下移植することにより、体重減少、摂食量低下などの悪液質に特徴的な症状を示すがん悪液質モデルラット樹立した。

本年度は、同モデルを用いて、六君子湯が摂食改善に有効であるか否かを、予防的観点、あるいは治療的観点の両者を考慮し、予防投与、並びに食思不振発症後での投与方法を計画した。同実験を通じて、六君子湯が食事改善に有効かどうかを評価し、さらにその作用メカニズムを明らかにするため、がん悪液質動物病態生理および六君子湯のグレリン受容体に対する作用をin vitroの評価系を用いて解析した。

B. 研究方法

1. 新規がん悪液質モデルラットの病態生理研究

(1)DNAマイクロアレイ

MKN45clone85および85As2細胞皮下移植によって誘導される悪液質症状は、体重減少、摂食量低下、除脂肪・脂肪・

筋肉量減少、血中 human leukemia inhibitory factor (LIF) 上昇、血中急性期蛋白の上昇および血中アルブミンの減少などすべてにおいて、85As2細胞移植群が顕著であった。これら二つの細胞抽出液を用いて、DNAマイクロアレイ (Agilent Whole Human Genome Array、解析ソフト: GeneSpringGX11.5) を実施した。

(2)腫瘍摘出の悪液質症状におよぼす影響

85As2細胞移植2週後 (悪液質症状発症後)、麻酔下で腫瘍を摘出し、縫合後に飼育ケージに戻した。細胞移植前からの体重、摂食量および飲水量を毎週測定した。また、5週後に筋肉・脂肪組織重量を測定、血液サンプルを採取後、血中human LIFを測定した。

(3)呼吸代謝の測定

85As2細胞移植4週後のラットの呼吸商 (= 単位時間当たりの二酸化炭素排出量 ÷ 単位時間当たりの酸素消費量)、自発運動量および体重当たりのカロリー消費量を小動物用代謝計測システム MK-5000RQ (室町機械) で測定した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

(4)グレリン投与による摂食亢進作用

85As2細胞移植2週後 (悪液質発症後)、グレリン (10nmol, i.p.) または生理食塩水を投与し、投与後1時間までの摂食量を測定した。対照群として、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物にグレリンまたは生理食塩水を同量投与した。悪液質群および対照群それぞれの群で、生理食塩水およびグレリン投与による影響を比較した。

(5)血中グレリン濃度測定

85As2細胞移植3または4週後のラットの腹部大静脈から血液を採取し、血

中グレリン濃度をELISAにより測定した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

2. 新規がん悪液質モデルラットに対する六君子湯の予防的効果および治療的効果の検討

(1) 六君子湯の予防的効果の検討

85As2細胞 (1×10^6 cells) を左右腹部に皮下移植後、体重、摂食量を毎週測定した。六君子湯1%混餌を、がん細胞移植1週間前から自由摂取で実験終了まで与えた。対照群 (85As2+CE-2) および正常群 (Saline+CE-2) には、通常食 (CE-2、日本オリエンタル酵母) を与えた。

(2) 六君子湯の治療的効果の検討

85As2細胞 (1×10^7 cells) を左右腹部に皮下移植後、体重、摂食量を毎週測定した。悪液質発症後 (がん細胞移植2週間後) から、六君子湯1g/kg/dayを1日2回7日間経口投与した。対照群 (85As2+distilled water) および正常群 (saline+distilled water) には、同量の蒸留水を与えた。実験終了後、腹部大静脈から血液を採取し、ELISAキットにより血中グレリン濃度を測定した。

3. 六君子湯のグレリン受容体シグナルに対する作用

humanグレリン受容体 (GHS-R) 安定発現HEK293T細胞あるいはratGHS-R安定発現COS細胞を用いた。GHS-R安定発現細胞に対し、六君子湯エキス (10-100 μ g/ml) またはアトラクチロジン (1-30 μ M) を前処置 (2-60分間) し、グレリン (3×10^{-10} - 1×10^{-7} M) 添加後のGq蛋白共役型GPCR (G protein-coupled receptor) 特異的シグナルを細胞内カルシウム濃度可視化アッ

セイ並びにラベルフリーセルベースアッセイシステム (CellKey™システム) を用いて測定し、六君子湯によるグレリン受容体シグナルへの影響をin vitroで検討した。

(倫理面への配慮)

六君子湯・大建中湯の、細胞レベルでの作用機序解明および動物モデルを用いた実験においては、当施設の実験動物倫理審査委員会ならびに遺伝子組み換え実験管理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 新規がん悪液質モデルラットの病態生理研究

(1) DNAマイクロアレイ

MKN45clone85および85As2細胞のDNAマイクロアレイの比較において、全データに共通してDetectedもしくはCompromisedフラグを示した24,066プローブのうち、有意な発現増加は、1832プローブ、有意な発現減少は2194プローブであった。

(2) 腫瘍摘出の悪液質症状におよぼす影響

85As2細胞移植によるがん悪液質モデルラットは、悪液質発症後からの腫瘍摘出により、体重、摂食量低下、飲水量低下、筋肉・脂肪組織重量低下などの悪液質症状が完全に回復した。血中LIF濃度は検出限界以下となった。

(3) 呼吸代謝の測定

本悪液質モデルラットでは、対照群と比較して、活動期 (21:00-翌朝7:00) の自発運動量が低下していた。さらに、悪液質モデルラットでは、自発運動量に差がない安静時 (9:00-14:00) におい

て、呼吸商が有意に高く、体重当たりのカロリー消費量が有意に亢進していた。

(4) グレリン投与による摂食亢進作用

グレリン投与により、対照（非担がん動物）群では、生理食塩水投与と比較して、有意な摂食量の増加が認められたが、悪液質モデルラットでは、グレリン投与による摂食量増加が認められなかった。

(5) 血中グレリン濃度

悪液質モデルラットは、対照（非担がん動物）群と比較して血中グレリン濃度の有意に高い値を示した。

2. 新規がん悪液質モデルラットに対する六君子湯の予防的効果および治療的効果の検討

85As2細胞 (1×10^6 cells) 移植ラットでは、移植2週目から有意な体重減少 ($93.53 \pm 1.85\%$ vs. 正常群) および有意な摂食量低下 ($86.75 \pm 2.36\%$ vs. 正常群) が認められ、悪液質の特徴的な症状を示した (図1)。同群では、4週目でさらに摂食量が低下した ($78.92 \pm 2.40\%$ vs. 正常群)。2週目から4週目にかけて体重は減少しなかったものの ($98.06 \pm 1.64\%$ vs. 85As2移植群2週)、正常群との体重差は拡大した ($80.82 \pm 2.53\%$ vs. コントロール群4週)。これに対し、六君子湯1%混餌群では、体重には影響なかったが、移植4週目で摂食量低下の有意な改善が認められた ($93.53 \pm 1.85\%$ vs. 正常群) (図1)。

治療効果の検討において、85As2細胞 (1×10^7 cells) 移植ラットは、移植2週目から有意な体重減少 ($84.33 \pm 1.29\%$ vs. 正常群) および有意な摂食量低下 ($75.73 \pm 2.27\%$ vs. 正常群) が認められ、予防効果の検討条件よりも重篤な悪液

質の症状を示した (図2)。85As2細胞移植+蒸留水投与群では、7日後の摂食量は低下したままであったが ($75.99 \pm 4.40\%$ vs. 正常群)、六君子湯7日間投与群では、摂食量低下の有意な改善が認められた ($93.61 \pm 8.09\%$ vs. 正常群) (図2)。さらに、85As2細胞移植+蒸留水投与群で認められた投与前後での有意な体重減少を六君子湯投与群は抑制した (図3)。一方、六君子湯投与群は、悪液質群で上昇していた血中グレリン値に対して影響をおよぼさなかった。

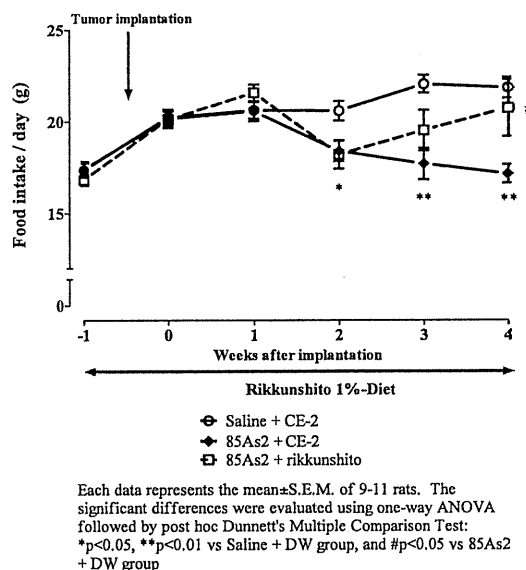
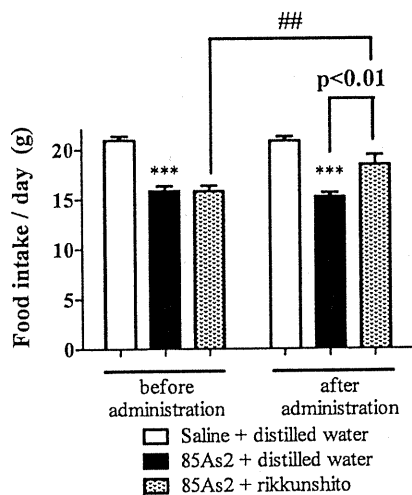
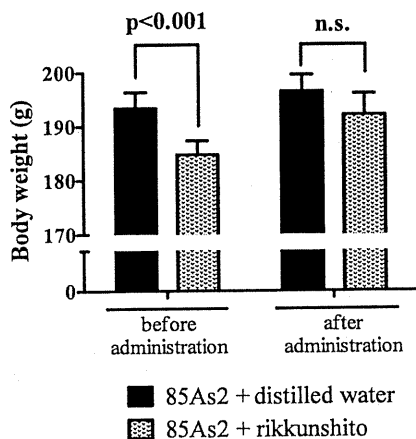


図1 がん悪液質モデルの摂食量低下に対する六君子湯の予防的効果の検討



Each column represents the mean±S.E.M. of 10-11 rats. The significant differences were evaluated using unpaired or paired t test: *** $p < 0.001$ vs post 85As2 +DW group (unpaired), and ## $p < 0.01$ vs pre 85As2+Rikkunshito group (paired)

図2 がん悪液質発症後（摂食量低下）からの六君子湯投与による摂食量改善作用



Each column represents the mean±S.E.M. of 10-11 rats. The significant differences were evaluated using paired t test.

図3 六君子湯投与後の体重減少抑制効果

3. 六君子湯のグレリン受容体シグナルに対する作用

CellKey™システムにおける測定において、GHS-R安定発現HEK293細胞へ

のグレリン添加により、Gq特異的シグナルが示された。六君子湯前処置により、本グレリン受容体シグナルの増強効果が認められた。

細胞内カルシウム濃度可視化アッセイにおいて、GHS-R安定発現COS細胞へのグレリン添加により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が示された。六君子湯前処置により、本グレリン受容体刺激細胞内カルシウムイオン濃度上昇の増強効果が認められた。さらに、六君子湯に含有される43成分のうちGHS-Rにbinding活性を示したアトラクチロジンは、六君子湯同様、グレリン受容体刺激細胞内カルシウムイオン濃度上昇の増強効果を示した。

D. 考察

ヒト胃がん細胞株由来MKN45clone85およびその腹膜播種性転移株85As2により作製したモデルラットは、悪液質に特徴的な、体重減少、摂食量低下、除脂肪量の減少、血中炎症性マーカーの上昇および血中アルブミン値の低下を示し、これは臨床でのがん悪液質研究の診断基準を反映しており、がん悪液質研究に適したモデルであると考えられることを昨年度報告した。すべての項目において、85As2細胞接種ラットでは、より重度な悪液質を誘導した。細胞のDNAマイクロアレイの結果から、発現上昇している遺伝子群および減少している遺伝子群が多数示され、これらのうちの遺伝子が悪液質誘導能に寄与する可能性があり、今後の検討を要する。

85As2細胞移植悪液質ラットモデルは、腫瘍摘出により悪液質症状が消失し、血中LIF値も検出限界を示したこと

から、本モデルにおける悪液質症状発症は、腫瘍由来であり、LIFが起因因子のひとつまたはバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

本モデルでは、体重当たりのカロリー消費が高くなっており、摂食量低下に加え、亢進したエネルギー消費が悪液質の発症の一因となる可能性を示唆している。さらに、本モデルでは、摂食量が低下しているにも関わらず、摂食亢進ペプチドであるグレリンは、血中で高値を示していた。本結果は、多数の臨床データと一致する。グレリン投与による摂食行動が悪液質モデルでは、抑制されていたことから、本モデルではグレリン抵抗性が惹起されている可能性が考えられた。

六君子湯はがん細胞移植前からの予防的な投与においても、がん悪液質発症後からの治療的投与においても、摂食量低下を有意に改善した。また、悪液質の進行による体重低下を抑制した。

上述のように、本モデルではグレリン抵抗性が惹起されているにも関わらず六君子湯が改善作用を示した。六君子湯の改善作用メカニズムを検証すべく、六君子湯のグレリン受容体レベルでの検討を行った結果、細胞内カルシウム濃度可視化アッセイおよびCellKey™アッセイシステムどちらのアッセイ系においても、六君子湯はグレリン受容体シグナルを増強した。六君子湯を構成する8種類の生薬のうちの一つである蒼朮に含まれるアトラクチロジンは、グレリン受容体にbinding活性を示し、さらに、六君子湯同様、グレリン受容体シグナルを増強したことから、六君子湯の活性成分のひとつである可能性が示唆された。

以上のことから、六君子湯は、より

悪性度の高く、カロリー消費亢進およびグレリン抵抗性が起こっている85As2細胞移植によるがん悪液質モデルにおいて予防的投与においても治療的投与においても改善効果を示した。今回の結果から、六君子湯の作用メカニズムのひとつとして、グレリン受容体シグナルの増強によるグレリン抵抗性の改善が関与している可能性が示唆された。本研究結果は、六君子湯の臨床での治療効果を期待させるものであり、がん患者のQOL向上への貢献が期待できる。

E. 結論

ヒト胃がん細胞株MKN45clone85およびその腹膜播種性転移株85As2細胞により、新しいがん悪液質動物モデルを作製した。両モデルは、臨床での悪液質の診断基準を反映し、がん悪液質の病態生理研究および治療薬の評価に応用可能であると考えられた。より悪性度の高い85As2細胞による悪液質モデルでは、エネルギー消費亢進やグレリン抵抗性が起こっていることが示唆された。

六君子湯は、本85As2細胞移植による悪液質モデルに対して、予防的および治療的いずれの投与においても改善効果を示したことから、臨床での治療効果およびがん患者のQOL向上への貢献が期待できると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokoyama T, Ohbuchi T, Saito T, Fujihara H, Minami K, Nagatomo T, Uezono Y, Ueta

- Y. Allylthiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats. *Eur J Pharmacol*, 655 (1-3): 31-37 (2011).
2. Yokoyama T, Minami K, Sudo Y, Horishita T, Ogata J, Yanagita T, Uezono Y. Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel $Na_v1.8$, $Na_v1.7$, and $Na_v1.4$ expressed in *Xenopus* oocytes. *J Anesth*, 25 (4): 609-613 (2011).
 3. Minami K, Sudo Y, Yokoyama T, Ogata J, Takeuchi M, Uezono Y. Sevoflurane inhibits the μ -opioid receptor function expressed in *Xenopus* oocytes. *Pharmacology*, 88 (3-4): 127-132 (2011).
 4. Imai S, Sudo Y, Nakamura A, Ozeki A, Asato M, Hojo M, Devi LA, Kuzumaki N, Suzuki T, Uezono Y, Narita M. Possible involvement of β -endorphin in a loss of the coordinated balance of μ -opioid receptors trafficking processes by fentanyl. *Synapse*, 65 (9): 962-966 (2011).
 5. Narita M, Imai S, Nakamura A, Ozeki A, Asato M, Rahmadi M, Sudo Y, Hojo M, Uezono Y, Devi LA, Kuzumaki N, Suzuki T. Possible involvement of prolonging spinal μ -opioid receptor desensitization in the development of antihyperalgesic tolerance to μ -opioids under a neuropathic pain-like state. *Addict Biol*, Epub ahead of print (2011).
 6. Fujitsuka N, Asakawa A, Uezono Y, Minami K, Yamaguchi T, Nijima A, Yada T, Maejima Y, Sedbazar U, Sakai T, Hattori T, Kase Y, Inui A. Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. *Transl Psychiatry*, 1: e23 (2011).
 7. 上園保仁. がん患者の症状緩和のため-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).
 8. 上園保仁. がん患者の症状緩和に役立つ漢方薬-漢方薬の有効性を示す、臨床につながる基礎研究-. *がん患者と対症療法*, 22(2): 140-146 (2011).
 9. 鈴木雅美, 上園保仁. 非ステロイド性鎮痛薬およびアセトアミノフェンによる重篤な副作用. *Anesthesia 21 Century*, 13(2):57-61 (2011).
 10. 上園保仁, 須藤結香. 腸管神経叢に発現している消化管運動制御受容体と、それらをターゲットにした消化管機能改善薬. *医学のあゆみ*, 238(10):904-908 (2011).
 11. 宮野加奈子, 上園保仁, 仲田義啓. パクリタキセル誘発性末梢神経障害のメカニズム. *ペインクリニック*, 32(10):1491-1498 (2011).
 12. Uezono Y, Miyano K, Suzuki M, Sudo Y, Shiraishi S, Terawaki K. A review of traditional Japanese medicines and their potential mechanism of action. *Current Pharmaceutical Design*, in press (2012).
 13. Sudo Y, Hojo M, Ando Y, Takada M, Murata H, Kurata S, Kanaide M, Nishida N, Uezono Y. $GABA_B$ receptors do not internalize after baclofen treatment possibly due to lack of the β -arrestin association; a real-time visualization study. *Synapse*, in press (2012).
2. 学会発表
 1. Ohtake N, Ikemura R, Ohbuchi K, Sudo Y, Uezono Y, Yamamoto M. The synergistic effects of herbal pungents 6-gingerol (6GC) 6-shogaol (6SG) and hydroxy α -sanshool (HAS) on *in vitro* peristaltic motility of isolated rat

- colon: Lessons from the unique prokinetic activity of Japanese traditional medicine daikenchuto. Digestive Disease Week 2011, Chicago, USA (2011年5月).
2. 寺脇潔, 柳原五吉, 澤田祐美, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 須藤結香, 白石成二, 上園保仁. 新規がん悪液質モデルラットの作製及び同モデルに対する漢方薬六君子湯の改善効果. 第16回日本緩和医療学会. 札幌市 (2011年7月).
 3. 鈴木雅美, 芝田晋介, 上園保仁, がんによる神経障害に起因する難治性疼痛発現メカニズムの解析. 第5回日本緩和医療薬学会年会. 幕張市 (2011年9月).
 4. 白石成二, 宮野加奈子, 須藤結香, 鈴木雅美, 上園保仁. 脊椎転移によるがん性疼痛モデルラットの検討. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).
 5. 寺脇潔, 柳原五吉, 澤田祐美, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 須藤結香, 白石成二, 上園保仁. ヒト胃がん細胞による新規がん悪液質モデルおよび漢方薬六君子湯の効果. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).
 6. 宮野加奈子, 白石成二, 須藤結香, 鈴木雅美, 寺脇潔, 上園保仁. vinblastineとcarboplatinはPKAを介してhuman TRPA 1を活性化する. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).
 7. 横山徹, 寺脇潔, 南浩一郎, 柳原五吉, 上田陽一, 上園保仁. がん悪液質モデルラットでは視索上核大細胞性ニューロンでの浸透圧感受性が変化している. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).
 8. Uezono Y. Pain and cachexia. 6th Cachexia Conference, Milan, Italy (2011年12月).
 9. Terawaki K, Yanagihara K, Sawada Y, Kashiwase Y, Suzuki M, Miyano M, Sudo Y, Shiraiishi S, Uezono Y. Establishment of novel animal models of cancer cachexia by transplantation of human gastric cancer cell lines and effects of rikkunshito, a traditional Japanese medicine, on the cancer cachexia models. 6th Cachexia Conference, Milan, Italy (2011年12月).
 10. Suzuki M, Ashikawa M, Narita M, Suzuki T, Matoba M, Yanagihara K, Terawaki K, Uezono Y. Changes in the expression of melanocortin receptors and pro-opiomelanocortin in the hypothalamus in a rat model of cancer cachexia. 6th Cachexia Conference, Milan, Italy (2011年12月).
 11. 須藤結香, 北條美能留, 宮野加奈子, 鈴木雅美, 寺脇潔, 白石成二, 西田教行, 上園保仁. シグナルペプチド付加HaloTag-GPCRの細胞膜移行と機能的アッセイ. 第85回日本薬理学会年会. 京都市 (2012年3月).
 12. 宮野加奈子, 白石成二, 大淵勝也, 須藤結香, 鈴木雅美, 寺脇潔, 山本雅浩, 的場元弘, 上園保仁. carboplatinによるtransient receptor potential ankyrin 1活性増強作用機序の解明. 第85回日本薬理学会年会. 京都市 (2012年3月).
 13. 芦川真帆, 鈴木雅美, 成田年, 長谷川実奈美, 鈴木勉, 的場元弘, 佐々木博己, 上園保仁. 癌性腹膜炎疼痛モデルマウスの脊髄後根神経節における μ -opioid受容体およびサブスタンスPの発現変化. 第85回日本薬

- 理学会年会. 京都市 (2012年3月).
14. 村松俊, 白石成二, 戸田亜希子, 茂木正行, 原真由美, 川崎良彦, 谷口幹雄, 上園保仁. アセトアミノフェン20 mg/kg経口投与後のラット脳内AM404濃度. 第85回日本薬理学会年会. 京都市 (2012年3月).
15. 橋本弘史, 吉村充弘, 石倉透, 藤原広明, 上園保仁, 上田陽一. コレシストキニンおよびアポモルフィン末梢投与によるラット室傍核における*c-fos* mRNA発現の検討. 第89回日本生理学会大会. 松本市 (2012年3月).
16. 横山徹, 寺脇潔, 南浩一郎, 柳原五吉, 上園保仁, 上田陽一. がん悪液質モデルラットでは視索上核大細胞性神経分泌細胞での浸透圧感受性が変化している. 第89回日本生理学会大会. 松本市 (2012年3月).

G. 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次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

六君子湯、大建中湯のがん悪液質に対する効果のランダムイズド
コントロールスタディ及びそのとりまとめ

研究分担者 乾 明夫 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
社会・行動医学講座（心身医療科）教授

研究要旨 六君子湯の抗悪液質効果のメカニズムの解析を動物実験で行った。その作用は、悪液質で亢進しているセロトニン（5-HT）系を阻害することによるもので、六君子湯生薬の一つであるチンピ成分のフラボノイドが重要であると考えられた。また膵がん例に対する六君子湯の効果をレトロスペクティブに解析し、その結果を確認しえた。

A. 研究目的

分担項目は、六君子湯、大建中湯のがん悪液質に対する効果のランダムイズドコントロールスタディ及びそのとりまとめであり、本年度は六君子湯を中心に、一部動物実験も施行し、臨床研究の評価項目設定のための基礎研究を継続した。動物実験による六君子湯の研究は、悪液質におけるグレリン抵抗性メカニズムと六君子湯の作用機構に解明を目的とした。また臨床研究では、膵がん例を対象とした後ろ向き調査研究を施行し、六君子湯の効果の確認と同時に、前向き調査研究のプロトコル作製に資することを目的とした。

B. 研究方法

動物実験は、我々が以前に報告した吉田肝がん細胞の担がんモデルラット

で、六君子湯の悪液質改善効果を体重減少、摂食量減少、筋肉量減少、消化管運動などに焦点を当てて解析を行った。また、六君子湯の作用機序をグレリン受容体発現細胞、コルチコトロピン放出因子（CRF）発現細胞、ニューロペプチドY（NPY）発現細胞を用いて検討した。

化学療法施行中の膵がん症例の中で、1カ月以上の六君子湯投与例とそれ以外の例を対象に、六君子湯の予後に及ぼす影響を検討した。

（倫理面への配慮）

いずれの研究も、当該施設の動物実験倫理委員会、臨床研究倫理委員会の承認を受けた研究であり、倫理に最大限の配慮がなされている。

C. 研究結果

担がんモデルラットでは、グレリンの相対的分泌低下、サイトカインや炎症を反映する蛋白 (CRP) の増加、消化管運動低下を認め、がん悪液質の病態に関わると考えられた。六君子湯は担がんモデルラットの体重減少、摂食量減少、筋肉量減少、消化管運動低下を改善した。セロトニン (5-HT) は 5-HT_{2c} 受容体を介して CRF の分泌促進、NPY 発現を減弱し、摂食を抑制する。六君子湯は 5-HT_{2c} 受容体拮抗作用を介して CRF 発現を減弱し、低下したグレリン分泌を回復することで、摂食を促進することが示唆された。また六君子湯は、グレリン受容体発現細胞においてグレリンシグナルを増強し、蒼朮に含まれるアトラクチロジンも同様の作用を持つことが示唆された。

臨床研究では、腹水を伴う膵がん患者で予後の有意な改善が認められ、古くより認められてきた六君子湯の利水作用を支持する所見でもあった。

D. 考察

がん性悪液質においては、グレリンの相対的分泌不全に加え、グレリン作用の減弱が特徴的である。研究分担者らは六君子湯がこのグレリン抵抗性を改善することを見出し、動物実験においてその作用機序が蒼朮に含まれるアトラクチロジンによることを示した。六君子湯は内因性のグレリンを刺激すると同時に、グレリン抵抗性を改善し、その作用機序はがん性悪液質で亢進しているセロトニン (5-HT) 5-HT_{2c} 受容体拮抗作用が中心であると考えられた。進行膵がん症例の後ろ向き調査研究から、六君子湯は食欲不振や体重増加というがん悪液質改善効果のみならず、

予後の改善効果を有することも示唆され、その臨床的意義は高いと考えられた。

E. 結論

六君子湯はがん性悪液質で低下しているグレリン分泌を刺激し、さらにグレリン抵抗性を改善しうる薬剤である。その作用機構は、抗がん剤やがん性悪液質で亢進するセロトニン (5-HT) 系の中樞、末梢における拮抗作用とグレリン感受性増強作用によると考えられた。進行膵がん症例の後ろ向き調査研究から、六君子湯は予後への改善効果を有することも示唆された。

今後、六君子湯の中樞における作用機序を、fMRI による健常者での検討を予定している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimiya M, Ataka K, Asakawa A, Chen CY, Kato I, Inui A. Regulation of gastroduodenal motility: acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin and hypothalamic peptides. *Digestion* 85 (2): 90-94, 2012.
2. Fujitsuka N, Asakawa A, Uezono Y, Minami K, Yamaguchi T, Nijima A, Yada T, Maejima Y, Sedbazar U, Sakai T, Hattori T, Kase Y and Inui A. Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. *Transl Psychiatry*, 1: e23, 2011.
3. Fujimiya M, Ataka K, Asakawa A, Chen CY, Kato I, Inui A. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin on the gastrointestinal motility. *Peptides*, 32

- (11): 2348-2351, 2011.
4. Asakawa A, Ataka K, Fujino K, Chen CY, Kato I, Fujimiya M, Inui A. Ghrelin family of peptides and gut motility. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 (Suppl 3): 73-74, 2011.
 5. Terashi M, Asakawa A, Harada T, Ushikai M, Coquerel Q, Sinno MH, Déchelotte P, Inui A, Fetissoff SO. Ghrelin reactive autoantibodies in restrictive anorexia nervosa. *Nutrition*, 27 (4): 407-413, 2011.

2. 学会発表

1. 乾 明夫. 癌性悪液質 —最近の進歩を中心に、また統合医療の立場から—. 第 12 回国際統合医学会特別講演. 宜野湾市 (2011年4月).
2. 乾 明夫. 摂食障害の病態と治療の進歩. 第 28 回医学会総会 シンポジウム. 東京都 (2011年4月).
3. 浅川 明弘, 乾 明夫. 悪液質の研究と臨床の展開 Parathyroid hormone-related protein の摂食抑制作用. 第 84 回日本内分泌学会. 神戸市 (2011年4月).
4. 乾 明夫. 消化管ペプチドによる食欲・体重調節. 第 23 回糖尿病と血管合併症 up to date. 西宮市 (2011年6月).
5. 浅川 明弘, 乾 明夫. 摂食障害研究の新たな展開 —末梢における摂食調節ペプチドからのアプローチ—. 第 52 回日本心身医学会総会. 横浜市 (2011年6月).
6. 乾 明夫. 悪液質治療における漢方の意義 —六君子湯を中心に—. 第 15 回日本摂食障害学会. 鹿児島市 (2011年9月).
7. 乾 明夫. 漢方の先端研究、特に悪

液質における六君子湯の作用を中心に. 第 12 回八ヶ岳シンポジウム. 東京都 (2011年9月).

8. 乾 明夫. 脳腸相関と摂食行動 —肥満と鏡像関係をなす悪液質病態を中心に—. 第 32 回日本肥満学会総会. 神戸市 (2011年9月).
9. 乾 明夫. 漢方の先端研究 —空腹ホルモングレリンに対する六君子湯のデュアルアクションと悪液質への応用を中心に—. 第 27 回耳鼻咽喉科漢方研究会. 東京都 (2011年10月).

G. 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次対がん総合戦略研究事業）
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
がん予防内科学講座 教授

研究要旨 がん患者の QOL 向上のための六君子湯のエビデンスを確立するため臨床研究、を立案し、「ゲムシタビン投与膾がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質進行抑制効果- 無作為化第 II 相比較試験」および「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果- 無作為化第 II 相比較試験」の二つのプロトコールの作成を行った。

A. 研究目的

我々はこれまでに、動物モデルを用いて六君子湯の食欲増進作用およびそのメカニズムを明らかにしてきた。本年度は、がん患者の QOL 向上のためのエビデンスを確立するため、六君子湯の臨床試験のプロトコールを立案し、完成させることを目的とした。

B. 研究方法

上園班に組織されているデータセンターならびに統計専門家らとともに、「ゲムシタビン投与膾がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質進行抑制効果- 無作為化第 II 相比較試験」のフルプロトコールの作成、および「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮が

ん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果- 無作為化第 II 相比較試験」のプロトコールコンセプトの作成を行った。

（倫理面への配慮）

臨床研究であるため、倫理面には特に配慮し、完成したフルプロトコールは、プロトコール審査委員会に諮り承認を得たのち、各参加施設の倫理審査委員会での承認を得ることとした。また、被験者には十分な説明を行い、説明同意文書に署名をいただいてから開始する予定であり、補償のための保険にも加入する予定となっている。

C. 研究結果

「ゲムシタビン投与膾がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質進行抑制効果

- 無作為化第 II 相比較試験」については、フルプロトコールが完成し、プロトコール審査委員会の承認を得て、実質的な研究責任機関である北海道大学病院の自主臨床研究事務局の審査委員会にて審査中である。一方、「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果- 無作為化第 II 相比較試験」については、プロトコールコンセプトが運営委員会にて承認され、フルプロトコールが完成し、再び運営委員会にて審査中である。

D. 考察

六君子湯はがん患者の悪液質の進行を抑制、あるいは抗がん剤による食欲不振を改善し、QOL や予後を改善する可能性があるため、本臨床研究において探索的な試験を行い、有用な評価項目が認められればプラセボ六君子湯を用いた第 III 相の臨床試験を計画して検証していく。

E. 結論

がん患者の QOL 向上のための六君子湯のエビデンスを確立するため、二つの臨床研究を立案し、プロトコールを作成した。各施設における倫理審査委員会にて承認を得たのち、臨床研究が開始される予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sadakane C, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M, Takeda H.

10-gingerol, a component of Rikkunshito, improves cisplatin-induced anorexia by inhibiting acylated ghrelin degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 412 (3): 506-511 (2011).

2. Saegusa Y, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Decreased plasma ghrelin contributes to anorexia following novelty stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301 (4): E685-E696 (2011).

2. 学会発表

1. Ohnishi S, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Influence of gender on peripheral ghrelin secretion. -Examination in the aging mice. *Digestive Disease Week 2011*. Chicago, USA (2011 年 5 月).
2. Ohnishi S, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Potential new treatment to alleviate chemotherapy anorexia. *Digestive Disease Week 2011*. Chicago, USA (2011 年 5 月).
3. Muto S, Takeda H, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Ghrelin resistance in stressed female advanced-age mice. *Digestive Disease Week 2011*. Chicago, USA (2011 年 5 月).
4. Takeda H, Muto S, Oridate N, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Impaired gastric emptying in gastroesophageal reflux disease rat model is caused by a reduced response to ghrelin. *Digestive Disease*

Week 2011. Chicago, USA (2011年5月).

5. Muto S, Takeda H, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Novelty stress-induced anorexia is due to the decrease in the plasma ghrelin level via 5-HT1B/2C-melanocortin-4 system activation. Digestive Disease Week 2011. Chicago, USA (2011年5月).

G. 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

六君子湯、大建中湯のがん悪液質に及ぼす効果の中樞への関与の解析

研究分担者 上田 陽一 産業医科大学 教授

研究要旨 動物に末梢投与した摂食抑制ペプチド、催吐剤および抗がん剤の摂食抑制作用に対する六君子湯、大建中湯の胃内投与効果を検討した。その結果、抗がん剤の摂食抑制作用は六君子湯の投与により有意に減弱した。六君子湯の作用メカニズム解析のため、これらの動物における脳内、特に視床下部における摂食関連ペプチドの発現動態についての検討を継続している。

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。視床下部ニューロンでは、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、摂食行動や代謝調節に重要な分子基盤である。

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、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ている。

今年度は、動物に催吐剤および抗がん

剤を投与して生じる摂食抑制作用に対する六君子湯、大建中湯の胃内投与効果を検討した。

B. 研究方法

- ① 成熟雄性ウイスター系ラットに催吐剤としてアポモルフィン（1 mg/kg 体重）を皮下投与した。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および画像解析装置（MCID）により定量化した。

- ② 成熟雄性ウイスター系ラットに抗がん剤のシスプラチン (6 mg/kg体重) を腹腔内投与して短期 (30, 60, 120, 180分後) の体重、摂食量、飲水量、血糖値、血漿浸透圧への影響を調べた。また、シスプラチン投与前に2回 (16時間前および直前) にわたり生理食塩水、六君子湯 (1 g/kg体重) の経口投与を行った。
- ③ 成熟雄性ウイスター系ラットに抗がん剤のシスプラチン (6 mg/kg体重) を腹腔内投与して長期 (24, 48, 72時間後) にわたる体重、摂食量、飲水量、血糖値、血漿浸透圧への影響を調べた。また、シスプラチン投与前に2回 (16時間前および直前) にわたり生理食塩水、六君子湯 (1 g/kg体重) の経口投与を行った。

(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。すべての実験前一週間ハンドリングを行った。

C. 研究結果

- ① ラットにアポモルフィンを皮下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ず、むしろ増強反応が見られた。
- ② ラットにシスプラチンを腹腔内投与して短期の体重、摂食量、飲水量、血糖値、血漿浸透圧を測定したが有意な変化は見られなかった。六君子湯投与群に置いても同様に変化は見られなかった。
- ③ ラットにシスプラチンを腹腔内投与

して長期の体重、摂食量、飲水量、血糖値、血漿浸透圧を測定したところ、シスプラチン投与48および72時間後に体重と摂食量の有意な減少、72時間後に血糖値の有意な減少が見られた。これらの減少反応は、六君子湯の経口投与により有意に減弱した。

D. 考察

抗がん剤の副作用として悪心・嘔気は重要な問題である。今回、催吐剤として知られているアポモルフィンをラットに投与して室傍核ニューロン神経活動を*c-fos*遺伝子の発現を指標にして観察した。その結果、アポモルフィン投与により*c-fos* mRNAが著明に増加したことから、この反応をアポモルフィンの催吐作用の指標として利用しうると考えられた。しかしながら、予想外なことに六君子湯および大建中湯の経口投与がこの反応を増強した。少なくともアポモルフィンの作用部位と六君子湯および大建中湯の作用部位が異なることが考えられた。

次に、抗がん剤のシスプラチンの作用について検討したところ、短期 (3時間) の効果はみられず、長期 (48および72時間) においてシスプラチン投与による体重減少、摂食量の減少および血糖値の低下が見られた。さらにこの反応は、六君子湯の経口投与により有意に減弱した。今後、この効果が、視床下部摂食関連ペプチドの発現にどのような影響を及ぼしているかについての検討が必要である。

E. 結論

催吐剤による視床下部反応は、六君子湯および大建中湯によって抑制されずむしろ増強反応が見られた。抗がん剤のシスプラチン投与によって生じる摂食抑制作用は、六君子湯の経口投与によって減弱することを明らかにした。

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. *Int J Cancer*, 128 (9): 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. *Eur J Pharmacol*, 655 (1-3): 31-37 (2011).
3. Hashimoto H, Ueta Y. Central effects of ghrelin, a unique peptide, on appetite and fluid/water drinking behavior. *Curr Protein Pept Sci*, 12 (4): 280-287 (2011).

2. 学会発表

1. 横山 徹, 寺脇 潔, 南 浩一郎, 柳原 五吉, 上田 陽一, 上園 保仁. がん悪液質モデルラットでは視索上核大細胞性ニューロンでの浸透圧感受性が変化している. 第70回

日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).

2. 橋本 弘史, 吉村 充弘, 石倉 透, 藤原 広明, 上園 保仁, 上田 陽一. コレシストキニンおよびアポモルフィン末梢投与によるラット室傍核における*c-fos* mRNA発現の検討. 第89回日本生理学会大会. 松本市 (2012年3月).
3. 横山 徹, 寺脇 潔, 南 浩一郎, 柳原 五吉, 上園 保仁, 上田 陽一. がん悪液質モデルラットでは視索上核大細胞性神経分泌細胞での浸透圧感受性が変化している. 第89回日本生理学会大会. 松本市 (2012年3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
特記事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
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 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 ストレスに關与する副腎髓質細胞機能に対する六君子湯の作用について、その解析を行った。ラット副腎髓質培養細胞株 PC12 において、カテコラミン生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素の発現に対する六君子湯の効果とその機序を調べた結果、六君子湯は PC12 細胞内の cAMP 量を増加させ、チロシン水酸化酵素遺伝子の発現を増強すること、及びカテコラミン分泌を促進することが明らかになった。以上の結果より、六君子湯は副腎髓質細胞に作用して、カテコラミン生合成と分泌を促進することが示され、ストレス反応における生体調節を行っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

悪液質実験動物モデルにおける筋萎縮の防止には交感神経アドレナリン性 β 受容体作動薬が有効であることが知られており、副腎髓質からのカテコラミン分泌促進が、がん悪液質の改善に役立つ可能性が考えられる。そこで、がん悪液質において食欲改善のために使用される六君子湯の末梢組織への直接作用を探る研究の一環として、副腎髓質の機能に対する六君子湯の影響を検討した。

B. 研究方法

ラット褐色細胞腫由来の培養細胞 PC12 に cAMP により発現が増強する β ガラクトシダーゼ遺伝子を導入した

細胞（PCVG 細胞）を用い、六君子湯に含まれる cAMP 増加物質の検出及び種々の試薬による cAMP 増加反応との比較を行った。また、PC12 細胞の六君子湯による cAMP 応答遺伝子の発現変化を調べるために、PCVG 細胞の β ガラクトシダーゼ活性とともに、カテコラミン生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素及び血管作動性腸管ペプチド(VIP)遺伝子の mRNA の定量をリアルタイム PCR 法で行った。さらに細胞からのカテコラミン分泌量を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

（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。動物由来の組織は培養細胞のみを用いた。