

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

がん治療の副作用軽減ならびにがん患者のQOL向上のための
漢方薬の臨床応用とその作用機構の解明

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者	上園 保仁	(国立がん研究センター研究所)
研究分担者	乾 明夫	(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)
	上田 陽一	(産業医科大学医学部)
	塚田 俊彦	(国立がん研究センター研究所)
	藤宮 峯子	(札幌医科大学医学部)
	樋上 賀一	(東京理科大学薬学部)
	河野 透	(旭川医科大学)
	大西 俊介	(北海道大学大学院医学研究科)
	櫻木 範明	(北海道大学大学院医学研究科)

平成25(2013)年5月

目 次

I. 総括研究報告

がん治療の副作用軽減ならびにがん患者の QOL 向上のための漢方薬の臨床応用とその作用機構の解明 上園 保仁	-----	1
---	-------	---

II. 分担研究報告

1. 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 上園 保仁	-----	25
2. 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 乾 明夫	-----	35
3. 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 上田 陽一	-----	39
4. 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 塚田 俊彦	-----	43
5. 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 藤宮 峯子	-----	47
6. がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響 樋上 賀一	-----	49
7. 大建中湯の消化器症状に対する効果の基礎ならびに臨床研究 河野 透	-----	53
8. 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 大西 俊介	-----	57
9. 六君子湯による抗がん剤の副作用軽減効果の第 2 相臨床研究の実施 櫻木 範明	-----	61

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	63
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	67
-----------------	-------	----

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）
総括研究報告書

がん治療の副作用軽減ならびにがん患者のQOL向上のための
漢方薬の臨床応用とその作用機構の解明

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 本研究は、漢方薬である六君子湯・大建中湯の作用メカニズムを基礎レベルで明らかにすること、ならびに同漢方薬の有効性をランダム化ドブコントロールスタディ（RCT）を含む臨床研究を用いて明らかにするものである。

基礎研究においては、ヒトがん悪液質診断基準を満たす複数のがん悪液質モデル動物を作製し、悪液質改善に対する六君子湯の効果を調べた。六君子湯は末梢および中枢に働き、特に食思改善ペプチド、グレリンシグナルを高めることにより摂食量を改善し、体重低下を抑制することがわかった。グレリンシグナルの亢進作用は、六君子湯の陳皮成分ヘスペリジンがグレリン分泌を促すこと、ならびに蒼朮成分のアラクチロジンがグレリン受容体の感受性を高めることによることを、動物モデルならびに細胞実験により明らかにした。さらに、シスプラチンで起こる消化器の異常運動ならびに食思不振症状は、六君子湯より改善されることを動物実験により明らかにした。加えて、六君子湯はがん悪液質による脂肪酸合成抑制を解除することを明らかにし、さらに副腎髄質機能、下垂体機能を調節している可能性も明らかにした。一方、大建中湯の成分は、臨床で用いられる血中レベルと同等の濃度で、培養細胞のアラキドン酸代謝酵素をさまざまなステップで抑制し、プロスタグランジンE2を特異的に抑制することを明らかにし、がんで起こるさまざまな体内の炎症を抑制する可能性を明らかにした。

臨床研究においては、がん悪液質による食思不振などの症状改善、ならびに抗がん剤で起こる消化器症状の改善に六君子湯が有効であるかを明らかにするため、北海道大学および道内の協力病院（14病院）において、手術不能がん患者を対象とした六君子湯の食思不振、体重減少の改善効果を調べる臨床試験プロトコールを作成し、本年度より患者登録を開始した（40例予定中、現在5例）。さらに子宮がん患者のシスプラチンによる嘔気嘔吐の改善に及ぼす六君子湯の効果についての臨床研究プロトコールも完成させ、次年度患

者登録開始予定の運びである。これら2つの臨床試験は、班内に設置した「プロトコル審査委員会」および「効果・安全性評価委員会」の支援のもと、行っている。

研究分担者

乾 明夫 鹿児島大学大学院医歯学
総合研究科 教授
上田 陽一 産業医科大学医学部
教授
塚田 俊彦 国立がん研究センター研
究所 分野長
藤宮 峯子 札幌医科大学医学部
教授
樋上 賀一 東京理科大学薬学部
教授
河野 透 旭川医科大学
客員准教授
大西 俊介 北海道大学大学院医学研
究科 助教
櫻木 範明 北海道大学大学院医学研
究科 教授

A. 研究目的

平成19年よりがん対策基本法が施行、次いで第一期がん対策推進基本計画が策定、さらに平成24年5月には第二期がん対策推進基本計画が閣議決定され、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推進されているところである。しかしなお、その対応が遅れているのが、終末期がん患者に多く見られる「がん悪液質」の症状改善対策、ならびに抗がん剤による悪心嘔吐等の副作用対策である。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、機能的性ディスペプシアや抗がん剤による食欲不振を改善させること、また食思改善ペプチドであるグレリンの分泌を促進しグレリンシグナルを促進させることが明らかとなり、六君子湯の消化器症状改善効果が注目されている。さらに抗がん剤の悪心嘔吐、便秘に大建中湯が有効であることがエビデンスを持って示されてきた。

本研究では、①がん患者の抗がん剤療法による副作用の改善、並びにがん悪液質の症状改善に、六君子湯・大建中湯が有効であるかどうかを、動物モデルならびに培養細胞を用いて作用メカニズムを明らかにする。加えて②ランダムイズドコントロールスタディ（RCT）を中心とした六君子湯、大建中湯の臨床研究を行い、同薬の臨床における効果を科学的に立証することとした。

1. 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

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。

昨年度までの研究において、低分化型ヒト胃がん細胞株（MKN-45）由来の85As2細胞の皮下移植により、悪液質に

特徴的な症状を示すがん悪液質モデルラットを確立した。

本年度は、同新規がん悪液質モデルを用いて、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。

2. 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

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、本年度も六君子湯を中心に、動物実験を施行し、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の解明に加え、担がんモデル動物の寿命延長効果に対する六君子湯の作用機構の解明を目的とした。

3. 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

今年度は、代表的な抗がん剤であるシスプラチンの摂食抑制作用に対する六君子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および血中

の液性因子を指標として神経回路・分子基盤から解明することを目的とした。

4. 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

六君子湯は種々の原因による食思不振の治療に用いられており、がん悪液質の軽減にも有効性が期待される。我々は以前、六君子湯が副腎髄質細胞内のcAMP量を増加させ、カテコラミンの生合成と分泌を促進することを示した。cAMPは種々のホルモンの生合成と分泌を調節するセカンドメッセンジャーとして知られているため、六君子湯は様々な内分泌細胞の機能に影響する可能性がある。今年度は、下垂体細胞に対する六君子湯の影響を検討した。

5. 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

シスプラチンなどの抗がん剤でおこる嘔吐は患者のQOLを著しく障害する。嘔吐改善には5-HT₃受容体拮抗剤が用いられるが、便秘などの副作用が避けられない。我々は昨年、六君子湯はシスプラチンで起こる上部消化管運動の異常を改善することを報告した。そのメカニズム解明のため、六君子湯が嘔吐の原因であるEC細胞からのセロトニン分泌を直接抑制するかどうかを調べた。

6. がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響

がん悪液質によるやせと健康長寿を示す適度なカロリー制限によるやせ（摂食量はがん悪液質モデルとほぼ同じ）、過度なカロリー制限によるやせの特に脂肪組織における相違点、六君子湯ががん悪液質の脂肪組織に及ぼす影響を分子細胞レベルで明らかにする。そして、がん悪液質での脂肪組織の萎縮抑制に対する六君子湯の作用点を明らかにする。

7. 大建中湯の抗炎症作用のメカニズム解明

抗がん剤の悪心嘔吐、便秘に大建中湯が有効であることがエビデンスを持って示されてきた。

さらに、大建中湯の薬効機序を分子レベルで解析した結果、吸収された大建中湯の有効成分、山椒のsanshools、乾姜のshogaols/gingerolsがカルシトニン関連ペプチドを介して炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗炎症性作用を発揮している機序が明らかとなり、加えてこれら有効成分が体内に吸収されることも明らかとなった。本研究は進行がんによる炎症や痛みに対する大建中湯の臨床応用、ひいてはQOL向上につながる臨床処方としての確立をめざすために、大建中湯の体内機序解明を目的とした。

8. 六君子湯の食思増進に及ぼす効果の検討、ならびに抗がん剤およびがん悪液質による食思不振に対する効果についての臨床研究

昨年度は、がん患者のQOL向上のためのエビデンスを確立するため、臍がんと患者の悪液質改善における六君子湯

の効果調べる臨床試験プロトコールを完成させた。本年度は、実際に臨床試験を開始した。さらに子宮がんに対するシスプラチン療法における嘔気嘔吐に六君子湯が有効であるかの臨床試験を行うべくプロトコール作成を行った。

B. 研究方法

1. 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

1) 新規がん悪液質モデルラットの病態生理研究

① 85As2細胞における悪液質誘発能増強メカニズム

(i) DNAマイクロアレイ

MKN45clone85および85As2細胞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。有意な増加を示した遺伝子については、Pathway Studio®（Elsevier）によるパスウェイ解析を行った。

(ii) 細胞培養上清中サイトカイン

MKN45clone85および85As2細胞を24あるいは48時間培養した上清中のhuman IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、およびLIFをProcarta® cytokine assay kit（Affymetrix Billerica）で測定した。

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 筋肉分解因子の測定

85As2細胞移植4週後のラットの腓腹筋を採取し、ホモジネート後、ISOGEN (Nippon gene Co., Ltd.) により total RNA を抽出し、Real-time polymerase chain reaction (PCR) により、E3 ubiquitin ligases である Atrogin-1/MAFbx、MuRF-1 を測定した。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。

⑤ in situ ハイブリダイゼーション

85As2細胞移植4週後のラットを断頭後、脳を取り出して凍結切片を作製した。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 paraventricular nucleus (PVN)、arcuate nucleus (ARC)、および lateral hypothalamic area (LHA) における摂食促進ペプチド neuropeptide Y (NPY)、agouti-related protein (AgRP) および orexin (ORX) 遺伝子、摂食抑制ペプチド proopiomelanocortin (POMC)、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)、corticotropin-releasing hormone (CRH) および melanin-concentrating hormone (MCH) 遺伝子の発現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。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。

⑥ 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。

⑦ 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。0、2および3週後に、体組成 (除脂肪量・脂肪量・体水分量) を ImpediVET™ Bioimpedance Spectroscopy device (ImpediMed Limited) で測定した。悪液質発症後 (がん細胞移植2週後) 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。また、筋肉（大胸筋、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋）および脂肪重量（精巣上体・腎臓・腸間膜周辺）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 (CellKeyTM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。

2. 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

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、消化管運動などに加え、生存延長効果とその作用機序に焦点を当てて解析を行い、マウス大腸がん細胞の担がんモデルマウスでも生存延長効果を観察した。

3. 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

成熟雄性ウイスター系ラットに生理食塩水もしくは抗がん剤のシスプラチン (6 mg/kg体重) を腹腔内投与して24、48、72時間後の体重、摂食量、飲水量および尿量を測定した。なお、シスプラチン投与前に2回にわたり蒸留水もしくは六君子湯 (1g/kg体重) の経口投与を行った。視床下部摂食関連ペプチド遺伝子の発現変化をISH法により定量化した。同時に採取した体幹血のグレリン濃度などを測定した。

4. 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

副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 産生マウス下垂体培養細胞AtT-20及び成長ホルモン (GH) 産生ラット下垂体培養細胞GH3を六君子湯及びアデニル酸シクラーゼの活性化薬 forskolin で刺激し、細胞内cAMPを免疫学的測定法により定量した。さらに、ACTH mRNA及びGH mRNAを定量的PCR法により定量するとともに、AtT-20培養液中に放出されるACTHを免疫学的測定法により定量した。株式会社ツムラより供与された六君子湯粉末を10%(w/v)の水懸濁液として2分間煮沸抽出したものを六君子湯原液として用いた。

5. 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

ラットにシスプラチン (5 mg/kg) およびvehicleを腹腔内投与し、30分後に採血。血清中のセロトニン濃度を測定した。さらに、シスプラチン投与2時間前に六君子湯 (1g/kg) を経口投与。正常対照群、六君子湯投与群、シスプラチン投与群、シスプラチン+六君子湯投与群でそれぞれ血中セロトニン濃度を比較検討した。

6. がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響

胃がん細胞接種による担がん悪液質 (CC) モデルラットとCCラットへの六君子湯投与群、コントロールラットの白色脂肪組織において、形態学的解析、脂質分解系および脂肪酸合成系タンパク質発現、ミトコンドリア量および関連酵素活性を解析した。また、自由摂食群の70%を2週間給餌したCRラット (30%CR ; 摂食量はCCとほぼ一致)、30%を給餌したCRラット (70%CR) と自由摂食群の脂肪組織において、同様の解析を行った。

7. 大建中湯の抗炎症作用のメカニズム解明

炎症および痛みの主原因の一つであるプロスタグランジンE2に対して大建中湯の薬物動態臨床試験結果で得た有効成分の血中レベルに相当する濃度で抑制できるかどうか培養細胞実験で検討を行う。ヒト培養上皮細胞に炎症性サイトカインやリポポリサッカライドで刺激し、プロスタグランジンE2産生を促し、山椒の sanshools、乾姜の shogaols/gingerols を添加による産生抑

制効果を検証、またアラキドン酸代謝に関与する各種酵素群の発現を定量的PCRで比較検討した。

8. 六君子湯の食思増進に及ぼす効果の検討、ならびに抗がん剤およびがん悪液質による食思不振に対する効果についての臨床研究

当研究班で組織されるデータセンターならびに統計専門家らとともに、「ゲムシタビン投与時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を作成した。また、「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」のフルプロトコールの作成を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は漢方薬である六君子湯、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、ならびにがん患者を対象とした臨床研究より構成される。

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。

基礎研究においては、各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。

臨床試験においては、臨床研究計画について、研究支援組織の運営委員会と臨床試験審査会、および効果安全性評価委員会での承認後、参加各施設の

倫理審査委員会の承認を受けることとした。

特に倫理面に配慮し、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し、補償のための保険にも加入した。

C. 研究結果

1. 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

1) 新規がん悪液質モデルラットの病態生理研究

① 85As2細胞における悪液質誘発能増強メカニズム

(i) 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、85As2細胞における有意な発現増加は、1832プローブ、有意な発現減少は2194プローブであった。有意な発現増加を示した遺伝子に対し、パスウェイ解析を行ったところ、85As2細胞ではtoll-like receptor (TLR) 系のシグナルが活性化していた。

(ii) 細胞培養上清中サイトカイン

MKN45clone85および85As2細胞培養上清中のサイトカインは、IL-1 β 、IL-6およびTNF- α は検出限界以下であった。両細胞培養上清中でIL-8およびLIFが10~1000pg/mlの範囲で検出された。細

胞間の比較では、IL-8: MKN45clone85>85As2、LIF: MKN45clone85<85As2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 筋肉分解因子の測定

がん悪液質モデルでは、Atrogin-1/MAFbxおよびMuRF-1が対照群と比較して有意に増加していた。

⑤ in situハイブリダイゼーション

がん悪液質モデルでは、摂食亢進ペプチド(NPY and AgRP in the ARC, ORX in the LHA) mRNAが増加、摂食抑制ペプチド(POMC and CART in the ARC, CRH in the PVN, MCH in the LHA) mRNAが減少していた。

⑥ 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。

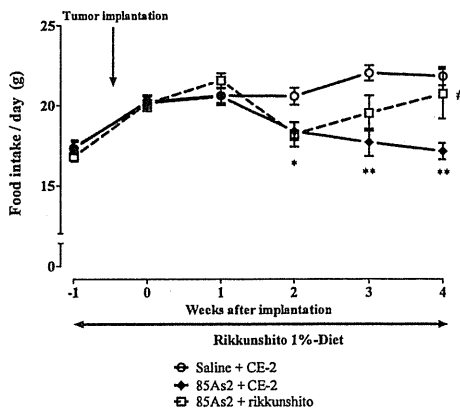
⑦ 血中グレリン濃度

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細胞移植ラットでは、移植2週目から有意な体重減少および有意な摂食量低下が認められ、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。2週目から4週目にかけては、体重は減少しなかったものの、正常群との体重差は拡大した。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(図1)。

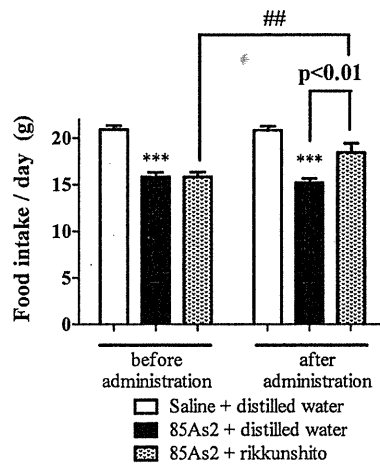


Each data represents the mean±S.E.M. of 9-11 rats. The significant differences were evaluated using one-way ANOVA followed by post hoc Dunnett's Multiple Comparison Test: *p<0.05, **p<0.01 vs Saline + DW group, and #p<0.05 vs 85As2 + DW group

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

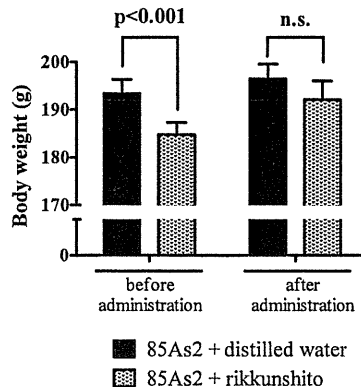
治療効果の検討において、85As2細胞移植ラットは、移植2週目から有意な体重減少および有意な摂食量低下が認められ、予防効果の検討条件よりも重篤な悪液質の症状を示した(図2)。85As2細胞移植+蒸留水投与群では、7日後の摂食量は低下したままであったが、六君子湯7日間投与群では、摂食量低下の

有意な改善が認められた(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(図3)、体組成においても除脂肪量および体水分量を増加させ、筋肉量も増加させた。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。血中LIF値に対する影響もおよぼさなかった。



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 (Data not shown)。

2. 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

担がんモデルラットでは、体重減少、摂食量減少、筋肉量減少、消化管運動低下、サイトカインや炎症を反映する蛋白 (CRP) の増加を認めた。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、CRPの増加を抑制した。担がんモデルラットの生存期間はグレリン受容体拮抗薬により短縮し、六君子湯や六君子湯の蒼朮の含まれるアトラクチロジンの投与により延長することが示された。また担がんモデルマウスでも六君子湯により生存期間が延長

した。アトラクチロジンはグレリンシグナルを増強することが示されており、六君子湯の生存延長効果の一部はグレリンシグナルの増強によるものと考えられた。

3. 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

蒸留水+シスプラチン群において体重および摂食量が有意に減少した。六君子湯+シスプラチン群では、蒸留水+シスプラチン群に比較して体重および摂食量が有意に増加し、蒸留水+生理食塩水群および六君子湯+生理食塩水群と有意差がなくなった。CRH、NPYは蒸留水+シスプラチン群で有意に減少し、六君子湯+シスプラチン群でコントロールレベルとなった。POMC、CART、MCH、orexinは蒸留水+シスプラチン群で有意に増加し、六君子湯+シスプラチン群でコントロールレベルとなった。active ghrelinは、六君子湯+シスプラチン群においてのみ有意に増加していた。

4. 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

六君子湯は用量依存的に、下垂体細胞であるAtT-20及びGH3のcAMP濃度を上昇させるとともに、アデニル酸シクラーゼの活性化薬forskolinの作用を増強した。AtT-20細胞内のACTH前駆体POMC mRNAは、forskolin刺激により用量依存的な発現の増加傾向が認められた。六君子湯は、forskolin刺激のない場合にはPOMC mRNAを軽度誘導した

が、3 μ M forskolinによるmRNAの発現誘導をむしろ抑制した。GH3細胞では、forskolinによるGH mRNAの発現誘導は認められず、また、六君子湯は3 μ M forskolin刺激時のmRNA量を抑制する傾向があった。全体として、六君子湯はホルモン遺伝子のmRNA量に一定方向の影響を及ぼさなかった。また、forskolinはAtT-20細胞からのACTH分泌を促進したが、六君子湯は明らかな影響を及ぼさなかった。

5. 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

昨年度の研究にてシスプラチン投与で胃の空腹期運動が消失し、異常な胃運動の亢進を認め、シスプラチンで誘発される空腹期運動の消失は六君子湯の投与で回復すること、またシスプラチン投与後に見られる異常な胃運動亢進も六君子湯の投与で回復することを明らかにしている。これらの結果は、シスプラチンによりEC細胞より分泌されるセロトニンの効果を六君子湯が抑制するためと考えられている。実際セロトニンの動態をしらべたところ、正常対照群の血中セロトニン濃度は、 598.7 ± 106.7 ng/ml (n=5)、六君子湯単独投与群は、 841.0 ± 115.6 ng/ml (n=5)で正常対象群と有意差はなかったが、シスプラチン単独投与群は、 1492.5 ± 231.2 ng/ml (n=5)で、正常対照群 (P<0.01) や六君子湯単独投与群 (P<0.05) より有意に増加した。シスプラチンと六君子湯併用投与群は、 717.5 ± 85.7 ng/ml (n=5)で、シスプラチン投与群より有意に減少 (P<0.05) し、正常レベルに戻ることが明らかと

なった。

6. がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響

昨年度のプロテオーム解析により、カロリー制限 (CR) 動物モデルの白色脂肪組織においては、脂肪酸合成関連タンパク質、ピルビン酸/リンゴ酸回路関連タンパク質、ミトコンドリア関連タンパク質の発現が亢進すること、citrate synthase活性及びcytochrome c oxidase活性が亢進することを見出した。上記の発現変化や酵素活性変化を2種の悪液質モデル (CC) で比較したところ、CRにより増加したfatty acid synthaseの発現が抑制されていることを明らかにした。この抑制は六君子湯の投与により改善傾向を示した。

今年度は、さらに詳しい解析を行った。CCおよび70%CR動物における脂肪細胞のサイズは有意に減少したが、30%CRでは変化はなく、六君子湯による影響も見られなかった。また、脂質分解関連タンパク質発現はCC、30%CR、70%CRともに有意に増加したが、六君子湯は効果を引き起こさなかった。

一方、脂質合成関連タンパク質の発現はCCと70%CRでは有意に減少したが、六君子湯の投与により減少改善される傾向にあった。さらに、30%CRにおいては有意に増加した。

ミトコンドリアDNA量は、30%CRではDNA量に変化が見られず、CCおよび70%CRでは有意に減少した。六君子湯はDNA量に影響を与えなかった。ミトコンドリア関連酵素活性については、CCでは変化なく、六君子湯による影響も見られなかったが、CRモデルではそ

の程度に比例して活性を有意に増加させた。

7. 大建中湯の抗炎症作用のメカニズム解明

大建中湯には3種類（山椒、乾姜、人參）の抽出生薬成分が含まれているが、特に、乾姜のshogaolsが0.1 $\mu\text{mol/L}$ という低濃度でプロスタグランジンE2を80%近く減少させることを明らかにした。その機序として生体膜のリン脂質をアラキドン酸に変換する細胞質型ホスホリパーゼA2、アラキドン酸からプロスタグランジンG2に変換するCOX2、最終的にプロスタグランジンE2に変換するプロスタグランジンE合成酵素を抑制することを明らかにした。生体防御に重要なCOX1に関して抑制効果は認められなかった。

8. 六君子湯の食思増進に及ぼす効果の検討、ならびに抗がん剤およびがん悪液質による食思不振に対する効果についての臨床研究

「ゲムシタビン投与膺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、平成24年4月に参加各施設とともにキックオフミーティングを行った。同年5月に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の承認を得た。同年8月より登録開始可能となった。平成25年4月現在、5例の登録となっている。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、フルプロトコールが完成し、平成25年3月にプロトコール審査委員会の承認を得た。現在、北海道大学病院の自主臨床研究事務局の審査委員会に提出し、審査中であり、承認後直ちに患者登録へと進む。

D. 考察

1. 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

ヒト胃がん腹膜播種性転移株85As2により作製したモデルラットは、悪液質に特徴的な症候を示し、臨床でのがん悪液質研究の診断基準を反映していた。

同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。さらに、細胞自体がLIFを産生することから、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。一方、MKN45clone85および85As2細胞はIL-8産生を示したが、悪液質動物の血中では検出されなかったため、直接の悪液質誘発因子ではないと考えられた。

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、パスウェイ解析によりTLRシグナルが活性化していることが示唆された。TLR4あるいはTLR5リガンド刺激により、85As2細胞がLIF産生を亢進するこ

とを確認しており、TLRシグナル活性化が悪液質誘導能に寄与す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、筋肉分解因子の亢進も確認されたことから、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。加えて、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、ヒトがん悪液質の臨床データと一致する。本モデルでは脳内摂食亢進ペプチドが増加し、摂食抑制ペプチドは減少しているにも関わらず摂食量が低下しており、さらに、グレリン投与による摂食行動が抑制されていたことから、本モデルにおいて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は改善作用を示した。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、およびCellKey™アッセイにて、六君子湯はグレリン受容体シグナルを増強することを明らかにした。加えて、六君子湯を構成する8種類の生薬のひとつ、蒼朮に含まれるアトラクチロジンが、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、六君子湯のグレリンシグナル活

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がん悪液質モデルにおいて予防的にも治療的にも改善効果を示した。

以上、六君子湯の作用メカニズムのひとつに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。

2. 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

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。研究分担者らは動物実験において、六君子湯が内因性のグレリンを刺激すると同時に、グレリンシグナルを増強し、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ことを見出したが、担がんモデルラットでグレリンシグナルの減弱が生存期間短縮に関わること、および六君子湯がこのグレリン抵抗性を改善して生存期間を延長することを複数の動物モデルで確認した。生存期間延長効果の一部が六君子湯に含まれるアトラクチロジンのグレリンシグナル増強作用によることを示した。

3. 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

今回、昨年度に見出した抗がん剤シスプラチン投与後の体重、摂食量の有意な減少および六君子湯の経口投与によるこれらの変化の有意な減弱を再確認した。次にこの六君子湯の作用機序について検討するため、視床下部摂食関連ペプチドの遺伝子発現について検討した。その結果、シスプラチン投与により摂食抑制ペプチドであるPOMC、CARTが弓状核において有意に増加し、摂食促進ペプチドであるNPYが有意に減少していたこと、および六君子湯の投与によりこれらのペプチドの変化がコントロールレベルに回復していたことから、シスプラチン投与による摂食抑制作用および六君子湯の改善効果はこれらのペプチドの変化が原因となって引き起こされたことが示唆される。

摂食抑制ペプチドであるCRHの有意な減少、摂食促進ペプチドであるMCH、orexinの有意な増加については、シスプラチン投与によって生じた摂食抑制の結果生じたものと考えられる。さらに六君子湯による摂食抑制の改善効果は、六君子湯が血中active ghrelin濃度を増加させ、active ghrelinが視床下部に作用してPOMC、NPYをコントロールレベルに回復させた可能性が考えられる。

4. 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

六君子湯は食欲改善の治療薬として、種々の病態において用いられるが、その効果の発現機序は必ずしも明らかではない。これまでの研究により、六君子湯が細胞内cAMPを増加させる成分

を含むことが示されていること、また、種々のホルモンの産生・分泌がcAMP依存的であることから、六君子湯は種々の内分泌細胞の機能に影響を及ぼす可能性がある。

下垂体のACTH産生細胞やGH産生細胞では、細胞内cAMPの上昇によりホルモン遺伝子の発現が誘導され、かつ細胞外へのホルモン放出が促進されることが知られている。本研究でも、AtT-20細胞のforskolinによる刺激実験では、既報の通り、cAMPの上昇とともにPOMC mRNAの増加とACTH分泌促進が認められた。一方、六君子湯による刺激ではcAMP濃度上昇を認めたものの、遺伝子発現促進とACTH分泌には明瞭な一定方向の作用を認めなかった。以上のことより、六君子湯はcAMPを増加させるが、その他の機序によってもACTH産生下垂体細胞の機能に影響する可能性が考えられた。GH3細胞については、forskolinによるcAMP上昇を認めたが、GH遺伝子発現が増加せず、正常下垂体のforskolinに対する反応を再現できなかった。その理由は不明であるが、GH3細胞が下垂体腫瘍細胞であり、正常のGH産生下垂体細胞とは異なる遺伝子発現調節を受けていることも一因と考えられる。

5. 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

抗がん剤でおこる嘔吐は患者のQOLを著しく障害する。本来嘔吐は5-HT₃受容体拮抗剤の投与で消失することが知られているが便秘などの副作用が避けられない。六君子湯が抗がん剤による嘔吐に効果があり、しかも副作用が

ないとすれば、きわめて有用な治療法と言える。平成24年度の研究で、六君子湯がシスプラチンで増加した血中セロトニン濃度を正常化させることが判明した。これまで、六君子湯とセロトニン分泌の研究はほとんどなされていなかったが、本研究成果は重要な示唆を与えるものである。

6. がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響

CCの白色脂肪組織は70%CRのそれと類似していたが、30%CRの白色脂肪組織とは特に脂肪酸合成関連タンパク質の発現に関して対照的であった。また、CCと70%CRではミトコンドリア量が顕著に減少した結果、単位ミトコンドリアあたりの酵素活性が過度に増強している可能性が示唆されたが、30%CRではそのような変化は見られなかった。六君子湯によるミトコンドリアへの効果は観察できなかったが、CCにより減少した脂肪酸合成系タンパク質発現を増加させた。以上より、六君子湯によるCC病態の改善効果の一部はde novo脂肪酸合成の増加にある可能性が示唆された。

7. 大建中湯の抗炎症作用のメカニズム解明

体内に吸収された大建中湯の主要成分である山椒の sanshools、乾姜の shogaol が、トランジェントレセプターポテンシャルチャンネルというカルシウムチャンネルを介して抗炎症性サイトカイン、抗炎症作用があることを明らかにしてきた [Surgery 2009, J Crohn's

Colitis 2010, J Gastroenterol 2011, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2013, Drug Metab Dispos 2011, Drug Metab Dispos 2013]。これら成分が痛みや炎症の原因であるプロスタグランジンE2産生を多標的に抑制する可能性があり、大建中湯ががん性疼痛や炎症を軽減できる可能性を探索することが本研究目的であり、漢方薬が合剤である意義を明らかにすることができると考えた。現在、がん領域における新規西洋薬の開発コストは天文学的数字である。抗がん剤の副作用やがん悪液質などに対する新規西洋薬の開発は困難な状況である。本研究成果はがん領域で新たな臨床応用をコストをかけずに検証できる可能性が高く、西洋薬と漢方薬を併用できる日本の医師と患者しかできない研究である。漢方薬が新たな適応疾患に単独使用されたり併用使用で既存の西洋薬の使用量を減らしたり上乗せ効果を確認することができれば医療経済上のメリットは大きい。がん患者のQOL維持向上において最も重要なものは痛みである。この痛みを軽減する方法はこれまでオピオイドや消炎鎮痛剤NSAIDを利用してきたが、それぞれ副作用も多く発現するため一定の制限がかけられてきたが、大建中湯によるがん性疼痛に関して動物実験や臨床試験で有益であることが証明されれば、副作用の発現が極めて低頻度である、安全な鎮痛薬として使用できる可能性がある。

8. 六君子湯の食思増進に及ぼす効果の検討、ならびに抗がん剤およびがん悪液質による食思不振に対する効果についての臨床研究

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第III相の臨床試験を計画して検証していく。

E. 結論

本研究は、漢方薬六君子湯、大建中湯の作用メカニズムを明らかにすること、ならびに同漢方薬の有効性を臨床研究を用いて確立するものである。

基礎研究においては、六君子湯が悪液質モデル動物の摂食量を改善し、体重低下を抑制することを明らかにした。その作用機序として、がん悪液質で起こっているグレリン分泌不全やグレリン抵抗性を六君子湯成分のヘスペリジン、アトラクチロジンが改善することを明らかにした。さらに、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する薬剤であり、動物実験で生存期間延長効果を持つ薬剤であることを示した。その作用機序は六君子湯の蒼朮の含まれるアトラクチロジンによるグレリンシグナル増強作用によるものが考えられた。

シスプラチンによる摂食抑制作用および六君子湯による摂食改善作用は、血中active ghrelinを介して視床下部摂食関連ペプチドの動態を修飾したことによって生じた可能性が示唆された。

六君子湯はACTH産生下垂体細胞及びGH産生下垂体細胞の細胞内cAMPを増加させる。しかし、ホルモンの産生・分泌に対しては強い作用がないことが示唆された。

ラットにおいてシスプラチン投与の2時間前に六君子湯を経口投与した群とvehicle群の血中セロトニン濃度を測定した。シスプラチン投与で血中のセロトニン濃度は有意に増加し、六君子湯投与でこの効果はブロックされた。

六君子湯投与による白色脂肪組織におけるde novo脂肪酸合成系の維持ががん悪液質病態の抑制に重要である可能性が示唆された。

大建中湯の成分が血中レベルに匹敵する濃度で培養細胞において多標的にアラキドン酸代謝酵素を抑制しプロスタグランジンE₂を特異的に抑制することを明らかにし、がんに伴う炎症や痛みを抑制できる可能性が示唆された。

臨床研究においては、がん悪液質の症状改善、加えて抗がん剤投与による消化器症状に六君子湯が有効であることを明らかにするため、臨床研究プロトコルを作成し、ひとつは患者登録を行い、もうひとつは次年度登録開始予定である。臨床研究は班内に設置した「プロトコル審査委員会」および「効果・安全性評価委員会」により支援を受けた。

抗がん剤による悪心嘔吐等の消化器症状改善、体重減少、倦怠感などががん悪液質の症状改善は、がん患者のQOL向上や生命予後に重要であるにも関わらず、治療法が確立されていない。当班では、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、また食欲改善ペプチドであるグレリンシグナルを増強することを見出した。

ほとんど副作用を有しない漢方薬が、抗がん剤副作用改善、ならびにがん悪液質症状改善に有効であることが科学的に立証されれば、両漢方薬は薬価収

載されており、直ちに臨床現場での広範な応用が可能である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki M, Narita M, Ashikawa M, Furuta S, Matoba M, Sasaki H, Yanagihara K, Terawaki K, Suzuki T, Uezono Y. Changes in the melanocortin receptors in the hypothalamus of a rat model of cancer cachexia. *Synapse*, 66 (9): 759-769, 2012.
2. 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 a lack of β -arrestin association: Study with a real-time visualizing assay. *Synapse*, 66 (9): 759-769, 2012.
3. 上園保仁. 変わる「第二次がん対策推進基本計画」-第一次がん対策推進基本計画実践後の反省をもとに、がん体験者の視点を取り入れて-。がん患者と対症療法, 23 (1): 106-113, 2012.
4. Horishita T, Ueno S, Yanagihara N, Sudo Y, Uezono Y, Okura D, Sata T. Inhibition by pregnenolone sulphate, a metabolite of the neurosteroid pregnenolone, of voltage-gated sodium channels expressed in *Xenopus* Oocytes. *J Pharmacol Sci*, 120 (1): 54-58, 2012.
5. Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, Furuta S, Kawamata T, Ashikawa M, Miyano K, Yanagihara K, Chiwaki F, Ochiya T, Suzuki T, Matoba M, Sasaki H, Uezono Y. The sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied expression of substance P and by changes in the μ -opioid receptors in the spinal cord of mice. *Anesthesiology*, 117 (4): 847-856, 2012.
6. 上園保仁. ここまでわかってきた漢方薬の「なぜ効くの？」と「本当に効くの？」-科学的エビデンスに基づいた、がん患者のQOLを高める漢方薬の効果-。がん患者と対症療法, 23 (2): 186-192, 2012.
7. Uezono Y, Miyano K, Sudo Y, Suzuki M, Shiraishi S, Terawaki K. A review of traditional Japanese medicines and their potential mechanism of action. *Curr Pharm Des*, 18 (31): 4839-4853, 2012.
8. Iwase S, Yamaguchi T, Miyaji T, Terawaki K, Inui A, Uezono Y. The clinical use of Kampo medicines (traditional Japanese herbal treatments) for controlling cancer patients' symptoms in Japan: a national cross-sectional survey. *BMC Complement Altern Med*, 12: 222, 2012.
9. Minami K, Uezono Y. The recent progress in research on the effects of anesthetics and analgesics on G protein-coupled receptors. *J Anesthesia*, 27 (2): 284-292, 2013.
10. Motoyama N, Morita K, Kitayama T, Shiraishi S, Uezono Y, Nishimura F, Kanamatsu T, Dohi T. Pain-releasing action of platelet-activating factor (PAF) antagonists in neuropathic pain animal models and the mechanisms of action. *Eur J Pain*, epub ahead of print, 2013.
11. Yanagihara K, Takigahira M, Mihara K, Kubo T, Morimoto C, Morita Y, Terawaki K, Uezono Y. Inhibitory

- effects of isoflavones on tumor growth and cachexia in newly established cachectic mouse models carrying human stomach cancers. *Nutr Cancer*, in press, 2013.
12. Fujitsuka N, Asakawa A, Amitani H, Hattori T, Inui A. Efficacy of ghrelin in cancer cachexia: clinical trials and a novel treatment by rikkunshito. *Crit Rev Oncog*, 17 (3): 277-284, 2012.
 13. Fujitsuka N, Asakawa A, Amitani H, Fujimiya M, Inui A. Ghrelin and gastrointestinal movement. *Methods Enzymol*, 514: 289-301, 2012.
 14. Inui A. Editorial: a new horizon of herbal medicines in anorexia-cachexia syndrome. *Curr Pharm Des*, 18 (31): 4747-4748, 2012.
 15. Miki K, Maekura R, Nagaya N, Nakazato M, Kimura H, Murakami S, Ohnishi S, Hiraga T, Miki M, Kitada S, Yoshimura K, Tateishi Y, Arimura Y, Matsumoto N, Yoshikawa M, Yamahara K, Kangawa K. Ghrelin treatment of cachectic patients with chronic obstructive pulmonary disease: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS One*, 7 (5): e35708, 2012.
 16. Nahata M, Muto S, Oridate N, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303 (1): G42-G53, 2012.
 17. Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Asaka M. Rikkunshito and ghrelin secretion. *Curr Pharm Des*, 18 (31): 4827-4838, 2012.
 18. Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Rikkunshito as a ghrelin enhancer. *Methods Enzymol*, 514: 333-351, 2012.
 19. Nahata M, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Saegusa Y, Iizuka S, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Serotonin 2C receptor antagonism ameliorates novelty-induced hypophagia in aged mice. *Psychoneuroendocrinology*, in press, 2013.
 20. Hashimoto H, Uezono Y, Ueta Y. Pathophysiological function of oxytocin secreted by neuropeptides: A mini review. *Pathophysiology*, 19 (4): 283-298, 2012.
 21. Yoshimura M, Matsuura T, Ohkubo J, Ohno M, Maruyama T, Ishikura T, Hashimoto H, Kakuma T, Yoshimatsu H, Terawaki K, Uezono Y, Ueta Y. The gene expression of the hypothalamic feeding-regulating peptides in cisplatin-induced anorexic rats. *Peptides*, in press, 2013.
 22. Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, Sano K, Tsukada T, Sakurai A. A novel splice site mutation of the *MEN1* gene identified in a patient with primary hyperparathyroidism. *Endocr J*, 59 (6): 523-530, 2012.
 23. Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, Tsukada T, Sakurai A. Application of an intracellular stability test of a novel missense menin mutant to the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr J*, 59 (12): 1093-1098, 2012.
 24. Horiuchi K, Okamoto T, Iihara M, Tsukada T. An analysis of genotype-phenotype correlations and survival outcomes in patients with primary hyperparathyroidism caused by multiple endocrine neoplasia type 1: the experience at a single institution. *Surg Today*, epub ahead of print, 2013.
 25. Ataka K, Nagaishi K, Asakawa A, Inui A, Fujimiya M. Alteration of antral and proximal colonic motility induced by