

癌医療におけるグレリンの包括的 QOL 改善療法の開発研究

研究分担者 寒川 賢治

（国立循環器病研究センター研究所 所長）

研究要旨

本研究では、グレリンの抗カヘキシア効果によって癌医療を強力に底上げすることを目的に、化学療法を実施する進行癌、根治術を実施する早期癌患者を対象に、グレリン投与の臨床試験を実施した。侵襲が過大で周術期に全身性炎症反応症候群 (SIRS) を来しやすい食道癌手術では、手術開始とともにグレリンを持続静注することで SIRS 期間を短縮することができた。プラチナ剤を用いる癌化学療法においては、グレリン投与で食欲低下を抑制する傾向が示された。膵癌化学療法では、治療前の血漿アシル/デスアシルグレリン比が化学療法に伴う消化器症状を予測していた。基礎研究として、癌モデル動物におけるグレリンの効果を分子レベルで解析した。大腸発癌モデルではグレリンの抗炎症作用が発癌を抑制する可能性が示唆され、肺癌カヘキシアモデルでは抗炎症と IGF-1 を介した経路が筋萎縮を抑制する可能性が示唆された。

A. 研究目的

グレリンは 1999 年にラットおよびヒトの胃内分泌細胞から発見された強力な成長ホルモン分泌促進活性をもつ 28 個のアミノ酸からなるペプチドである。グレリンの生理作用は、下垂体からの成長ホルモン分泌促進だけでなく、成長ホルモン非依存性に摂食亢進、エネルギー蓄積、抗炎症、交感神経抑制、心血管保護など多彩な生体調節機能を有していることが明らかとなった。

癌治療において抗癌剤治療や副作用軽減治療は確実に進歩しているにもかかわらず、術後の栄養障害や抗癌剤による食欲喪失など、治療に伴う患者の苦痛は甚大である。グレリンは摂食亢進だけでなく抗炎症など多彩な作用により、化学療法や大侵襲手術に伴う合併症や副作用を軽減する

ことが期待できる。

本研究では、癌医療を強力に底上げすることを目的に、化学療法を実施する進行癌、根治術を実施する早期癌患者を対象に、グレリン投与の臨床試験を実施する。基礎研究として、癌モデル動物におけるグレリンの効果を分子レベルで解析する。

B. 研究方法

1. 進行肺癌患者の QOL 改善に対するグレリンの臨床効果

これまでの検討で、シスプラチンを中心とした抗癌剤化学療法 1 コース後に、82% の患者で day 2 からの 7 日間に著しい摂食低下を来し、97% の患者で平均 1.7 kg の体重減少を来していた。

これらの結果を受けて、本年度はグレリン投与の臨床試験を開始する体制を整備し、臨床試験を開始した。研究デザインは二重盲検プラセボコントロール試験とした。抗癌剤治療開始後 14 日間の摂食量低下抑制を主要評価項目として、抗癌剤治療 day 2 から 1 日 2 回、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のグレリンを 6 日間静注投与する。プラセボには同量の生理的食塩水を投与する。

2. 上部消化管手術後におけるグレリン補充療法

昨年度は食道癌根治術施行患者を対象に臨床第 I 相試験を施行した。また、主要評価項目として、術後合併症発生率、副次的評価項目として SIRS 期間、血液検査所見 (CRP, IL-6)、栄養指標 (Rapid turnover protein)、ホルモン測定を施行した。

本年度は、食道癌根治術施行患者の侵襲軽減に対するグレリンの臨床応用を目指し、以下のような方法で研究を展開した。

食道切除胃管再建術後早期におけるグレリン投与の臨床効果に関するランダム化第 Ⅱ 相試験を施行した。当科において平成 24 年 4 月～平成 25 年 9 月に胸部食道癌一期的根治術を施行した 40 例を対象とし、20 例を実薬 (合成グレリン 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) 投与、20 例を偽薬 (生食) 投与の 2 群に無作為化割付けした (グレリン群 vs プラセボコントロール群)。手術開始時から持続的に 5 日間経静脈的に投与し、合併症発生率、SIRS 期間を主要評価項目として安全性と有効性を評価した。副次的評価項目として、手術施行前後の炎症所見 (WBC、IL-6、CRP)、栄養指標 (Rapid turnover protein)、ホルモン測定 (GH)、体組成変化 (DEXA) を評価した。

3. 進行膵癌におけるグレリンの臨床的位置づけに関する研究

対象：国立がん研究センター東病院において、膵癌肝転移と診断され全身化学療法が予定された患者のうち、文書にて研究に同意した被験者を対象とした。

測定：全身化学療法前と 1 ヶ月後に、AG、DG、AG 比、体組成、自記式質問票による症状スコアを測定した。治療有効性に関わる臨床データは 3 ヶ月毎に前向きに調査して記録した。全身化学療法中の有害事象は、有害事象共通用語規準 (Common Toxicity Criteria : CTCAE) で評価した。

解析：食欲不振は、症状無し：0～最も強い：10 までの 11 段階でスコア化され、食欲不振スコアが全体中央値よりも小さい患者は「食欲不振なし」とし、「食欲不振なし」群と「食欲不振」群との群間で AG、DG、AG 比を比較検討して食欲不振と関連するグレリン指標を特定した。次に、食欲不振関連グレリン指標と全身化学療法の有効性と安全性との関連について解析した。

4. 高発癌環境におけるグレリンの作用と微小転移巣に対するグレリンの影響

大腸炎発がんマウスモデルを用い、グレリン投与の発がんへの影響を検証した。

生後 8 週のマウス (オス) に発癌イニシエーターとしてアゾキシメタン (AOM) を腹腔内単回投与し、その 1 週間後から発癌プロモーターとして 2% デキストラン硫酸 (DSS) 1 週間飲水を 3 回反復投与することにより、大腸炎を誘発し、大腸発癌モデルとした。グレリン投与の影響は、生理食塩水に溶解したグレリンを DSS 投与時に腹腔内投与 (3 nmoles/day) し、生理食塩水のみを投与した群と比較することで検証した。AOM 投与後 12 週間の時点でマウスを安楽死させ、解剖後、腸管に形成された腫瘍の数を計測し、組織サンプルを採取して解析を行った。炎症性サイトカインの

発現は腸管組織から抽出した核酸を用いて RT-PCR 法で検討した。

5. 進行肺癌に対するグレリンの臨床応用と抗カヘキシア作用の解明

平成 25 年度は、前年度までに作成した進行肺癌カヘキシアモデルを用いて、以下の方法を研究を展開した。

肺腺癌カヘキシアモデルにおいて、38 週齢から 42 週齢までグレリン 10 nmol/body を 1 日 2 回、腹腔内投与し、グレリンの効果を体重変化、摂餌量、内臓脂肪量、血液中炎症性サイトカイン濃度、腓腹筋横断面積、腓腹筋重量で評価した。さらに、筋組織中の筋特異的コピキチンリガーゼ mRNA 発現を検討した。

6. 肝胆道膵手術におけるグレリン研究

グレリン投与によるマウス膵切除モデルでの膵液漏への影響と担癌状態癌増殖や栄養状態の検討を行った。侵襲の大きな肝・膵切除におけるグレリンの血行動態と投与による安全性と短期効果を検討した。

平成 25 年 4 月～25 年 12 月までの時点で、肝胆膵手術前後のグレリン濃度測定を 27 症例（肝切除 10 例、膵切除 17 例）追加した。平成 24 年度までの結果と合わせて、手術前後の活性型アシルグレリン（以下 AG）と不活性型デアシルグレリン（以下 DG）およびその比（AG/DG）を解析した。

平成 24 年 3 月に肝切除 2 例、膵切除 1 例に術後短期のグレリン投与を施行した。次いで平成 25 年肝膵切除後 6 例にグレリン投与を行った（対照は非投与 6 例）、肝切除 2 例（投与 0 例、非投与 2 例）、膵切除 9 例（投与 7 例、非投与 4 例）。肝膵切除をまとめて、術前後の基礎代謝、体組成、食事摂取量、カロリー量の変化、投与前から終わり

までのグレリン・レプチン濃度、血液生化学データ、IL-6、代謝指標の変動を測定した。またグレリン投与による有害事象の有無を検討した。膵切除後長期栄養状態不良でのグレリン投与 1 例では 1 年経過を観察した。

ラット膵尾側切除による膵液漏モデルでは 3ug/kg および 30ug/kg の投与濃度いずれも術後 1、3 日目で体重、腹水量、腹水中アミラーゼ濃度、腹水中リパーゼ濃度を測定し、膵液漏へのグレリン投与の影響を解析した。

膵癌細胞 MIA-PaCa2 皮下移植マウスで、グレリン投与による体重、腫瘍重量を投与後 8 日目に測定し、担癌状態に与える影響を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究においてヒトを対象とした研究を行うに際しては「臨床研究に関する倫理指針」に則って実施し、各分担研究施設の倫理委員会で研究計画書の内容および実施の適否について、科学的および倫理的な側面が審議・承認された上で行った。宮崎大学で実施した「進行肺癌患者の QOL 改善に対するグレリンの臨床効果」の研究では、平成 26 年 1 月 22 日に実施された、厚生労働省による臨床研究に関する倫理指針に係る適合性調査において、研究期間記載の間違いを指摘された。このため、宮崎大学医学部附属病院医の倫理委員会にて詳細な調査の上、審査が行われた。平成 26 年 3 月 11 日の医の倫理委員会による最終判断としては、研究期間の記載間違いは重大な倫理違反とはならないとされた。しかしながら、宮崎大学で登録された 4 症例の研究データについては、解析の対象とはしないこととした。

動物を用いた研究を実施するに当たっては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼養及び保管並びに苦

痛の軽減に関する基準に準じ、各分担研究施設の動物実験委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果及び D. 考察

1. 進行肺癌患者の QOL 改善に対するグレリンの臨床効果

本研究は宮崎大学、産業医科大学、鳥取大学の 3 施設による、多施設研究である。平成 25 年度は、肺癌患者の QOL に対するグレリンの臨床効果の評価についてランダム化二重盲検比較試験のプロトコルを作成し、倫理委員会の審査、CRF の作製、院内製剤化の体制を整え、臨床試験を開始した。臨床試験の内容は UMIN へ登録した (UMIN000010230)。

本臨床試験では、最終的に 3 施設から 20 症例が臨床データ評価の対象となった。グレリン投与に伴う重篤な有害事象は認められなかった。10 症例がグレリン投与、10 症例がプラセボ投与に振り分けられた。抗癌剤の白金製剤としては、シスプラチンが 5 症例、カルボプラチンが 15 症例であった。主要エンドポイントである 14 日間の摂食量については、グレリン群が 1496 ± 288 kcal/day (27.6 ± 5.5 kcal/kg/day)、プラセボ群が 1456 ± 381 kcal/day (27.4 ± 5.8 kcal/kg/day) であり、両群間に統計学的有意差は認められなかった。摂食低下が著しい抗癌剤治療の day 1 から day 7 までの 7 日間の摂食量でも、グレリン群が 1458 ± 332 kcal/day (27.0 ± 6.7 kcal/kg/day)、プラセボ群が 1363 ± 425 kcal/day (25.9 ± 7.0 kcal/kg/day) とグレリン群で摂食量が多い傾向ではあったが、統計学的な有意差は認められなかった。副次的エンドポイントとして、EORTC-QLQ30 による QOL スコアと VAS スケールにて評価した自覚症状を検討した。抗癌剤投与の day 15 における EORTC-QLQ30 では、Global health status の各項目、Symptoms

scales の各項目で、グレリン群とプラセボ群間に有意差は認められなかった。また、抗癌剤投与から 14 日間の気力、倦怠感、食欲、吐き気、痛み、しびれに関する VAS スケールでも、両群間に有意差は認められなかった。

今回の臨床研究では、多くの患者にプラチナ製剤として消化器症状がシスプラチンより少ないカルボプラチンが使用されており、この事が摂食量や QOL スコアに影響した可能性がある。

2. 上部消化管手術後におけるグレリン補充療法

グレリン群とプラセボ群で、術前術中の患者背景因子に、明らかな差を認めなかった。全例においてグレリンを投与することが可能で、投与に起因すると考えられる合併症は認めなかった。在院死症例は認めず、再手術施行症例も認めなかった。術後経過としては、介入が必要な合併症ではグレリン群で術後肺炎が有意に少なく、術後の SIRS 期間は 3.0 ± 2.9 日 vs 6.7 ± 6.1 日 ($p = 0.0062$) であった。また、術後の CRP 推移や IL-6 の上昇はグレリン群で有意に抑制されていた。また、術後のトランスサイレチン、トランスフェリン、レチノール結合蛋白の低下がグレリン群で有意に減少していた。

3. 進行膵癌におけるグレリンの臨床的位置づけに関する研究

平成 25 年 12 月までに登録した 84 名の被験者の中から、膵癌肝転移と病理学的に確定診断されグレリン血中濃度が測定できた 72 名を評価した。治療法別の割合は、ゲムシタピン単剤療法 (GEM) 26.8%、GEM+タルセバ併用療法 39.4%、他の抗癌剤レジメン 18.3%、best supportive care 15.5%であった。治療前グレリン血中濃度は、AG 中央値: 31.5 pg/ml、DG 中央値: 148.8 pg/ml、AG 比: 0.17 であった。食欲不振スコアの治療前

中央値は 3 であり、「食欲不振」群に特徴的に治療前グレリン指標は AG 比低値 ($p < 0.01$) および AG 低値 ($p = 0.04$) であった。

全身化学療法を行った 61 名の消化器毒性とグレリン指標との関連では、悪心 Grade 2 以上の患者集団では Grade 2 未満と比較して、治療開始から 1 ヶ月間の AG 比が減少する傾向であった ($p = 0.08$)。

AG 比は、化療前および化療中の食欲不振や消化器症状のよい指標であり、AG 比が低下している患者集団はグレリン補充療法のよい適応であると考えられた。

今後、進行膵癌に対する全身化学療法は、平成 25 年 12 月に保険承認された、消化器毒性の強い 3 剤併用レジメンである FOLFIRINOX に移行する。グレリンの臨床的意義を前向きに確認する本コホートは平成 26 年 8 月まで登録を継続する。従って、AG 比は FOLFIRINOX の消化器毒性を予測するバイオマーカーとなる可能性について検討することが可能である。本研究は終了するが、本研究は継続する予定である。

4. 高発癌環境におけるグレリンの作用と微小転移巣に対するグレリンの影響

グレリン投与群 ($n = 11$) と非投与群 ($n = 9$) の比較では、両群間において形成大腸腫瘍 (組織学的には腺癌) の数が異なり、グレリン投与群では腫瘍形成が顕著に抑制されていることが明らかとなった。両群においてグレリン受容体 mRNA の発現には差は見られなかったが、DSS 投与後にみられる炎症性サイトカイン ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) の発現は、特に近位大腸において、グレリン投与群で低い傾向が認められた。なお、両群共に転移巣の形成は見られなかった。グレリン投与はマウス大腸炎発がんモデルにおいて有意に発癌を抑制した。DSS 投与後大腸組織

における炎症性サイトカイン発現がグレリン投与によって低下したこと、また、既にこれまでの研究で明らかにしたように、Apc 変異マウスモデルにおいて、グレリン投与は腫瘍形成数に対して影響を示さなかったことから、マウス大腸大腸炎発がんモデルにみられたグレリン投与による発がん抑制は、グレリンが有する抗炎症作用に起因していると考えられた。

5. 進行肺癌に対するグレリンの臨床応用と抗カヘキシア作用の解明

Pten 欠損肺腺癌カヘキシアマウスに対して、ウレタン投与後 30 週目より、グレリン 20 nmol/日 (グレリン投与群) もしくは PBS (対象群) を連日 4 週間腹腔内投与したところ、グレリン治療群は対象群と比べて、体重、摂餌量、内臓脂肪量、腓腹筋重量と横断面積が有意に増加していた。また、グレリン群は対照群に比較して、血液中 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 などの炎症性サイトカイン産生が有意に抑制されていた。

さらにグレリン群では、筋組織中 MuRF-1、Atrogin-1 など筋特異的ユビキチンリガーゼの mRNA 発現が有意に抑制される一方、筋組織中 IGF-1 mRNA 発現は有意に上昇していた。

IL-1 や $\text{TNF}\alpha$ 受容体刺激の下流にあり、筋特異的ユビキチンリガーゼ発現に影響する P38 のリン酸化は抑制されていた。IGF-1 受容体刺激の下流にある AKT リン酸化は促進、さらに筋特異的ユビキチンリガーゼ発現に影響を与え、AKT により核内移行が阻害される FOXO1 の核内移行は抑制されていた。

グレリンのカヘキシアにおける筋萎縮抑制効果は、抗炎症作用と IGF-1 経路を介した、筋蛋白分解抑制と筋蛋白合成促進による可能性が示唆された。

6. 肝胆膵手術におけるグレリン研究

1. 肝胆膵手術後のグレリン濃度測定を 32 症例（肝切除 11 例、膵切除 21 例）に施行。活性型アシルグレリン（以下 AG）は 8.8 ± 9.7 fmol/ml、不活性型デスアシルグレリン（以下 DG）は 32 ± 19.1 fmol/ml、AG と DG 比は 0.01 ± 0.024 であった。男女差や年齢との相関はなかった。肝切除症例では術前に AG が有意に高値であった ($p < 0.01$)。疾患別には肝癌で AG が高い傾向にあった。基礎代謝では呼吸商（栄養素燃焼率）と関する傾向があった ($p = 0.08$)。年齢、BMI、熱量解析や体組成指数、食欲・QOL スコアとは相関がなかった。血液検査ではヘモグロビンやアルブミン値と AG や DG は有意な負の相関があった ($p < 0.05$)。術後 1 日目に AG、DG、AG/DG は有意に低下し ($p < 0.05$)、3 日目には回復していた。術後の変化に性別、切除の違いは関連しなかった。
2. 投与グレリン粉末は院内で点滴静注用に液状バイアル化し、術後 9 例にグレリン投与を行った（肝切除 2、膵切除 7）。対照は非投与 6 例（肝切除 2、膵切除 4）。グレリン投与群では術後 10 日目以降の安静時エネルギー消費量が減少した ($p < 0.05$)。グレリン投与で血中グレリン濃度、レプチン濃度変化に差はなかった。有意差はないがグレリン投与はやや摂取カロリー量が高い傾向があった。術後の炎症所見、肝・膵・腎・代謝機能に差はなかった。腸管蠕動亢進を 3 例に認めたが重篤な副作用はなかった。術式別に上記結果に差はなかった。膵切除後長期栄養状態不良例 1 例では一時的に症状や筋力改善を認めたが、1 年経過した現在変化はなかった。
3. ラット膵尾側切除による膵液漏モデルでは $3\mu\text{g}/\text{kg}$ および $30\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与濃度いずれも

術後 1、3 日目で体重、腹水量、腹水中アミラーゼ濃度に差はなく有害効果はなかったが、1 日目の腹水中リパーゼ分泌がグレリン投与群で抑制される傾向にあった。

4. 膵癌細胞 MIA-PaCa2 皮下移植マウスで、グレリン投与による体重、腫瘍重量を投与後 8 日目に測定し、担癌状態に与える影響を検討した。グレリン投与の有無に関わらず体重変化に差はなかった。グレリン非投与に比べ、投与群で腫瘍重量の増加が抑制される傾向にあった。

E. 結論

本研究は、医療シーズの発見から機能解析まで直接携わった研究者らが、臨床の現場でトランスレーショナルリサーチを実践し、市場化を推進する橋渡し研究である。

進行癌の全身化学療法では、グレリン治療により QOL 改善と栄養改善による抗癌剤治療コンプライアンス改善が期待される。手術や抗癌剤など癌治療に伴う食欲低下、栄養障害は全ての癌に共通した課題である。グレリンにより癌患者の QOL を改善することができれば、患者や家族の苦痛を軽減し、その医療成果は社会への貢献としても極めて大きい。

大侵襲手術に伴う過剰な炎症性サイトカイン誘導は全身性炎症反応症候群を来し、入院期間遷延や予後不良の大きな要因である。グレリンの抗炎症作用は手術成績の向上や予後改善につながり、大侵襲手術の支持療法として期待できる。グレリンは外科術後早期回復 (enhanced recovery after surgery) に寄与する事が期待できる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yano Y, Nakazato M, Toshinai K, Inokuchi T, Matsuda S, Hidaka T, Hayakawa M, Kangawa K, Shimada K, Kario K.: Circulating des-acyl ghrelin improves cardiovascular risk prediction in older hypertensive patients. Am J Hypertens, 27: 727-733, 2014.
2. Yamamoto K, Takiguchi S, Miyata H, Miyazaki Y, Hiura Y, Yamasaki M, Nakajima K, Fujiwara Y, Kangawa K, Doki Y. Reduced plasma ghrelin levels on day 1 after esophagectomy: a new predictor of prolonged systemic inflammatory response syndrome. Surg Today, 43: 48-54, 2013

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

