

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

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

グレリンは強力な成長ホルモン分泌促進活性をもつペプチドであり、さらに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ている。

本研究では、グレリンの多彩な作用によって癌医療を強力に底上げすることを目的に、7つの観察研究、5つのグレリン投与の介入研究、6つの基礎研究を完遂した。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た。大侵襲手術においてグレリンの抗炎症作用は全身性炎症反応症候群を軽減するとともに、摂食亢進作用は栄養状態の悪化を抑制することで手術成績の向上や予後改善につながることを期待された。基礎研究では、グレリンの抗炎症作用や IGF-1 を介した作用がカヘキシアに対して有効で、抗腫瘍効果に寄与する可能性も示された。

A. 研究目的

本研究チームはグレリンの発見に引き続いて、摂食亢進、エネルギー蓄積、抗炎症、心機能改善、骨格筋増大などの作用を報告し、さらにトランスレーショナルリサーチによりグレリンの臨床への応用を推進してきた。

癌治療は総じて大侵襲で癌患者の全身状態や QOL を損ないやすい。抗癌剤治療による食思不振と摂食低下に伴う栄養障害は、直接患者の苦痛や治療継続の大きな障壁となり、予後不良の要因である。生体内で産生される食欲亢進物質により快適な経口摂取を回復し、栄養状態を改善する事は患者 QOL 改善だけでなく、癌治療に対するコンプライアンスの向上にも有用である。癌医療に応用可能な食欲亢進物質のシーズは今までに存在せず、

本研究は学術的に独創性が高く、社会的にもニーズの高いテーマである。グレリン治療によって癌患者 QOL の改善を図るとともに、癌治療を強力に底上げすることが本研究の目的である。さらに、これまでのグレリンの基礎研究は *in vitro* での検証が主体であり、生体内癌組織におけるグレリンの役割に関する知見は十分ではない。グレリンの生体内がん細胞・組織に対する影響を検証する基礎的研究は重要である。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

1) 抗癌剤化学療法を施行する進行肺癌患者に

グレリンを投与し、その臨床効果を検証する前に、それらの患者における内因性グレリンの動態を検討した。

宮崎大学医学部附属病院に入院し、化学療法を施行する進行肺癌患者 11 症例を対象とした。化学療法の day -1、4、8、11、14 に AIA 法により血漿アシルグレリン、デスアシルグレリンを測定した。また、アンケート (VAS スケール) を用いて食欲、倦怠感、気力、嘔気等自覚症状の程度を評価した。化学療法前と 14 日後の QOL スコアを European Organization Research and Treatment of Cancer (EORTC), QOL-C30 で評価した。これらの自覚症状や QOL スコアとグレリン値との関連を検討した。

2) グレリン投与の臨床試験を開始する体制を整備し、臨床試験を実施した。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 日間の摂取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 μ g/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. 消化器癌集学的治療におけるグレリンによる包括的支持療法の検討

1) 胃切除患者の QOL 改善に対するグレリンの臨床応用を目指し研究を展開した。胃切除後 1 年以上経過し、術前体重の 15% 以上の体重減少を認める、あるいは BMI が 19 以下の患者を対象に、グレリン 3 μ g/kg を混入させた生理食塩水: 50ml、1 日 2 回朝・夕食前に、約 10~30 分かけて点滴投与を行った。主評価項目として食事摂取量測定を施行した。また、副次的評価項目として、体重変化、食欲スケール (VAS)、栄養指標 (Rapid turnover protein)、ホルモン測定 (GH、leptin)、QOL スコア (EORTC) を評価した。

2) シスプラチンを用いた化学療法を施行する食道癌患者の副作用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。

2-1) シスプラチンを用いた化学療法を施行する食道癌患者を対象に主評価項目として経時的なグ

レリンの測定を施行した。また、副次的評価項目として、化学療法施行前後と施行中に食事摂取量、食欲スケール (VAS)、栄養指標 (Rapid turnover protein)、ホルモン測定 (GH、leptin)、QOL スコア (EORTC) を評価した。

2-2) シスプラチンを用いた化学療法を施行する食道癌患者を対象にグレリンのランダム化比較第相試験を計画した。実薬 (合成グレリン 3 μ g/kg) と偽薬 (生食) の 2 群に無作為化割付けし、化学療法施行中の朝夕 2 回 7 日間経静脈的に投与し、食事摂取量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、化学療法施行前後と施行中に食事摂取量、食欲スケール (VAS)、栄養指標 (Rapid turnover protein)、ホルモン測定 (GH、leptin)、QOL スコア (EORTC) を評価した。また、2 群間において副作用の発生頻度を詳細に検討した。

3) 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。

3-1) 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。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 (systemic inflammatory response syndrome) 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。

3-2) 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 μ g/kg/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. 膵癌患者におけるグレリンによる QOL 改善療法の開発研究

1) 「消化器毒性と治療成績」

臨床病理学的に膵癌と診断され、ゲムシタピン耐性進行膵がんの2次治療として、フルオロウラシル系経口抗癌剤である S-1 単剤療法を実施した症例のうち、S-1 療法の用量 (80 / 100 / 120 mg/day: 体表面積に応じて選択) と用法 (4 週投与 2 週休薬) が添付文書に従っており、S-1 服薬量の経過が後ろ向きに追跡可能で臓器機能が保たれている 57 例を対象とした。

S-1 治療期間中の相対的用量強度 (relative dose intensity: RDI) を計算して記録し、化療中の有害事象は、有害事象共通用語規準 (Common Toxicity Criteria: CTCAE) を用いて評価した。全生存期間 (OS) および無増悪生存期間 (PFS) は化療開始日を起算日として計算し、RDI と消化器毒性や治療成績との関連について検討を行った。

2) 「消化器症状や消化器毒性と関連するグレリン関連バイオマーカー」

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。

全身化学療法前、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、CTCAE で評価した。

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関連バイオマーカーを特定した。そして、全身化学療法前と 1 ヶ月後の間でのグレリン関連バイオマーカーの変動と消化器毒性などの有害事象との関連を検討し

た。

3) 「膵癌組織のグレリン受容体発現」

国立がん研究センター東病院において、膵癌肝転移と確定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。診断目的の肝生検時に核酸抽出用組織を別に採取して遺伝子を抽出し、グレリン受容体である成長ホルモン分泌促進因子受容体 1a の mRNA 発現を検討した。

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および Apc 変異マウス腸発がんモデルマウスを用い、グレリン遺伝子欠損およびグレリン投与の影響を検証した。

大腸炎発がんモデルにおいては、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。グレリン遺伝子欠損 (KO) の影響は、グレリン KO マウス及び野生型マウスを用いて比較した。グレリン投与の影響は、共に野生型マウスを用いて、生理食塩水群とグレリン投与群に分け、グレリン投与群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。

Apc 変異モデルは、ApcMin/+を用いた。15 週齢で安楽死させることとし、グレリン投与群は 11 週齢より生理食塩水に溶解したグレリンを腹腔内投与 (3 nmoles/day) した。コントロール群は生理食塩水を腹腔内投与した。また、グレリン遺伝子欠損の影響は、グレリン KO マウスと ApcMin/+マウスを交配すること

でグレリン KO/ApcMin/+マウスを作成し、検証した。

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

- 1) 進行肺癌カヘキシアモデルの作製と再現性確認のため、以下の方法で研究を展開した。

細気管支肺胞上皮特異的に癌抑制遺伝子 Pten を欠損したマウス (10 週齢) に化学発癌剤 (Urethane, 1mg/g body weight) を腹腔内投与した。Urethane 投与 5ヶ月後にマウスを麻酔し、肺を摘出し、腫瘍数、腫瘍径の測定ならびに組織学的検討を行った。

- 2) 進行肺癌カヘキシアモデルを用いて、以下の方法でグレリンの抗カヘキシア作用を検討した。

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ユビキチンリガーゼ mRNA 発現を検討した。

6. 肝胆膵手術におけるグレリン研究

本研究においては以下の 4 つのテーマについて研究を行った。

- 1) 肝胆膵手術 (肝・膵切除) における術後グレリン濃度変化の解析。
- 2) 肝胆膵手術後のグレリン投与による摂食、栄養状態の変化、および同手術後に長期間栄養状態の低下した症例でのグレリン投与による病態改善の解析。
- 3) 動物実験における膵切除後の膵液漏モデルにおけるグレリン投与の影響の解析。
動物実験における胆膵癌担癌状態でのグレリンの腫瘍増殖に関する解析。

(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、および 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

- 1) 症例の背景は、男性 6 例、女性 5 例、平均年齢は 66 歳、肺癌の内訳は非小細胞肺癌 期 1 例、期 5 例、小細胞肺癌限局型 4 例、進展型 1 例であった。

抗癌剤投与から 14 日間に全症例で体重が減少し、平均で -2.2kg の減少を来した。VAS スケールで評価した QOL スコアは、気力、倦怠感、食欲、嘔気ともに抗癌剤治療の day 4 ~ 8 で最低となり、その後改善傾向となった。血漿中アシ

ルグレリン濃度の動態は化学療法前値の平均が 8.4 ± 2.4 fmol/ml (中央値5.1 fmol/ml) に対してday 4で最低値の平均 7.0 ± 2.6 fmol/ml (中央値3.98 fmol/ml) となり、その後はほぼ前値に戻った。EORTC QOL C-30で評価したQOLスコアでは、その下部尺度であるGlobal、Function、Symptomともに一定の傾向は認められなかった。しかし、Functionスコアに関しては、抗癌剤化学療法によって14日間のうちに増悪した群と増悪しなかった群に分けると、増悪しなかった群で血漿アシルグレリンの前値が有意に低く(増悪群 17.0 ± 7.9 fmol/ml vs 非増悪群 6.3 ± 2.2 fmol/ml, $p = 0.016$)、14日間の経過を通して血漿アシルグレリン値が低い傾向にあった。

- 2) 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. 消化器癌集学的治療におけるグレリンによる包括的支持療法の検討

- 1) 20例の胃切除患者全例においてグレリンを投与することが可能であり、投与に起因すると考えられる有害事象は認めなかった。グレリン投与により食事摂取カロリーは有意に増加し、食欲の改善と体重増加を認めた。グレリンは胃切除術後の長期経過症例においても、食欲を改善し、食事摂取量を増加させ、体重上昇をもたらすことが示唆された。

2-1) 20例の食道癌化学療法患者全例で食事摂取量、食欲、QOLスコアが化学療法施行前に比べ低下した。また、化学療法3日目、8日目においてグレリン値が有意に低下した。化学療法の副作用である食欲・食事摂取量はグレリン値に相関した。食道癌化学療法施行患者において、食事摂取量低下はグレリン値が重要な役割を果たしており、食事摂取量低下はQOL低下につながることを示唆され

た (Int J Clin Oncol 2012)。

2-2) グレリン群とプラセボ群で患者背景因子に明らかな差を認めず、全例においてグレリンを投与することが可能であった。投与に起因する有害事象は認めなかった。グレリン群で食事摂取量、食欲が改善した。化学療法による有害事象のうち食欲不振と嘔気が、グレリン群で有意に改善を認めた。また、化学療法後のQOLスコアはプラセボ群に比べグレリン群で良好であった。食道癌化学療法施行患者において、グレリン投与は嘔気や食欲不振を改善させ、食事摂取量を増やしQOLの改善につながることを示唆された。食道癌化学療法施行患者において、グレリン投与は副作用軽減に有用であることが示唆された (Cancer 2012)。

3-1) 20例の食道亜全摘胃管再建術患者にグレリン投与を行った。投与に起因すると考えられる合併症は認めなかった。当科におけるこれまでの食道癌術後患者と比べると、グレリンを投与することで、術後のCRP上昇が抑制され、術後のSIRS期間が短縮した。食道亜全摘胃管再建術患者において、グレリンは術後安全に投与可能であり、また、術後の炎症抑制に関与する可能性が示唆された。

3-2) 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、グレリン群において、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有意に抑制されていた。食道癌術後早期患者にグレリンは安全に投与でき、術後の炎症抑制効果、異化

抑制効果を認めることが示唆された。

3. 膵癌患者におけるグレリンによるQOL改善療法の開発研究

1) 「消化器毒性と治療成績」

1-1) 患者背景

解析対象患者は、57名であった。

年齢中央値 (範囲): 62.0 才 (37 - 78)、性別: 男性 33 例 (57.9%)、PS 0/1: 33 例 (57.9%) / 24 例 (42.1%)

1-2) S-1の相対的用量強度 (RDI)

RDI中央値 (範囲): 90 % (範囲: 10.7 - 115)

1-3) 消化器毒性とRDI

CTCAE Grade 2以上の食欲不振や悪心を認めた症例群の平均RDIは65%と61%であり、食欲不振や悪心Gr < 2のRDI (85%, 83%) と比較して低値であった ($p = 0.002, p = 0.005$) (表1)。

Factor	食欲不振スコア		p (wilcoxon)
	3未満	3以上	
AG (pg/mL)	Median (25%/75%tile) 42.7 (17.6/83.5)	23.9 (0.0/44.0)	0.04
DAG (pg/mL)	Median (25%/75%tile) 152.9 (60.4/262.6)	135.5 (62.1/389.7)	0.95
AG比	Median (25%/75%tile) 0.24 (0.15/0.32)	0.11 (0.00/0.20)	< 0.01

1-4) 消化器毒性と治療成績

OS中央値: 289 日 (95%信頼区間: 228 - 314)

食欲不振 Gr > 2 (296 日) vs. Gr < 2群 (246 日) $p = 0.32$

悪心 Gr > 2 (296 日) vs. Gr < 2群 (246 日) $p = 0.32$

PFS中央値: 125 日 (95%信頼区間: 92 - 158)

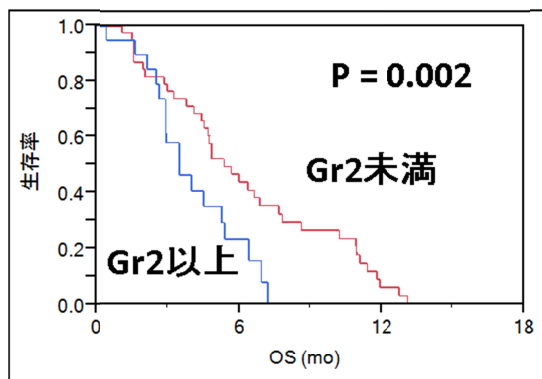
食欲不振 Gr > 2 (296 日) vs. Gr < 2群 (246 日) $p = 0.32$

悪心 Gr > 2 (296 日) vs. Gr < 2群 (246 日) $p = 0.32$

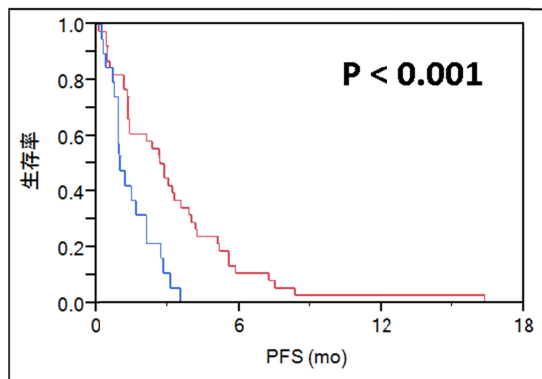
食欲不振 (図2) や悪心がGr2以上であった症例群は、OSおよびPFSが不良であった。

図2. 悪心と治療成績

OS



PFS



2) 「消化器症状や消化器毒性と関連するグレリン関連バイオマーカー」

2-1) 患者背景

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。

2-2) グレリン血中濃度と消化器症状

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 (表1)。

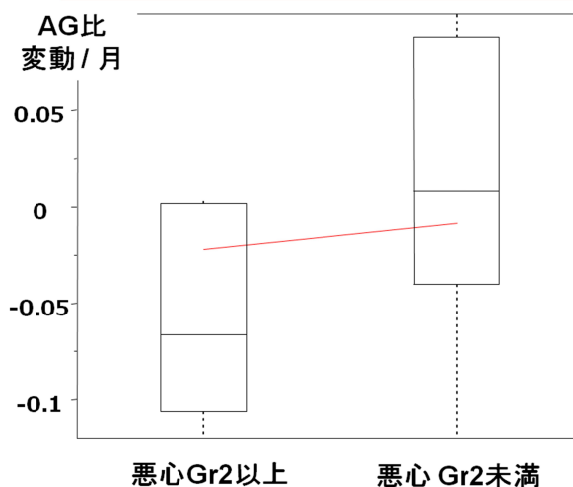
表1. 有害事象別のS-1相対的用量強度 (RDI)

有害事象	Grade	数	Mean RDI (95%CI)	P
食欲不振	<2	35	0.85 (0.76-0.94)	0.002
	≥2	22	0.61 (0.48-0.75)	
悪心	<2	38	0.83 (0.75-0.92)	0.005
	≥2	19	0.61 (0.45-0.77)	

2-3) グレリン血中濃度の変動と消化器毒性

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 ($p = 0.08$) (図1)。

図1. 消化器毒性(悪心)とAG比の変動



3) 「膵癌組織のグレリン受容体発現」

3-1) 患者背景

病理診断にて膵がん肝転移と確定診断され、初発治療として全身化学療法が行われた症例のうち、肝転移の腫瘍生検組織より核酸抽出が行われ、成長ホルモン分泌促進因子受容体1aの発現解析が可能であった27例を解析した。

3-2) リアルタイムRT-PCRによるmRNA発現解析

肝生検検体より採取したmRNAを用いてリアルタイムRT-PCRを行ったところ、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHのCp値の中央値は19.7サイクル (範囲：16.9-21.5) と十分な発現を

認めたとの比べて、グレリン受容体である成長ホルモン分泌促進因子受容体1aのCp値の中央値は38.4サイクル(範囲:36.1-40.0)とほとんど発現が認められなかった。

進行膵がん2次化学療法でのS-1療法では、悪心や食欲不振が強い集団は用量強度と治療成績が共に低下していた。S-1を含むフルオロウラシル系レジメンを施行する進行膵癌患者では、グレリン補充療法を追加することにより消化器毒性が軽減して用量強度が維持されて治療成績が改善することが期待される。

AG比は、化療前および化療中の食欲不振や消化器毒性のよい指標であり、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。

膵がん肝転移の腫瘍組織では、グレリン受容体の遺伝子発現をほとんど認められないため、グレリンによる腫瘍組織への作用は考慮しなくてもよいレベルであると考えられた。

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

グレリンKOマウス (n = 11) 及び野生型マウス (n = 10) に大腸炎発がんモデルを作成し比較したところ、大腸に形成された腫瘍数は野生型マウス群が平均5.1個、グレリンKOマウス群が平均4.7個であり、両群に差はみられなかった。しかし、腫瘍サイズはKOマウスの方が大きい傾向に

あり、野生型マウスはKOマウスと比較して、計2mm以下の小さな腫瘍が有意に多かった。なお、両群ともに転移巣の形成は見られなかった。グレリン受容体mRNAについては、野生型マウス、KOマウスどちらの腫瘍組織でもGHSR1bが発現していた。また、コントロールマウスの腫瘍組織にはグレリンmRNAの発現を認めた。

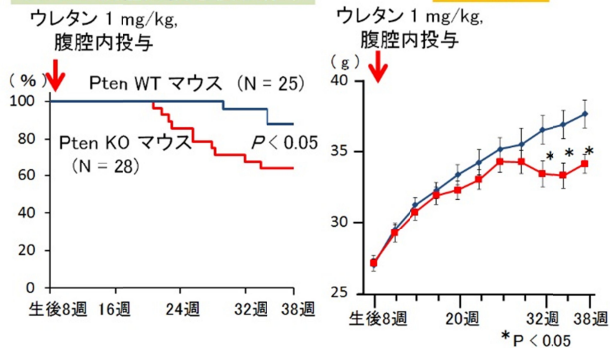
次に、野生型マウスを用いて、大腸炎発がんモデルにおけるグレリン投与の意義について検討した。投与群 (n = 11) と非投与群 (n = 9) の比較では、投与群と非投与群において形成された大腸腫瘍(組織学的には腺癌)の数はそれぞれ3.1個と0.2個であり、グレリン投与群では腫瘍形成が顕著に抑制されていることが明らかとなった。両群においてグレリン受容体mRNAの発現には差は見られなかったが、DSS投与後にみられる炎症性サイトカイン(TNF、IL-1)の発現は、特に近位大腸において、グレリン投与群で低い傾向が認められた。なお、両群ともに転移巣の形成は見られなかった。

Apc変異マウスを用いた実験では、グレリン投与あるいはグレリン遺伝子欠損によって腫瘍形成数の有意な相違は観察されなかった。

5. 進行肺癌におけるグレリンの抗カヘキシア作用の解明

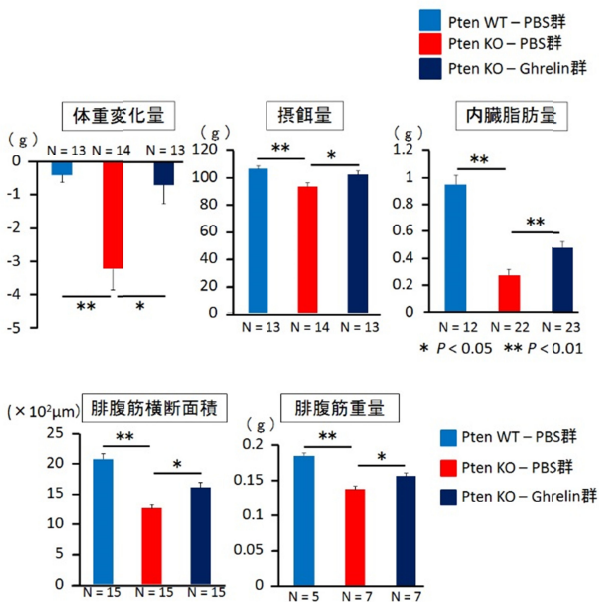
1) Pten欠損マウスはウレタン投与5ヶ月後に高率に肺腺癌を発症した。一方、野生型は肺腺種のみ発症し、発症数も少なかった。腫瘍数、腫瘍サイズともにPten欠損マウスにおいて増加・増大していた。ウレタン投与後38週まで観察したところ、Pten欠損マウスは野生型Ptenマウスに比べて有意に体重が少なく ($p < 0.05$)、生存率も有意に低かった ($p < 0.05$)。

ウレタン腹腔内投与後生存率



2) 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。

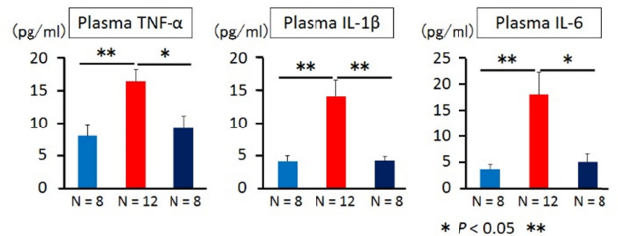
グレリン腹腔内投与は悪液質を改善する



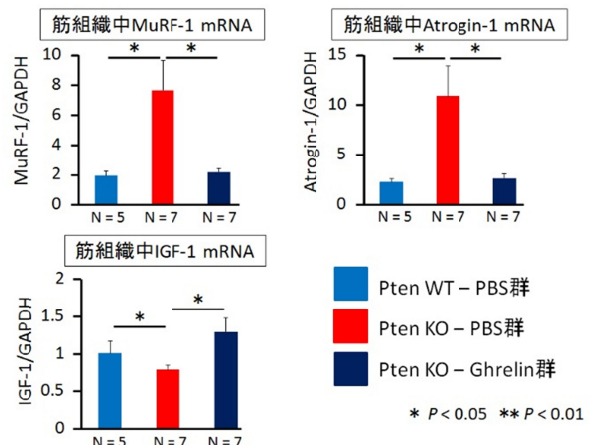
このPten欠損肺腺癌カヘキシアマウスに対して、ウレタン投与後30週目より、グレリン20 nmol/日 (グレリン投与群) もしくはPBS (対象群) を連日4週間腹腔内投与したところ、グレリン治療群は対象群と比べて、体重、摂餌量、内臓脂肪量、腓腹筋重量と横断面積が有意に増加していた。

自由摂餌したグレリン投与群とPBS対照群と同量の摂餌に制限したグレリン投与群では、自由摂餌グレリン群が有意に内臓脂肪量と腓腹筋重量が多く、摂餌制限グレリン群は内臓脂肪量、腓腹筋重量においてPBS対照群と同等であった。このモデルにおける体重減少抑制効果の一部は少なくともグレリンによる摂餌量増加と関連していると考えられた。

また、グレリン群は対照群に比較して、血液中TNF- α 、IL-1 β 、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。



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 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。

グレリンは胃のみならず消化管分泌に影響を及ぼす可能性があることから膵切除後の膵液漏を助長させる懸念があったが、動物実験ではそのような効果はなく逆に膵酵素リパーゼを減少させる傾向があった。担癌状態で癌増殖に影響する懸念されるが、動物実験では予想と異なり癌増殖を抑制する効果が得られた。すでに他の消化管領域でのグレリン投与による栄養状態改善が報告されており、肝膵切除での接触改善を期待したが、摂取カロリー量の増加する傾向は示されたが顕著な結果は得られなかった。

E. 結論

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。カヘキシア制御のため国際悪液質学会が組織されるなど、海外でも関心が高まっている。グレリンによる癌患者の QOL 改善は、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、術後経過に悪影響を及ぼす。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。手術侵襲に伴う摂食不良、栄養状態増悪は入院が遷延する要因である。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。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。癌患者にとって、摂食意欲の低下は重大な問題である。グレリン治療は癌患者が喪失した「食を楽しむ喜び」を回復

し、癌医療の満足度を向上する創薬研究である。

これまでのグレリンの基礎研究は *in vitro* での検証が主体である。既に確立済みである発癌モデルを用いた基礎研究は、腫瘍増大や癌力ヘキシアに対するグレリンの作用を *in vivo* で検証することができ、治療適応や新たな臨床展開の足掛かりになることが期待される。

F. 健康危険情報

総合研究報告書にまとめて報告。

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, Mori M, 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.
3. Hiura Y, Takiguchi S, Yamamoto K, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Nakajima K, Miyata H, Fujiwara Y, Mori M, Kangawa K, Doki Y. Effects of ghrelin administration during chemotherapy with advanced esophageal cancer patients: A prospective, randomized, placebo-controlled phase 2 study. *Cancer*, 118: 4785-4794, 2012.
4. Takiguchi S, Adachi S, Yamamoto K, Morii E, Miyata H, Nakajima K, Yamasaki M, Kangawa K, Mori M, Doki Y. Mapping analysis of ghrelin producing cells in the human stomach associated with chronic gastritis and early cancers. *Dig Dis Sci*, 57: 1238-1246, 2012.
5. Iwasaki E, Suzuki H, Masaoka T, Nishizawa T, Hosoda H, Kangawa K, Hibi T. Enhanced gastric ghrelin production and secretion in rats with gastric outlet obstruction. *Dig Dis Sci*, 57: 858-864, 2012.
6. Tsuchimochi W, Kyoraku I, Yamaguchi H, Toshinai K, Shiomi K, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin prevents the development of experimental diabetic neuropathy in rodents. *Eur J Pharmacol*, 702: 187-193, 2013.
7. Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M. What is the general action of ghrelin for vertebrates? - comparisons of ghrelin's effects across vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*, 181: 187-191, 2013.
8. Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Kangawa K. Therapeutic potential of ghrelin in restricting-type anorexia nervosa. *Methods Enzymol*, 514: 381-398, 2012.
9. 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: e35708, 2012.
10. Sugiyama M, Yamaki A, Furuya M, Inomata N, Minamitake Y, Ohsuye K, Kangawa K. Ghrelin improves body weight loss and skeletal muscle catabolism associated with angiotensin

- II-induced cachexia in mice. *Regul Pept*, 178: 21-28, 2012.
11. Akamizu T, Kangawa K. The physiological significance and potential clinical applications of ghrelin. *Eur J Intern Med*. 23: 197-202, 2012.
 12. Morozumi N, Sato S, Yoshida S, Yamaki A, Furuya M, Inomata N, Ohnuma N, Minamitake Y, Ohsuye K, Kangawa K. A new strategy for metabolic stabilization of motilin using the C-terminal part of ghrelin. *Peptides*, 33: 279-284, 2012.
 13. Mogami S, Suzuki H, Fukuhara S, Matsuzaki J, Kangawa K, Hibi T. Reduced ghrelin production induced anorexia after rat gastric ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302: G359-364, 2012.
 14. Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Transgenic overexpression of intraislet ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302: E403-408, 2012.
 15. Fukumori R, Sugino T, Shingu H, Moriya N, Hasegawa Y, Kojima M, Kangawa K, Obitsu T, Kushibiki S, Taniguchi K. Effects of calcium salts of long-chain fatty acids and rumen-protected methionine on plasma concentrations of ghrelin, glucagon-like peptide-1 (7 to 36) amide and pancreatic hormones in lactating cows. *Domest Anim Endocrinol*, 42: 74-82, 2012.
 16. Akamizu T, Sakura N, Shigematsu Y, Tajima G, Ohtake A, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K. Analysis of plasma ghrelin in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II. *Eur J Endocrinol*, 166: 235-240, 2012.
 17. Kojima M, Kangawa K. The discovery of ghrelin: with a little luck and great passion. Preface. *Peptides*, 32: 2153-2154, 2011.
 18. Imazu Y, Yanagi S, Miyoshi K, Tsubouchi H, Yamashita S, Matsumoto N, Ashitani J, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin ameliorates bleomycin-induced acute lung injury by protecting alveolar epithelial cells and suppressing lung inflammation. *Eur J Pharmacol*, 672: 153-158, 2011.
 19. Ikeda K, Chiba T, Sugai T, Kangawa K, Hosoda H, Suzuki K. Correlation between plasma or mucosal ghrelin levels and chronic gastritis. *Hepatogastroenterology*, 58: 889-902, 2011.
 20. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Yoh J, Takahashi S, Nagamitsu S, Kakuma T, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T. Ghrelin levels are reduced in Rett syndrome patients with eating difficulties. *Int J Dev Neurosci*, 29: 899-902, 2011.
 21. Schwenke DO, Gray EA, Pearson JT, Sonobe T, Ishibashi-Ueda H, Campillo I, Kangawa K, Umetani K, Shirai M. Exogenous ghrelin improves blood flow distribution in pulmonary hypertension-assessed using synchrotron radiation microangiography. *Pflugers Arch*, 462: 397-406, 2011.
 22. Fukumori R, Yokotani A, Sugino T, Itoh F, Kushibiki S, Shingu H, Moriya N, Hasegawa Y, Kojima M, Kangawa K, Obitsu T, Taniguchi K. Effects of amino acids infused into the vein on ghrelin-induced GH, insulin and glucagon secretion in lactating cows. *Anim Sci J*, 82: 267-273, 2011.

23. Fukumori R, Sugino T, Hasegawa Y, Kojima M, Kangawa K, Obitsu T, Taniguchi K. Plasma ghrelin concentration is decreased by short chain fatty acids in wethers. *Domest Anim Endocrinol*, 41: 50-55, 2011.
24. Akamizu T, Kangawa K. Therapeutic applications of ghrelin to cachexia utilizing its appetite-stimulating effect. *Peptides*, 32: 2295-2300, 2011.
25. Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K. Recent advances in the phylogenetic study of ghrelin. *Peptides*, 32: 2155-2174, 2011.
26. Shiiya T, Ueno H, Toshinai K, Kawagoe T, Naito S, Tobina T, Nishida Y, Shindo M, Kangawa K, Tanaka H, Nakazato M: Significant lowering of plasma ghrelin but not des-acyl ghrelin in response to acute exercise in men. *Endocr J*, 58: 335-342, 2011.
27. Koizumi M, Hosoya Y, Dezaki K, Yada T, Hosoda H, Kangawa K, Nagai H, Lefor AT, Sata N, Yasuda Y: Postoperative weight loss does not resolve after esophagectomy despite normal serum ghrelin levels. *Ann Thorac Surg*, 91: 1032-1037, 2011.
28. Yoh J, Nishi Y, Hosoda H, Tajiri Y, Yamada K, Yanase T, Doi R, Yonemoto K, Kangawa K, Kojima M, Tanaka E, Kusukawa J: Plasma levels of n-decanoyl ghrelin, another acyl- and active-form of ghrelin, in human subjects and the effect of glucose- or meal-ingestion on its dynamics. *Regul Pept*. 167: 140-148, 2011.
29. Akamizu T, Kangawa K: Ghrelin for cachexia. *J Cachex Sarcopenia Muscle*, 1: 169-176, 2010.
30. Kojima M, Kangawa K: Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue. *Ann N Y Acad Sci*, 1200: 140-148, Review, 2010.
31. Nakahara K, Okame R, Katayama T, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N: Nutritional and environmental factors affecting plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J Endocrinol*, 207: 95-103, 2010.
32. Ida T, Miyazato M, Lin XZ, Kaiya H, Sato T, Nakahara K, Murakami N, Kangawa K, Kojima M: Purification and characterization of caprine ghrelin and its effect on growth hormone release. *J Mol Neurosci*, 42: 99-105, 2010.
33. Schwenke DO, Pearson JT, Kangawa K, Cragg PA, Shirai M: Exogenous ghrelin accentuates the acute hypoxic ventilatory response after two weeks of chronic hypoxia in conscious rats. *Acta Physiol (Oxf)*, 200: 279-287, 2010.
34. Takahashi H, Kurose Y, Suzuki Y, Kojima M, Yamaguchi T, Yoshida Y, Azuma Y, Sugino T, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Kobayashi S: Changes in blood pancreatic polypeptide and ghrelin concentrations in response to feeding in sheep. *J Anim Sci*, 88: 2103-2107, 2010.
35. Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Kanamoto N, Bando M, Kohno K, Sato T, Kojima M, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T: A postweaning reduction in circulating ghrelin temporarily alters growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing hormone in male mice but does not affect somatic growth. *Endocrinology*, 151: 1743-1750, 2010.
36. Inoue Y, Nakahara K, Kangawa K, Murakami N: Transitional change in rat fetal cell proliferation in response to ghrelin and des-acyl ghrelin during the last stage of pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*, 393: 455-460, 2010.
37. Yamamoto K, Takiguchi S, Miyata H, Adachi S, Hiura Y, Yamasaki M, Nakajima K, Fujiwara Y,

Mori M, Kangawa K, Doki Y: Randomized phase II study of clinical effects of ghrelin after esophagectomy with gastric tube reconstruction. *Surgery*, 148: 31-38, 2010.

3. その他 なし。

38. Adachi S, Takiguchi S, Okada K, Yamamoto K, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Fujiwara Y, Hosoda H, Kangawa K, Mori M, Doki Y: Effects of ghrelin administration after total gastrectomy: a prospective, randomized, placebo-controlled phase II study. *Gastroenterology*, 138: 1312-1320, 2010.
39. Kojima M, Kangawa K: Ghrelin: from gene to physiological function. *Results Probl Cell Differ*, 50: 185-205, Review, 2010.

2. 学会発表

1. 寒川賢治: 新規ホルモン“グレリン”: 発見から臨床応用へ. 第7回日本消化管学会総会学術集会、特別講演、京都、2月18日、2011.
2. 寒川賢治: 未知の生体内ペプチドへの挑戦: 探索・発見から臨床応用へ. 第34回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、特別講演、福岡、9月11日、2010.
3. 寒川賢治: 未知のペプチドの探索・発見から臨床応用へ. 第62回日本生物工学会大会、シンポジウム、宮崎、10月27日、2010.
4. Kangawa K: Discovery of ghrelin and its clinical application. 第5回国際神経ペプチド学会日本支部シンポジウム、特別講演、京都、12月7日、2010.

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。

