

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

研究代表者 松元 信弘

宮崎大学医学部内科学講座 神経呼吸内分泌代謝学分野 助教

研究要旨

癌悪液質は「改善が困難な進行性の筋萎縮により種々の機能障害が生じる病態」と定義される。癌患者の約8割が悪液質となり、癌悪液質は癌関連死亡の約3割を占める。癌悪液質における筋萎縮は、IGF1/AKT/S6Kを介する筋タンパク合成系、IL-6などの悪液質関連サイトカインを介する筋タンパク分解系のバランスが異常となることで、分解に傾くことが原因とされる。グレリンは成長ホルモン分泌促進作用、食欲増進作用、抗炎症作用を有するペプチドである。これまでに癌悪液質患者に対して、グレリン投与は食欲改善作用を有することが報告されたが、筋萎縮に対する研究は十分に行われていない。

今回我々は、pAkt/PI3K経路を負に制御するホスファターゼであるPtenを肺上皮特異的に欠損させたマウス（Pten-K0マウス）を用いて肺腺癌悪液質モデルを作成し、癌悪液質におけるグレリン投与の効果を検討した。グレリン投与は、摂餌量、体重、筋重量、筋横断面積の減少を抑制し、IL-6などの血中炎症性サイトカイン濃度やAtrogin-1などの筋特異的ユビキチンリガーゼの発現上昇を抑制した。これらの効果は、グレリンの持つ抗炎症作用や、筋組織中のIGF1濃度を上昇させることが関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

癌悪液質は「改善が困難な進行性の筋萎縮により種々の機能障害が生じる病態」と定義される。癌患者の約8割が悪液質となり、癌悪液質は癌関連死亡の約3割を占め、癌医療において、患者のQOLに大きく影響を与える重要な病態である。グレリンは成長ホルモン分泌促進作用、食欲増進作用、抗炎症作用を有するペプチドである。これまでに癌悪液質患者に対して、グレリン投与は食欲改善作用を有することが報告されているが、筋萎縮に対する研究は十分に行われていない。

これまで、グレリンの癌との関連研究はin vitroが主体であり、生体内癌組織におけるグレリンの役割は未だ不明である。癌カヘキシアモデルや癌転移モデルを用いた基礎研究は、発癌や転移巣の成立と増大に対するグレリンの作用をin vivoで検証することができ、より良い治療適応や新たな臨床展開への足掛かりとなる。

本研究は、癌性カヘキシアに対するグレリンの作用機序を分子レベルで解明し、グレリン治療開発に新たな切り口から貢献することを目標とする。本研究では、細気管支肺胞上皮特異的にがん抑制遺伝子であるPtenを欠損したマウスの肺腺癌カヘ

キシアモデルを用いて、癌性カヘキシア、特に筋委縮に対するグレリン作用のメカニズムを解析する。

B. 研究方法

- 1) 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 (8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) 上記の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、グレリンの効果を生体重変化、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。

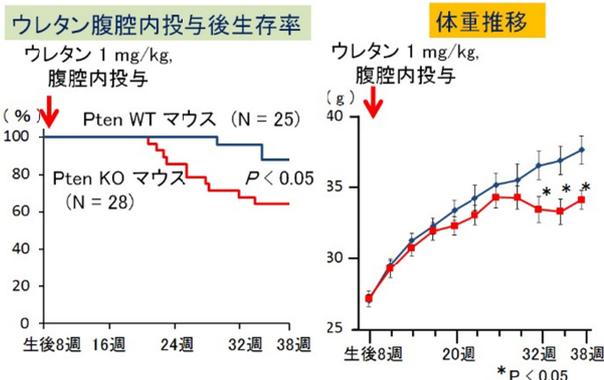
(倫理面への配慮)

本研究においてマウスを対象とした研究を行うに際しては、本施設の遺伝子組換え実験委員会ならびに動物実験安全委員会の承認を得て、規定に従って実施した。

C. 研究結果、および D. 考察

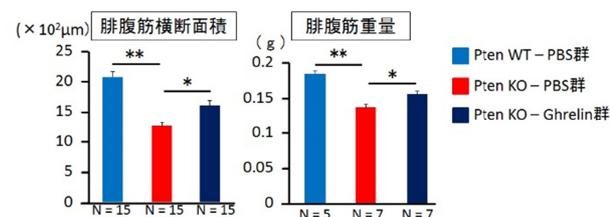
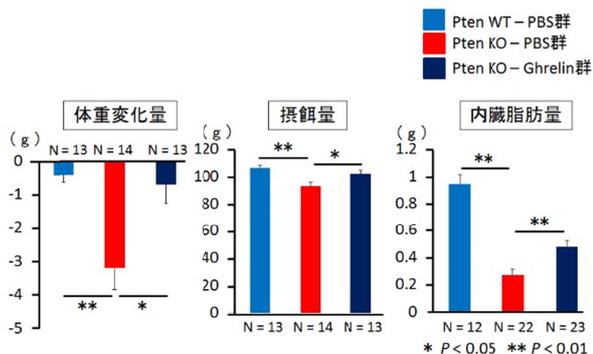
Pten 欠損マウスはウレタン投与5ヶ月後に高率に肺腺癌を発症した。一方、野生型は肺腺種のみ発症し、発症数も少なかった。腫瘍数、腫瘍サイズともに Pten 欠損マウスにおいて有意に増加・増大していた。

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 ($p < 0.05$)。



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 ($p < 0.05$)、摂餌量 ($p < 0.05$)、内臓脂肪量 ($p < 0.05$)、腓腹筋重量 ($p < 0.01$) と横断面積 ($p < 0.05$) が有意に増加していた。

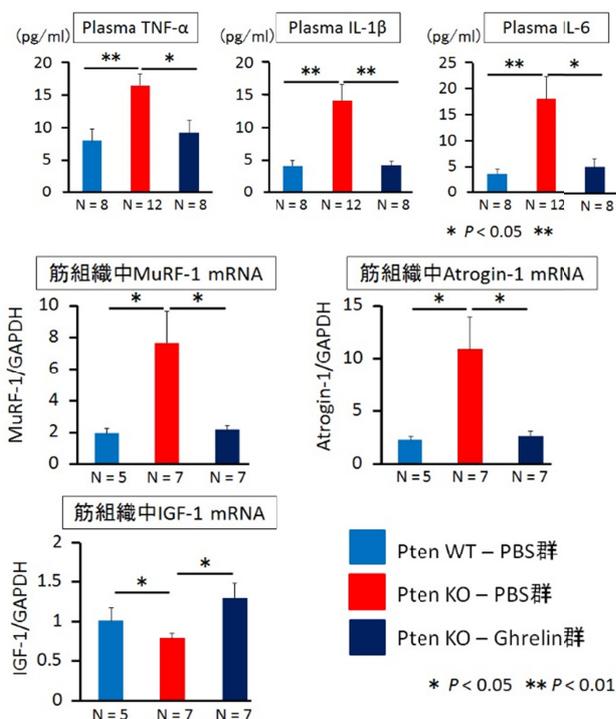
グレリン腹腔内投与は悪液質を改善する



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 ($p < 0.05$)、IL-1 β ($p < 0.01$)、IL-6 ($p < 0.05$) 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 ($p < 0.05$)、Atrogin-1 ($p < 0.05$) 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($p < 0.05$) 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。



E. 結論

Pten欠損マウスに化学発癌剤urethaneを腹腔内投与することで、肺腺癌カヘキシア動物モデルを確立した。このモデルでは摂食低下により体重減少を生じ、悪液質を来していると考えられた。このモデルにグレリンを投与することで、摂餌量、体重、筋重量、筋横断面積の減少を抑制し、IL-6などの血中炎症性サイトカイン濃度やAtrogin-1

などの筋特異的ユビキチンリガーゼの発現上昇を抑制した。これらの効果は、グレリンの持つ抗炎症作用や、筋組織中のIGF1濃度を上昇させることが関与している可能性が考えられた。

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. 松元信弘、中里雅光：グレリンによる摂食調節機構. *Anti-Aging Medicine*, 10: 36-39, 2014.
2. Arimura Y, Yamazaki S, Yanagi S, Matsumoto N, Takegami M, Hayashino Y, Fukuhara S, Nakazato M. Clinical usefulness of the two-question assessment tool for depressive symptoms in Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Lung*, 191: 101-107, 2013.
3. Sakamoto A, Matsumoto N, Arimura Y, Yanagi S, Iiboshi H, Tokoijima M, Yamashita S, Nakazato M: Hepatic portal venous gas in a patient undergoing chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Int Canc Conf J*, 2: 14-16, 2013.
4. 郡山晴喜、京樂 格、山下秀一、塩見一剛、松元信弘、中里雅光：肺小細胞癌に合併し、癌化学療法で改善した傍腫瘍性小脳変性症と Lambert-Eaton 筋無力症候群の同時発症例. *臨床神経学*, 53: 104-108, 2013.
5. Matsumoto N, Nakazato M.: Clinical application of ghrelin for chronic respiratory diseases. *Methods Enzymol*, 514: 399-407, 2012.
6. 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.

7. 坂元昭裕、松元信弘、中里雅光：グレリンのトランスレーショナルリサーチ．カレントセラピー，30: 21-25, 2012.
8. 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.
9. 松元信弘、中里雅光：グレリンのトランスレーショナルリサーチ．実験医学、29: 803-807, 2011.

2. 学会発表

1. Tsubouchi H, Yanagi S, Matsumoto N, Nakazato M: Ghrelin ameliorates cachectic status in the mouse model of lung cancer model. European Respiratory Society Annual Congress 2013. Poster, Barcelona, Sep. 9, 2013.
2. 坂元昭裕、松元信弘、郡山晴喜、坪内拡張、柳 重久、飯干宏俊、床島真紀、中里雅光：ALI/ARDSにおけるグレリンの病態生理学的意義の検討．第 110 回日本内科学会総会、東京．4月12日，2013年．
3. Yanagi S, Imazu Y, Miyoshi K, Tsubouchi H, Matsumoto N, Nakazato M: Ghrelin ameliorates bleomycin-induced acute lung injury by protecting alveolar epithelial cells and suppressing lung inflammation. European Respiratory Society VIENNA 2012, Vienna,

Austria, Sep.4, 2012.

4. 坂元昭裕、松元信弘、郡山晴喜、坪内拡張、三好かほり、有村保次、柳 重久、佐野ありさ、床島真紀、中里雅光：肺癌化学療法中の血清グレリン値の臨床的意義．第 109 回日本内科学会総会，ポスター，京都，4月13日，2012.
5. 今津善史、柳 重久、三好かほり、坪内拡張、松元信弘、中里雅光：プレオマイシン急性肺傷害モデルマウスに対するグレリンの肺保護作用．第 52 回日本呼吸器学会学術講演会，ポスター，神戸，4月21日，2012.
6. Sakamoto A, Matsumoto N, Arimura Y, Yangi S, Sano A, Tokojima M, Nakazato M.: Clinical significance of ghrelin in patients who are undergoing chemotherapy for lung cancer. CHEST 2011, Honolulu, Oct.22-26, 2011.
7. 坂元昭裕、有村保次、柳 重久、佐野ありさ、床島真紀、松元信弘、中里雅光：高齢者肺癌化療法での血漿グレリンの動態とQOLとの関連．第 22 回日本老年医学会九州地方会，口演，佐賀，3月3日，2012.
8. 今津善史、芦谷淳一、坪内拡張、坂元昭裕、今井光一、三好かほり、有村保次、柳 重久、京樂由佳、松元信弘、中里雅光：プレオマイシン急性肺傷害モデルマウスを用いたグレリンの抗炎症作用に関する検討．第 50 回日本呼吸器学会学術講演会、ポスター、京都、4月25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

3. その他

なし