

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マイズドコントロールスタディ及びそのとりまとめに関する研究

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 がん悪液質の病態では脳腸ペプチドが重要な役割を果たしている。六君子湯投与によってがん悪液質が改善した動物実験の結果を踏まえ、fMRIを用いて健常人に対する六君子湯の中枢作用を検討した。予備検討にてヒトにおいても中枢作用を有する可能性が示唆された。

A. 研究目的

抗がん剤の副作用を含めたがん悪液質による症状を軽減するため、六君子湯の有効性や奏功機序を立証することで、がん患者のQOL向上や生命予後を改善する可能性がある。がん悪液質の病態では脳腸ペプチドが重要な役割を果たしており、平成25年度は六君子湯投与によってがん悪液質が改善した動物実験の報告(Translational Psychiatry, 2011)を踏まえ、ヒトに対する六君子湯の中枢作用の解明を目的とする。

B. 研究方法

20歳以上の健常人20名を六君子湯投与群および対照群の2群に無作為に割り付け、六君子湯投与前にfMRIを実施する。六君子湯を経口投与し、90分の安静時間に心理検査(POMS、BDI、

GSRs、VAS、Edinburgh Handedness Inventory)を行い、fMRIを実施する。撮像中に運動、語想起、嗅覚、味覚などの刺激を与え、脳局所におけるオキシヘモグロビン濃度を測定することにより、作用部位の特定を行う。

(倫理面への配慮)

当該施設の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

予備検討では、六君子湯の単回投与により、認知刺激下での脳血流に変化をもたらすことが示唆された。本実験は終了したが、担当者の体調不良のため、心理検査および画像検査の解析ができておらず、結果の解析を他の者に引き継ぐことも検討中である。

D. 考察

予備検討の結果のみであるが、六君子湯は動物実験と同様にヒトにおいても、中枢への作用を有する可能性が示唆された。今後は本試験の解析を行い、ヒトに対する六君子湯の中枢作用を明らかにしていく。

E. 結論

がん悪液質の病態では脳腸ペプチドが重要な役割を果たしている。六君子湯投与によってがん悪液質が改善した動物実験の結果を踏まえ、fMRIを用いて健常人に対する六君子湯の中枢作用を検討した。予備検討から六君子湯はヒトにおいても中枢作用を有する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Fujitsuka N, Nakamura N, Inui A. Cancer cachexia pathophysiology and translational aspect of herbal medicine. *Jpn J Clin Oncol.* 2013 Jul;43(7):695-705. Review.
2. Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Nakamura N, Inui A. Cancer cachexia--pathophysiology and management. *J Gastroenterol.* 2013 May;48(5):574-94. doi: 10.1007/s00535-013-0787-0. Epub 2013 Mar 20. Review.
3. Amitani M, Asakawa A, Amitani H, Inui A. Control of food intake and muscle wasting in cachexia. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 Oct; 45(10):2179-85.

4. 鈴木 甫, 浅川 明弘, 網谷 東方, 乾 明夫【Cachexia と栄養管理】 Cachexia の診断、病態と治療. 栄養-評価と治療(0915-759X)30 巻 4 号 ページ 268-271(2013.11)
5. 網谷 真理恵, 網谷 東方, 浅川 明弘, 乾 明夫【Cachexia と栄養管理】 Cachexia の新しい治療. 栄養-評価と治療(0915-759X)30 巻 4 号 ページ 293-297(2013.11)
6. 米田 孝一, 浅川 明弘, 乾 明夫【Cachexia と栄養管理】 緩和ケアチームからみた cachexia へのアプローチ. 栄養-評価と治療 (0915-759X)30 巻 4 号 ページ 298-300(2013.11)

2. 学会発表

1. Asakawa A, Fujitsuka N, Uezono Y, Minami K, Yamaguchi T, Nijima A, Yada T, Maejima Y, Sedbazar U, Sakai,T, Hattori T, Kase Y, Inui A: The herbal medicine rikkunshito in cancer anorexia-cachexia: impact on survival and relationship to ghrelin signaling. 7th Cachexia Conference. Dec 10, 2013. Kobe, Japan.
2. 乾 明夫
癌の緩和医療と漢方 第 19 回岐阜東洋医学研究会 2013 年 1 月 17 日 岐阜
3. 乾 明夫
死の生理学に関するエビデンスー食の立場からー 第 18 回日本緩和医療学会学術大会ランチョンセミナー 2013 年 6 月 21 日 横浜
4. 乾 明夫
緩和医療と漢方薬ーエビデンスを中心にー 第 22 回ひむか東洋

医学会学術講演会 2013年11月
10日 宮崎

5. 乾 明夫

悪液質のトピックス ―癌を中心
に― 第18回日本心療内科学会
総会 2013年12月7日 名古屋

6. 乾 明夫

がん悪液質と食欲調節ホルモン
第51回日本癌治療学会シンポジ
ウム 2013年10月25日 京都

7. 乾 明夫

がん悪液質の病態と治療 Cross
Cancer Research Symposium 2013
2013年11月9日 東京

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枢への関与の解析

研究分担者 上田 陽一 産業医科大学医学部第一生理学 教授

研究要旨 動物に抗がん剤（シスプラチン）を末梢投与することで生じる副作用としての摂食抑制作用が六君子湯の投与によって改善することを確認した。この効果にセロトニン系が関与しているか否かについてセロトニン枯渇モデル動物を作成して検討した。その結果、シスプラチン投与によって生じる摂食抑制作用の六君子湯による改善効果にセロトニン系が一部関与していることを見出した。

A. 研究目的

我々の正常な摂食行動は、種々の神経性・液性情報によって多層かつ巧妙に調節されている。特に、視床下部における摂食促進ペプチドおよび摂食抑制ペプチド（視床下部摂食関連ペプチド）の役割は大きい。一方、がん悪液質に特徴的な食思不振、体重減少などの脳内メカニズムについては未だ十分には解明されていない。また、抗がん剤の副作用としての嘔気・嘔吐は重大な症状であるにもかかわらず改善するのは難しい。

我々は、これまでに動物（ラット）に抗がん剤（シスプラチン）を投与することによって生じる摂食抑制作用および体重減少に対して六君子湯の投与がグレリンの分泌を促進し、摂食抑制・体重減少を有意に改善することを見出した。さらに、この六君子湯の効果は、血中グレリン濃度を増加させて

視床下部摂食関連ペプチドの変動を正常レベルに是正することによって生じていることが示唆された。

最近、抗がん剤による摂食抑制作用および六君子湯の摂食促進作用にセロトニン系が関与している可能性が報告されている。

そこで今年度は、パラクロロフェニルアラニン（PCPA）を末梢投与することによりセロトニン枯渇モデル動物（ラット）を作製し、視床下部における視床下部摂食関連ペプチドの変動およびシスプラチンと六君子湯の投与効果について検討し、これらの作用発現にセロトニン系が関与しているか否かについて検討した。

B. 研究方法

① 7週令雄性ウイスター系ラットを用いて、生理食塩水腹腔内投与+48時間自由給餌群（n=7）、生理食塩水腹

腔内投与+48時間摂食制限群 (n=7)、PCPA腹腔内投与+48時間自由給餌群 (n=8) およびPCPA腹腔内投与+48時間摂食制限群 (n=8) の4群に分けて各処置を行った。Day0およびDay1に生理食塩水 (1ml/100g体重) もしくはPCPA (20mg/100g体重) を腹腔内投与し、その後Day1からDay3まで48時間自由給餌もしくは摂食制限を行った。実験開始後、24時間毎に体重、摂食量および飲水量を測定した。実験期間中は全て自由飲水とした。

- ② Day3に断頭し、素早く脳を取り出し、体幹血を採血した。取り出した脳は、ドライアイス上で速やかに凍結して、その後-80℃で保存した。保存した脳からクリオスタットを用いて12 μmの凍結切片を作成し、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて視床下部の摂食促進ペプチド (NPY、AgRP、MCH、Orexin) ・摂食抑制ペプチド (Oxytocin、CRH、TRH、POMC、CART) 遺伝子発現量を部位別に定量化した。また、HPLC-ECD法を用いて視床下部セロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミン量を測定した。同時に採血した体幹血からはセロトニン濃度を測定した。
- ③ PCPA (20mg/100g体重、2回/1日1回腹腔内) 投与ラットにシスプラチン (6mg/kg、腹腔内) および六君子湯 (1g/ml/100g体重、経口胃内) を投与して摂食量および体重の変化を調べた。PCPA+シスプラチン+水道水投与群 (n=8) およびPCPA+シスプラチン+六君子湯投与群 (n=8) の摂食量および体重を24時間毎に測定した。

(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。すべての実験前に一週間ハンドリングを行った。視床下部摂食関連ペプチド遺伝子発現、セロトニン濃度など短時間で変動する可能性があるため、ギロチンを用いて素早く断頭した。

C. 研究結果

- ① 摂食制限によって視床下部各部位における摂食関連ペプチド遺伝子発現の変動は、以下の通りであった。室傍核におけるCRHおよびTRHの低下、弓状核におけるPOMCおよびCARTの低下、弓状核におけるNPYおよび視床下部外側野におけるMCHが増加した。
- ② PCPA投与後に摂食制限を行った場合、弓状核におけるPOMCおよびCARTの低下を認めず、NPYは有意に増加するものの十分な増加を示さなかった。
- ③ 視床下部および血中セロトニン濃度は著明に減少していた。なお、視床下部ノルアドレナリンおよびドーパミン濃度にPCPA投与の有無で有意差はなかった。
- ④ PCPA投与 (セロトニン枯渇モデル) ラットでは、シスプラチン投与による摂食量の減少および体重の減少が見られた。これらのラットで六君子湯を胃内投与した場合、シスプラチン投与による摂食量の減少および体重の減少の抑制傾向は見られたが有意な変化ではなかった。

D. 考察

今回、抗がん剤 (シスプラチン) による摂食抑制作用が六君子湯の経口投与によって改善されるメカニズムにセロトニン系が関与している可能性につ

いて検討した。

その結果、シスプラチン投与による摂食抑制および体重減少に対する六君子湯の抑制効果にセロトニン系が一部関与している可能性が見出された。

今回の実験で、PCPAの腹腔内投与によって作成されたセロトニン枯渇モデルラットにおいて視床下部および血中のセロトニン濃度が著明に減少していることを確認した。したがって、このセロトニン枯渇モデルラットは、視床下部のみならず全身のセロトニン系が枯渇した状態であり、六君子湯が作用するセロトニン系の局在部位を同定することができなかった。しかしながら、視床下部におけるセロトニン系の関与の可能性は極めて大きい。今後、この点を含め、六君子湯の作用点におけるより詳細な検討が必要である。

E. 結論

六君子湯によるシスプラチン誘発性摂食抑制作用に対する減弱作用の一部はセロトニン系を介している可能性を見出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 46: 13-19, 2013
2. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Katoh, A. Ohno, M. Ishikura, T. Kakuma, T.

Yoshimatsu, H. Murphy, D. & Ueta, Y. A c-fos-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgene is differentially expressed in rat forebrain and brainstem after chronic dehydration and rehydration. *Journal of Neuroendocrinology* 25(5): 478-487, 2013

3. Yoshimura, M. Hagimoto, M. Matsuura, T. Ohkubo, J. Ohno, M. Maruyama, T. Ishikura, T. Hashimoto, H. Kakuma, T. Yoshimatsu, H. Terawaki, K. Uezono, Y. Toyohira, Y. Yanagihara, N. & Ueta, Y. Effects of food deprivation on the hypothalamic feeding-regulating peptides gene expression in serotonin depleted rats. *J Physiol Sci* 64(2): 97-104, 2014
4. Terawaki, K. Sawada, Y. Kashiwase, Y. Hashimoto, H. Yoshimura, M. Suzuki, M. Miyano, K. Sudo, Y. Shiraishi, S. Higami, Y. Yanagihara, K. Kase, Y. Ueta, Y. & Uezono, Y. New cancer cachexia rat model generated by implantation of a peritoneal dissemination-derived human stomach cancer cell line. *American Journal of Physiology : Endocrinology and Metabolism* 306: E373-E387, 2014
5. Yoshimura, M. Matsuura, T. Ohkubo, J. Maruyama, T. Ishikura, T. Hashimoto, H. Kakuma, T. Mori, M. & Ueta, Y. A role of nesfatin-1/NucB2 in dehydration-induced anorexia. *American Journal of Physiology : Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. (epub ahead of print)

2. 学会発表

1. 上田 陽一、吉村 充弘、橋本 弘史 (2013年8月2-4日) 抗がん剤シスプラチン投与によるラット摂食抑

- 制作用～視床下部関連ペプチドによる検討～、第23回日本病態生理学会大会、東京
2. 上田 陽一、吉村 充弘、森 昌朋 (2013年8月24日) 脱水誘発性摂食抑制反応に関する分子機構：第18回アディポサイエンス・シンポジウム、大阪
 3. 上田 陽一、橋本 弘史、横山 徹、上園 保仁 (2013年10月3-5日) シスプラチン誘発拒食ラットの摂食およびグレリン分泌に対する六君子湯の作用、第72回日本癌学会学術総会、横浜
 4. 萩本 真理奈、吉村 充弘、松浦 孝紀、大久保 淳一、大野 素子、丸山 崇、石倉 透、橋本 弘史、加隈 哲也、吉松 博信、寺脇 潔、上園 保仁、豊平 由美子、柳原 延章、上田 陽一 (2013年10月18-19日) 視床下部セロトニン枯渇モデルラットにおける摂食関連ペプチド遺伝子発現の変化、第64回西日本生理学会、北九州
 5. 吉村 充弘、松浦 孝紀、大久保 淳一、丸山 崇、橋本 弘史、加隈 哲也、吉松 博信、森 昌朋、上田 陽一 (2013年10月25-26日) 脱水誘発性摂食抑制反応に対するNesfatin-1/NucB2の役割：第40回日本神経内分泌学会学術集会・第38回日本比較内分泌学会大会合同大会、宮崎
 6. 上田 陽一 (2014年1月27日) アノレキシアモデル動物における視床下部摂食関連ペプチド発現と六君子湯の効果：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」班平成25年度 班会議、東京
 7. Yoshimura, M. Matsuura, T. Ohkubo, J. Ohno, M. Maruyama, T. Ishikura, T. Kakuma, T. Yoshimatu, H. Mori, M. & Ueta, Y. (2013年7月15-19日) Nesfatin-1/NucB2 is a crucial peptide in dehydration-induced anorexia in rats. 10th World Congress on Neurohypophysial Hormones, Bristol, England
 8. Yoshimura, M. Matsuura, T. Ohkubo, J. Ohno, M. Ishikura, T. Kakuma, T. Yoshimatsu, H. Mori, M. & Ueta, Y. (2013年9月10-13日) Nesfatin-1/NucB2 is a crucial peptide in dehydration-induced anorexia in rats. The 36th Naito Conference on Molecular Aspects of Energy Balance and Feeding Behavior, Sapporo, Japan
 9. Ueta, Y. Yoshimura, M. & Uezono, Y. (2013年12月9-11日) Effects of oral administration of Rikkunshito on cisplatin-induced anorexia in rats. 7th Cachexia Conference, Kobe, Japan
- 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 昨年度に引き続き、下垂体培養細胞からのホルモン分泌に対する六君子湯の影響を検討した。アデニル酸シクラーゼ活性化薬フォルスコリンは、AtT-20 細胞及び GH3 細胞の cAMP を増加させるとともに、ACTH および成長ホルモン(GH)の分泌を促進した。一方、これらの細胞中の cAMP を増加させる六君子湯は、GH3 細胞からの GH 分泌を有意に抑制した。AtT-20 細胞からの ACTH 分泌に対しても、有意ではないが抑制する傾向が見られた。以上の結果より、六君子湯は ACTH 分泌細胞及び GH 分泌細胞に対して、その細胞内 cAMP 増加作用だけでは説明できない、ホルモン分泌抑制的な影響を及ぼすことが示唆された。

A. 研究目的

六君子湯は食思不振の治療薬として用いられる漢方薬であり、がん悪液質の軽減にも有効性が期待される。しかし、六君子湯が効果を発現する機序は不明な点が多く、その解明はこの漢方薬の効果的な利用や改良につながると考えられる。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。昨年度までの研究により、六君子湯が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)産生ラット下垂体細胞 GH3 において、細胞内 cAMP を増加させること、しかし ACTH や GH の遺伝子発現には明確な変動をもたらさないことが明らかになった。今年度は、これらの細胞からのホルモン分泌に対する六君子湯の影響を引き続き検討した。

B. 研究方法

AtT-20 細胞及び GH3 細胞を六君子湯及びアデニル酸シクラーゼの活性化薬フォルスコリン(forskolin)で刺激し、培養細胞中に放出される ACTH 及び GH を免疫学的測定法により定量した。また、六君子湯の構成成分のうち、

細胞内 cAMP 増加作用が顕著なニンジンとチンピについても、ホルモン分泌作用について検討した。

細胞は実験前日に 12-well または 24-well の培養プレートに半密集の状態に細胞を撒き、実験直前に種々の刺激薬を含む新しい培養液に交換した後、経時的に培養液を回収した。刺激実験時も、維持用培養液と同様に血清含有培養液を用いた。

六君子湯は株式会社ツムラより供与された粉末を 10%(w/v)の水懸濁液として 2 分間煮沸した後、1/9 容積の 10 倍濃度リン酸緩衝生理食塩水を加えたものを 100%六君子湯液とした。チンピとニンジンは、株式会社ウチダ和漢薬から原末を購入し、同様に抽出して用いた。

(倫理面への配慮)

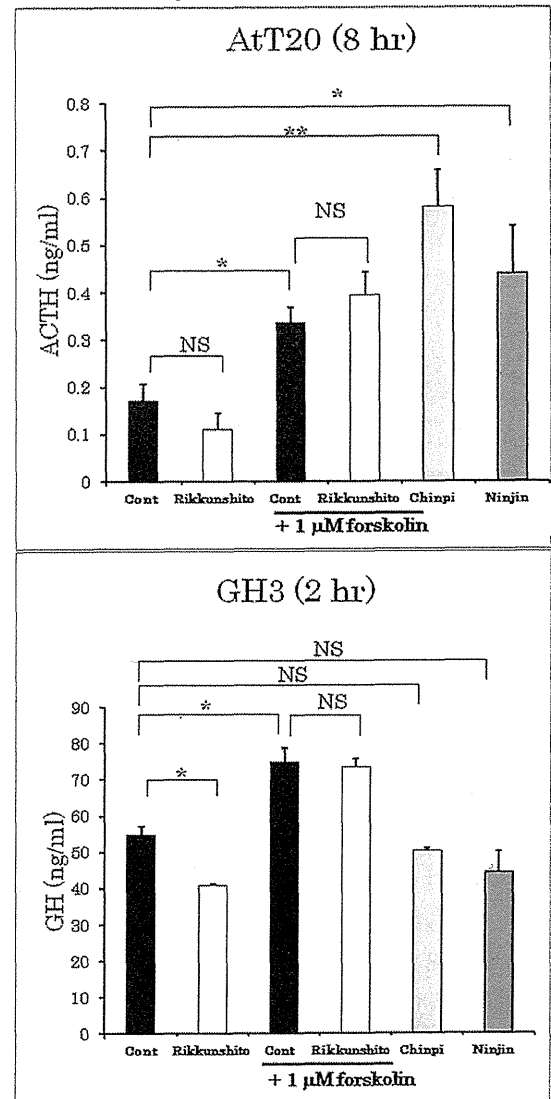
本研究では、ヒト由来の試料等を用いる研究は行わなかった。動物由来の組織は、すでに確立され広く利用されている培養細胞のみを用いた。したがって、倫理的な問題はない。

C. 研究結果 (図)

forskolin は、AtT-20 細胞及び GH3 細胞からそれぞれ ACTH および GH の分泌を有意に促進した。一方、六君子湯(1%)は GH3 細胞からの GH 分泌を有意に抑制した。AtT-20 細胞からの ACTH 分泌に対しても、有意ではないが抑制する傾向が見られた。forskolin 1 μ M で刺激した時のホルモン分泌に対しては、両細胞で六君子湯の有意な作用を認めなかった。

六君子湯を構成する 8 種類の成分のうち、これまでの研究により強力な

cAMP 増加作用を有することが判明したチンピとニンジンの抽出液は、両者とも AtT-20 細胞からの ACTH 分泌を有意に促進したが、GH3 細胞からの GH 分泌に対しては明らかな作用を認めなかった。



(n=4, Mean \pm SE, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS, statistically not significant)

D. 考察

これまでの研究により、六君子湯は種々の細胞において cAMP 増加作用を有することが明らかになった。しか

し、特定の細胞の六君子湯に対する反応は、それぞれの細胞に固有の複雑なシグナル伝達経路への、六君子湯が含む様々な物質の影響の結果として現れるため、必ずしも cAMP 増加のみによって説明できるとは限らない。

以前、我々は副腎髄質由来の培養細胞において、六君子湯が細胞内 cAMP を増加させ、副腎髄質ホルモンの合成に関わる律速酵素の遺伝子発現を促進すること、さらにカテコラミン分泌を促進することを見出した。今回、2種類の下垂体細胞を対象として、六君子湯の作用を検討した結果、細胞内 cAMP 増加作用は認めたものの、ホルモン分泌促進作用は認めず、GH 分泌に対してはむしろ抑制作用が認められた。同じ条件下の実験で、アデニル酸シクラーゼを直接活性化して細胞内 cAMP を増加させる試薬 forskolin は、両細胞からのホルモン分泌を促進することが確認されたため、六君子湯によるホルモン分泌抑制は cAMP を介するものではないと考えられる。実際、六君子湯の構成成分のうち、cAMP の増加作用が特に強いニンジンとチンピは、AtT-20 細胞からの ACTH 分泌を促進した。このことは、cAMP 増加作用以外の作用を有する物質が六君子湯に含まれており、それらがホルモン分泌に抑制的に働く可能性を示唆する。

本研究で用いた AtT-20 細胞及び GH3 細胞は下垂体腫瘍由来の培養細胞であり、正常に分化した下垂体細胞の機能のある程度保持しているが、細胞外刺激に対する反応性が正常と異なる可能性は否定できない。よって、動物から分離した正常下垂体の初代培養細胞などを用いて、これらの結果

を追試することが役立つと考えられる。

E. 結論

六君子湯は下垂体 ACTH 産生細胞及び GH 産生細胞に対して、細胞内 cAMP 増加作用を有するが、その細胞内 cAMP 増加作用では説明できない、ホルモン分泌抑制的な作用を有することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 43: 894-899, 2013

2. 学会発表

1. Tsukada, T., Nagamura, Y., Terawaki, K., Uezono, Y. Cyclic AMP production is enhanced in pituitary cells by a traditional Japanese medicine rikkunshito. 第 72 回日本癌学会総会、横浜市 (2013 年 10 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

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に関する研究

研究分担者 藤宮峯子 札幌医科大学医学部 教授

研究要旨 抗がん剤（シスプラチン）は、悪心・嘔吐を惹起し、上部および下部消化管運動の異常を来す。このメカニズムとして、シスプラチンは消化管粘膜のEC細胞からのセロトニン放出を刺激することが知られている。今回の研究で、六君子湯が、シスプラチンで刺激されるEC細胞からのセロトニン放出を抑制することがわかった。これまで抗がん剤の副作用に対する治療薬として、5-HT3受容体拮抗剤などが知られていたが、十分な効果が得られていなかった。六君子湯がEC細胞からのセロトニン分泌そのものを抑えるという本研究結果は、抗がん剤の副作用の軽減につながる重要な示唆を与える。

A. 研究目的

抗がん剤（シスプラチン）は、悪心・嘔吐を惹起し、患者のQOLを極めて傷害する。本研究は、六君子湯がシスプラチンで起こる悪心・嘔吐を予防出来るかどうかを動物実験で調べ、そのメカニズムを検索することを目的にした。シスプラチンは腸管粘膜のenterochromaffin cell (EC) 細胞からのセロトニン分泌を刺激し、放出されたセロトニンは延髄の嘔吐中枢に作用して悪心・嘔吐を引き起こすことが知られている。平成25年度の研究では、ラットを用いてEC細胞がもっとも高密度で分布する十二指腸の灌流実験を行い、六君子湯がシスプラチンで刺激されるEC細胞からのセロトニン分

泌にどのような影響を与えるかを調べた。

B. 研究方法

ラットを麻酔下に ex vivo duodenal perfusion を施し、0.1 M PBS (1ml/min) で十二指腸を灌流、灌流液中のセロトニン濃度を経時的に液体クロマトグラフィーで測定した。灌流開始1時間後にシスプラチン(1.7mg/kg)およびvehicleを尾静脈投与し、シスプラチン投与2時間前に六君子湯(1 g/kg)を経口投与した群を作成。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灌流液中のセロトニン濃度を比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、札幌医大実験動物倫理委員会承認されている。

C. 研究結果

正常対照群の十二指腸灌流液中のセロトニン濃度は、 31.5 ± 2.7 ng/ml ($n=5$)、六君子湯単独投与群は、 39.0 ± 2.6 ng/ml ($n=5$)で正常対象群と有意差はなかった。シスプラチン単独投与群は、 62.5 ± 3.2 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、 30.5 ± 1.7 ng/ml ($n=5$)で、シスプラチン投与群より有意に減少 ($P < 0.01$) し、正常レベルに戻った。

D. 考察

抗がん剤でおこる悪心・嘔吐は患者のQOLを著しく障害する。本来悪心・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作用に効果があり、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。

シスプラチンは消化管のEC細胞からのセロトニン分泌を刺激し、悪心・嘔吐を惹起することが知られている。本研究の結果、六君子湯はシスプラチンで刺激されるEC細胞からのセロトニン分泌を直接ブロックすることがわかり、過剰なセロトニン分泌で起こるシスプラチンの副作用に効果があることが判明した。

E. 結論

本研究の結果、六君子湯はシスプラチンでおこる十二指腸のEC細胞からのセロトニン分泌を抑制し、抗がん剤の副作用としての悪心・嘔吐を抑制する効果があることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ataka K, Asakawa A, Nagaishi K, Kaimoto K, Sawada A, Hayakawa Y, Tatezawa R, Inui A, Fujimiya M. Bone marrow-derived microglia infiltrate into the paraventricular nucleus of chronic psychological stress-loaded mice. *PLoS One*. 2013, 8(11):e81744.
2. Nagaishi K, Ataka K, Echizen E, Arimura Y, Fujimiya M. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic hepatocyte damage in mice by inhibiting infiltration of bone marrow-derived cells. *Hepatology*. 2014, 59(5):1816-29.
3. Chiba H, Ataka K, Iba K, Nagaishi K, Yamashita T, Fujimiya M. Diabetes impairs the interactions between long-term hematopoietic stem cells and osteopontin-positive cells in the endosteal niche of mouse bone marrow. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013, 305(7):C693-703.

2. 学会発表

なし

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

『がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯投与による影響』に
関する研究

研究分担者 樋上 賀一 東京理科大学薬学部
分子病理・代謝学研究室 教授

研究要旨 がん悪液質（CC）ラットの白色脂肪組織（WAT）の変化を、短期の適度（30%CR；摂食量はCCとほぼ一致）および高度なカロリー制限（70%CR）ラットの（WAT）と比較し、さらに六君子湯やグレリンがCCに及ぼす影響を検討した。その結果、白色脂肪組織におけるde novo脂肪酸合成系の低下がCC病態に関連する可能性および六君子湯によるCC病態改善効果の一部がグレリンシグナルを介した脂肪酸合成系タンパク質発現量の増加にある可能性が示唆された。

A. 研究目的

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、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、六君子湯やグレリン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機序の解明を目指す。

B. 研究方法

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（WAT）において、脂質分解系および脂肪酸合成系タンパク質発現を解析した。また、悪液質モデルである胃

がん細胞による担がん（CC）ラットとCCラットへの六君子湯投与群、グレリン投与群、対照群のWATにおいて、同様の解析を行った。そして、CCと30%CR、70%CRの相違、さらに六君子湯やグレリン投与によるCC病態改善効果を検討した。

（倫理面への配慮）

本実験計画は、東京理科大学動物実験委員会にて承認されている（承認番号Y13030）。

C. 研究結果

WATにおける脂質分解関連タンパク質の発現は、30%CRおよび70%CRにおいても有意に増加した。また、CCにより有意に増加した。一方、脂肪酸合成関連タンパク質の発現は、30%CRでは有意に増加したが、70%CRでは

有意に減少した。また、CC で減少した。

加えて、六君子湯やグレリンは、CC による脂質分解関連タンパク質発現の増加に影響を与えなかった。一方、CC による脂肪酸合成関連タンパク質発現の減少やリン酸化 Akt の減少は、六君子湯により改善傾向を示した。またグレリンは CC による脂肪酸合成関連タンパク質発現の減少を一部改善した。しかし、グレリンによる作用は CC に対してよりもコントロール群に対する方が強かった。

D. 考察

CC の WAT は 70%CR の WAT と類似していたが、30%CR の WAT 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。

六君子湯による脂質分解系への効果は観察できなかったが、六君子湯が CC により減少した脂肪酸合成系タンパク質発現やリン酸化 Akt を増加させたことから、六君子湯による CC 病態の改善効果の一部は、de novo 脂肪酸合成の亢進およびインシュリン抵抗性改善にある可能性が示唆された。

また、グレリンにより、脂肪酸合成系タンパク質発現亢進作用は CC に対してよりもコントロール群に対する方が強かったことから、六君子湯による CC 病態の改善効果の一部は、グレリンを介するものの、CC によるグレリン抵抗性がグレリン作用を減弱させている可能性が考えられた。

E. 結論

六君子湯投与による一部グレリン

シグナルを介した白色脂肪組織における de novo 脂肪酸合成系の活性化およびインシュリン抵抗性の改善が、がん悪液質病態の改善に重要である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okita N, Ishikawa N, Mizunoe Y, Oku M, Nagai W, Suzuki Y, Matsushima S, Mikami K, Okado H, Sasaki T, Higami Y. Inhibitory effect of p53 on mitochondrial content and function during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Mar 28;446(1):91-7.
2. Terawaki K, Sawada Y, Kashiwase Y, Hashimoto H, Yoshimura M, Suzuki M, Miyano K, Sudo Y, Shiraishi S, Higami Y, Yanagihara K, Kase Y, Ueta Y, Uezono Y. New cancer cachexia rat model generated by implantation of a peritoneal dissemination-derived human stomach cancer cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Feb 15;306(4):E373-87.
3. Matsuo T, Miyata Y, Sagara Y, Higami Y, Tobu S, Matsuo M, Noguchi M, Shimokawa I, Kanetake H, Sakai H. Renoprotective effects of telmisartan after unilateral renal ablation in rats. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2013 Oct 10;6:207-14.
4. Okita N, Yoshimura M, Watanabe K, Minato S, Kudo Y, Higami Y, Tanuma S. CHK1 cleavage in programmed cell death is intricately regulated by both caspase and non-caspase family proteases. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan;1830(1):2204-13.

5. Chujo Y, Fujii N, Okita N, Konishi T, Narita T, Yamada A, Haruyama Y, Tashiro K, Chiba T, Shimokawa I, Higami Y. Caloric restriction-associated remodeling of rat white adipose tissue: effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, sterol regulatory element binding protein-1, and macrophage infiltration. *Age (Dordr)*. 2013 Aug;35(4):1143-56.
6. 土屋拓郎、沖田直之、須藤結香、樋上賀一、カロリー制限が白色脂肪組織における脂肪酸合成に及ぼす影響の経時的解析、*基礎老化研究*、37: 29-31, 2013
7. 須藤結香、沖田直之、樋上賀一、カロリー制限による抗老化・寿命延伸効果のメカニズム ～脂肪組織のリモデリングと脂質代謝の活性化～、*自律神経*、50: 192-195, 2013
2. 学会発表
 1. 水之江雄平、三上健太郎、沖田直之、須藤結香、樋上賀一、脂肪細胞におけるオートファジーの役割、第36回日本基礎老化学会大会、大阪、*基礎老化研究*、37: 43, 2013
 2. 土屋拓郎、沖田直之、須藤結香、樋上賀一、カロリー制限がミトコンドリアおよび脂質代謝に及ぼす影響の経時的解析、第36回日本基礎老化学会大会、大阪、*基礎老化研究*、37: 43, 2013
 3. 成田匠、藤井波木、沖田直之、須藤結香、樋上賀一、Srebp-1c はカロリー制限 (CR) による抗老化・寿命延伸効果に重要である、第36回日本基礎老化学会大会、大阪、*基礎老化研究*、37: 43, 2013
 4. 樋上賀一、脂肪細胞におけるオートファジー、第102回日本病理学会総会、札幌、*日本病理学会誌*、102: 334, 2013
 5. Mizunoe Y, Mikami K, Okita N, Narahara T, Negishi A, Yoshida M, Sudo Y, Higami Y. Autophagic flux is suppressed via ROS in differentiated and hypertrophic adipocytes. *APDO Symposium 2013, Tokyo*, 68, 2013
 6. Fujii N, Okita N, Chujo Y, Narita T, Sakai M, Sudo Y, Higami Y. Srebp-1c is required for life-long caloric restriction-induced mitochondrial biogenesis in white adipose tissue of mice. *APDO Symposium 2013, Tokyo*, 70, 2013
 7. 横山明信、須藤結香、平山重人、樋上賀一、藤井秀明、上園保仁、オピオイドリガンド新規スクリーニング法確立と同法を用いたδ受容体サブタイプとオピオイド受容体ヘテロダイマーの相関解析、第66回日本薬理学会西南部会、福岡
 8. 柏瀬陽平、寺脇潔、鈴木雅美、宮野加奈子、須藤結香、白石成二、樋上賀一、加瀬義夫、柳原五吉、上園保仁、新規がん悪液質モデルラットでのグレリン抵抗性の発現および漢方薬六君子湯によるグレリンシグナルを介した症状改善効果、第66回日本薬理学会西南部会、福岡
 9. 鈴木裕規、永井 亘、沖田直之、岡戸仁志、田川亮真、須藤結香、樋上賀一、新規肥満応答性 E3 コ

ビキチンリガーゼ WWP1 の脂肪細胞における機能解析、第 18 回アディポサイエンスシンポジウム、大阪

10. 樋上賀一、藤井波木、成田匠、酒井将弘、須藤結香、沖田直之、カロリー制限による Srebp-1c を介した代謝のリモデリング、第 18 回アディポサイエンスシンポジウム、大阪
11. 須藤結香、水之江雄平、三上健太郎、奈良原誠大、根岸亜梨沙、吉田実樹、沖田直之、樋上賀一、オートファジーは脂肪細胞におけるアディポカイン分泌バランスを改善する、第 18 回アディポサイエンスシンポジウム、大阪

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

大建中湯のがんに伴う炎症、疼痛抑制効果に関する研究

研究分担者 河野 透 札幌東徳洲会病院 先端外科センター長

研究要旨 大建中湯は、3つの有効生薬（山椒、乾姜、薬用人参）の抽出成分からなる日本独自の複合植物薬である。その薬理機序に関して申請者らが成分レベルで解明を進めた結果、乾姜の主要成分 shogaols/gingerols がプロスタグランジン E2 産生を多標的（細胞質型ホスホリパーゼ、COX2、プロスタグランジン E 合成酵素）な抑制機序が明かとなり、さらに山椒成分の sanshools が標的細胞の感受性を高めることで shogaols/gingerols が低濃度でも効果を発揮できる相乗的な作用を有していることが明らかとなり大建中湯の構成生薬成分が多標的かつ相乗的效果で、癌に伴う炎症、疼痛を抑制する可能性が示唆できた。

A. 研究目的

大建中湯には3種類（山椒、乾姜、人参）の抽出生薬成分が含まれる日本固有の植物薬である。大建中湯の薬物動態にて山椒成分の sanshools が急速かつ大量に血中に移行し、遅れて乾姜成分の shogaols/gingerols がゆっくりと血中に移行することが判明。しかしながらその量は低濃度であり、これまで薬効機序を分子レベルで解析に用いた有効濃度をかなり下回っていた。そこで、sanshools が細胞の感受性を高めることで低濃度の shogaols/gingerols が作用を発現できるのではないかという仮説を本研究の目的とする。

B. 研究方法

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を使用し、以下の実験を行った。摘出したラットの近位大腸内腔に圧トランスデューサを装着し、全体をクレブス緩衝液に水没させ固定、腸管運動（migrating motor complex, MMC）をビデオカメラと圧トランスデューサによって観察記録した。細胞の興奮性を決定する resting potential を制御するカリウムチャネル（KCNKs）の各種ブロッカー、オープナーを用いて検討した。KCNKs 発現の免疫組織学的検討も行った。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮を特に必要としな

い研究方法であるが、旭川医大、北海道大学の研究管理等に準拠し研究を進める。

C. 研究結果

消化管平滑筋細胞および神経叢に KCNKs が発現していることを確認した。KCNKs ブロッカーは MMC を惹起し、その MMC は KCNKs オープナーで減弱した。sanshools は強く律動的な MMC が観察され、KCNKs オープナーによって用量依存的に減弱し、高用量で完全消失した。単独投与では MMC を起こさない低用量の sanshools と shogaols/gingerols を同時投与すると MMC が起こることを観察した。

D. 考察

体内に吸収された大建中湯の主要成分である乾姜の shogaols/gingerols が濃度依存性に腸管上皮細胞に存在する Ca チャネル TRPA1 を刺激し、ADM を分泌させることが判明した。しかし、薬物動態試験結果では 6-shogaol の血中濃度は低く、われわれの *vitro* の実験に用いた有効濃度とはかなりかけ離れていた。そこで、一過性ではあるが、血中に高濃度に吸収される山椒成分に着目した。山椒成分は乾姜成分同様に TRP チャネル TRPA1、TRPV1 のアゴニスト作用があるだけでなく、電位開口型カリウムチャネル KCNK のブロッカーであることが知られている hydroxy- α -sanshool と hydroxy- β -sanshool に注目した。KCNK チャネルはほとんどの細胞の細胞膜に存在し、カリウム

を細胞内から細胞外に選択的に排出し、細胞機能を維持している。その細胞機能のひとつに細胞活動の感受性を低くし、外来刺激閾値を高めることで細胞自体の安定性を高めている。神経細胞では電位依存性の Na チャネルの開放を制御している。最近の研究で、hydroxy- α -sanshool や hydroxy- β -sanshool が腸管平滑筋細胞や腸管神経細胞の KCNK3 や KCNK9 のブロッカーとなることで腸管運動を亢進していることを明らかにしてきた。そこで薬物動態試験とこれらの研究結果から次なる仮説を持つに至った。大建中湯が投与されると、まず最初に山椒成分が腸管上皮細胞や腸管平滑筋、腸管神経細胞の KCNK チャネルをブロックし、各細胞の感受性を高く、つまり閾値を低くすることで、後から到達する乾姜成分の刺激量（血中濃度）が低くても効果が発現できる状態に変化させる。つまり、培養細胞や動物実験で単独に用いた成分濃度よりかなり低用量でも効果が発現できることを示唆している。今回、腸管運動を単独では全く影響を与えない程度の山椒成分と乾姜成分の両者を投与すると強い蠕動亢進が起こることが観察された。しかしながら、この事象を完全に説明することは困難だが、われわれの仮説は極めて魅力的かつ有力な候補となることは確かであるが、その詳細は今後の研究で明らかにされていくものと考えている。

E. 結論

大建中湯の山椒成分が標的細胞の KCNK チャネルをブロックすることで薬物感受性を高め、乾姜成分が相乗