

- Terashita, Z.-I., Kawamura, M., Takatani, M., Tsushima, S., Imura, Y., Nishikawa, K. (1992). Beneficial effects of TCV-309, a novel potent and selective platelet-activating factor antagonist in endotoxin and anaphylaxis shock in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 260, 748–755.
- Tsuda, M., Ishii, S., Masuda, T., Hasegawa, S., Nakamura, K., Nagata, K., Yamashita, T., Furue, H., Tozaki-Saitoh, H., Yoshimura, M., Koizumi, S., Shimizu, T., Inoue, K. (2007). Reduced pain behaviors and extracellular signal-related protein kinase activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor. *J Neurochem* 102, 1658–1668.
- Vargaftig, B.B., Ferreira, S.H. (1981). Blockade of the inflammatory effects of platelet-activating factor by cyclo-oxygenase inhibitors. *Braz J Med Biol Res* 14, 187–189.

がん患者の生活の質の向上をめざす がん疼痛およびがん悪液質症状改善のための研究 —がん患者へ届ける基礎から臨床への トランスレーショナルリサーチ—

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
上園 保仁

はじめに

がん患者の念願であった「がん対策を充実させて！」という思いは、2006年に「がん対策基本法」を成立させ、そしてそれに基づき翌年「がん対策推進基本計画」が策定されました。それから5年後の2012年5月には「第2期がん対策推進基本計画」が決定され、がん患者やその家族の思い、意向を取り上げ、その実現をめざすために、がん予防から適切な検査法、新規治療法の開発、そして患者の望む緩和ケア実践に至るまでの総合的対策が以前に比べ強く推進されました。また、この2年でその結果を検証するためのプログラムが策定され、そのもとで計画の「真の進捗」が問われ、その結果に基づき第3期へとつながっていく運びになっています。

私たちは、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にて基礎医学から臨床へのトランスレーショナル(橋渡し)研究を行っています。以前私たちは、がん患者の生活の質向上のための研究について、本連載の第2回¹⁾の80ページに、「現在私たちの研究室では、がん性腹膜炎の痛みの研究をするために、ラット腹腔に胃がん細胞を移植することによりがん性腹膜炎モデルを作製しようと試みています。作製したモデルラットを用いて、いかにしてがん性腹膜炎の痛みを客観的に評価できるかを現在試行錯誤中であり、この基礎医学セミナーの連載のどこかでその結果をご紹介しますできればと思っています」と書きました。そ

れから3年近く経ちまして、今回その結果をようやく報告することができます。また、他の研究結果も併せてご報告したいと思います。

進行がん患者の最も辛い症状の1つは痛みであり、それは進行がん患者の70%が経験します。痛みは最も患者のquality of life(QOL)を低下させている症状の1つです。緩和ケアの臨床の大きな柱は「がん患者を痛みから解放すること」であり、わが国においても1986年よりWHOによる「WHO3段階除痛ラダー」に沿って適切ながん疼痛対策が行われるようになりました。しかし、この方法が周知され津々浦々まで用いられているかということ、まだまだ不十分であるのが現実です。このWHO3段階除痛ラダーを広めていくことが急務である一方、さらにみえてくるものはこのWHO3段階除痛ラダーについて「もっと工夫できないか」「もっとよい方法はないか」という思いです。もちろんWHO3段階除痛ラダーを適切に用いることが治療の第一歩ですが、この方法をしっかりと用いてもまだ10~15%の患者のがんの痛みがとれないというデータがあります。

WHO3段階除痛ラダーに従って治療を行うと、痛みの強さに応じて非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)やアセトアミノフェンからコデインリン酸塩などの弱オピオイド、そしてモルヒネなどの強オピオイドへと、症状に応じて弱いものから強いものへと選択が行われます。それに加えて、経験からその臨床使用に至った適応外使用の「鎮痛補助薬」といわれる薬剤群の処方が必要に応じて用いられます²⁾。WHO3段階除痛ラダーに

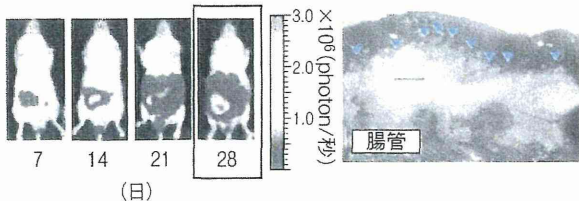
沿って治療を行っても10~15%の患者で痛みがとれないのは、痛みを起こすメカニズムがかなり複雑であること、まだまだわかっていないところがあるということ、裏返すと、私たちの体には医療用麻薬(オピオイド)が作用するオピオイド受容体を利用して鎮痛する方法とNSAIDsを用いて鎮痛する方法に加え、ほかに痛みを発生させる機構、そして痛みを抑える機構が存在するということだと思います。したがって、その残りのメカニズムを解明すること、それに立脚した治療法を臨床へフィードバックすることはとても重要です。

サイエンスにおける分子生物学や遺伝子工学の進歩は、痛みに関与する細胞膜受容体やイオンチャネル、そのアゴニスト、アンタゴニストなどの研究開発を指数関数的に進歩させてきました。その結果、 μ 、 δ 、 κ と3種類あるオピオイド受容体活性化による鎮痛機構は分子レベルでかなり解き明かされてきましたし、モルヒネ、オキシコドン、フェンタニル、メサドンといったわが国で用いられているオピオイドの鎮痛作用の使い分けや耐性メカニズムの違いなどがかなり克明にわかってきました³⁾。くわえて、さまざまな適応外使用の鎮痛補助薬がどの受容体やイオンチャネルなどを介して鎮痛効果を発揮しているのかという点についても、解明が進んできています。しかし、問題は私たちが細胞レベルや動物モデルを使って明らかにしたメカニズムが、果たしてヒトにも当てはまるのかということです。この狭間をしっかりと繋いでいくことがとても大切です。がん研究で重要なことは、ヒトの症状を反映するがんモデル動物をいかにうまくつくれるかです。また、患者のがん疼痛を表現できる動物モデルをいかに作製するか、モデル動物を用いて得られた結果をヒトにどのように当てはめていくか、この間隙を埋めることもまた重要なポイントです。

がん腹膜播種モデルを用いた鎮痛の研究

私たちは、国立がん研究センター中央病院緩和医療科との共同研究で、オピオイドがあまり効かない腹膜播種性のがん疼痛をとるメカニズムを明らかにし、痛みをとる薬剤を臨床応用に進めるという研究のため、まずそんな症状を有するようなモデル動物の作製開発を行いました。図1に示すように、がん細胞を植えることでがん細胞の特徴をもったがんを発症させることのできる免疫不全Scidマウスの腹腔に低分化型胃癌60As6Luc細胞を注入し、腹痛を呈するモデルマウス、つまり胃がんで腹膜播種がありお腹が痛むというモデルを作製しました(図1)。このようにしてできあがったモデルマウスは鎮痛効果を示す以上の高用量のモルヒネ(10mg/kg)を与えても痛みはほとんど取れませんでした。鎮痛補助薬の1つである局所麻酔薬リドカインを低用量(0.4mg/kg)加えると痛みがほとんど消えてしまうことが明らかとなりました。また、その分子メカニズムについて解析を進めるために、腹腔からの痛みを伝えている部位の脊髄後根神経節の μ -オピオイド受容体遺伝子、ならびにリドカインが働くと考えられている電位依存性ナトリウムチャネル(Nav1.7)の遺伝子発現を測定したところ、その部位での μ -オピオイド受容体はその発現が50%にまで低下しており、一方Nav1.7は30%上昇していることが判明しました。つまりこのモデルでモルヒネが効きにくくリドカインが効きやすい要因として、これらターゲット分子の増減が原因である可能性が明らかになり(図1)、これらの結果を論文に報告しました⁴⁾。また、同研究に加えて、モルヒネがなかなか効かない骨転移のモデルをつくり、同モデルにおいてケタミンが効果的な鎮痛作用を有することも明らかにし、この結果は現在論文にまとめているところです。そのほかに抗癌剤、放射線で発生する口内炎にも焦点を当

- ・使用動物：C.B17/Icr-scldマウス
- ・細胞：低分化型胃癌(60As6Luc, 1×10^6 cell, i.p.)



脊髄後根神経節の遺伝子発現変化

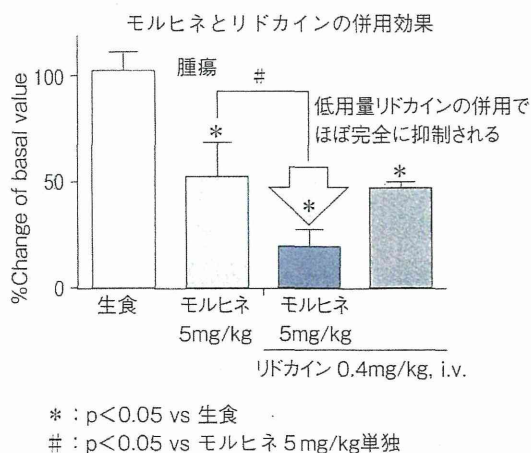
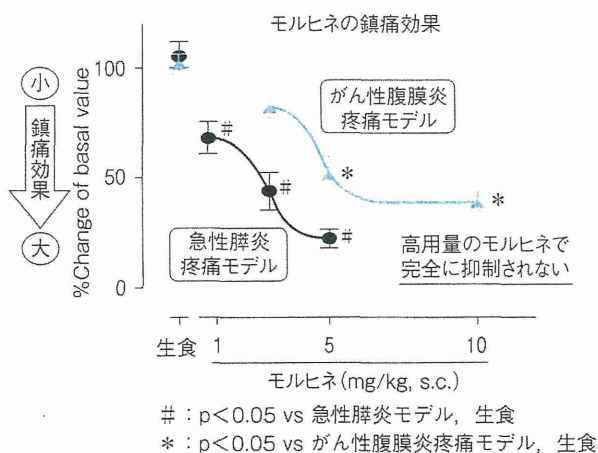
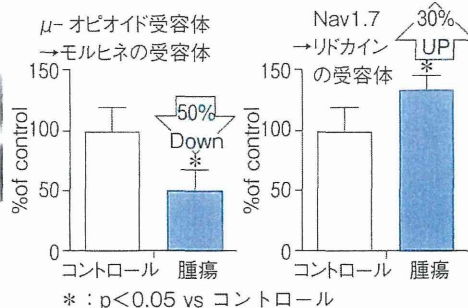


図1. 腹膜播種に伴う難治性癌痛に対するリドカインの鎮痛効果とメカニズム

で、口内炎の痛みをとり、食感や味覚には影響を与えないような新規薬剤の開発を鋭意行っています。この研究についても、口内炎の痛みを客観的に評価できる新たなモデル動物を作製するところから開始しました。この結果が出ましたら、改めて報告できればと思っています。

がん悪液質モデルを用いた患者のQOLを向上させるための研究

がんの痛みに加え、がん患者のQOLを下げるものはほかにもさまざまなものがあります。がん患者のQOLを下げる要因は何かというシステムティックレビュー⁵⁾において、がん患者には37項目以上もの耐えられない苦しみが存在するとの報告があり、上位から疲労感74%、痛み71%、倦怠

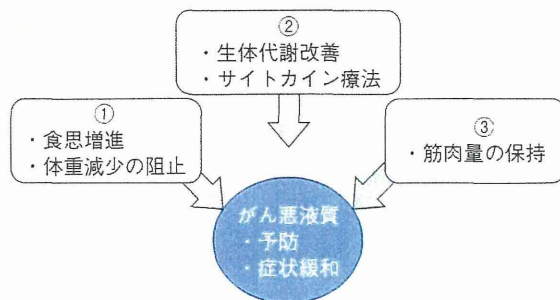


図2. がん悪液質の予防ならびに症状緩和療法のアプローチ

感69%、衰弱感60%、食思不振53%でした⁶⁾。

進行性のがん患者はその70%ががん悪液質と呼ばれる症状、たとえば食思不振、体重減少、特に筋肉量の減少を主徴とする症状を呈します。がん悪液質患者は明らかに予後が悪く、がん悪液質自

体が原因で死亡する患者はがん死亡の20%を占めるといわれ、膵臓がん、胃がん患者に多くみられます⁷⁾。ところが、がん悪液質の予防、治療には決定的なものがないのが現状です。悪液質の症状改善にはさまざまな薬剤が用いられてはいますが、確固たるエビデンスのあるものは多くありません。がん悪液質の症状改善ならびに治療へのアプローチとしては、図2に挙げる3つが考えられます。

本連載の第4回⁶⁾に、私たちの現在行っている悪液質の研究を取り上げました(62ページ)。ようやくその研究の一部がまとまってきましたので、今回その結果も報告します。

私たちは、がん悪液質の症状改善を体重減少の阻止ならびに食思改善を促す薬剤を探すことから始めようと思いました。まず、ヒト胃がん細胞をラット皮下に移植することによりがん悪液質を惹起するモデルを作製しました。そのために、植える胃がん細胞を「悪性」のものに誘導させ、植えるとかかなりの確率で悪液質を起こすという細胞を選び出しました⁸⁾。その細胞を用いると、マウスやラットは100%の確率でがん悪液質を引き起こすことがわかりました⁸⁾(さらに続編投稿中)。同モデルを用いて食思不振や胃炎、嘔吐改善にわが国で古くより用いられている漢方薬「六君子湯」ががん悪液質による体重減少、食思不振の症状を改善するかどうかの実験を行ったところ、六君子湯はその両方とも改善することがわかりました(論文投稿中)。

シスプラチンなどの抗癌剤治療を受けているがん患者は、食事ができない、食事ができても吐いてしまうといった副作用を生じることが多く、このような副作用は抗癌剤を継続使用するうえでの大きな問題となっています。シスプラチンを投与して食思不振を起こさせたラットを用いた別の実験によって、六君子湯がラットの食思を改善すること、またそのメカニズムとして末梢組織で唯一食思促進ペプチドとして知られているグレリン⁹⁾

の分泌増加が明らかとなりました¹⁰⁾。投与されたシスプラチンが腸管にあるクロム親和性細胞から大量のセロトニンを分泌させ、その結果消化管のセロトニン5HT_{2c}受容体が刺激され、胃からのグレリンの分泌が低下することがわかりました。六君子湯はこの5HT_{2c}受容体を抑制することで大量のセロトニンによって低下していたグレリンの分泌を回復させることを明らかにしました。さらに、六君子湯を構成する8種の生薬の1つ、陳皮(温州ミカンの皮を乾燥させたもの)に含まれるヘスペリジンなどのフラボノイド類にその効果があることも突き止められました¹⁰⁾。これらに関するお話は、本連載の第5回¹¹⁾でも詳しく紹介しています。

私たちの作製した胃がん細胞接種悪液質モデルラットでは、六君子湯のがん悪液質における食思改善、体重減少の阻止作用を明らかにしましたが、この食思改善は六君子湯によるグレリン分泌の促進作用によるものだろうと考えました。一方、悪液質を発症したがん患者は食欲が低下し、やせをきたしていますが、実は血中グレリン濃度は上昇しているケースがむしろ多いことも明らかになってきました。おそらくフィードバック機構によりグレリン濃度が上昇しているものと考えられています。そこで私たちのつくったがん悪液質モデルラットのグレリン血中濃度を測定したところグレリンはすでに増加しており、また驚いたことに六君子湯が食思改善や体重減少の阻止を引き起こす際にグレリン濃度は上昇しないことも明らかになったのです。六君子湯が摂食量を増やし体重減少を改善するメカニズムの説明として、私たちは六君子湯にはグレリン受容体を介したシグナルの感受性を上げる作用があるのではと考えました。そこでグレリン受容体発現細胞を用いてグレリン受容体活性化シグナルを測定したところ、六君子湯はグレリンによる反応性を上昇させていること、つまりグレリンの受け手側であるグレリン受容体のシグナルを増強させることがわかりまし

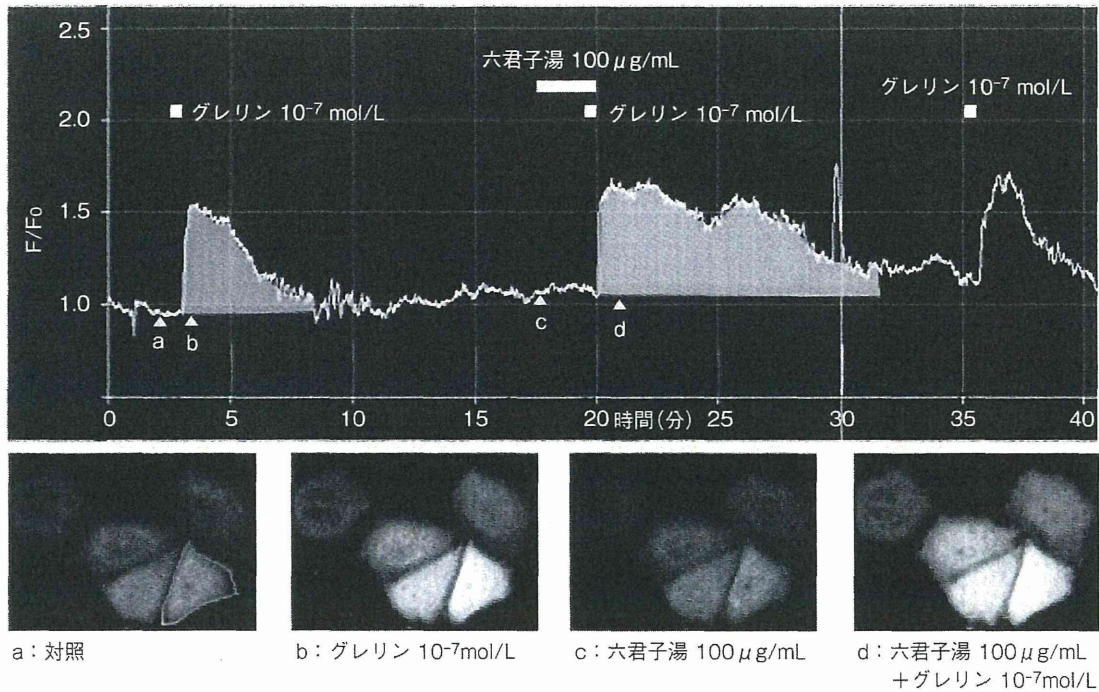


図3. グレリン受容体発現細胞に対する六君子湯のグレリンシグナル増強効果

グレリン受容体(GHS-R)発現細胞においてグレリンによって誘発されるF/F₀蛍光の変化。

(文献12)より改変・引用)

た(図3)¹²⁾。さらに、六君子湯を構成する蒼朮という生薬に含まれるアトラクチロジンにその促進作用があることを突き止めました¹²⁾。

これらの結果を合わせると、六君子湯は陳皮に含まれるヘスペリジンがグレリン分泌を促進し、蒼朮に含まれるアトラクチロジンがグレリン受容体の感受性を上げることで摂食を促す可能性が考えられます。また別の実験で、グレリンが体内不活性化されるステップを六君子湯の生薬成分である生姜のジンゲロールが阻害し、その結果血中に活性化グレリンが長く存在することも明らかになりました¹³⁾。これらをまとめたものが図4です。このように、六君子湯などの漢方薬はそれを構成する生薬成分が協調しあってグレリンシグナルを高めていることが明らかになったわけです¹⁴⁾。

2007～2011年の「がん対策推進基本計画」、2012～2016年の「第2期がん対策推進基本計画」

の策定にあたり、特に働く世代や小児へのがん対策とがんになっても安心して暮らせる社会の構築などの項目が重要課題として追加されました。2012年に50周年を迎えた独立行政法人国立がん研究センターは、わが国におけるがん予防・診断・治療研究における中枢機関です。私たちの研究の場である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は、がん患者の苦痛を和らげQOLを向上させるための研究を鋭意進め、がん患者のための基礎から臨床に至るトランスレーショナル緩和・支持療法研究を行っていかうと日々研究を進めています。がんに対する診断、治療は、昨今の科学の進展もありまさに日進月歩です。効果的な抗癌剤が次々と生まれるなか、がん患者がより効き目のある抗癌剤と付き合う期間が長くなってきているのが現状です。つまり、抗癌剤の副作用と向き合う期間も長くなってきている

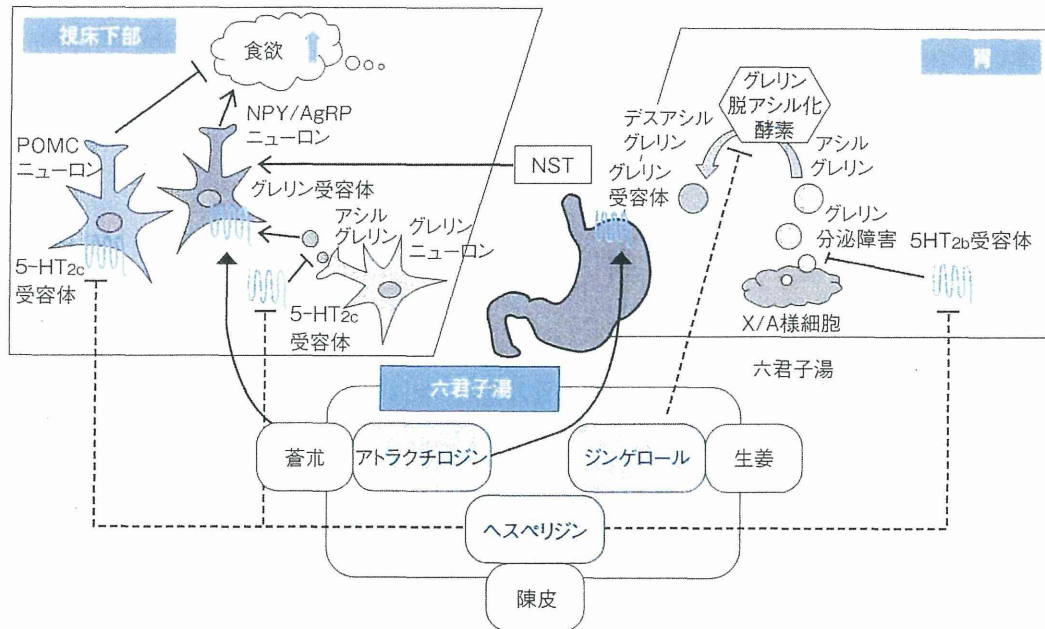


図1 六君子湯の作用機序（グレルリンシグナル）

六君子湯の2成分が協調して、食思促進ペプチド「グレリン」シグナルを高める。その結果、食思不振が回復し体重減少を抑える。

のです。今後は抗がん剤による副作用の改善、がん悪液質の症状改善など、がん患者のQOLを向上させることがこれまで以上にクローズアップされることと思います。私たちは、がん患者の訴えと向き合い、QOLを維持・向上させるための研究を今後も前進させていきたいと思っています。

文献

- 1) 上園保仁：がん疼痛基礎医学研究 ―経験を科学に―。がん患者と対療 21：78-81, 2010
- 2) 的場元弘：がん疼痛治療のレシピ。東京、春秋社、1-147, 2007
- 3) 今井哲司, 成田 年, 富安志郎, 他：オピオイドの薬理学。Mebio 27：70-78, 2010
- 4) Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, et al：Sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied by changes in the expression of substance P and μ -opioid receptors in the spinal cord of mice.

Anesthesiology 117：847-856, 2012

- 5) Teunissen SC, Wesker W, Kruitwagen C, et al：Symptom prevalence in patients with incurable cancer：a systematic review. J Pain Symptom Manage 34：94-104, 2007
- 6) 上園保仁：がん患者の症状緩和のために ―がん悪液質の予防、症状改善をめざす基礎医学研究。がん患者と対療 22：58-63, 2011
- 7) Tisdale MJ：Biology of cachexia. J Natl Cancer Inst 89：1763-1773, 1997
- 8) Yanagihara K, Takigahira M, Mihara K, et al：Inhibitory effects of isoflavones on tumor growth and cachexia in newly established cachectic mouse models carrying human stomach cancers. Nutr Cancer 65：578-589, 2013
- 9) Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al：Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 402：656-660, 1999
- 10) Takeda H, Sadakane C, Hattori T, et al：Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT2

- receptor antagonism. *Gastroenterology* **134** : 2004-2013, 2008
- 11) 上園保仁 : がん患者の症状緩和に役立つ漢方薬—漢方薬の有効性を示す。臨床につながる基礎研究—, *がん患者と対療* **22** : 140-146, 2011
- 12) Fujitsuka N, Asakawa A, Uezono Y, et al : Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. *Transl Psychiatry* **1** : e23, 2011
- 13) Sadakane C, Muto S, Nakagawa K, et al : 10-Gingerol, a component of rikkunshito, improves cisplatin-induced anorexia by inhibiting acylated ghrelin degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **412** : 506-511, 2011
- 14) Uezono Y, Miyano K, Sudo Y, et al : A review of traditional Japanese medicines and their potential mechanism of action. *Curr Pharm Des* **18** : 4839-4853, 2012

New cancer cachexia rat model generated by implantation of a peritoneal dissemination-derived human stomach cancer cell line

Kiyoshi Terawaki,^{1,5} Yumi Sawada,¹ Yohei Kashiwase,^{1,3} Hirofumi Hashimoto,⁴ Mitsuhiro Yoshimura,⁴ Masami Suzuki,¹ Kanako Miyano,¹ Yuka Sudo,^{1,3} Seiji Shiraishi,¹ Yoshikazu Higami,³ Kazuyoshi Yanagihara,² Yoshio Kase,⁵ Yoichi Ueta,⁴ and Yasuhito Uezono¹

¹Division of Cancer Pathophysiology, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan; ²Division of Translational Research, Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan;

³Laboratory of Molecular Pathology and Metabolic Disease, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Chiba, Japan; ⁴Department of Physiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan; ⁵Tsumura Research Laboratories, Tsumura & Co., Ibaraki, Japan

Submitted 1 March 2013; accepted in final form 5 December 2013

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* 306: E373–E387, 2014. First published December 17, 2013; doi:10.1152/ajpendo.00116.2013.—Cancer cachexia (CC), a syndrome characterized by anorexia and body weight loss due to low fat-free mass levels, including reduced musculature, markedly worsens patient quality of life. Although stomach cancer patients have the highest incidence of cachexia, few experimental models for the study of stomach CC have been established. Herein, we developed stomach CC animal models using nude rats subcutaneously implanted with two novel cell lines, i.e., MKN45c185, established from the human stomach cancer cell line MKN-45, and 85As2, derived from peritoneal dissemination of orthotopically implanted MKN45c185 cells in mice. Both CC models showed marked weight loss, anorexia, reduced musculature and muscle strength, increased inflammatory markers, and low plasma albumin levels; however, CC developed earlier and was more severe in rats implanted with 85As2 than in those implanted with MKN45c185. Moreover, human leukemia inhibitory factor (LIF), a known cachectic factor, and hypothalamic orexigenic peptide mRNA levels increased in the models, whereas hypothalamic anorexigenic peptide mRNA levels decreased. Surgical removal of the tumor not only abolished cachexia symptoms but also reduced plasma LIF levels to below detectable limits. Importantly, oral administration of rikkunshito, a traditional Japanese medicine, substantially ameliorated CC-related anorexia and body composition changes. In summary, our novel peritoneal dissemination-derived 85As2 rat model developed severe cachexia, possibly caused by LIF from cancer cells, that was ameliorated by rikkunshito. This model should provide a useful tool for further study into the mechanisms and treatment of stomach CC.

cachexia; leukemia inhibitory factor; rikkunshito; stomach cancer model; anorexia

CANCER CACHEXIA, A MULTIFACTORIAL SYNDROME characterized by anorexia and the loss of body weight, adipose tissue, and skeletal muscle, is observed in 80% of advanced cancer patients and accounts for at least 20% of cancer-related deaths (20, 35, 42). This syndrome causes not only poor quality of life (QOL) but also poor responses to chemotherapy, highlighting the need for improved cancer cachexia treatments. Weight loss,

the most prominent clinical feature of cachexia, is observed in 30–80% of cancer patients, depending on tumor type. For example, weight loss occurs at a very high frequency (83%) in stomach and pancreatic cancer patients but is less prominent in patients with breast cancer, acute nonlymphocytic leukemia, and sarcomas (35). Although cachexia strongly impacts the success of therapeutic treatments, the mechanisms underlying this syndrome are not fully understood. Stomach cancer patients in particular have the highest incidence of cachexia; however, few experimental models for the study of stomach cancer cachexia have been established (4, 14, 66).

A useful cachexia model must meet three of the following five diagnostic criteria in addition to weight loss: anorexia, decreased muscle strength, fatigue, low fat-free mass (FFM) index, and abnormal biochemistry (anemia, increased inflammatory markers, and low serum albumin) (14). Moreover, Argilés et al. (1) reported that two specific indicators, anorexia and metabolic disturbances, should be identified before arriving at a diagnosis of cachexia-associated weight loss. Although body weight maintenance is the most important end point of any cachexia treatment, body composition and QOL should also be monitored (1). Accordingly, anorexia and body composition are very important in both the diagnosis and treatment of cachexia and should be present in any experimental model designed to study this syndrome.

To address the need for an experimental stomach cancer cachexia animal model, we previously screened 15 human stomach cancer cell lines for their ability to induce weight loss in mice after subcutaneous implantation (63). Among the cell lines that were screened, only the MKN-45 cell line induced body weight loss, with an incidence of 40% in tumor-bearing mice (63). On the basis of these findings, we established two novel cell lines from MKN-45 cells: MKN45c185 and 85As2 (63). Implantation of MKN45c185 cells induces body weight loss in mice with 100% efficiency. The 85As2 cell line, derived from peritoneal metastasis of orthotopically implanted MKN45c185 cells, has a strong capacity to induce peritoneal dissemination and body weight loss (100% efficiency) in mice.

Anorexia is a key factor in both the diagnosis and treatment of cachexia. Appetite facilitation reinforces physical strength and improves QOL. Thus, anorexia is very important for the evaluation of cachexia. In our previous mouse model, evaluation of cachexia based on weight loss was possible, whereas anorexia could not be used to assess cachexia because of instability in the reduction of food consumption (63). There-

Address for reprint requests and other correspondence: K. Terawaki, Div. of Cancer Pathophysiology, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan (e-mail: kterawak@ncc.go.jp).

fore, our mouse cachexia model was not suitable to evaluate drug efficacy or mechanisms of cachexia-associated anorexia. To address this problem, we aimed to establish two novel stomach cancer cachexia models by implanting MKN45c185 and 85As2 cell lines into nude rats. We determined the usefulness of these cancer cachexia models in evaluating anorexia, body composition changes (including low FFM), and weight loss. Moreover, body composition changes, including low FFM, are useful in elucidating the mechanisms of anorexia associated with stomach cancer cachexia. To investigate the underlying mechanisms of cachexia in these models, plasma levels of cytokines known to be involved in cancer cachexia development, such as interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor (TNF) α , and leukemia inhibitory factor (LIF) (13, 19, 40, 58), were also evaluated. Because the hypothalamus is a key regulator of energy homeostasis and a major site for the integration of metabolic signals in the central nervous system, the expression of hypothalamic feeding-regulating peptides was determined. In addition, the expression of the muscle-specific E3 ubiquitin ligases atrogin-1/muscle atrophy F-box (MAFbx) and muscle RING finger 1 (MuRF-1), which are important mediators of skeletal muscle loss, was also evaluated (6, 25).

To assess the efficacy of our novel stomach cancer cachexia rat models in evaluating treatment outcomes, we examined the impact of rikkunshito therapy on cachexia-associated symptoms in these models. Rikkunshito has been approved by the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan and is widely prescribed as a remedy for various gastrointestinal syndromes, such as anorexia, dyspepsia, and gastritis (29, 44). Rikkunshito was found to improve anorexia symptoms in a double-blind study of patients with functional dyspepsia (29). Additionally, increasing evidence from experimental animal models has shown that rikkunshito ameliorates several types of anorexia (23, 24, 57). It has been reported that with rikkunshito there is an increase in the secretion of the orexigenic hormone ghrelin by the inhibition of 5-HT_{2B/2C} receptors, an enhancement of ghrelin receptor (GHSR) signaling efficiency, and a facilitation of gastric emptying and gastric adaptive relaxation, all of which may contribute to ameliorate anorexia (24, 32, 57, 60, 64). Herein, we examined specifically the efficacy of rikkunshito in ameliorating anorexia symptoms in our novel cancer cachexia rat models.

MATERIALS AND METHODS

Animal experimentation. Six-week-old male F344/NJcl-rnu/rnu rats (Clea-Japan, Tokyo, Japan) were housed individually under a 12:12-h light-dark cycle (lights on at 0800) at a constant temperature and humidity, with ad libitum access to food and water. Rats were allowed to acclimate to laboratory conditions for 2 wk prior to experimentation. All studies were performed according to the Guidelines for Animal Experiments drafted by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the National Cancer Center and approved by the committee (approval nos. T09-050-M02 and T09-050-C04), and they met the ethical standards required by the law and the guidelines concerning experimental animals in Japan.

Cell lines and culture conditions. MKN45c185 and 85As2 cell lines were established from the human stomach MKN-45 cancer cell line, as described previously (63). Cells were maintained in RPMI 1640 medium (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100 IU/ml penicillin G

sodium, and 100 μ g/ml streptomycin sulfate (Nacalai Tesque) under a 5% CO₂ and 95% air atmosphere at 37°C.

Tumor cell implantation. MKN45c185 and 85As2 cells were harvested from subconfluent cultures after brief exposure to 0.25% trypsin and 0.2% ethylenediaminetetraacetic acid. Cells were washed once in serum-free medium and resuspended in phosphate-buffered saline. Anesthetized rats were subcutaneously inoculated with either 1×10^6 - 10^7 cells/site (tumor-bearing rats) or saline alone (non-tumor-bearing control rats) in the left and right flanks. The major and minor tumor axes were measured, and the tumor volume was estimated using the following equation: tumor volume (cm³) = major axis (cm) \times minor axis (cm) \times minor axis (cm) \times 1/2, and tumor volume was converted to tumor weight (mg)/mm³ (14, 17, 66).

Rat model characterization. Body weight and composition, organ tissue weight, food and water consumption, and grip strength were evaluated in each model. Body weight and food and water consumption were measured weekly. Body composition was determined using the ImpediVET Bioimpedance Spectroscopy device (ImpediMed, Brisbane, Australia) to accurately measure FFM, fat mass (FM), and total body water (TBW) (52). Blood collected from the abdominal aorta was centrifuged (3,000 rpm, 10 min), and the plasma was stored at -80°C until analysis. Organ tissues were immediately dissected and weighed. Gastrocnemius muscle tissue was fixed with 10% formalin and embedded in paraffin for histological analysis. Cross sectional area, perimeter, Feret diameter, and minimum Feret diameter were calculated using Image J software (15). Grip strength was measured using a grip strength meter for rats and mice (MK-380CM/F; Muromachi Kikai, Tokyo, Japan).

Tumor removal experiment. Anesthetized rats were subcutaneously inoculated with either 85As2 1×10^7 cells/site (tumor-bearing rats) or saline alone (non-tumor-bearing control rats) in the left and right flanks. Tumor growth, body weight, and food and water intake were measured weekly. Cancer cachexia clearly developed in tumor-bearing rats 2 wk after implantation. After that, tumor-bearing cancer cachectic rats were divided into two groups; one group was not treated and the other group had their tumors removed. Tumors were removed with surgical scissors, and the incision was closed using a surgical needle and sutures under anesthesia. The body composition was measured at weeks 0 (before tumor implantation), 2 (before tumor removal), and 4 and 5 (after tumor removal). Grip strength was measured, and the plasma and gastrocnemius muscle were collected 5 wk after implantation.

Real-time polymerase chain reaction. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed as described previously (56). Briefly, the hypothalamic area was dissected on an ice-cold metal plate, and total RNA was isolated using an Isogen kit (Nippon Gene, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was reverse transcribed from 5 μ g of total RNA using the SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA) in a final volume of 100 μ l. Diluted cDNA (2 μ l) was amplified in a rapid thermal cycler (LightCycler; Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) using LightCycler 480 SYBR Green I Mastermix (Roche, Barcelona, Spain) and the following primers: atrogin-1/MAFbx 5'-GAA GAC CGG CTA CTG TGG AA-3' (forward) and 5'-ATC AAT CGC TTG CGG ATC T-3' (reverse), MuRF-1 5'-AGG ACT CCT GCC GAG TGA C-3' (forward) and 5'-TTG TGG CTC AGT TCC TCC TT-3' (reverse), forkhead box O1 (Foxo-1) 5'-TCA GGC TAG GAG TTA GTG AGC A-3' (forward) and 5'-AAG GAG GGG TGA AGG GCA TC-3' (reverse), Foxo-3 5'-CTC AGC CAG TGG ACA GTG AA-3' (forward) and 5'-GCT CTG GAG TAG GGA TGC TG-3' (reverse), Foxo-4 5'-GCC GAG CCT GTC CTT ATC CA-3' (forward) and 5'-TTG AGT GTG TGA CCA CCT ATC CCT A-3' (reverse), IGF-I 5'-GCA CTC TGC TTG CTC ACC TTT A-3' (forward) and 5'-TCC GAA TGC TGG AGC CAT A-3' (reverse), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 5'-CCC CCA ATG TAT CCG TTG TG-3' (forward) and 5'-TAG CCC AGG ATG CCC TTT AGT-3' (reverse). PCR products were quantified using Light-