

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

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者	上園 保仁	(国立がん研究センター研究所)
研究分担者	乾 明夫	(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)
	上田 陽一	(産業医科大学医学部)
	塚田 俊彦	(国立がん研究センター研究所)
	藤宮 峯子	(札幌医科大学医学部)
	樋上 賀一	(東京理科大学薬学部)
	河野 透	(旭川医科大学)
	大西 俊介	(北海道大学大学院医学研究科)
	櫻木 範明	(北海道大学大学院医学研究科)

平成25(2013)年5月

## 目 次

・ 総括研究報告	
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 上園 保仁	----- 1
・ 分担研究報告	
1 . 六君子湯、大建中湯が抗がん剤の副作用、がん悪液質の改善にいたるメカニズムの解明と臨床研究結果の解析 上園 保仁	----- 25
2 . 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イズドコントロールスタディ及びそのとりまとめ 乾 明夫	----- 35
3 . 六君子湯、大建中湯のがん悪液質に及ぼす効果の中樞への関与の解析 上田 陽一	----- 39
4 . 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 塚田 俊彦	----- 43
5 . 六君子湯、大建中湯のがん悪液質（特に消化器症状）に対する効果の基礎実験 藤宮 峯子	----- 47
6 . がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響 樋上 賀一	----- 49
7 . 大建中湯の消化器症状に対する効果の基礎ならびに臨床研究 河野 透	----- 53
8 . 六君子湯、大建中湯のがん悪液質（特に消化器症状）に対する効果のランダムイズドコントロールスタディ 大西 俊介	----- 57
9 . 六君子湯による抗がん剤の副作用軽減効果の第 2 相臨床研究の実施 櫻木 範明	----- 61
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 63
・ 研究成果の刊行物・別刷	----- 67

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）  
総括研究報告書

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

研究代表者 上園 保仁 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

研究要旨 本研究は、漢方薬である六君子湯・大建中湯の作用メカニズムを基礎レベルで明らかにすること、ならびに同漢方薬の有効性をランダムイズドコントロールスタディ（RCT）を含む臨床研究を用いて明らかにするものである。

基礎研究においては、ヒトがん悪液質診断基準を満たす複数のがん悪液質モデル動物を作製し、悪液質改善に対する六君子湯の効果を調べた。六君子湯は末梢および中枢に働き、特に食思改善ペプチド、グレリンシグナルを高めることにより摂食量を改善し、体重低下を抑制することがわかった。グレリンシグナルの亢進作用は、六君子湯の陳皮成分ヘスペリジンがグレリン分泌を促すこと、ならびに蒼朮成分のアトラクチロジンがグレリン受容体の感受性を高めることによることを、動物モデルならびに細胞実験により明らかにした。さらに、シスプラチンで起こる消化器の異常運動ならびに食思不振症状は、六君子湯より改善されることを動物実験により明らかにした。加えて、六君子湯はがん悪液質による脂肪酸合成抑制を解除することを明らかにし、さらに副腎髄質機能、下垂体機能を調節している可能性も明らかにした。一方、大建中湯の成分は、臨床で用いられる血中レベルと同等の濃度で、培養細胞のアラキドン酸代謝酵素をさまざまなステップで抑制し、プロスタグランジンE2を特異的に抑制することを明らかにし、がんで起こるさまざまな体内の炎症を抑制する可能性を明らかにした。

臨床研究においては、がん悪液質による食思不振などの症状改善、ならびに抗がん剤で起こる消化器症状の改善に六君子湯が有効であるかを明らかにするため、北海道大学および道内の協力病院（14病院）において、手術不能がん患者を対象とした六君子湯の食思不振、体重減少の改善効果を調べる臨床試験プロトコールを作成し、本年度より患者登録を開始した（40例予定中、現在5例）。さらに子宮がん患者のシスプラチンによる嘔気嘔吐の改善に及ぼす六君子湯の効果についての臨床研究プロトコールも完成させ、次年度患

者登録開始予定の運びである。これら2つの臨床試験は、班内に設置した「プロトコル審査委員会」および「効果・安全性評価委員会」の支援のもと、行っている。

#### 研究分担者

乾 明夫 鹿児島大学大学院医歯学  
総合研究科 教授  
上田 陽一 産業医科大学医学部  
教授  
塚田 俊彦 国立がん研究センター研  
究所 分野長  
藤宮 峯子 札幌医科大学医学部  
教授  
樋上 賀一 東京理科大学薬学部  
教授  
河野 透 旭川医科大学  
客員准教授  
大西 俊介 北海道大学大学院医学研  
究科 助教  
櫻木 範明 北海道大学大学院医学研  
究科 教授

#### A. 研究目的

平成19年よりがん対策基本法が施行、次いで第一期がん対策推進基本計画が策定、さらに平成24年5月には第二期がん対策推進基本計画が閣議決定され、がん患者の生活の質（Quality of Life, (QOL)）の維持向上のための緩和医療ならびにその進展のための研究が推進されているところである。しかしなお、その対応が遅れているのが、終末期がん患者に多く見られる「がん悪液質」の症状改善対策、ならびに抗がん剤による悪心嘔吐等の副作用対策である。これらは、がん患者の生命予後やQOL向上のために重要であるにも関わらず、治療法や研究法が十分に確立されていない。

近年漢方薬である六君子湯が、機能的ディスペプシアや抗がん剤による食欲不振を改善させること、また食思改善ペプチドであるグレリンの分泌を促進しグレリンシグナルを促進させることが明らかとなり、六君子湯の消化器症状改善効果が注目されている。さらに抗がん剤の悪心嘔吐、便秘に大建中湯が有効であることがエビデンスを持って示されてきた。

本研究では、がん患者の抗がん剤療法による副作用の改善、並びにがん悪液質の症状改善に、六君子湯・大建中湯が有効であるかどうかを、動物モデルならびに培養細胞を用いて作用メカニズムを明らかにする。加えてランダムイズドコントロールスタディ（RCT）を中心とした六君子湯、大建中湯の臨床研究を行い、同薬の臨床における効果を科学的に立証することとした。

#### 1. 六君子湯、大建中湯が抗がん剤の副作用、がん悪液質の改善にいたるメカニズムの解明と臨床研究結果の解析

近年、漢方薬である六君子湯が抗がん剤による食欲不振改善効果を有すること、また食思改善ペプチドであるグレリンの分泌を促進することが報告され、六君子湯のがん領域における消化器症状改善効果が注目されている。

昨年度までの研究において、低分化型ヒト胃がん細胞株（MKN-45）由来の85As2細胞の皮下移植により、悪液質に特徴的な症状を示すがん悪液質モデル

ラットを確立した。

本年度は、同新規がん悪液質モデルを用いて、六君子湯が摂食改善に有効であるか否かを、予防的観点、あるいは治療的観点の両者を考慮し、予防投与、並びに食思不振発症後での投与方法を計画した。同実験を通じて、六君子湯が食事改善に有効かどうかを評価し、さらにその作用メカニズムを明らかにするため、がん悪液質動物病態生理および六君子湯のグレリン受容体に対する作用をin vitroの評価系を用いて解析した。

## **2．六君子湯、大建中湯のがん悪液質に対する効果のランダムイズドコントロールスタディ及びそのとりまとめ**

分担項目は、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イズドコントロールスタディ及びそのとりまとめであり、本年度も六君子湯を中心に、動物実験を施行し、臨床研究の評価項目設定のための基礎研究を継続した。動物実験による六君子湯の研究は、悪液質におけるグレリン抵抗性メカニズムの解明に加え、担がんモデル動物の寿命延長効果に対する六君子湯の作用機構の解明を目的とした。

## **3．六君子湯、大建中湯のがん悪液質に及ぼす効果の中樞への関与の解析**

今年度は、代表的な抗がん剤であるシスプラチンの摂食抑制作用に対する六君子湯の効果のメカニズムを視床下部摂食関連ペプチドの動態および血中の液性因子を指標として神経回路・分子基盤から解明することを目的とした。

## **4．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**

六君子湯は種々の原因による食思不振の治療に用いられており、がん悪液質の軽減にも有効性が期待される。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。今年度は、下垂体細胞に対する六君子湯の影響を検討した。

## **5．六君子湯、大建中湯のがん悪液質（特に消化器症状）に対する効果の基礎実験**

シスプラチンなどの抗がん剤でおこる嘔吐は患者のQOLを著しく障害する。嘔吐改善には5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗剤が用いられるが、便秘などの副作用が避けられない。我々は昨年、六君子湯はシスプラチンで起こる上部消化管運動の異常を改善することを報告した。そのメカニズム解明のため、六君子湯が嘔吐の原因であるEC細胞からのセロトニン分泌を直接抑制するかどうかを調べた。

## **6．がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響**

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（摂食量はがん悪液質モデルとほぼ同

じ)、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点を明らかにする。

## 7. 大建中湯の抗炎症作用のメカニズム解明

抗がん剤の悪心嘔吐、便秘に大建中湯が有効であることがエビデンスを持って示されてきた。

さらに、大建中湯の薬効機序を分子レベルで解析した結果、吸収された大建中湯の有効成分、山椒のsanshools、乾姜のshogaols/gingerolsがカルシトニン関連ペプチドを介して炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗炎症性作用を発揮している機序が明らかとなり、加えてこれら有効成分が体内に吸収されることも明らかとなった。本研究は進行がんによる炎症や痛みに対する大建中湯の臨床応用、ひいてはQOL向上につながる臨床処方としての確立をめざすために、大建中湯の体内機序解明を目的とした。

## 8. 六君子湯の食思増進に及ぼす効果の検討、ならびに抗がん剤およびがん悪液質による食思不振に対する効果についての臨床研究

昨年度は、がん患者のQOL向上のためのエビデンスを確立するため、隣がん患者の悪液質改善における六君子湯の効果を調べる臨床試験プロトコルを完成させた。本年度は、実際に臨床試験を開始した。さらに子宮がんに対

するシスプラチン療法における嘔気嘔吐に六君子湯が有効であるかの臨床試験を行うべくプロトコル作成を行った。

## B. 研究方法

### 1. 六君子湯、大建中湯が抗がん剤の副作用、がん悪液質の改善にいたるメカニズムの解明と臨床研究結果の解析

#### 1) 新規がん悪液質モデルラットの病態生理研究

85As2細胞における悪液質誘発能増強メカニズム

##### (i) DNAマイクロアレイ

MKN45clone85および85As2細胞の細胞抽出液を用いて、DNAマイクロアレイ (Agilent Whole Human Genome Array、解析ソフト: GeneSpringGX11.5) を実施した。有意な増加を示した遺伝子については、Pathway Studio® (Elsevier) によるパスウェイ解析を行った。

##### (ii) 細胞培養上清中サイトカイン

MKN45clone85および85As2細胞を24あるいは48時間培養した上清中のhuman IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α、およびLIFをProcarta® cytokine assay kit (Affymetrix Billerica) で測定した。

腫瘍摘出の悪液質症状におよぼす影響

85As2細胞移植2週後 (悪液質症状発症後)、麻酔下で腫瘍を摘出し、縫合後に飼育ケージに戻した。細胞移植前からの体重、摂食量および飲水量を毎週測定した。また、5週後に筋肉・脂肪組織重量を測定、血液サンプルを採取後、血中human LIFを測定した。

##### 呼吸代謝の測定

85As2細胞移植4週後のラットの呼吸

商 (= 単位時間当たりの二酸化炭素排出量 ÷ 単位時間当たりの酸素消費量)、自発運動量および体重当たりのカロリー消費量を小動物用代謝計測システム MK-5000RQ (室町機械) で測定した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

#### 筋肉分解因子の測定

85As2細胞移植4週後のラットの腓腹筋を採取し、ホモジネート後、ISOGEN (Nippon gene Co., Ltd.) により total RNA を抽出し、Real-time polymerase chain reaction (PCR) により、E3 ubiquitin ligases である Atrogin-1/MAFbx、MuRF-1 を測定した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

#### in situ ハイブリダイゼーション

85As2細胞移植4週後のラットを断頭後、脳を取り出して凍結切片を作製した。RI(<sup>35</sup>S)標識したオリゴ合成DNAプローブを用いて in situ ハイブリダイゼーション法により視床下部 paraventricular nucleus (PVN)、arcuate nucleus (ARC)、および lateral hypothalamic area (LHA) における摂食促進ペプチド neuropeptide Y (NPY)、agouti-related protein (AgRP) および orexin (ORX) 遺伝子、摂食抑制ペプチド proopiomelanocortin (POMC)、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)、corticotropin-releasing hormone (CRH) および melanin-concentrating hormone (MCH) 遺伝子の発現をフィルムオートラジオグラフィおよび画像解析装置 (MCID) により定量化した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

#### グレリン投与による摂食亢進作用

85As2細胞移植2週後(悪液質発症後) グレリン (10nmol, i.p.) または生理食

塩水を投与し、投与後1時間までの摂食量を測定した。対照群として、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物にグレリンまたは生理食塩水を同量投与した。悪液質群および対照群それぞれの群で、生理食塩水およびグレリン投与による影響を比較した。

#### 血中グレリン濃度測定

85As2細胞移植3または4週後のラットの腹部大静脈から血液を採取し、血中グレリン濃度をELISAにより測定した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

2) 新規がん悪液質モデルラットに対する六君子湯の予防的効果および治療的効果の検討

#### 六君子湯の予防的効果の検討

85As2細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を左右腹部に皮下移植後、体重、摂食量を毎週測定した。六君子湯1%混餌を、がん細胞移植1週間前から自由摂取で実験終了まで与えた。対照群 (85As2+CE-2) および正常群 (Saline+CE-2) には、通常食 (CE-2、日本オリエンタル酵母) を与えた。

#### 六君子湯の治療的効果の検討

85As2細胞 ( $1 \times 10^7$  cells) を左右腹部に皮下移植後、体重、摂食量を毎週測定した。0、2および3週後に、体組成(除脂肪量・脂肪量・体水分量)を ImpediVET™ Bioimpedance Spectroscopy device (ImpediMed Limited) で測定した。悪液質発症後(がん細胞移植2週後)から、六君子湯1g/kg/day を1日2回7日間経口投与した。対照群 (85As2+distilled water) および正常群 (saline+distilled water) には、同量の蒸留水を与えた。実験終了後、腹部大静脈から血液を採取し、ELISAキットに

より血中グレリン濃度を測定した。また、筋肉(大胸筋、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋)および脂肪重量(精巣上体・腎臓・腸間膜周辺)を測定した。

### 3) 六君子湯のグレリン受容体シグナルに対する作用

humanグレリン受容体(GHS-R)安定発現HEK293T細胞あるいはratGHS-R安定発現COS細胞を用いた。GHS-R安定発現細胞に対し、六君子湯エキス(10-100 $\mu$ g/ml)またはアトラクチロジン(1-30 $\mu$ M)を前処置(2-60分間)し、グレリン( $3\times 10^{-10}$ - $1\times 10^{-7}$ M)添加後のGq蛋白共役型GPCR(G protein-coupled receptor)特異的シグナルを細胞内カルシウム濃度可視化アッセイ並びにラベルフリーセルベースアッセイシステム(CellKey<sup>TM</sup>システム)を用いて測定し、六君子湯によるグレリン受容体シグナルへの影響をin vitroで検討した。

## 2. 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イズドコントロールスタディ及びそのとりまとめ

動物実験は、我々が以前に報告した吉田肝がん細胞の担がんモデルラットで、六君子湯の悪液質改善効果を体重減少、摂食量減少、筋肉量減少、消化管運動などに加え、生存延長効果とその作用機序に焦点を当てて解析を行い、マウス大腸がん細胞の担がんモデルマウスでも生存延長効果を観察した。

## 3. 六君子湯、大建中湯のがん悪液質に及ぼす効果の中樞への関与の解析

成熟雄性ウイスター系ラットに生理食塩水もしくは抗がん剤のシスプラチ

ン(6 mg/kg体重)を腹腔内投与して24、48、72時間後の体重、摂食量、飲水量および尿量を測定した。なお、シスプラチン投与前に2回にわたり蒸留水もしくは六君子湯(1g/kg体重)の経口投与を行った。視床下部摂食関連ペプチド遺伝子の発現変化をISH法により定量化した。同時に採取した体幹血のグレリン濃度などを測定した。

## 4. 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

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)産生ラット下垂体培養細胞GH3を六君子湯及びアデニル酸シクラーゼの活性化薬forskolinで刺激し、細胞内cAMPを免疫学的測定法により定量した。さらに、ACTH mRNA及びGH mRNAを定量的PCR法により定量するとともに、AtT-20培養液中に放出されるACTHを免疫学的測定法により定量した。株式会社ツムラより供与された六君子湯粉末を10%(w/v)の水懸濁液として2分間煮沸抽出したものを六君子湯原液として用いた。

## 5. 六君子湯、大建中湯のがん悪液質(特に消化器症状)に対する効果の基礎実験

ラットにシスプラチン(5 mg/kg)およびvehicleを腹腔内投与し、30分後に採血。血清中のセロトニン濃度を測定した。さらに、シスプラチン投与2時間前に六君子湯(1g/kg)を経口投与。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



投与群でそれぞれ血中セロトニン濃度を比較検討した。

## 6. がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響

胃がん細胞接種による担がん悪液質(CC)モデルラットとCCラットへの六君子湯投与群、コントロールラットの白色脂肪組織において、形態学的解析、脂質分解系および脂肪酸合成系タンパク質発現、ミトコンドリア量および関連酵素活性を解析した。また、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において、同様の解析を行った。

## 7. 大建中湯の抗炎症作用のメカニズム解明

炎症および痛みの主要原因の一つであるプロスタグランジンE2に対して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で抑制できるかどうか培養細胞実験で検討を行う。ヒト培養上皮細胞に炎症性サイトカインやリポポリサッカライドで刺激し、プロスタグランジンE2産生を促し、山椒の sanshools、乾姜の shogaols/gingerols を添加による産生抑制効果を検証、またアラキドン酸代謝に関与する各種酵素群の発現を定量的PCRで比較検討した。

## 8. 六君子湯の食思増進に及ぼす効果の検討、ならびに抗がん剤およびがん悪液質による食思不振に対する効果についての臨床研究

当研究班で組織されるデータセンターならびに統計専門家らとともに、「ゲムシタピン投与群がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質進行抑制効果-無作為化第 相比較試験」のフルプロトコールを作成した。また、「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第 相比較試験」のフルプロトコールの作成を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は漢方薬である六君子湯、大建中湯の、細胞レベルでの作用機序解明および動物モデルを用いた実験、ならびにがん患者を対象とした臨床研究より構成される。

いずれの研究も、当該施設の動物実験倫理委員会、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。

基礎研究においては、各施設の実験動物倫理審査委員会ならびに遺伝子組み換え実験管理委員会の承認を得ている。

臨床試験においては、臨床研究計画について、研究支援組織の運営委員会と臨床試験審査会、および効果安全性評価委員会での承認後、参加各施設の倫理審査委員会の承認を受けることとした。

特に倫理面に配慮し、完成したフルプロトコールはプロトコール審査委員会に諮り承認を得たのち、各参加施設の倫理審査委員会での承認を得ることとした。また、被験者には十分な説明を行い、説明同意文書に署名をいただ

いてから開始し、補償のための保険にも加入した。

## C. 研究結果

### 1. 六君子湯、大建中湯が抗がん剤の副作用、がん悪液質の改善にいたるメカニズムの解明と臨床研究結果の解析

#### 1) 新規がん悪液質モデルラットの病態生理研究

85As2細胞における悪液質誘発能増強メカニズム

##### (i) DNAマイクロアレイ

MKN45clone85および85As2細胞のDNAマイクロアレイの比較において、全データに共通してDetectedもしくはCompromisedフラグを示した24,066プローブのうち、85As2細胞における有意な発現増加は、1832プローブ、有意な発現減少は2194プローブであった。有意な発現増加を示した遺伝子に対し、パスウェイ解析を行ったところ、85As2細胞ではtoll-like receptor (TLR)系のシグナルが活性化していた。

##### (ii) 細胞培養上清中サイトカイン

MKN45clone85および85As2細胞培養上清中のサイトカインは、IL-1 $\beta$ 、IL-6およびTNF- $\alpha$ は検出限界以下であった。両細胞培養上清中でIL-8およびLIFが10~1000pg/mlの範囲で検出された。細胞間の比較では、IL-8: MKN45clone85>85As2、LIF: MKN45clone85<85As2であった。

腫瘍摘出の悪液質症状におよぼす影響

85As2細胞移植によるがん悪液質モデルラットは、悪液質発症後からの腫瘍摘出により、体重、摂食量低下、飲水量低下、筋肉・脂肪組織重量低下な

どの悪液質症状が完全に回復した。血中LIF濃度は検出限界以下となった。

#### 呼吸代謝の測定

本悪液質モデルラットでは、対照群と比較して、活動期(21:00-翌朝7:00)の自発運動量が低下していた。さらに、悪液質モデルラットでは、自発運動量に差がない安静時(9:00-14:00)において、呼吸商が有意に高く、体重当たりのカロリー消費量が有意に亢進していた。

#### 筋肉分解因子の測定

がん悪液質モデルでは、Atrogin-1/MAFbxおよびMuRF-1が対照群と比較して有意に増加していた。

#### in situハイブリダイゼーション

がん悪液質モデルでは、摂食亢進ペプチド(NPY and AgRP in the ARC, ORX in the LHA) mRNAが増加、摂食抑制ペプチド(POMC and CART in the ARC, CRH in the PVN, MCH in the LHA) mRNAが減少していた。

#### グレリン投与による摂食亢進作用

グレリン投与により、対照(非担がん動物)群では、生理食塩水投与と比較して、有意な摂食量の増加が認められたが、悪液質モデルラットでは、グレリン投与による摂食量増加が認められなかった。

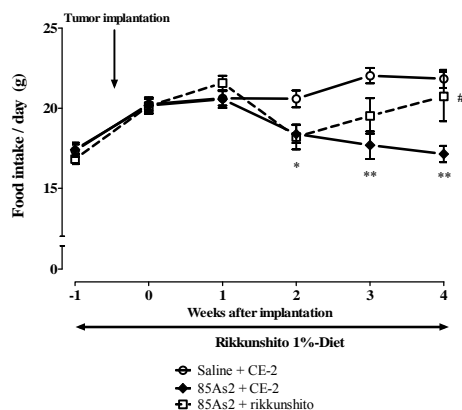
#### 血中グレリン濃度

悪液質モデルラットは、対照(非担がん動物)群と比較して血中グレリン濃度の有意に高い値を示した。

#### 2) 新規がん悪液質モデルラットに対する六君子湯の予防的効果および治療的効果の検討

85As2細胞移植ラットでは、移植2週目から有意な体重減少および有意な摂食量低下が認められ、悪液質の特徴的

な症状を示した(図1)。同群では、4週目でさらに摂食量が低下した。2週目から4週目にかけては、体重は減少しなかったものの、正常群との体重差は拡大した。これに対し、六君子湯1%混餌群では、体重には影響なかったが、移植4週目で摂食量低下の有意な改善が認められた(図1)。

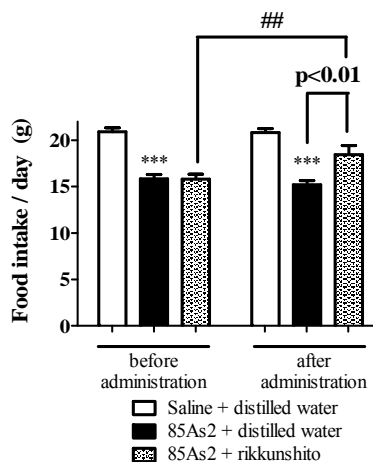


Each data represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 9-11 rats. The significant differences were evaluated using one-way ANOVA followed by post hoc Dunnett's Multiple Comparison Test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs Saline + DW group, and # $p < 0.05$  vs 85As2 + DW group

図1 がん悪液質モデルの摂食量低下に対する六君子湯の予防的効果の検討

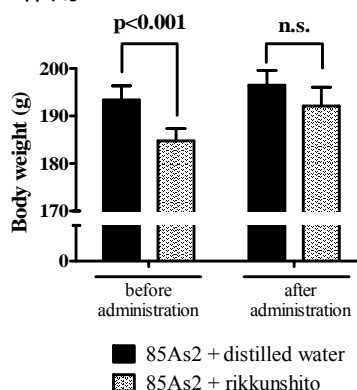
治療効果の検討において、85As2細胞移植ラットは、移植2週目から有意な体重減少および有意な摂食量低下が認められ、予防効果の検討条件よりも重篤な悪液質の症状を示した(図2)。85As2細胞移植+蒸留水投与群では、7日後の摂食量は低下したままであったが、六君子湯7日間投与群では、摂食量低下の有意な改善が認められた(図2)。さらに、85As2細胞移植+蒸留水投与群で認められた投与前後での有意な体重減少を六君子湯投与群は抑制し(図3)、体組成においても除脂肪量および体水分量を増加させ、筋肉量も増加させた。一方、六君子湯投与群は、悪液質群で上昇していた血中グレリン値に対して影響をおよぼさなかった。血中LIF値に

対する影響もおよぼさなかった。



Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-11 rats. The significant differences were evaluated using unpaired or paired t test: \*\*\* $p < 0.001$  vs post 85As2 + DW group (unpaired), and ## $p < 0.01$  vs pre 85As2 + Rikkunshito group (paired)

図2 がん悪液質発症後(摂食量低下)からの六君子湯投与による摂食量改善作用



Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-11 rats. The significant differences were evaluated using paired t test.

図3 六君子湯投与後の体重減少抑制効果  
3) 六君子湯のグレリン受容体シグナルに対する作用

CellKey™システムにおける測定において、GHS-R安定発現HEK293細胞へのグレリン添加により、Gq特異的シグナルが示された。六君子湯前処置により、本グレリン受容体シグナルの増強効果が認められた。

細胞内カルシウム濃度可視化アッセ

イにおいて、GHS-R安定発現COS細胞へのグレリン添加により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が示された。六君子湯前処置により、本グレリン受容体刺激細胞内カルシウムイオン濃度上昇の増強効果が認められた。さらに、六君子湯に含有される43成分のうちGHS-Rにbinding活性を示したアトラクチロジンは、六君子湯同様、グレリン受容体刺激細胞内カルシウムイオン濃度上昇の増強効果を示した (Data not shown)。

## 2. 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イズドコントロールスタディ及びそのとりまとめ

担がんモデルラットでは、体重減少、摂食量減少、筋肉量減少、消化管運動低下、サイトカインや炎症を反映する蛋白 (CRP) の増加を認めた。六君子湯は担がんモデルラットの体重減少、摂食量減少、筋肉量減少、消化管運動低下を改善し、CRPの増加を抑制した。担がんモデルラットの生存期間はグレリン受容体拮抗薬により短縮し、六君子湯や六君子湯の蒼朮の含まれるアトラクチロジンの投与により延長することが示された。また担がんモデルマウスでも六君子湯により生存期間が延長した。アトラクチロジンはグレリンシグナルを増強することが示されており、六君子湯の生存延長効果の一部はグレリンシグナルの増強によるものと考えられた。

## 3. 六君子湯、大建中湯のがん悪液質に及ぼす効果の中樞への関与の解析

蒸留水 + シスプラチン群において体

重および摂食量が有意に減少した。六君子湯 + シスプラチン群では、蒸留水 + シスプラチン群に比較して体重および摂食量が有意に増加し、蒸留水 + 生理食塩水群および六君子湯 + 生理食塩水群と有意差がなくなった。CRH、NPYは蒸留水 + シスプラチン群で有意に減少し、六君子湯 + シスプラチン群でコントロールレベルとなった。POMC、CART、MCH、orexinは蒸留水 + シスプラチン群で有意に増加し、六君子湯 + シスプラチン群でコントロールレベルとなった。active ghrelinは、六君子湯 + シスプラチン群においてのみ有意に増加していた。

## 4. 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

六君子湯は用量依存的に、下垂体細胞であるAtT-20及びGH3のcAMP濃度を上昇させるとともに、アデニル酸シクラーゼの活性化薬forskolinの作用を増強した。AtT-20細胞内のACTH前駆体POMC mRNAは、forskolin刺激により用量依存的な発現の増加傾向が認められた。六君子湯は、forskolin刺激のない場合にはPOMC mRNAを軽度誘導したが、3  $\mu$ M forskolinによるmRNAの発現誘導をむしろ抑制した。GH3細胞では、forskolinによるGH mRNAの発現誘導は認められず、また、六君子湯は3  $\mu$ M forskolin刺激時のmRNA量を抑制する傾向があった。全体として、六君子湯はホルモン遺伝子のmRNA量に一定方向の影響を及ぼさなかった。また、forskolinはAtT-20細胞からのACTH分泌を促進したが、六君子湯は明らかな影響を及ぼさなかった。

## 5. 六君子湯、大建中湯のがん悪液質（特に消化器症状）に対する効果の基礎実験

昨年度の研究にてシスプラチン投与で胃の空腹期運動が消失し、異常な胃運動の亢進を認め、シスプラチンで誘発される空腹期運動の消失は六君子湯の投与で回復すること、またシスプラチン投与後に見られる異常な胃運動亢進も六君子湯の投与で回復することを明らかにしている。これらの結果は、シスプラチンによりEC細胞より分泌されるセロトニンの効果を六君子湯が抑制するためと考えられている。実際セロトニンの動態をしらべたところ、正常対照群の血中セロトニン濃度は、 $598.7 \pm 106.7$  ng/ml (n=5)、六君子湯単独投与群は、 $841.0 \pm 115.6$  ng/ml (n=5) で正常対象群と有意差はなかったが、シスプラチン単独投与群は、 $1492.5 \pm 231.2$  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、 $717.5 \pm 85.7$  ng/ml (n=5) で、シスプラチン投与群より有意に減少 (P<0.05) し、正常レベルに戻ることが明らかとなった。

## 6. がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響

昨年度のプロテオーム解析により、カロリー制限 (CR) 動物モデルの白色脂肪組織においては、脂肪酸合成関連タンパク質、ピルビン酸/リンゴ酸回路関連タンパク質、ミトコンドリア関連

タンパク質の発現が亢進すること、citrate synthase 活性及び cytochrome c oxidase 活性が亢進することを見出した。上記の発現変化や酵素活性変化を2種の悪液質モデル (CC) で比較したところ、CRにより増加した fatty acid synthase の発現が抑制されていることを明らかにした。この抑制は六君子湯の投与により改善傾向を示した。

今年度は、さらに詳しい解析を行った。CCおよび70%CR動物における脂肪細胞のサイズは有意に減少したが、30%CRでは変化はなく、六君子湯による影響も見られなかった。また、脂質分解関連タンパク質発現はCC、30%CR、70%CRともに有意に増加したが、六君子湯は効果を引き起こさなかった。

一方、脂質合成関連タンパク質の発現はCCと70%CRでは有意に減少したが、六君子湯の投与により減少改善される傾向にあった。さらに、30%CRにおいては有意に増加した。

ミトコンドリアDNA量は、30%CRではDNA量に変化が見られず、CCおよび70%CRでは有意に減少した。六君子湯はDNA量に影響を与えなかった。ミトコンドリア関連酵素活性については、CCでは変化なく、六君子湯による影響も見られなかったが、CRモデルではその程度に比例して活性を有意に増加させた。

## 7. 大建中湯の抗炎症作用のメカニズム解明

大建中湯には3種類 (山椒、乾姜、人參) の抽出生薬成分が含まれているが、特に、乾姜の shogaols が  $0.1 \mu\text{mol/L}$  という低濃度でプロスタグランジンE2を80%近く減少させることを明らかにし

た。その機序として生体膜のリン脂質をアラキドン酸に変換する細胞質型ホスホリパーゼA2、アラキドン酸からプロスタグランジンG2に変換するCOX2、最終的にプロスタグランジンE2に変換するプロスタグランジンE合成酵素を抑制することを明らかにした。生体防御に重要なCOX1に関して抑制効果は認められなかった。

## 8 . 六君子湯の食思増進に及ぼす効果の検討、ならびに抗がん剤およびがん悪液質による食思不振に対する効果についての臨床研究

「ゲムシタビン投与時がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質進行抑制効果-無作為化第 Ⅰ 相比較試験」については、フルプロトコールが完成し、プロトコール審査委員会の承認を得て、平成24年4月に参加各施設とともにキックオフミーティングを行った。同年5月に実質的な研究責任機関である北海道大学病院の自主臨床研究事務局の審査委員会の承認を得た。同年8月より登録開始可能となった。平成25年4月現在、5例の登録となっている。一方、「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第 Ⅰ 相比較試験」については、フルプロトコールが完成し、平成25年3月にプロトコール審査委員会の承認を得た。現在、北海道大学病院の自主臨床研究事務局の審査委員会に提出し、審査中であり、承認後直ちに患者登録へと進む。

### D . 考察

## 1 . 六君子湯、大建中湯が抗がん剤の副作用、がん悪液質の改善にいたるメカニズムの解明と臨床研究結果の解析

ヒト胃がん腹膜播種性転移株85As2により作製したモデルラットは、悪液質に特徴的な症候を示し、臨床でのがん悪液質研究の診断基準を反映していた。

同悪液質ラットモデルは、腫瘍摘出により悪液質症状が消失し、血中LIF値も検出限界を示した。さらに、細胞自体がLIFを産生することから、本モデルにおける悪液質症状発症は、腫瘍由来であり、LIFが起因子のひとつまたはバイオマーカーとなる可能性が示唆された。一方、MKN45clone85および85As2細胞はIL-8産生を示したが、悪液質動物の血中では検出されなかったため、直接の悪液質誘発因子ではないと考えられた。

細胞のDNAマイクロアレイの結果から、発現上昇している遺伝子群および減少している遺伝子群が多数示され、パスウェイ解析によりTLRシグナルが活性化していることが示唆された。TLR4あるいはTLR5リガンド刺激により、85As2細胞がLIF産生を亢進することを確認しており、TLRシグナル活性化が悪液質誘導能に寄与する可能性が示唆された。

本モデルでは、体重当たりのカロリー消費が高く、筋肉分解因子の亢進も確認されたことから、摂食量低下に加え、亢進したエネルギー消費が悪液質の発症の一因となる可能性を示唆している。加えて、摂食量が低下しているにも関わらず、摂食亢進ペプチドであるグレリンは、血中で高値を示していた。本結果は、ヒトがん悪液質の臨床

データと一致する。本モデルでは脳内摂食亢進ペプチドが増加し、摂食抑制ペプチドは減少しているにも関わらず摂食量が低下しており、さらに、グレリン投与による摂食行動が抑制されていたことから、本モデルにおいてグレリン抵抗性が惹起されている可能性が考えられた。

六君子湯はがん細胞移植前からの予防的な投与においても、がん悪液質発症後からの治療的投与においても、摂食量低下を有意に改善した。また、悪液質の進行による体重低下を抑制した。

上述のように、本モデルではグレリン抵抗性が惹起されているにも関わらず六君子湯は改善作用を示した。六君子湯の改善作用メカニズムを検証すべく、六君子湯のグレリン受容体レベルでの検討を行った結果、細胞内カルシウム濃度、およびCellKey™アッセイにて、六君子湯はグレリン受容体シグナルを増強することを明らかにした。加えて、六君子湯を構成する8種類の生薬のひとつ、蒼朮に含まれるアトラクチロジンが、グレリン受容体にbinding活性を示し、さらに、六君子湯同様、グレリン受容体シグナルを増強したことから、六君子湯のグレリンシグナル活性成分のひとつである可能性が示唆された。

以上のことから、六君子湯は、より悪性度の高く、カロリー消費亢進およびグレリン抵抗性が起こっているがん悪液質モデルにおいて予防的にも治療的にも改善効果を示した。

以上、六君子湯の作用メカニズムのひとつにグレリン受容体シグナルの増強によるグレリン抵抗性の改善が関与している可能性が示唆された。本研究結果は、六君子湯の臨床での治療効果

を期待させるものであり、がん患者のQOL向上への貢献が期待できる。

## **2 . 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イズドコントロールスタディ及びそのとりまとめ**

がん性悪液質においては、グレリンの相対的分泌不全に加え、グレリン作用の減弱が特徴的である。研究分担者らは動物実験において、六君子湯が内因性のグレリンを刺激すると同時に、グレリンシグナルを増強し、その作用機序はがん性悪液質で亢進しているセロトニン(5-HT)-5-HT<sub>2c</sub>受容体拮抗作用が中心であることを見出したが、担がんモデルラットでグレリンシグナルの減弱が生存期間短縮に関わること、および六君子湯がこのグレリン抵抗性を改善して生存期間を延長することを複数の動物モデルで確認した。生存期間延長効果の一部が六君子湯に含まれるアトラクチロジンのグレリンシグナル増強作用によることを示した。

## **3 . 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**

今回、昨年度に見出した抗がん剤シスプラチン投与後の体重、摂食量の有意な減少および六君子湯の経口投与によるこれらの変化の有意な減弱を再確認した。次にこの六君子湯の作用機序について検討するため、視床下部摂食関連ペプチドの遺伝子発現について検討した。その結果、シスプラチン投与により摂食抑制ペプチドであるPOMC、CARTが弓状核において有意に増加し、摂食促進ペプチドであるNPYが有意に減少していたこと、および六君子湯の

投与によりこれらのペプチドの変化がコントロールレベルに回復していたことから、シスプラチン投与による摂食抑制作用および六君子湯の改善効果はこれらのペプチドの変化が原因となって引き起こされたことが示唆される。

摂食抑制ペプチドであるCRHの有意な減少、摂食促進ペプチドであるMCH、orexinの有意な増加については、シスプラチン投与によって生じた摂食抑制の結果生じたものと考えられる。さらに六君子湯による摂食抑制の改善効果は、六君子湯が血中active ghrelin濃度を増加させ、active ghrelinが視床下部に作用してPOMC、NPYをコントロールレベルに回復させた可能性が考えられる。

#### **4 . 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**

六君子湯は食欲改善の治療薬として、種々の病態において用いられるが、その効果の発現機序は必ずしも明らかではない。これまでの研究により、六君子湯が細胞内cAMPを増加させる成分を含むことが示されていること、また、種々のホルモンの産生・分泌がcAMP依存的事であることから、六君子湯は種々の内分泌細胞の機能に影響を及ぼす可能性がある。

下垂体のACTH産生細胞やGH産生細胞では、細胞内cAMPの上昇によりホルモン遺伝子の発現が誘導され、かつ細胞外へのホルモン放出が促進されることが知られている。本研究でも、AtT-20細胞のforskolinによる刺激実験では、既報の通り、cAMPの上昇とともにPOMC mRNAの増加とACTH分泌促進が認められた。一方、六君子湯による刺激で

はcAMP濃度上昇を認めたものの、遺伝子発現促進とACTH分泌には明瞭な一定方向の作用を認めなかった。以上のことより、六君子湯はcAMPを増加させるが、その他の機序によってもACTH産生下垂体細胞の機能に影響する可能性が考えられた。GH3細胞については、forskolinによるcAMP上昇を認めたが、GH遺伝子発現が増加せず、正常下垂体のforskolinに対する反応を再現できなかった。その理由は不明であるが、GH3細胞が下垂体腫瘍細胞であり、正常のGH産生下垂体細胞とは異なる遺伝子発現調節を受けていることも一因と考えられる。

#### **5 . 六君子湯、大建中湯のがん悪液質（特に消化器症状）に対する効果の基礎実験**

抗がん剤でおこる嘔吐は患者のQOLを著しく障害する。本来嘔吐は5-HT<sub>3</sub>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。平成24年度の研究で、六君子湯がシスプラチンで増加した血中セロトニン濃度を正常化させることが判明した。これまで、六君子湯とセロトニン分泌の研究はほとんどなされていなかったが、本研究成果は重要な示唆を与えるものである。

#### **6 . がん悪液質モデル動物末梢組織の解析と六君子湯、大建中湯投与による影響**

CCの白色脂肪組織は70%CRのそれ



と類似していたが、30%CRの白色脂肪組織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。また、CCと70%CRではミトコンドリア量が顕著に減少した結果、単位ミトコンドリアあたりの酵素活性が過度に増強している可能性が示唆されたが、30%CRではそのような変化は見られなかった。六君子湯によるミトコンドリアへの効果は観察できなかったが、CCにより減少した脂肪酸合成系タンパク質発現を増加させた。以上より、六君子湯によるCC病態の改善効果の一部はde novo脂肪酸合成の増加にある可能性が示唆された。

## 7. 大建中湯の抗炎症作用のメカニズム解明

体内に吸収された大建中湯の主要成分である山椒の sanshools、乾姜の shogaol が、トランジェントレセプターポテンシャルチャンネルというカルシウムチャンネルを介して抗炎症性サイトカイン、抗炎症作用があることを明らかにしてきた [Surgery 2009, J Crohn's Colitis 2010, J Gastroenterol 2011, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2013, Drug Metab Dispos 2011, Drug Metab Dispos 2013]。これら成分が痛みや炎症の原因であるプロスタグランジンE2産生を多標的に抑制する可能性があり、大建中湯ががん性疼痛や炎症を軽減できる可能性を探索することが本研究目的であり、漢方薬が合剤である意義を明らかにすることができると考えた。現在、がん領域における新規西洋薬の開発コストは天文学的数字である。抗がん剤の副作用やがん悪液質などに対する新規西洋薬の開発は困難な状況で

ある。本研究成果はがん領域で新たな臨床応用をコストをかけずに検証できる可能性が高く、西洋薬と漢方薬を併用できる日本の医師と患者しかできない研究である。漢方薬が新たな適応疾患に単独使用されたり併用使用で既存の西洋薬の使用量を減らしたり上乗せ効果を確認することができれば医療経済上のメリットは大きい。がん患者のQOL維持向上において最も重要なものは痛みである。この痛みを軽減する方法はこれまでオピオイドや消炎鎮痛剤NSAIDを利用してきたが、それぞれ副作用も多く発現するため一定の制限がかけられてきたが、大建中湯によるがん性疼痛に関して動物実験や臨床試験で有益であることが証明されれば、副作用の発現が極めて低頻度である、安全な鎮痛薬として使用できる可能性がある。

## 8. 六君子湯の食思増進に及ぼす効果の検討、ならびに抗がん剤およびがん悪液質による食思不振に対する効果についての臨床研究

六君子湯はがん患者の悪液質の進行を抑制、あるいは抗がん剤による食欲不振を改善し、QOLや予後を改善する可能性があるため、本臨床研究において探索的な試験を行い、有用な評価項目が認められれば第Ⅱ相の臨床試験を計画して検証していく。

### E. 結論

本研究は、漢方薬六君子湯、大建中湯の作用メカニズムを明らかにすること、ならびに同漢方薬の有効性を臨床研究を用いて確立するものである。

基礎研究においては、六君子湯が悪液質モデル動物の摂食量を改善し、体重低下を抑制することを明らかにした。その作用機序として、がん悪液質で起こっているグレリン分泌不全やグレリン抵抗性を六君子湯成分のヘスペリジン、アトラクチロジンが改善することを明らかにした。さらに、六君子湯はがん性悪液質で低下しているグレリン分泌を刺激し、さらにグレリン抵抗性を改善する薬剤であり、動物実験で生存期間延長効果を持つ薬剤であることを示した。その作用機序は六君子湯の蒼朮の含まれるアトラクチロジンによるグレリンシグナル増強作用によるものが考えられた。

シスプラチンによる摂食抑制作用および六君子湯による摂食改善作用は、血中active ghrelinを介して視床下部摂食関連ペプチドの動態を修飾したことによって生じた可能性が示唆された。

六君子湯はACTH産生下垂体細胞及びGH産生下垂体細胞の細胞内cAMPを増加させる。しかし、ホルモンの産生・分泌に対しては強い作用がないことが示唆された。

ラットにおいてシスプラチン投与の2時間前に六君子湯を経口投与した群とvehicle群の血中セロトニン濃度を測定した。シスプラチン投与で血中のセロトニン濃度は有意に増加し、六君子湯投与でこの効果はブロックされた。

六君子湯投与による白色脂肪組織におけるde novo脂肪酸合成系の維持ががん悪液質病態の抑制に重要である可能性が示唆された。

大建中湯の成分が血中レベルに匹敵する濃度で培養細胞において多標的にアラキドン酸代謝酵素を抑制しプロスタグランジンE<sub>2</sub>を特異的に抑制する

ことを明らかにし、がんに伴う炎症や痛みを抑制できる可能性が示唆された。

臨床研究においては、がん悪液質の症状改善、加えて抗がん剤投与による消化器症状に六君子湯が有効であることを明らかにするため、臨床研究プロトコルを作成し、ひとつは患者登録を行い、もうひとつは次年度登録開始予定である。臨床研究は班内に設置した「プロトコル審査委員会」および「効果・安全性評価委員会」により支援を受けた。

抗がん剤による悪心嘔吐等の消化器症状改善、体重減少、倦怠感などのがん悪液質の症状改善は、がん患者のQOL向上や生命予後に重要であるにも関わらず、治療法が確立されていない。当班では、六君子湯が抗がん剤による食思不振改善効果を有すること、また食欲改善ペプチドであるグレリンシグナルを増強することを見出した。

ほとんど副作用を有しない漢方薬が、抗がん剤副作用改善、ならびにがん悪液質症状改善に有効であることが科学的に立証されれば、両漢方薬は薬価収載されており、直ちに臨床現場での広範な応用が可能である。

## F．健康危険情報

なし。

## G．研究発表

### 1. 論文発表

1. Suzuki M, Narita M, Ashikawa M, Furuta S, Matoba M, Sasaki H, Yanagihara K, Terawaki K, Suzuki T, Uezono Y. Changes in the melancortin

- receptors in the hypothalamus of a rat model of cancer cachexia. *Synapse*, 66 (9): 759-769, 2012.
2. Sudo Y, Hojo M, Ando Y, Takada M, Murata H, Kurata S, Kanaide M, Nishida N, Uezono Y. GABA<sub>B</sub> receptors do not internalize after baclofen treatment, possibly due to a lack of  $\beta$ -arrestin association: Study with a real-time visualizing assay. *Synapse*, 66 (9): 759-769, 2012.
  3. 上園保仁. 変わる「第二次がん対策推進基本計画」-第一次がん対策推進基本計画実践後の反省をもとに、がん体験者の視点を取り入れて-。がん患者と対症療法, 23 (1): 106-113, 2012.
  4. Horishita T, Ueno S, Yanagihara N, Sudo Y, Uezono Y, Okura D, Sata T. Inhibition by pregnenolone sulphate, a metabolite of the neurosteroid pregnenolone, of voltage-gated sodium channels expressed in *Xenopus* Oocytes. *J Pharmacol Sci*, 120 (1): 54-58, 2012.
  5. Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, Furuta S, Kawamata T, Ashikawa M, Miyano K, Yanagihara K, Chiwaki F, Ochiya T, Suzuki T, Matoba M, Sasaki H, Uezono Y. The sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied expression of substance P and by changes in the  $\mu$ -opioid receptors in the spinal cord of mice. *Anesthesiology*, 117 (4): 847-856, 2012.
  6. 上園保仁. ここまでわかってきた漢方薬の「なぜ効くの？」と「本当に効くの？」-科学的エビデンスに基づいた、がん患者のQOLを高める漢方薬の効果-。がん患者と対症療法, 23 (2): 186-192, 2012.
  7. Uezono Y, Miyano K, Sudo Y, Suzuki M, Shiraishi S, Terawaki K. A review of traditional Japanese medicines and their potential mechanism of action. *Curr Pharm Des*, 18 (31): 4839-4853, 2012.
  8. Iwase S, Yamaguchi T, Miyaji T, Terawaki K, Inui A, Uezono Y. The clinical use of Kampo medicines (traditional Japanese herbal treatments) for controlling cancer patients' symptoms in Japan: a national cross-sectional survey. *BMC Complement Altern Med*, 12: 222, 2012.
  9. Minami K, Uezono Y. The recent progress in research on the effects of anesthetics and analgesics on G protein-coupled receptors. *J Anesthesia*, 27 (2): 284-292, 2013.
  10. Motoyama N, Morita K, Kitayama T, Shiraishi S, Uezono Y, Nishimura F, Kanamatsu T, Dohi T. Pain-releasing action of platelet-activating factor (PAF) antagonists in neuropathic pain animal models and the mechanisms of action. *Eur J Pain*, epub ahead of print, 2013.
  11. Yanagihara K, Takigahira M, Mihara K, Kubo T, Morimoto C, Morita Y, Terawaki K, Uezono Y. Inhibitory effects of isoflavones on tumor growth and cachexia in newly established cachectic mouse models carrying human stomach cancers. *Nutr Cancer*, in press, 2013.
  12. Fujitsuka N, Asakawa A, Amitani H, Hattori T, Inui A. Efficacy of ghrelin in cancer cachexia: clinical trials and a novel treatment by rikkunshito. *Crit Rev Oncog*, 17 (3): 277-284, 2012.
  13. Fujitsuka N, Asakawa A, Amitani H, Fujimiya M, Inui A. Ghrelin and gastrointestinal movement. *Methods Enzymol*, 514: 289-301, 2012.
  14. Inui A. Editorial: a new horizon of herbal medicines in anorexia-cachexia

- syndrome. *Curr Pharm Des*, 18 (31): 4747-4748, 2012.
15. 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 (5): e35708, 2012.
  16. Nahata M, Muto S, Oridate N, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303 (1): G42-G53, 2012.
  17. Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Asaka M. Rikkunshito and ghrelin secretion. *Curr Pharm Des*, 18 (31): 4827-4838, 2012.
  18. Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Rikkunshito as a ghrelin enhancer. *Methods Enzymol*, 514: 333-351, 2012.
  19. Nahata M, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Saegusa Y, Iizuka S, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Serotonin 2C receptor antagonism ameliorates novelty-induced hypophagia in aged mice. *Psychoneuroendocrinology*, in press, 2013.
  20. Hashimoto H, Uezono Y, Ueta Y. Pathophysiological function of oxytocin secreted by neuropeptides: A mini review. *Pathophysiology*, 19 (4): 283-298, 2012.
  21. 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*, in press, 2013.
  22. Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, Sano K, Tsukada T, Sakurai A. A novel splice site mutation of the *MEN1* gene identified in a patient with primary hyperparathyroidism. *Endocr J*, 59 (6): 523-530, 2012.
  23. Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, Tsukada T, Sakurai A. Application of an intracellular stability test of a novel missense menin mutant to the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr J*, 59 (12): 1093-1098, 2012.
  24. 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*, epub ahead of print, 2013.
  25. Ataka K, Nagaishi K, Asakawa A, Inui A, Fujimiya M. Alteration of antral and proximal colonic motility induced by chronic psychological stress involves central urocortin 3 and vasopressin in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303 (4): G519-G28, 2012.
  26. Fujimiya M, Ataka K, Asakawa A, Chen CY, Kato I, Inui A. Regulation of gastroduodenal motility: acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin and hypothalamic peptides. *Digestion*, 85 (2): 90-94, 2012.
  27. 樋上賀一. 脂質代謝の変化からみたカロリー制限による抗老化・寿命延長作用のメカニズム. *心身医学*, 52 (3): 194-200, 2012.
  28. Nagai W, Okita N, Matsumoto H, Okado H, Oku M, Higami Y.

- Reversible induction of PARP1 degradation by p53-inducible cis-imidazoline compounds. *Biochem Biophys Res Commun*, 421 (1): 15-19, 2012.
29. Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, Fukushima M, Yuguchi K, Mikami K, Yamauchi A, Watanabe K, Noguchi M, Nakamura M, Toda T, Higami Y. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. *Mech Ageing Dev*, 133 (5): 255-266, 2012.
30. 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)*, epub ahead of print, 2012.
31. 藤井波木, 沖田直之, 樋上賀一. カロリー制限による白色脂肪組織を中心とした脂質代謝の活性化. *基礎老化研究*, 36 (2): 31-38, 2012.
32. Mikami K, Okita N, Tokunaga Y, Ichikawa T, Okazaki T, Takemoto K, Nagai W, Matsushima S, Higami Y. Autophagosomes accumulate in differentiated and hypertrophic adipocytes in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, 427 (4): 758-763, 2012.
33. 河野透, 上園保仁. 腸管血流からみた大建中湯の役割 アメリカ臨床治療薬TU-100になった理由. *医学のあゆみ*, 241 (2), 163-169, 2012.
34. 河野透. 今日のがん治療を支える漢方薬のエビデンス. In: *がん漢方*. 南山堂, pp16-25, 2012.
35. 掛地吉弘, 河野透. In: *EBMによるがん領域の漢方の使い方*. ライフサイエンス, pp1-49, 2012.
36. Kono T, Kaneko A, Omiya Y, Ohbuchi K, Ohno N, Yamamoto M. Epithelial transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-dependent adrenomedullin upregulates blood flow in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304 (4): G428-G436, 2013.
37. 河野透. 消化器疾患に対する漢方医療の実際 イレウス. *臨床消化器内科*, 28 (2): 189-196, 2013.
38. Hosaka M, Watari H, Kato T, Odagiri T, Konno Y, Mitamura T, Kikawa S, Suzuki Y, Sakuragi N. Clinical efficacy of paclitaxel/cisplatin as an adjuvant chemotherapy for patients who underwent radical hysterectomy and systematic lymphadenectomy. *J Surg Oncol*, 105 (6): 612-616, 2012.
39. Watari H, Hosaka M, Wakui Y, Nomura E, Hareyama H, Tanuma F, Hattori R, Azuma M, Kato H, Takeda N, Ariga S, Sakuragi N. A prospective study on the efficacy of octreotide in the management of malignant bowel obstruction in gynecologic cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 22 (4): 692-696, 2012.
40. Dong P, Karaayvazb M, Jiach N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H, Sudo S, Ju J, Sakuragi N. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene*, epub ahead of print, 2012.
41. Kato T, Watari H, Endo D, Mitamura T, Odagiri T, Konno Y, Hosaka M, Kobayashi N, Todo Y, Sudo S, Takeda M, Dong P, Kaneuchi M, Kudo M, Sakuragi N. New revised FIGO 2008 staging for endometrial cancer

produces better discrimination in survival compared with the 1988 staging system. *J Surg Oncol*, 106 (8): 938-941, 2012.

42. Hosaka M, Fujita H, Hanley SJB, Sasaki T, Shirakawa Y, Abiko M, Kudo M, Kaneuchi M, Watari H, Kikuchi K, Sakuragi N. Incidence risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 or more severe lesions is a function of human papillomavirus genotypes and severity of cytological and histological abnormalities in adult Japanese women. *Int J Cancer*, 132 (2): 327-334, 2013.

## 2. 学会発表

1. Kubota K, Ohbuchi K, Ohtake N, Yamamoto M, Sudo Y, Uezono Y. Hydroxy  $\alpha$ -sanshool, a major ingredient of TU-100 (Daikenchuto), augments migrating motor complex of proximal colon triggered by other prokinetic stimuli. *Digestive Disease Week 2012*. San Diego, USA (2012年5月).
2. 上園保仁. がん患者の生活の質向上のために-がんの痛み、がんのつらさを和らげるための基礎から臨床へのトランスレーショナルリサーチ. 第53回日本心身医学会総会ならびに学術講演会. 鹿児島市 (2012年5月).
3. Kokubun H, Uezono Y, Matoba M. Novel method for determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) in cancer patient serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. 7th World Research Congress of the European Association for Palliative Care. Trondheim, Norway (2012年6月).
4. 横山徹, 南浩一郎, 寺脇潔, 竹内護, 上園保仁. がん悪液質では中枢での浸透圧感受性が変化している: モデルラットを用いた検討. 日本麻酔科学会第59回学術集会. 神戸市 (2012年6月).
5. 上園保仁. アセトアミノフェンに関する最近の知見. 第17回日本緩和医療学会学術大会. 神戸市 (2012年6月).
6. 岩瀬哲, 山口拓洋, 宮路天平, 上園保仁. がん患者の症状コントロールを目的とした医療用漢方薬の使用実態についての全国アンケート調査. 第17回日本緩和医療学会学術大会. 神戸市 (2012年6月).
7. 鈴木雅美, 成田年, 芦川真帆, 川股知之, 宮野加奈子, 鈴木勉, 的場元弘, 上園保仁. がんの腹膜播種病態下におけるモルヒネ抵抗性メカニズムの解析. 第32回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム. 東京 (2012年9月).
8. 寺脇潔, 柳原五吉, 澤田祐美, 柏瀬陽平, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 須藤結香, 白石成二, 樋上賀一, 上園保仁. ヒト胃がん細胞による新規がん悪液質モデルの確立および病態生理. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌市 (2012年9月).
9. 柏瀬陽平, 寺脇潔, 澤田祐美, 須藤結香, 柳原五吉, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 白石成二, 樋上賀一, 上園保仁. 新規がん悪液質モデルに対する漢方薬六君子湯の改善効果およびグレリンシグナルを介したメカニズム. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌市 (2012年9月).
10. 宮野加奈子, 白石成二, 鈴木雅美, 須藤結香, 澤田祐美, 寺脇潔, 上園

- 保仁. 抗がん剤carboplatin投与による末梢神経障害にTRPA1チャンネルが関与する. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌市 (2012年9月).
11. 上園保仁, 寺脇潔, 柏瀬陽平, 澤田祐美, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 須藤結香, 横山明信, 小柳尚史, 白石成二. がん性悪液質の予防・治療薬の開発-漢方薬を中心とした基礎から臨床にいたる橋渡し研究-. 第6回日本緩和医療薬学会年会. 神戸市 (2012年10月).
  12. 鈴木雅美, 芝田晋介, 光永修一, 的場元弘, 上園保仁, 成田年. がん性疼痛モデル作製とその臨床応用: オールジャパンで展開されるべき緩和医療トランスレーショナルリサーチ. 第6回日本緩和医療薬学会年会. 神戸市 (2012年10月).
  13. 上園保仁, 寺脇潔. 漢方薬「六君子湯」の食思改善ペプチド「グレリン」を介した消化管機能調整作用. 第49回日本臨床生理学会総会. 長崎市 (2012年10月).
  14. 上園保仁. がん治療に求められる漢方薬の役割: 放射線治療への貢献とその期待. 日本放射線腫瘍学会第25回学術大会. 東京 (2012年11月).
  15. 鈴木雅美, 成田年, 芝田晋介, 井上未紀, 田崎慶彦, 的場元弘, 上園保仁. 膵がん腹膜播種疼痛モデルを用いたがんによる神経障害性疼痛の病態生理の解析. 第86回日本薬理学会年会. 福岡市 (2013年3月).
  16. 宮野加奈子, 南浩一郎, 横山徹, 大淵勝也, 山本雅浩, 白石成二, 的場元弘, 上園保仁. がん疼痛治療剤トラマドールはTRPA1活性を選択的に阻害する. 第86回日本薬理学会年会. 福岡市 (2013年3月).
  17. 寺脇潔, 柏瀬陽平, 澤田祐美, 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におけるグレリン抵抗性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改善効果. 第86回日本薬理学会年会. 福岡市 (2013年3月).
  18. 田崎慶彦, 鈴木雅美, 芝田晋介, 池上大悟, 成田年, 上園保仁. 膵がん腹膜播種モデルマウスの脳内アストロサイトの变化. 第86回日本薬理学会年会. 福岡市 (2013年3月).
  19. Inui A. Ghrelin and energy homeostasis focused on cancer anorexia-cachexia syndrome. The 9th International Symposium on Growth and Nutrition in Children with Chronic Kidney Diseases. San Diego, USA (2012年4月).
  20. 蔡明倫, 浅川明弘, 網谷真理恵, 春田いづみ, 網谷東方, 上園保仁, 山口武人, 新島旭, 矢田俊彦, 乾明夫. 六君子湯によるグレリンシグナル増強と膵癌患者の生存期間延長効果. 第109回日本内科学会総会・講演会. 京都市 (2012年4月).
  21. 浅川明弘, 上園保仁, 藤宮峯子, 矢田俊彦, 新島旭, 乾明夫. シンポジウム2 悪液質の進歩 癌性悪液質におけるグレリンシグナルの臨床応用の可能性. 第53回日本心身医学会. 鹿児島市 (2012年5月).
  22. 乾明夫. 『経験』から『科学』へ明らかになってきた漢方の作用メカニズム . 第2回市民公開セミナー「がんと漢方薬」のこと 漢方薬の現状とこれから. 東京 (2012年6月).
  23. 乾明夫. 悪液質の最近の進歩 空

- 腹ホルモングレリン 漢方薬六君子湯を中心に . 独立行政法人産業技術総合研究所 第2回健康工学科学部門研究会. 淡路市 (2012年9月).
24. 乾明夫. 悪液質の最近の進歩 (特別講演). 第3回新潟がん栄養療法研究会. 新潟市 (2012年10月).
  25. 浅川明弘, 山口武人, 乾明夫. グレリンシグナルの増強は癌性悪液質を改善する. 第54回日本消化器病学会. 神戸市 (2012年10月).
  26. 乾明夫. がん悪液質の最近の進歩. 第36回日本死の臨床研究会. 京都市 (2012年11月).
  27. Ohnishi S, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Sadakane C, Nahata M, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M. A study on gender differences in feeding behavior and plasma acyl ghrelin levels in aged mice following exposure to a novel environmental stress. Digestive Disease Week 2012. San Diego, USA (2012年5月).
  28. 大西俊介, 武藤修一, 武田宏司. 性差が末梢グレリン分泌に与える影響-老化マウスにおける検討-. 第98回日本消化器病学会総会 ワークショップ. 東京 (2012年4月).
  29. 武田宏司, 武藤修一, 大西俊介. グレリンシグナルの定価がGERDにおける胃排出定価に関与する. 第54回日本消化器病学会大会, 神戸市 (2012年10月).
  30. 上田陽一. 悪液質モデル動物における視床下部摂食関連ペプチドの動態. 第53回日本心身医学会総会ならびに学術講演会シンポジウム. 鹿児島市 (2012年5月).
  31. 上田陽一, 吉村充弘, 橋本弘史, 石倉透, 横山徹, 上園保仁. シスプラチン投与におけるラット摂食抑制反応に対する六君子湯の胃内投与効果. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌市 (2012年9月).
  32. Ueta Y. Drinking and feeding behavior based on peptides and TRP channels. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of KoSCI & the 2<sup>nd</sup> AISCRIB. Korea (2012年11月).
  33. 塚田俊彦, 永村優央子, 寺脇潔, 上園保仁. 六君子湯はPC12細胞におけるカテコラミン合成と分泌を促進する. 第71回日本癌学会総会. 札幌市 (2012年9月).
  34. 樋上賀一. 脂肪酸合成関連転写因子sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1cは絶食耐性遺伝子である. 第101回日本病理学会総会. 東京 (2012年4月).
  35. 湯口景子, 土屋拓郎, 福島麻友美, 沖田直之, 戸田年総, 樋上賀一. カロリー制限によるミトコンドリアバイオジェネシスの経時的変化. 第35回日本基礎老化学会大会. 習志野 (2012年7月).
  36. 福永大地, 森秀一, 久保幸恵, 中山亮, 村瀬尚哉, 宮崎剛, 樋上賀一, 重本和宏. 老齢マウスの筋線維タイプ特異的な筋委縮の病態解明. 第35回日本基礎老化学会大会. 習志野 (2012年7月).
  37. 徳永雄紀, 三上健太郎, 沖田直之, 樋上賀一. 肥満における組織特異的オートファジーの解析. 第35回日本基礎老化学会大会. 習志野 (2012年7月).
  38. 大塚佑樹, 沖田直之, 寺脇潔, 上園保仁, 樋上賀一. カロリー制限とがん悪液質の白色脂肪細胞組織における応答性の違い. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京 (2012年10月).



39. 武本佳那子, 三上健太郎, 沖田直之, 樋上賀一. 脂肪酸が肝臓細胞のオートファジーに及ぼす影響. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京 (2012年10月).
40. 石川菜摘, 奥美紗子, 永井恒, 鈴木裕規, 沖田直之, 樋上賀一. 脂肪細胞および筋細胞におけるがん抑制遺伝子p53を介したミトコンドリア制御. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京 (2012年10月).
41. 福永大地, 久保幸穂, 森秀一, 宮崎剛, 樋上賀一, 重本和宏. 老齡マウスを用いた加齡性筋委縮の筋線維タイプ特異な筋病態の解析. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡 (2012年12月).
42. 藤井波木, 沖田直之, 仲條良和, 小西智一, 成田匠, 樋上賀一. カロリー制限による成長ホルモン非依存的なラット白色脂肪組織のリモデリング. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡 (2012年12月).
43. Kono T, Kaneko A, Matsumoto C, Hibino T, Shigenobu T, Fukutake M, Uezono Y. Amelioration of 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters by TJ-14 (Hangeshashinto), inhibitor of inducible prostaglandin E2 and proinflammatory cytokine. Digestive Disease Week 2012, San Diego, USA (2012年5月).
44. Kono T, Omiya Y, Kaneko A, Yamamoto M. Intraluminal TRPA1 agonists: an effective means to increase intestinal blood flow. Digestive Disease Week 2012, San Diego, USA (2012年5月).
45. 櫻木範明. 子宮頸がん征圧をめざした予防対策とQOL重視の手術治療. 第19回日本がん予防学会. 岐阜市 (2012年6月).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得
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

六君子湯、大建中湯が抗がん剤の副作用、がん悪液質の改善にいたる  
メカニズムの解明と臨床研究結果の解析

研究代表者 上園 保仁 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

研究要旨 がん悪液質の症状改善に及ぼす漢方薬の効果を解析するため、ヒトのがん悪液質の診断基準を満たす新規モデル動物を樹立した。ヒト胃がん細胞株MKN45由来85As2細胞接種により作製されたがん悪液質動物モデルに対し、六君子湯は、がん細胞移植前からの予防的な投与、悪液質発症後投与という治療的観点を考慮した検討において、いずれにおいても有意な摂食改善効果を示した。食思改善ペプチド、グレリンの血中濃度の測定の結果、グレリン濃度は同悪液質モデルではコントロールに比較し有意に高いことが判明し、本がん悪液質モデル動物ではグレリン抵抗性が惹起されている可能性が示唆された。

今回の実験により、六君子湯は血中グレリン濃度が高いモデル動物においても摂食改善効果を示したことから、六君子湯はグレリン受容体を介するシグナルを増強させることにより摂食改善作用を惹起したことが考えられた。実際にグレリン受容体発現細胞を用いたin vitro研究にて、六君子湯を構成する8種類の生薬のうちのひとつ、蒼朮に含まれるアトラクチロジンにグレリン受容体反応の増強効果があることを明らかにした。

これらの結果から、六君子湯は、グレリンが効きにくいがん悪液質患者の摂食改善に際しても効果を示し、患者のQOLを向上させる可能性が示唆された。

#### A . 研究目的

平成19年よりがん対策基本法が施行、引き続き第一期がん対策推進基本計画が策定され、がん患者の生活の質（Quality of Life, QOL）の維持向上のための緩和医療ならびにその進展のため

の研究が行われている。さらに平成24年には第二期がん対策推進基本計画が策定され、研究推進が図られている。その中でも対応が遅れているのが、抗がん剤による悪心嘔吐等の副作用対策、ならびに終末期がん患者に多く見られる「がん悪液質」の症状改善である。

これらは、がん患者の生命予後やQOL向上のために重要であるにも関わらず、治療法や研究法が十分に確立されていない。

近年、漢方薬である六君子湯が抗がん剤による食欲不振改善効果を有すること、また食思改善ペプチドであるグレリンの分泌を促進することが報告され、がん領域における六君子湯の消化器症状改善効果が注目されている。

昨年度までの研究において、低分化型ヒト胃がん細胞株(MKN-45)由来のクローン細胞株(MKN45clone85)、および、その腹膜播種性転移株として樹立された85As2細胞をヌードラットに皮下移植することにより、体重減少、摂食量低下などの悪液質に特徴的な症状を示すがん悪液質モデルラットを確立した。これらのがん悪液質モデルにおいて、悪液質誘発因子として知られている炎症性サイトカインInterleukin(IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ およびleukemia inhibitory factor(LIF)の血中濃度を検討したところ、LIFのみが上昇しており、本モデルにおける悪液質誘発因子として示唆された。MKN45clone85および85As2細胞皮下移植によって誘導される悪液質症状は、体重減少、摂食量低下、除脂肪・脂肪・筋肉量減少、血中LIF上昇、血中急性期蛋白の上昇および血中アルブミンの減少などすべてにおいて、85As2細胞移植群が顕著であり、より早期に重度な症状を示す薬効評価に適した新規がん悪液質モデルとして報告した。

本年度は、同新規がん悪液質モデルを用いて、六君子湯が摂食改善に有効であるか否かを、予防的観点、あるいは治療的観点の両者を考慮し、予防投与、並びに食思不振発症後での投与方法

を計画した。同実験を通じて、六君子湯が食事改善に有効かどうかを評価し、さらにその作用メカニズムを明らかにするため、がん悪液質動物病態生理および六君子湯のグレリン受容体に対する作用をin vitroの評価系を用いて解析した。

## B. 研究方法

### 1. 新規がん悪液質モデルラットの病態生理研究

(1) 85As2細胞における悪液質誘発能増強メカニズム

(i) DNAマイクロアレイ

MKN45clone85および85As2細胞の細胞抽出液を用いて、DNAマイクロアレイ(Agilent Whole Human Genome Array、解析ソフト: GeneSpringGX11.5)を実施した。有意な増加を示した遺伝子については、Pathway Studio®(Elsevier)によるパスウェイ解析を行った。

(ii) 細胞培養上清中サイトカイン

MKN45clone85および85As2細胞を24あるいは48時間培養した上清中のhuman IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、およびLIFをProcarta® cytokine assay kit(Affymetrix Billerica)で測定した。

(2) 腫瘍摘出の悪液質症状におよぼす影響

85As2細胞移植2週後(悪液質症状発症後)、麻酔下で腫瘍を摘出し、縫合後に飼育ケージに戻した。細胞移植前からの体重、摂食量および飲水量を毎週測定した。また、5週後に筋肉・脂肪組織重量を測定、血液サンプルを採取後、血中human LIFを測定した。

(3) 呼吸代謝の測定

85As2細胞移植4週後のラットの呼吸商(=単位時間当たりの二酸化炭素排

出量 ÷ 単位時間当たりの酸素消費量)、自発運動量および体重当たりのカロリー消費量を小動物用代謝計測システム MK-5000RQ (室町機械) で測定した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

#### (4) 筋肉分解因子の測定

85As2細胞移植4週後のラットの腓腹筋を採取し、ホモジネート後、ISOGEN (Nippon gene Co., Ltd.) により total RNA を抽出し、Real-time polymerase chain reaction (PCR) により、E3 ubiquitin ligases である Atrogin-1/MAFbx、MuRF-1 を測定した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

#### (5) in situ ハイブリダイゼーション

85As2細胞移植4週後のラットを断頭後、脳を取り出して凍結切片を作製した。RI(<sup>35</sup>S)標識したオリゴ合成DNAプローブを用いて in situ ハイブリダイゼーション法により視床下部 paraventricular nucleus (PVN)、arcuate nucleus (ARC)、および lateral hypothalamic area (LHA) における摂食促進ペプチド neuro peptide Y (NPY)、agouti-related protein (AgRP) および orexin (ORX) 遺伝子、摂食抑制ペプチド proopiomelanocortin (POMC)、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)、corticotropin-releasing hormone (CRH) および melanin-concentrating hormone (MCH) 遺伝子の発現をフィルムオートラジオグラフィおよび画像解析装置 (MCID) により定量化した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

#### (6) グレリン投与による摂食亢進作用

85As2細胞移植2週後(悪液質発症後) グレリン (10nmol, i.p.) または生理食

塩水を投与し、投与後1時間までの摂食量を測定した。対照群として、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物にグレリンまたは生理食塩水を同量投与した。悪液質群および対照群それぞれの群で、生理食塩水およびグレリン投与による影響を比較した。

#### (7) 血中グレリン濃度測定

85As2細胞移植3または4週後のラットの腹部大静脈から血液を採取し、血中グレリン濃度をELISAにより測定した。対照群は、生理食塩水を皮下投与した非担がん動物とした。

## 2. 新規がん悪液質モデルラットに対する六君子湯の予防的効果および治療的効果の検討

### (1) 六君子湯の予防的効果の検討

85As2細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を左右腹部に皮下移植後、体重、摂食量を毎週測定した。六君子湯1%混餌を、がん細胞移植1週間前から自由摂取で実験終了まで与えた。対照群 (85As2+CE-2) および正常群 (Saline+CE-2) には、通常食 (CE-2、日本オリエンタル酵母) を与えた。

### (2) 六君子湯の治療的効果の検討

85As2細胞 ( $1 \times 10^7$  cells) を左右腹部に皮下移植後、体重、摂食量を毎週測定した。0、2および3週後に、体組成(除脂肪量・脂肪量・体水分量)を ImpediVET™ Bioimpedance Spectroscopy device (ImpediMed Limited) で測定した。悪液質発症後(がん細胞移植2週後)から、六君子湯 1g/kg/day を1日2回7日間経口投与した。対照群 (85As2+distilled water) および正常群 (saline+distilled water) には、同量の蒸留水を与えた。実験終了後、腹部大静脈から血液を採取し、ELISAキットに

より血中グレリン濃度を測定した。また、筋肉(大胸筋、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋)および脂肪重量(精巣上体・腎臓・腸間膜周辺)を測定した。

### 3. 六君子湯のグレリン受容体シグナルに対する作用

humanグレリン受容体(GHS-R)安定発現HEK293T細胞あるいはratGHS-R安定発現COS細胞を用いた。GHS-R安定発現細胞に対し、六君子湯エキス(10-100 $\mu$ g/ml)またはアトラクチロジン(1-30 $\mu$ M)を前処置(2-60分間)し、グレリン( $3 \times 10^{-10}$ - $1 \times 10^{-7}$ M)添加後のGq蛋白共役型GPCR(G protein-coupled receptor)特異的シグナルを細胞内カルシウム濃度可視化アッセイ並びにラベルフリーセルベースアッセイシステム(CellKey™システム)を用いて測定し、六君子湯によるグレリン受容体シグナルへの影響をin vitroで検討した。

(倫理面への配慮)

六君子湯・大建中湯の、細胞レベルでの作用機序解明および動物モデルを用いた実験においては、当施設の実験動物倫理審査委員会ならびに遺伝子組み換え実験管理委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### 1. 新規がん悪液質モデルラットの病態生理研究

(1) 85As2細胞における悪液質誘発能増強メカニズム

(i) DNAマイクロアレイ

MKN45clone85および85As2細胞のDNAマイクロアレイの比較において、

全データに共通してDetectedもしくはCompromisedフラグを示した24,066プローブのうち、85As2細胞における有意な発現増加は、1832プローブ、有意な発現減少は2194プローブであった。有意な発現増加を示した遺伝子に対し、パスウェイ解析を行ったところ、85As2細胞ではtoll-like receptor(TLR)系のシグナルが活性化していた。

(ii) 細胞培養上清中サイトカイン

MKN45clone85および85As2細胞培養上清中のサイトカインは、IL-1 $\beta$ 、IL-6およびTNF- $\alpha$ は検出限界以下であった。両細胞培養上清中でIL-8およびLIFが10~1000pg/ml(条件によって異なる)の範囲で検出された。細胞間の比較では、IL-8:MKN45clone85>85As2、LIF:MKN45clone85<85As2であった。

(2) 腫瘍摘出の悪液質症状におよぼす影響

85As2細胞移植によるがん悪液質モデルラットは、悪液質発症後からの腫瘍摘出により、体重、摂食量低下、飲水量低下、筋肉・脂肪組織重量低下などの悪液質症状が完全に回復した。血中LIF濃度は検出限界以下となった。

(3) 呼吸代謝の測定

本悪液質モデルラットでは、対照群と比較して、活動期(21:00-翌朝7:00)の自発運動量が低下していた。さらに、悪液質モデルラットでは、自発運動量に差がない安静時(9:00-14:00)において、呼吸商が有意に高く、体重当たりのカロリー消費量が有意に亢進していた。

(4) 筋肉分解因子の測定

がん悪液質モデルでは、Atrogin-1/MAFbxおよびMuRF-1が対照群と比較して有意に増加していた。

(5) in situハイブリダイゼーション

がん悪液質モデルでは、摂食亢進ペプチド (NPY and AgRP in the ARC, ORX in the LHA) mRNAが増加、摂食抑制ペプチド (POMC and CART in the ARC, CRH in the PVN, MCH in the LHA) mRNAが減少していた。

#### (6) グレリン投与による摂食亢進作用

グレリン投与により、対照 (非担がん動物) 群では、生理食塩水投与と比較して、有意な摂食量の増加が認められたが、悪液質モデルラットでは、グレリン投与による摂食量増加が認められなかった。

#### (7) 血中グレリン濃度

悪液質モデルラットは、対照 (非担がん動物) 群と比較して血中グレリン濃度の有意に高い値を示した。

## 2. 新規がん悪液質モデルラットに対する六君子湯の予防的効果および治療的効果の検討

85As2細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) 移植ラットでは、移植2週目から有意な体重減少 ( $93.53 \pm 1.85\%$  vs. 正常群) および有意な摂食量低下 ( $86.75 \pm 2.36\%$  vs. 正常群) が認められ、悪液質の特徴的な症状を示した (図1)。同群では、4週目でさらに摂食量が低下した ( $78.92 \pm 2.40\%$  vs. 正常群)。2週目から4週目にかけて体重は減少しなかったものの ( $98.06 \pm 1.64\%$  vs. 85As2移植群2週)、正常群との体重差は拡大した ( $80.82 \pm 2.53\%$  vs. コントロール群4週)。これに対し、六君子湯1%混餌群では、体重には影響なかったが、移植4週目で摂食量低下の有意な改善が認められた ( $93.53 \pm 1.85\%$  vs. 正常群) (図1)。

治療効果の検討において、85As2細胞 ( $1 \times 10^7$  cells) 移植ラットは、移植2週目から有意な体重減少 ( $84.33 \pm 1.29\%$  vs.

正常群) および有意な摂食量低下 ( $75.73 \pm 2.27\%$  vs. 正常群) が認められ、予防効果の検討条件よりも重篤な悪液質の症状を示した (図2)。85As2細胞移植+蒸留水投与群では、7日後の摂食量は低下したままであったが ( $75.99 \pm 4.40\%$  vs. 正常群)、六君子湯7日間投与群では、摂食量低下の有意な改善が認められた ( $93.61 \pm 8.09\%$  vs. 正常群) (図2)。さらに、85As2細胞移植+蒸留水投与群で認められた投与前後での有意な体重減少を六君子湯投与群は抑制し (図3)、体組成においても除脂肪量および体水分量を増加させ、筋肉量も増加させた。一方、六君子湯投与群は、悪液質群で上昇していた血中グレリン値に対して影響をおよぼさなかった。血中LIF値に対する影響もおよぼさなかった。

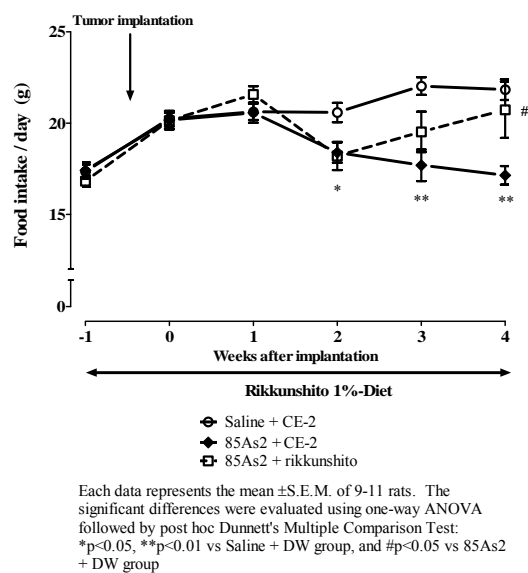
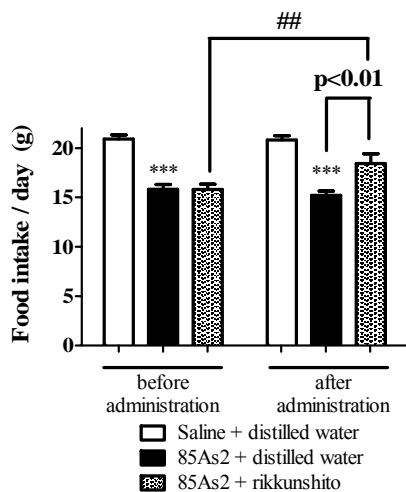
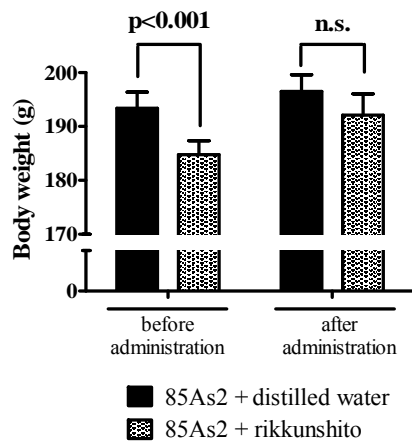


図1 がん悪液質モデルの摂食量低下に対する六君子湯の予防的効果の検討



Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-11 rats. The significant differences were evaluated using unpaired or paired t test: \*\*\* $p < 0.001$  vs post 85As2 + DW group (unpaired), and ## $p < 0.01$  vs pre 85As2 + Rikkunshito group (paired)

図2 がん悪液質発症後（摂食量低下）からの六君子湯投与による摂食量改善作用



Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-11 rats. The significant differences were evaluated using paired t test.

図3 六君子湯投与後の体重減少抑制効果

### 3. 六君子湯のグレリン受容体シグナルに対する作用

CellKey™システムにおける測定において、GHS-R安定発現HEK293細胞へ

のグレリン添加により、Gq特異的シグナルが示された。六君子湯前処置により、本グレリン受容体シグナルの増強効果が認められた。

細胞内カルシウム濃度可視化アッセイにおいて、GHS-R安定発現COS細胞へのグレリン添加により細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が示された。六君子湯前処置により、本グレリン受容体刺激細胞内カルシウムイオン濃度上昇の増強効果が認められた。さらに、六君子湯に含有される43成分のうちGHS-Rにbinding活性を示したアトラクチロジンは、六君子湯同様、グレリン受容体刺激細胞内カルシウムイオン濃度上昇の増強効果を示した。

#### D. 考察

ヒト胃がん細胞株由来MKN45clone85およびその腹膜播種性転移株85As2により作製したモデルラットは、悪液質に特徴的な、体重減少、摂食量低下、除脂肪量の減少、血中炎症性マーカーの上昇および血中アルブミン値の低下を示し、これは臨床でのがん悪液質研究の診断基準を反映しており、がん悪液質研究に適したモデルであると考えられることを昨年度までに報告した。すべての項目において、85As2細胞接種ラットでは、より重度な悪液質を誘導した。

85As2細胞移植悪液質ラットモデルは、腫瘍摘出により悪液質症状が消失し、血中LIF値も検出限界を示した。さらに、細胞自体がLIFを産生することから、本モデルにおける悪液質症状発症は、腫瘍由来であり、LIFが起因子のひとつまたはバイオマーカーとなる可能性が示唆された。一方、

MKN45clone85および85As2細胞はIL-8産生を示したが、悪液質動物の血中では検出されなかったため、直接の悪液質誘発因子ではないと考えられた。

細胞のDNAマイクロアレイの結果から、発現上昇している遺伝子群および減少している遺伝子群が多数示され、パスウェイ解析によりTLRシグナルが活性化していることが示唆された。TLR4あるいはTLR5リガンド刺激により、85As2細胞がLIF産生を亢進することを確認しており、TLRシグナル活性化が悪液質誘導能に寄与する可能性が示唆された。

本モデルでは、体重当たりのカロリー消費が高くなっており、筋肉分解因子の亢進も確認され、摂食量低下に加え、亢進したエネルギー消費が悪液質の発症の一因となる可能性を示唆している。さらに、本モデルでは、摂食量が低下しているにも関わらず、摂食亢進ペプチドであるグレリンは、血中で高値を示していた。本結果は、多数の臨床データと一致する。本モデルの脳内では、摂食亢進ペプチドが増加、摂食抑制ペプチドが減少しているにも関わらず、摂食量が低下しており、さらには、グレリン投与による摂食行動が抑制されていたことから、本モデルではグレリン抵抗性が惹起されている可能性が考えられた。

六君子湯はがん細胞移植前からの予防的な投与においても、がん悪液質発症後からの治療的投与においても、摂食量低下を有意に改善した。また、悪液質の進行による体重低下を抑制した。

上述のように、本モデルではグレリン抵抗性が惹起されているにも関わらず六君子湯が改善作用を示した。六君子湯は血中LIF濃度に影響をおよぼさ

なかったため、悪液質誘発因子の抑制による悪液質改善作用ではないと考えられた。六君子湯の改善作用メカニズムを検証すべく、六君子湯のグレリン受容体レベルでの検討を行った結果、細胞内カルシウム濃度可視化アッセイおよびCellKey™アッセイシステムどちらのアッセイ系においても、六君子湯はグレリン受容体シグナルを増強した。六君子湯を構成する8種類の生薬のうちの一つである蒼朮に含まれるアトラクチロジンは、グレリン受容体にbinding活性を示し、さらに、六君子湯同様、グレリン受容体シグナルを増強したことから、六君子湯の活性成分の一つである可能性が示唆された。

以上のことから、六君子湯は、より悪性度の高く、カロリー消費亢進およびグレリン抵抗性が起こっている85As2細胞移植によるがん悪液質モデルにおいて予防的投与においても治療的投与においても改善効果を示した。今回の結果から、六君子湯の作用メカニズムのひとつとして、グレリン受容体シグナルの増強によるグレリン抵抗性の改善が関与している可能性が示唆された。本研究結果は、六君子湯の臨床での治療効果を期待させるものであり、がん患者のQOL向上への貢献が期待できる。

## E . 結論

ヒト胃がん細胞株MKN45clone85およびその腹膜播種性転移株85As2細胞により、新しいがん悪液質動物モデルを作製した。両モデルは、臨床での悪液質の診断基準を反映し、がん悪液質の病態生理研究および治療薬の評価に応用可能であると考えられた。より悪



性度の高い<sup>85</sup>As<sub>2</sub>細胞による悪液質モデルでは、エネルギー消費亢進やグレルリン抵抗性が起こっていることが示唆された。

六君子湯は、本<sup>85</sup>As<sub>2</sub>細胞移植による悪液質モデルに対して、予防的および治療的いずれの投与においても改善効果を示したことから、臨床での治療効果およびがん患者のQOL向上への貢献が期待できると考えられた。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

1. Suzuki M, Narita M, Ashikawa M, Furuta S, Matoba M, Sasaki H, Yanagihara K, Terawaki K, Suzuki T, Uezono Y. Changes in the melanocortin receptors in the hypothalamus of a rat model of cancer cachexia. *Synapse*, 66 (9): 759-769, 2012.
2. Sudo Y, Hojo M, Ando Y, Takada M, Murata H, Kurata S, Kanaide M, Nishida N, Uezono Y. GABA<sub>B</sub> receptors do not internalize after baclofen treatment, possibly due to a lack of β-arrestin association: Study with a real-time visualizing assay. *Synapse*, 66 (9): 759-769, 2012.
3. 上園保仁. 変わる「第二次がん対策推進基本計画」-第一次がん対策推進基本計画実践後の反省をもとに、がん体験者の視点を取り入れて-。がん患者と対症療法, 23 (1): 106-113, 2012.
4. Horishita T, Ueno S, Yanagihara N, Sudo Y, Uezono Y, Okura D, Sata T. Inhibition by pregnenolone sulphate, a metabolite of the neurosteroid pregnenolone, of voltage-gated sodium channels expressed in *Xenopus* Oocytes. *J Pharmacol Sci*, 120 (1): 54-58, 2012.
5. 河野透, 上園保仁. 腸管血流からみた大建中湯の役割 アメリカ臨床治療薬TU-100になった理由. *医学のあゆみ*, 241 (2): 163-169, 2012.
6. Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, Furuta S, Kawamata T, Ashikawa M, Miyano K, Yanagihara K, Chiwaki F, Ochiya T, Suzuki T, Matoba M, Sasaki H, Uezono Y. The sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied expression of substance P and by changes in the μ-opioid receptors in the spinal cord of mice. *Anesthesiology*, 117 (4): 847-856, 2012.
7. 上園保仁. ここまでわかってきた漢方薬の「なぜ効くの？」と「本当に効くの？」-科学的エビデンスに基づいた、がん患者のQOLを高める漢方薬の効果-。がん患者と対症療法, 23 (2): 186-192, 2012.
8. Uezono Y, Miyano K, Sudo Y, Suzuki M, Shiraishi S, Terawaki K. A review of traditional Japanese medicines and their potential mechanism of action. *Curr Pharm Des*, 18 (31): 4839-4853, 2012.
9. Hashimoto H, Uezono Y, Ueta Y. Pathophysiological function of oxytocin secreted by neuropeptides; a mini review. *Pathophysiology*, 19 (4): 283-298, 2012.
10. Iwase S, Yamaguchi T, Miyaji T, Terawaki K, Inui A, Uezono Y. The clinical use of Kampo medicines (traditional Japanese herbal treatments) for controlling cancer patients' symptoms in Japan: a national cross-sectional survey. *BMC Complement Altern Med*, 12: 222, 2012.
11. Minami K, Uezono Y. The recent progress in research on the effects of

- anesthetics and analgesics on G protein-coupled receptors. *J Anesthesia*, 27 (2): 284-292, 2013.
12. Motoyama N, Morita K, Kitayama T, Shiraishi S, Uezono Y, Nishimura F, Kanamatsu T, Dohi T. Pain-releasing action of platelet-activating factor (PAF) antagonists in neuropathic pain animal models and the mechanisms of action. *Eur J Pain*, epub ahead of print, 2013.
  13. Yanagihara K, Takigahira M, Mihara K, Kubo T, Morimoto C, Morita Y, Terawaki K, Uezono Y. Inhibitory effects of isoflavones on tumor growth and cachexia in newly established cachectic mouse models carrying human stomach cancers. *Nutr Cancer*, in press, 2013.
  14. 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. *Peptide*, in press, 2013.
2. 学会発表
1. Ohtake N, Ikemura R, Ohbuchi K, Sudo Y, Uezono Y, Yamamoto M. The synergistic effects of herbal pungents 6-gingerol (6GC) 6-shogaol (6SG) and hydroxy  $\alpha$ -sanshool (HAS) on *in vitro* peristaltic motility of isolated rat colon: Lessons from the unique prokinetic activity of Japanese traditional medicine daikenchuto. Digestive Disease Week 2011, Chicago, USA (2011年5月).
  2. 寺脇潔, 柳原五吉, 澤田祐美, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 須藤結香, 白石成二, 上園保仁. 新規がん悪液質モデルラットの作製及び同モデルに対する漢方薬六君子湯の改善効果. 第16回日本緩和医療学会. 札幌市 (2011年7月).
  3. 鈴木雅美, 芝田晋介, 上園保仁. がんによる神経障害に起因する難治性疼痛発現メカニズムの解析. 第5回日本緩和医療薬学会年会. 幕張市 (2011年9月).
  4. 白石成二, 宮野加奈子, 須藤結香, 鈴木雅美, 上園保仁. 脊椎転移によるがん性疼痛モデルラットの検討. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).
  5. 寺脇潔, 柳原五吉, 澤田祐美, 鈴木雅美, 宮野加奈子, 須藤結香, 白石成二, 上園保仁. ヒト胃がん細胞による新規がん悪液質モデルおよび漢方薬六君子湯の効果. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).
  6. 宮野加奈子, 白石成二, 須藤結香, 鈴木雅美, 寺脇潔, 上園保仁. vinblastineとcarboplatinはPKAを介してhuman TRPA 1を活性化する. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).
  7. 横山徹, 寺脇潔, 南浩一郎, 柳原五吉, 上田陽一, 上園保仁. がん悪液質モデルラットでは視索上核大細胞性ニューロンでの浸透圧感受性が変化している. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市 (2011年10月).
  8. Uezono Y. Pain and cachexia. 6th Cachexia Conference, Milan, Italy (2011年12月).
  9. Terawaki K, Yanagihara K, Sawada Y, Kashiwase Y, Suzuki M, Miyano M, Sudo Y, Shiraishi S, Uezono Y. Establishment of novel animal models of cancer cachexia by transplantation

- of human gastric cancer cell lines and effects of rikkunshito, a traditional Japanese medicine, on the cancer cachexia models. 6th Cachexia Conference, Milan, Italy (2011年12月).
10. Suzuki M, Ashikawa M, Narita M, Suzuki T, Matoba M, Yanagihara K, Terawaki K, Uezono Y. Changes in the expression of melanocortin receptors and pro-opiomelanocortin in the hypothalamus in a rat model of cancer cachexia. 6th Cachexia Conference, Milan, Italy (2011年12月).
  11. 須藤結香, 北條美能留, 宮野加奈子, 鈴木雅美, 寺脇潔, 白石成二, 西田教行, 上園保仁. シグナルペプチド付加HaloTag-GPCRの細胞膜移行と機能的アッセイ. 第85回日本薬理学会年会. 京都市 (2012年3月).
  12. 宮野加奈子, 白石成二, 大淵勝也, 須藤結香, 鈴木雅美, 寺脇潔, 山本雅浩, 的場元弘, 上園保仁. carboplatinによるtransient receptor potential ankyrin 1活性増強作用機序の解明. 第85回日本薬理学会年会. 京都市 (2012年3月).
  13. 芦川真帆, 鈴木雅美, 成田年, 長谷川実奈美, 鈴木勉, 的場元弘, 佐々木博己, 上園保仁. 癌性腹膜炎疼痛モデルマウスの脊髄後根神経節における $\mu$ -opioid受容体およびサブスタンスPの発現変化. 第85回日本薬理学会年会. 京都市 (2012年3月).
  14. 村松俊, 白石成二, 戸田亜希子, 茂木正行, 原真由美, 川崎良彦, 谷口幹雄, 上園保仁. アセトアミノフェン20 mg/kg経口投与後のラット脳内AM404濃度. 第85回日本薬理学会年会. 京都市 (2012年3月).
  15. 橋本弘史, 吉村充弘, 石倉透, 藤原広明, 上園保仁, 上田陽一. コレシストキニンおよびアポモルフィン末梢投与によるラット室傍核における*c-fos* mRNA発現の検討. 第89回日本生理学会大会. 松本市 (2012年3月).
  16. 横山徹, 寺脇潔, 南浩一郎, 柳原五吉, 上園保仁, 上田陽一. がん悪液質モデルラットでは視索上核大細胞性神経分泌細胞での浸透圧感受性が変化している. 第89回日本生理学会大会. 松本市 (2012年3月).
- 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

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 六君子湯の抗悪液質効果のメカニズムの解析を動物実験で行った。六君子湯は担がんモデル動物の生存期間延長効果を示した。その作用は、悪液質で減弱しているグレリンシグナルを増強することによるもので、蒼朮のアトラクチロジンが重要であると考えられた。

A．研究目的

分担項目は、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イズドコントロールスタディ及びそのとりまとめであり、本年度も六君子湯を中心に、動物実験を施行し、臨床研究の評価項目設定のための基礎研究を継続した。動物実験による六君子湯の研究は、悪液質におけるグレリン抵抗性メカニズムの解明に加え、担がんモデル動物の寿命延長効果に対する六君子湯の作用機構の解明を目的とした。

B．研究方法

動物実験は、我々が以前に報告した吉田肝がん細胞の担がんモデルラットで、六君子湯の悪液質改善効果を体重減少、摂食量減少、筋肉量減少、消化管運動などに加え、生存延長効果とその作用機序に焦点を当てて解析を行い、

マウス大腸がん細胞の担がんモデルマウスでも生存延長効果を観察した。

（倫理面への配慮）

いずれの研究も、当該施設の動物実験倫理委員会、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

担がんモデルラットでは、体重減少、摂食量減少、筋肉量減少、消化管運動低下、サイトカインや炎症を反映する蛋白（CRP）の増加を認めた。六君子湯は担がんモデルラットの体重減少、摂食量減少、筋肉量減少、消化管運動低下を改善し、CRPの増加を抑制した。担がんモデルラットの生存期間はグレリン受容体拮抗薬により短縮し、六君子湯や六君子湯の蒼朮の含まれるアトラクチロジンの投与により延長するこ

とが示された。また担がんモデルマウスでも六君子湯により生存期間が延長した。アトラクチロジンはグレリンシグナルを増強することが示されており、六君子湯の生存延長効果の一部はグレリンシグナルの増強によるものと考えられた。

#### D . 考察

がん性悪液質においては、グレリンの相対的分泌不全に加え、グレリン作用の減弱が特徴的である。研究分担者らは動物実験において、六君子湯が内因性のグレリンを刺激すると同時に、グレリンシグナルを増強し、その作用機序はがん性悪液質で亢進しているセロトニン(5-HT)-5-HT<sub>2c</sub>受容体拮抗作用が中心であることを見出したが、担がんモデルラットでグレリンシグナルの減弱が生存期間短縮に関わること、および六君子湯がこのグレリン抵抗性を改善して生存期間を延長することを複数の動物モデルで確認した。生存期間延長効果の一部が六君子湯に含まれるアトラクチロジンのグレリンシグナル増強作用によることを示した。

#### E . 結論

六君子湯はがん性悪液質で低下しているグレリン分泌を刺激し、さらにグレリン抵抗性を改善しうる薬剤であり、動物実験でがん性悪液質の病態の改善および生存期間延長効果を持つ薬剤であることを示した。その作用機序は六君子湯の蒼朮の含まれるアトラクチロジンによるグレリンシグナル増強作用によるものが考えられた。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Iwase S, Yamaguchi T, Miyaji T, Terawaki K, Inui A, Uezono Y. The clinical use of Kampo medicines (traditional Japanese herbal treatments) for controlling cancer patients' symptoms in Japan: a national cross-sectional survey. *BMC Complement Altern Med*, 12: 222, 2012.
2. Fujitsuka N, Asakawa A, Amitani H, Hattori T, Inui A. Efficacy of ghrelin in cancer cachexia: clinical trials and a novel treatment by rikkunshito. *Crit Rev Oncog*, 17 (3): 277-284, 2012.
3. Fujitsuka N, Asakawa A, Amitani H, Fujimiya M, Inui A. Ghrelin and gastrointestinal movement. *Ethods Enzymol*, 514: 289-301, 2012.
4. Inui A. Editorial: a new horizon of herbal medicines in anorexia-cachexia syndrome. *Curr Pharm Des*, 18 (31): 4747-4748, 2012.

##### 2. 学会発表

1. Akio Inui. Ghrelin and energy homeostasis focused on cancer anorexia-cachexia syndrome. The 9th International Symposium on Growth and Nutrition in Children with Chronic Kidney Diseases. San Diego, USA (2012年4月).
2. 蔡明倫, 浅川明弘, 網谷真理恵, 春田いづみ, 網谷東方, 上園保仁, 山口武人, 新島旭, 矢田俊彦, 乾明夫. 六君子湯によるグレリンシグナル増強と肺癌患者の生存期間延長効果. 第109回日本内科学会総会・講演会. 京都市 (2012年4月).
3. 浅川明弘, 上園保仁, 藤宮峯子, 矢

- 田俊彦, 新島旭, 乾明夫. シンポジウム2 悪液質の進歩 癌性悪液質におけるグレリンシグナルの臨床応用の可能性. 第53回日本心身医学会. 鹿児島市 (2012年5月).
4. 乾明夫. 『経験』から『科学』へ 明らかになってきた漢方の作用メカニズム . 第2回市民公開セミナー「がんと漢方薬」のこと 漢方薬の現状とこれから. 東京 (2012年6月).
  5. 乾明夫. 悪液質の最近の進歩 空腹ホルモングレリン 漢方薬六君子湯を中心に . 独立行政法人産業技術総合研究所 第2回健康工学科学部門研究会. 淡路市 (2012年9月).
  6. 乾明夫. 悪液質の最近の進歩 (特別講演). 第3回新潟がん栄養療法研究会. 新潟市 (2012年10月).
  7. 浅川明弘, 山口武人, 乾明夫. グレリンシグナルの増強は癌性悪液質を改善する. 第54回日本消化器病学会. 神戸市 (2012年10月).
  8. 乾明夫. がん悪液質の最近の進歩. 第36回日本死の臨床研究会. 京都市 (2012年11月).
- 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 動物に抗がん剤を末梢投与することで生じる摂食抑制、視床下部摂食関連ペプチドおよび血中グレリンに対する六君子湯の胃内投与効果を検討した。その結果、六君子湯の投与により摂食抑制作用の有意な減弱、一部の視床下部摂食関連ペプチド発現の有意な変化および血中グレリン濃度の有意な増加を見出した。

A．研究目的

我々の摂食行動は、末梢からの液性・神経性情報および高次脳機能からの情報が視床下部（摂食中枢および満腹中枢）で統合されることによって調節されている。視床下部ニューロンでは、種々の摂食促進ペプチド・摂食抑制ペプチド（摂食関連ペプチド）を産生しており、摂食行動や代謝調節に重要な分子基盤である。

我々はがん悪液質で特徴的な食思不振、体重減少および嘔気・嘔吐を惹起する脳内メカニズムについて主に視床下部で産生される摂食関連ペプチドに焦点を当てて解明すること、がん悪液質および抗がん剤の副作用に対する六君子湯、大建中湯の効果のメカニズムを視床下部摂食関連ペプチドの動態を指標として脳内神経回路・分子基盤から解明することを目的としている。

今年度は、昨年度に得られた知見である動物に抗がん剤を投与して生じる

摂食抑制作用に対する六君子湯の胃内投与効果を再確認し、さらに視床下部における摂食関連ペプチドの発現動態の変化および血中グレリン濃度について検討した。

B．研究方法

成熟雄性ウイスター系ラットに生理食塩水もしくは抗がん剤のシスプラチン（6 mg/kg体重）を腹腔内投与して24, 48, 72時間後の体重、摂食量、飲水量および尿量を代謝ケージを用いて測定した。なお、シスプラチン投与前に2回（16時間前および直前）にわたり蒸留水もしくは六君子湯（1g/kg体重）の経口投与を行った。蒸留水＋生理食塩水群、六君子湯＋生理食塩水群、蒸留水＋シスプラチン群、六君子湯＋シスプラチン群の4群を作成し、各群7-8匹を用いた。

で作製した4群のラット全てを72時間後に断頭し、脳および体幹血

を採取した。取り出した脳はドライアイス上で凍結後、クリオスタットを用いて薄切切片を作製し、RI(<sup>35</sup>S)標識したオリゴ合成DNAプローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーション法により視床下部摂食関連ペプチド(oxytocin、CRH、POMC、CART、NPY、AgRP、MCHおよびorexin)遺伝子の発現変化をフィルムオートラジオグラフィおよび画像解析装置(MCID)により定量化した。

で同時に採取した体幹血は遠心分離後、血漿浸透圧、血糖値、コルチコステロン、active ghrelinおよびdesacyl ghrelinを測定した。

#### (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および血中コルチコステロンやグレリンは短時間で変動する可能性があるため、ギロチンを用いてすばやく断頭した。

#### C. 研究結果

蒸留水 + シスプラチン群において体重および摂食量が有意に減少した。六君子湯 + シスプラチン群では、蒸留水 + シスプラチン群に比較して体重および摂食量が有意に増加し、蒸留水 + 生理食塩水群および六君子湯 + 生理食塩水群と有意差がなくなった。

蒸留水 + 生理食塩水群、六君子湯 + 生理食塩水群、蒸留水 + シスプラチン群、六君子湯 + シスプラチン群の4群において、oxytocin、AgRPは変化なかった。CRH、NPYは蒸留水 +

シスプラチン群で有意に減少し、六君子湯 + シスプラチン群でコントロールレベルとなった。POMC、CART、MCH、orexinは蒸留水 + シスプラチン群で有意に増加し、六君子湯 + シスプラチン群でコントロールレベルとなった。

蒸留水 + 生理食塩水群、六君子湯 + 生理食塩水群、蒸留水 + シスプラチン群、六君子湯 + シスプラチン群の4群において、血漿浸透圧、血糖値、コルチコステロン濃度およびdesacyl ghrelin濃度に有意差はなかった。一方、active ghrelinは、六君子湯 + シスプラチン群においてのみ有意に増加していた。

#### D. 考察

抗がん剤の副作用として悪心・嘔気は重要な問題である。

今回、昨年度に見出した抗がん剤シスプラチン投与後の体重、摂食量の有意な減少および六君子湯の経口投与によるこれらの変化の有意な減弱を再確認した。

次にこの六君子湯の作用機序について検討するため、視床下部摂食関連ペプチドの遺伝子発現について検討した。その結果、シスプラチン投与により摂食抑制ペプチドであるPOMC、CARTが弓状核において有意に増加し、摂食促進ペプチドであるNPYが有意に減少していたこと、および六君子湯の投与によりこれらのペプチドの変化がコントロールレベルに回復していたことから、シスプラチン投与による摂食抑制作用および六君子湯の改善効果はこれらのペプチドの変化が原因となって引き起こされたことが示唆される。



摂食抑制ペプチドであるCRHの有意な減少、摂食促進ペプチドであるMCH, orexinの有意な増加については、シスプラチン投与によって生じた摂食抑制の結果生じたものと考えられる。

さらに六君子湯による摂食抑制の改善効果は、六君子湯が血中active ghrelin濃度を増加させ、active ghrelinが視床下部に作用してPOMC、NPYをコントロールレベルに回復させた可能性が考えられる。

## E . 結論

シスプラチンによる摂食抑制作用および六君子湯による摂食改善作用は、血中active ghrelinを介して視床下部摂食関連ペプチドの動態を修飾したことによって生じた可能性が示唆された。

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hashimoto H, Uezono, Y, Ueta Y. Pathophysiological function of oxytocin secreted by neuropeptides: A mini review. Pathophysiology, 19 (4): 283-298, 2012.
2. 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, in press, 2013.

### 2. 学会発表

1. 上田陽一. 悪液質モデル動物における視床下部摂食関連ペプチドの動態. 第53回日本心身医学会総会ならびに学術講演会シンポジウム. 鹿児島市 (2012年5月).
2. 上田陽一, 吉村充弘, 橋本弘史, 石倉透, 横山徹, 上園保仁. シスプラチン投与におけるラット摂食抑制反応に対する六君子湯の胃内投与効果. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌市 (2012年9月).
3. Ueta Y. Drinking and feeding behavior based on peptides and TRP channels. The 3<sup>rd</sup> International Symposium of KoSCI & the 2<sup>nd</sup> AISCRIB. Korea (2012年11月).

## 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 下垂体内分泌細胞に対する六君子湯の影響について検討した。副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）産生培養細胞及び成長ホルモン（GH）産生培養細胞において、細胞内cAMP量及びホルモン遺伝子発現に対する六君子湯の影響を調べた。その結果、六君子湯は両細胞内のcAMP量を増加させたが、ホルモン遺伝子発現には明らかな影響を与えなかった。また、ACTH分泌に対しても明らかな影響を与えなかった。一方、アデニル酸シクラーゼ活性化薬は細胞内cAMP量の増加とともにACTH産生細胞からのACTH分泌を促進した。以上の結果より、六君子湯は下垂体細胞に対してcAMP増加作用を示すが、下垂体におけるホルモンの産生・分泌に対しては強い作用のないことが示唆された。

#### A．研究目的

六君子湯は種々の原因による食思不振の治療に用いられており、がん悪液質の軽減にも有効性が期待される。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。本研究では、下垂体細胞に対する六君子湯の影響を検討した。

#### B．研究方法

ACTH産生マウス下垂体培養細胞At

T-20及びGH産生ラット下垂体培養細胞GH3を六君子湯及びアデニル酸シクラーゼの活性化薬forskolinで刺激し、細胞内cAMPを免疫学的測定法により定量した。さらに、ACTH mRNA及びGH mRNAを定量的PCR法により測定するとともに、培養細胞中に放出されるACTHを免疫学的測定法により定量した。

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。

（倫理面への配慮）

本年度の研究では、ヒト由来の試料

等を用いる研究は行わなかった。動物由来の組織は培養細胞のみを用いた。

### C. 研究結果

AtT-20細胞及びGH3細胞を六君子湯、forskolin、又はその両方で刺激し、細胞内cAMP量を測定した。その結果、六君子湯は用量依存的に両細胞内のcAMP濃度を有意に上昇させるとともに、アデニル酸シクラーゼの活性化薬であるforskolinの作用を増強することが明らかになった(図1a, b)。

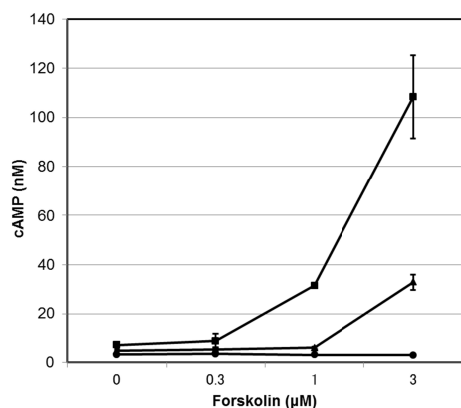


図1a. 六君子湯及びforskolinで30間分刺激した後のAtT-20細胞内cAMP濃度。  
n=3, Mean±SE.  
●コントロール、▲六君子湯1%、■六君子湯3%

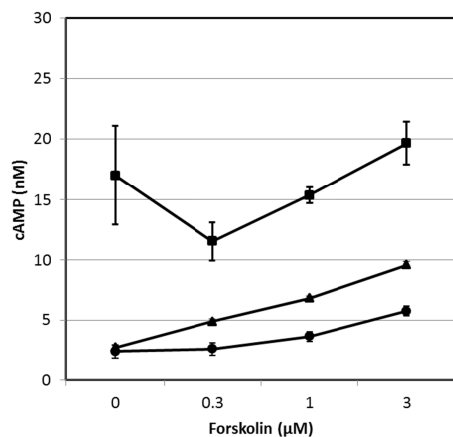


図1b. 六君子湯及びforskolinで30間分刺激した後のGH3細胞内cAMP濃度。  
n=3, Mean±SE.  
●コントロール、▲六君子湯1%、■六君子湯3%

六君子湯によって惹起される細胞内

cAMPの増加が、cAMP応答遺伝子の発現を増強するか否かを調べる目的で、ACTH前駆体proopiomelanocortin (POMC) 遺伝子及びGH遺伝子のmRNAをそれぞれ定量した。AtT-20細胞では既報の通り、forskolinによる用量依存的なPOMC mRNAの発現増加傾向が認められた。六君子湯はforskolin刺激のない場合にはmRNAの軽度の誘導を認めたが、3 mM forskolinによるmRNAの発現誘導をむしろ抑制する傾向が見られた(図2a)。一方、GH3細胞では、forskolinによるGH mRNAの発現誘導は認められず、また、六君子湯は3 mM forskolin刺激時のmRNA量を抑制する傾向があった(図2b)。

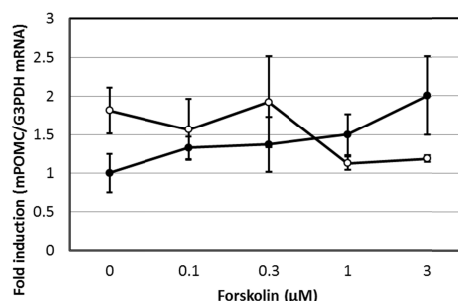


図2a. 六君子湯及びforskolinで6時間刺激した後のAtT-20細胞内POMC mRNA量。  
n=3, Mean±SE.  
●コントロール、○六君子湯3%

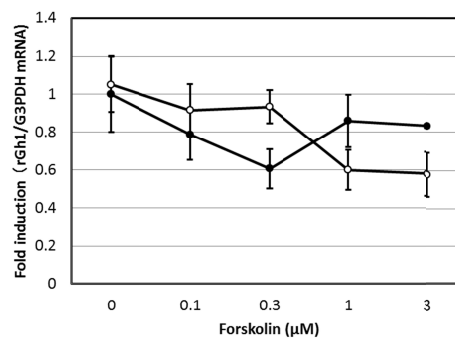


図2b. 六君子湯及びforskolinで6時間刺激した後のGH3細胞内GH mRNA量。  
n=3, Mean±SE.  
●コントロール、○六君子湯3%

六君子湯による細胞内cAMP濃度の

上昇が下垂体細胞からのホルモン分泌を促進するか否かを、AtT-20細胞培養液中のACTH濃度を測定することにより検討した。その結果、forskolinはAtT-20細胞からのACTH分泌を促進したが、六君子湯は明らかな影響を及ぼさなかった（図3）。

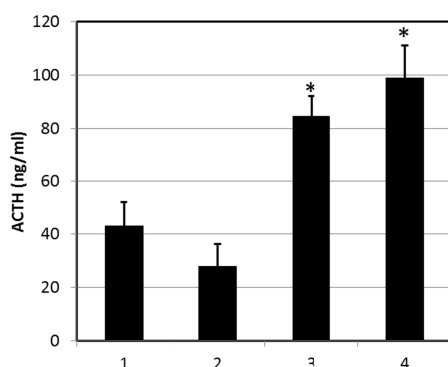


図3. AtT-20細胞を8時間刺激後の培養液中のACTH濃度。n=4, Mean±SE.  
1. コントロール、2. 六君子湯3%、3. 1 μM forskolin、4. 六君子湯3%+1 μM forskolin  
\*, P<0.05 vs control

#### D . 考察

六君子湯は食欲改善の治療薬として、種々の病態で用いられるが、その効果の発現機序は必ずしも明らかではない。これまでの研究により、六君子湯が細胞内cAMPを増加させる成分を含むことが知られており、また、種々のホルモンの産生・分泌がcAMP依存的であることから、六君子湯は種々の内分泌細胞の機能に影響を及ぼす可能性がある。

下垂体のACTH産生細胞やGH産生細胞では、細胞内cAMPの上昇により遺伝子発現が誘導され、かつ細胞外へのホルモン放出が促進されることが知られている。本研究でも、AtT-20細胞のforskolinによる刺激実験では、既報の通り、cAMPの上昇とともにPOMC遺伝子発現の促進とACTH分泌促進が認められた。一方、六君子湯による刺激ではcA

MP濃度上昇を認めたものの、遺伝子発現促進とACTH分泌には明瞭な一定方向の作用を認めなかった。以上のことから、六君子湯はcAMPを増加させるとともに、その他の機序によってもACTH産生下垂体細胞の機能に影響する可能性が考えられた。GH3細胞については、forskolinによるcAMP上昇によっても、GH遺伝子発現が増加せず、正常下垂体のforskolinに対する反応を再現できなかった。その理由は不明であるが、GH3細胞が下垂体腫瘍細胞であり、正常のGH産生下垂体細胞とは異なる遺伝子発現調節を受けていることも一因と考えられる。

#### E . 結論

六君子湯はACTH産生下垂体細胞及びGH産生下垂体細胞の細胞内cAMPを増加させる。しかし、ホルモンの産生・分泌に対しては強い作用がないことが示唆された。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, Sano K, Tsukada T, Sakurai A. A novel splice site mutation of the *MEN1* gene identified in a patient with primary hyperparathyroidism. *Endocr J*, 59 (6): 523-530, 2012.
2. Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, Tsukada T, Sakurai A. Application of an intracellular stability test of a novel missense menin mutant to the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr J*, 59 (12): 1093-1098, 2012.
3. 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, epub ahead of print, 2013.

## 2. 学会発表

1. Tsukada T., Nagamura Y, Terawaki K, Uezono S. Enhancement of catecholamine biosynthesis and secretion in PC12 cells by a traditional Japanese medicine rikkunshito. 第71回日本癌学会総会. 札幌市 (2012年9月).

## 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解剖学第2講座 教授

研究要旨 抗がん剤（cisplatin）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、cisplatin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-HT<sub>3</sub>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

シスプラチンは腸管のEC細胞からのセロトニン放出を増加させることで、悪心・嘔吐を引き起こすことが知られている。我々は平成23年度の研究で、六君子湯がシスプラチンで起こる上部消化管運動の異常を改善することを報告した。上部消化管運動に関連するセロトニン受容体は5-HT<sub>3</sub>や5-HT<sub>4</sub>受容体が知られているが、六君子湯はそれらの受容体には親和性がない（Takeda H et al. Gastroenterology 134: 2004-2013, 2008）。そこで平成24年度の研究で、六君子湯がEC細胞からのセロトニン分泌を直接抑制するかどうかを調べた。

#### B．研究方法

ラットにシスプラチン（5 mg/kg）およびvehicleを腹腔内投与し、30分後に採血。血清セロトニン濃度を測定した。さらに、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。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血中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で承認されている。

#### C．研究結果

正常対照群の血中セロトニン濃度は、 $598.7 \pm 106.7$  ng/ml (n=5)、六君子湯単独

投与群は、 $841.0 \pm 115.6$  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、 $1492.5 \pm 231.2$  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、 $717.5 \pm 85.7$  ng/ml (n=5)で、シスプラチン投与群より有意に減少 ( $P < 0.05$ ) 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-HT<sub>3</sub>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emesis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。平成24年度の研究で、六君子湯がシスプラチンで増加した血中セロトニン濃度を正常化させることが判明した。これまで、六君子湯とセロトニン分泌の研究はほとんどなされていなかったが、本研究成果は重要な示唆を与えるものである。

#### E . 結論

ラットにおいてシスプラチン投与の2時間前に六君子湯を経口投与した群とvehicle群の血中セロトニン濃度を測定した。シスプラチン投与で血中のセロトニン濃度は有意に増加し、六君子湯投与でこの効果はブロックされた。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fujitsuka N, Asakawa A, Amitani H, Fujimiya M, Inui A. Ghrelin and gastrointestinal movement. *Methods Enzymol*, 514: 289-301, 2012.
2. Ataka K, Nagaishi K, Asakawa A, Inui A, Fujimiya M. Alteration of antral and proximal colonic motility induced by chronic psychological stress involves central urocortin 3 and vasopressin in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303 (4): G519-G528, 2012.
3. Fujimiya M, Ataka K, Asakawa A, Chen CY, Kato I, Inui A. Regulation of gastroduodenal motility: acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin and hypothalamic peptides. *Digestion*, 85 (2): 90-94, 2012.

##### 2. 学会発表

なし

#### 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 薬学部生命創薬科学科  
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）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、さらに六君子湯がCCに及ぼす影響を検討した。その結果、脂質分解系タンパク質発現はCC、30%CR、70%CRともに亢進したが、脂肪酸合成系タンパク質発現はCCでは抑制され、30%CRでは亢進、70%CRでは変化がなかった。またCCおよび70%CRではミトコンドリア数の減少にともない単位ミトコンドリア当たりの活性が過度に亢進しているようであった。一方、CCへの六君子湯投与は脂肪酸合成系の低下を改善したが、ミトコンドリアへの影響は見られなかった。以上の結果から、白色脂肪組織におけるde novo脂肪酸合成系の低下と単位ミトコンドリア当たりの過度な機能亢進が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前者を改善すること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点を明らかにする。

B．研究方法

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、コントロールラットの白色脂肪組織（WAT）において、形態学的解析、脂質分解系および脂肪酸合成系タンパク質発現、ミトコンドリア量、ミトコンドリア関連酵素活性を解析した。また、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Y12029)。

## C. 研究結果

脂肪細胞のサイズはCCで減少したが、六君子湯による影響は見られなかった。また30%CRでは脂肪細胞のサイズに変化は見られなかったが、70%CRでは有意に減少した。

脂質分解関連タンパク質の発現はCCにより有意に増加したが、六君子湯による影響は見られなかった。また、30%CR、70%CRともに有意に増加した。一方、脂質合成関連タンパク質の発現はCCで減少したが、六君子湯によりその減少は改善傾向を示した。また、30%CRでは有意に増加したが、70%CRでは有意に減少した。

ミトコンドリアDNA量で表されるミトコンドリア量はCCで有意に減少したが、六君子湯による影響は見られなかった。また30%CRでは変化が見られなかったが、70%CRでは有意に減少した。一方、ミトコンドリア関連酵素活性はCCにより変化なく、六君子湯による影響も見られなかった。またCRの程度に比例して、その活性は有意に増加した。

## 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。また、CCと70%CRではミトコンドリア量が顕著に減少し

た結果、単位ミトコンドリアあたりの酵素活性が過度に増強している可能性が示唆されたが、30%CRではそのような変化は見られなかった。

六君子湯によるミトコンドリアへの効果は観察できなかったが、CCにより減少した脂肪酸合成系タンパク質発現を増加させた。以上より、六君子湯によるCC病態の改善効果の一部はde novo脂肪酸合成の増加にある可能性が示唆された。

## E. 結論

六君子湯投与による白色脂肪組織におけるde novo脂肪酸合成系の維持ががん悪液質病態の抑制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. 樋上賀一. 脂質代謝の変化からみたカロリー制限による抗老化・寿命延長作用のメカニズム. 心身医学, 52 (3): 194-200, 2012.
2. Nagai W, Okita N, Matsumoto H, Okado H, Oku M, Higami Y. Reversible induction of PARP1 degradation by p53-inducible cis-imidazole compounds. Biochem Biophys Res Commun, 421 (1): 15-19, 2012.
3. Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, Fukushima M, Yuguchi K, Mikami K, Yamauchi A, Watanabe K, Noguchi M, Nakamura M, Toda T, Higami Y. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. Mech Ageing Dev, 133 (5): 255-266, 2012.

4. 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)*, epub ahead of print, 2012.
  5. 藤井波木, 沖田直之, 樋上賀一. カロリー制限による白色脂肪組織を中心とした脂質代謝の活性化. *基礎老化研究*, 36 (2): 31-38, 2012.
  6. Mikami K, Okita N, Tokunaga Y, Ichikawa T, Okazaki T, Takemoto K, Nagai W, Matsushima S, Higami Y. Autophagosomes accumulate in differentiated and hypertrophic adipocytes in a p53-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, 427 (4): 758-763, 2012.
2. 学会発表
1. 樋上賀一. 脂肪酸合成関連転写因子 sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1cは絶食耐性遺伝子である. 第101回日本病理学会総会. 東京 (2012年4月).
  2. 湯口景子, 土屋拓郎, 福島麻友美, 沖田直之, 戸田年総, 樋上賀一. カロリー制限によるミトコンドリアバイオジェネシスの経時的変化. 第35回日本基礎老化学会大会. 習志野 (2012年7月).
  3. 福永大地, 森秀一, 久保幸恵, 中山亮, 村瀬尚哉, 宮崎剛, 樋上賀一, 重本和宏. 老齡マウスの筋線維タイプ特異的な筋萎縮の病態解明. 第35回日本基礎老化学会大会. 習志野 (2012年7月).
  4. 徳永雄紀, 三上健太郎, 沖田直之, 樋上賀一. 肥満における組織特異的オートファジーの解析. 第35回日本基礎老化学会大会. 習志野 (2012年7月).
  5. 大塚佑樹, 沖田直之, 寺脇潔, 上園保仁, 樋上賀一, カロリー制限とがん悪液質の白色脂肪細胞組織における応答性の違い. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京 (2012年10月).
  6. 武本佳那子, 三上健太郎, 沖田直之, 樋上賀一. 脂肪酸が肝臓細胞のオートファジーに及ぼす影響. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京 (2012年10月).
  7. 石川菜摘, 奥美紗子, 永井恒, 鈴木裕規, 沖田直之, 樋上賀一. 脂肪細胞および筋細胞におけるがん抑制遺伝子p53を介したミトコンドリア制御. 第56回日本薬学会関東支部大会. 東京 (2012年10月).
  8. 福永大地, 久保幸穂, 森秀一, 宮崎剛, 樋上賀一, 重本和宏. 老齡マウスを用いた加齢性筋萎縮の筋線維タイプ特異的な筋病態の解析. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡 (2012年12月).
  9. 藤井波木, 沖田直之, 仲條良和, 小西智一, 成田匠, 樋上賀一. カロリー制限による成長ホルモン非依存的なラット白色脂肪組織のリモデリング. 第35回日本分子生物学会年会. 福岡 (2012年12月).
- 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 旭川医科大学外科学講座  
消化器病態外科学分野 客員准教授

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、これまで行ってきた大建中湯の抗炎症性作用の機序解明の中で乾姜の主要成分ショウガオール、ジンゲオールがプロスタグランジンE<sub>2</sub>産生を抑制し、その機序としてアラキドン酸代謝に関わる重要酵素（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）の抑制機序が含まれていた。大建中湯の構成生薬成分が多標的にプロスタグランジンE<sub>2</sub>抑制効果を有する可能性があり、がんに伴う炎症、疼痛に関して治療への応用が期待される。

A．研究目的

大建中湯の薬効機序を分子レベルで解析した結果、吸収された大建中湯の有効成分、山椒のsanshools、乾姜のshogaols/gingerolsがカルシトニン関連ペプチドを介して炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗炎症性作用を発揮している機序が明らかにし、さらにはこれら有効成分が体内に吸収されることも明らかとなりつつあり、進行がんによる炎症や痛みに対する大建中湯の臨床応用を示唆する機序解明を本研究の目的とする。

B．研究方法

炎症および痛みの主原因の一つであ

るプロスタグランジンE<sub>2</sub>に対して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で抑制できるかどうか培養細胞実験で検討を行う。ヒト培養上皮細胞に炎症性サイトカインやリポポリサッカライドで刺激し、プロスタグランジンE<sub>2</sub>産生を促し、山椒のsanshools、乾姜のshogaols/gingerolsを添加による産生抑制効果を検証、またアラキドン酸代謝に関与する各種酵素群の発現を定量的PCRで比較検討する。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮を特に必要としない培養細胞を用いた研究方法であるが、旭川医大研究管理等に準拠し研究を進める。

## C . 研究結果

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ているが、特に、乾姜のshogaolsが0.1 $\mu$ mol/Lという低濃度でプロスタグランジンE2を80%近く減少させることを明らかにした。その機序として生体膜のリン脂質をアラキドン酸に変換する細胞質型ホスホリパーゼA2、アラキドン酸からプロスタグランジンG2に変換するCOX2、最終的にプロスタグランジンE2に変換するプロスタグランジンE合成酵素を抑制することを明らかにした。生体防御に重要なCOX1に関して抑制効果は認められなかった。

## D . 考察

体内に吸収された大建中湯の主要成分である山椒のsanshools、乾姜のshogaolが、トランジェントレセプターポテンシャルチャンネルというカルシウムチャンネルを介して抗炎症性サイトカイン、抗炎症作用があることを明らかにしてきた [ Surgery 2009, J Crohn's Colitis 2010, J Gastroenterology 2011, American J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2013, Drug Metab Dispos 2011, Drug Metab Dispos 2013 ]。これら成分が痛みや炎症の原因であるプロスタグランジンE2産生を多標的に抑制する可能性があり、大建中湯ががん性疼痛や炎症を軽減できる可能性を探索することが本研究目的であり、漢方薬が合剤である意義を明らかにすることができる考えた。その点から本研究は極めて独創的である。現在、がん領域における新規西洋薬の開発コストは天文学的数字である。抗がん剤の副作用やがん悪

液質などに対する新規西洋薬の開発は困難な状況である。本研究成果はがん領域で新たな臨床応用をコストをかけずに検証できる可能性が高く、西洋薬と漢方薬を併用できる日本の医師と患者しかできない研究である。漢方薬が新たな適応疾患に単独使用されたり併用使用で既存の西洋薬の使用量を減らしたり上乗せ効果を確認することができれば医療経済上のメリットは大きい。がん患者において最も気がかりな点は痛みである。この痛みを軽減する方法はこれまでオピオイドや消炎鎮痛剤NSAIDを利用してきたが、それぞれ副作用も多く発現するため一定の制限がかけられてきたが、大建中湯によるがん性疼痛に関して動物実験や臨床試験で有益であることが証明されれば、副作用の発現が極めて低頻度の安全な鎮痛薬として使用できる可能性がある。

## E . 結論

大建中湯の成分が血中レベルに匹敵する濃度で培養細胞において多標的にアラキドン酸代謝酵素を抑制しプロスタグランジンE2を特異的に抑制することを明らかにし、がんに伴う炎症や痛みを抑制できる可能性が示唆できた。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

1. 河野透, 上園保仁. 腸管血流からみた大建中湯の役割 アメリカ臨床治療薬TU-100になった理由. 医学のあゆみ, 241 (2), 163-169, 2012.
2. 河野透. 今日のがん治療を支える漢方薬のエビデンス. In: がん漢方. 南山堂, pp16-25, 2012.

3. 掛地吉弘, 河野透. In: EBMによるがん領域の漢方の使い方. ライフサイエンス, pp1-49, 2012.
4. Kono T, Kaneko A, Omiya Y, Ohbuchi K, Ohno N, Yamamoto M. Epithelial transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-dependent adrenomedullin upregulates blood flow in rat small intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 304 (4): G428-G436, 2013.
5. 河野透. 消化器疾患に対する漢方医料の実際 イレウス. 臨床消化器内科, 28 (2): 189-196, 2013.

## 2. 学会発表

1. Kono T, Kaneko A, Matsumoto C, Hibino T, Shigenobu T, Fukutake M, Uezono Y. Amelioration of 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters by TJ-14 (Hangeshashinto), inhibitor of inducible prostaglandin E2 and proinflammatory cytokine. Digestive Disease Week 2012, San Diego, USA (2012年5月).
2. Kono T, Omiya Y, Kaneko A, Yamamoto M. Intraluminal TRPA1 agonists: an effective means to increase intestinal blood flow. Digestive Disease Week 2012, San Diego, USA (2012年5月).

## 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

六君子湯を用いたがん患者のQOL向上のための臨床研究

研究分担者 大西 俊介 北海道大学大学院医学研究科  
消化器内科学分野 助教

研究要旨 がん患者のQOL向上のための六君子湯のエビデンスを確立するため、臨床研究を立案し、「ゲムシタピン投与膺がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質進行抑制効果-無作為化第 比較試験」および「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第 比較試験」の二つのプロトコールの作成を行った。前者については平成24年8月より登録開始となった。

A．研究目的

我々はこれまでに、動物モデルを用いて六君子湯の食欲増進作用およびそのメカニズムを明らかにし、がん患者のQOL向上のためのエビデンスを確立するため、臨床試験のプロトコールを作成してきた。本年度は、実際に臨床試験を開始した。

B．研究方法

上園班で組織されるデータセンターならびに統計専門家らとともに、「ゲムシタピン投与膺がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質進行抑制効果-無作為化第 比較試験」のフルプロトコールを作成した。また、「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の

効果-無作為化第 比較試験」のフルプロトコールの作成を行った。

（倫理面への配慮）

臨床研究であるため、倫理面には特に配慮し、完成したフルプロトコールはプロトコール審査委員会に諮り承認を得たのち、各参加施設の倫理審査委員会での承認を得ることとした。また、被験者には十分な説明を行い、説明同意文書に署名をいただいてから開始し、補償のための保険にも加入した。

C．研究結果

「ゲムシタピン投与膺がん患者における軽度悪液質または前悪液質状態に対する六君子湯の悪液質進行抑制効果-無作為化第 比較試験」については、フルプロトコールが完成し、プロトコール審査委員会の承認を得て、平成24

年4月に参加各施設とともにキックオフミーティングを行った。同年5月に実質的な研究責任機関である北海道大学病院の自主臨床研究事務局の審査委員会の承認を得た。同年8月より登録開始可能となった。平成25年4月現在、5例の登録となっている。一方、「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第 相比較試験」については、フルプロトコールが完成し、平成25年3月にプロトコール審査委員会の承認を得た。現在、北海道大学病院の自主臨床研究事務局の審査委員会に提出し、審査中である。

#### D . 考察

六君子湯はがん患者の悪液質の進行を抑制、あるいは抗がん剤による食欲不振を改善し、QOLや予後を改善する可能性があるため、本臨床研究において探索的な試験を行い、有用な評価項目が認められれば第 相の臨床試験を計画して検証していく。

#### E . 結論

がん患者のQOL向上のための六君子湯のエビデンスを確立するため、二つの臨床研究のプロトコールを作成した。一つは実際に登録開始となり、もう一つも近々登録開始となる予定である。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Miki K, Maekura R, Nagaya N, Nakazato M, Kimura H, Murakami S, Ohnishi S, Hiraga T, Miki M, Kitad

a 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 (5): e35708, 2012.

2. Nahata M, Muto S, Oridate N, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 303 (1): G42-G53, 2012.
3. Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Asaka M. Rikkunshito and ghrelin secretion. *Curr Pharm Des*, 18 (31): 4827-4838, 2012.
4. Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Rikkunshito as a ghrelin enhancer. *Methods Enzymol*, 514: 333-351, 2012.
5. Nahata M, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Saegusa Y, Iizuka S, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Serotonin 2C receptor antagonism ameliorates novelty-induced hypohagia in aged mice. *Psychoneuroendocrinology*, in press, 2013.

##### 2. 学会発表

1. Ohnishi S, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Sadakane C, Nahata M, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M. A study on gender differences in feeding behavior and plasma acyl ghrelin levels in aged mice following exposure to a novel environmental stress. *Digestive Disease Week 2012*. San Diego, USA (2012年5月). (Gastroenterology)



- gy, 142 (5): S559, 2012)
2. 大西俊介, 武藤修一, 武田宏司. 性差が末梢グレリン分泌に与える影響-老化マウスにおける検討-. 第98回日本消化器病学会総会 ワークショップ. 東京 (2012年4月). (日本消化器病学会雑誌, 109: 臨増総 A323 )
  3. 武田宏司, 武藤修一, 大西俊介. グレリンシグナルの定価がGERDにおける胃排出定価に関与する. 第54回日本消化器病学会大会, 神戸市 (2012年10月). (日本消化器病学会雑誌, 109: 臨増大会A822 )

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

六君子湯を用いたがん患者のQOL向上のための臨床研究

研究分担者 櫻木 範明 北海道大学大学院医学研究科  
生殖内分泌腫瘍学 教授

研究要旨 がん患者のQOL向上のための六君子湯のエビデンスを確立するため、臨床研究を立案し、「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第II相比較試験」のプロトコルの作成を行った。現在、北海道大学病院自主臨床研究事務局の審査委員会にて審議中である。

A．研究目的

これまでに行われてきた動物モデルを用いて明らかとなった六君子湯の食欲増進作用とそのメカニズムに基づき、がん患者のQOL向上のためのエビデンスを確立するため、臨床試験のプロトコルの作成を行う。

B．研究方法

上園班で組織されるデータセンターならびに統計専門家らとともに、シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第 相比較試験」のフルプロトコルの作成を行った。

（倫理面への配慮）

臨床研究であるため、倫理面には特に配慮し、完成したフルプロトコルはプロトコル審査委員会に諮り承認

を得たのち、各参加施設の倫理審査委員会での承認を得ることとしている。また、被験者には十分な説明を行い、説明同意文書に署名をいただいてから開始し、補償のための保険にも加入する。

C．研究結果

「シスプラチンを含む化学療法を施行される子宮がん患者の食欲不振に対する六君子湯の効果-無作為化第 相比較試験」について、フルプロトコルが完成し、平成25年3月にプロトコル審査委員会の承認を得た。現在、北海道大学病院の自主臨床研究事務局の審査委員会に提出し、審査中である。

D．考察

六君子湯はがん患者の悪液質の進行を抑制、あるいは抗がん剤による食欲

不振を改善し、QOLや予後を改善する可能性があるため、本臨床研究において探索的な試験を行い、有用な評価項目が認められれば第 相の臨床試験を計画して検証していく。

## E . 結論

がん患者のQOL向上のための六君子湯のエビデンスを確立するため、臨床研究のプロトコールを作成し、近々登録開始となる予定である。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hosaka M, Watari H, Kato T, Odagiri T, Konno Y, Mitamura T, Kikawa S, Suzuki Y, Sakuragi N. Clinical efficacy of paclitaxel/cisplatin as an adjuvant chemotherapy for patients who underwent radical hysterectomy and systematic lymphadenectomy. J Surg Oncol, 105 (6): 612-616, 2012.
2. Watari H, Hosaka M, Wakui Y, Nomura E, Hareyama H, Tanuma F, Hattori R, Azuma M, Kato H, Takeda N, Ariga S, Sakuragi N. A prospective study on the efficacy of octreotide in the management of malignant bowel obstruction in gynecologic cancer. Int J Gynecol Cancer, 22 (4): 692-696, 2012.
3. Dong P, Karaayvazb M, Jiac N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H, Sudo S, Ju J, Sakuragi N. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. Oncogene, epub ahead of print, 2012.
4. Kato T, Watari H, Endo D, Mitamu

ra T, Odagiri T, Konno Y, Hosaka M, Kobayashi N, Todo Y, Sudo S, Takeda M, Dong P, Kaneuchi M, Kudo M, Sakuragi N. New revised FIGO 2008 staging for endometrial cancer produces better discrimination in survival compared with the 1988 staging system. J Surg Oncol, 106 (8): 938-941, 2012.

5. Hosaka M, Fujita H, Hanley SJB, Sasaki T, Shirakawa Y, Abiko M, Kudo M, Kaneuchi M, Watari H, Kikuchi K, Sakuragi N. Incidence risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 or more severe lesions is a function of human papillomavirus genotype and severity of cytological and histological abnormalities in adult Japanese women. Int J Cancer, 132 (2): 327-334, 2013.

### 2. 学会発表

1. 櫻木範明. 子宮頸がん征圧をめざした予防対策とQOL重視の手術治療. 第19回日本がん予防学会. 岐阜市 (2012年6月).

## 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。

・研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
河野透.	今日のがん治療を支える漢方薬のエビデンス	今津嘉宏	がん漢方	南山堂	東京	2012	16-25
掛地吉弘, 河野透.	EBMによるがん領域の漢方の使い方	掛地吉弘 河野透	EBMによるがん領域の漢方の使い方	ライフサイエンス	東京	2012	1-49

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki M, Narita M, Ashikawa M, Furuta S, Matoba M, Sasaki H, Yanagihara K, Terawaki K, Suzuki T, Uezono Y.	Changes in the melancortin receptors in the hypothalamus of a rat model of cancer cachexia.	Synapse	66 (8)	747-751	2012
Sudo Y, Hojo M, Ando Y, Takada M, Murata H, Kurata S, Kanaide M, Nishida N, Uezono Y.	GABA <sub>B</sub> receptors do not internalize after baclofen treatment possibly due to lack of the $\beta$ -arrestin association;a real-time visualization study.	Synapse	66 (9)	759-769	2012
上園保仁.	変わる「第二次がん対策推進基本計画」-第一次がん対策推進基本計画実践後の反省をもとに、がん体験者の視点を取り入れて-	がん患者と対症療法	23 (1)	106-113	2012
Horishita T, Ueno S, Yanagihara N, Sudo Y, Uezono Y, Okura D, Sata T.	Inhibition by pregnenolone sulphate, a metabolite of the neurosteroid pregnenolone, of voltage-gated sodium channels expressed in <i>Xenopus</i> Oocytes.	J Pharmacol Sci	120 (1)	54-58	2012
Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, Furuta S, Kawamata T, Ashikawa M, Miyano K, Yanagihara K, Chiwaki F, Ochiya T, Suzuki T, Matoba M, Sasaki H, Uezono Y.	The sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied expression of substance P and by changes in the $\mu$ -opioid receptors in the spinal cord of mice.	Anesthesiology	117 (4)	847-856	2012
上園保仁.	ここまでわかってきた漢方薬の「なぜ効くの？」と「本当に効くの？」-科学的エビデンスに基づいた、がん患者のQOLを高める漢方薬の効果-	がん患者と対症療法	23 (2)	186-192	2012
Uezono Y, Miyano K, Sudo Y, Suzuki M, Shiraishi S, Terawaki K.	A review of traditional Japanese medicines and their potential mechanism of action.	Curr Pharm Des	18 (31)	4839-4853	2012
Iwase S, Yamaguchi T, Miyaji T, Terawaki K, Inui A, Uezono Y.	The clinical use of Kampo medicines (traditional Japanese herbal treatments) for controlling cancer patients' symptoms in Japan: a national cross-sectional survey.	BMC Complement Altern Med	12	222	2012

Minami K, <u>Uezono Y.</u>	The recent progress in research on the effects of anesthetics and analgesics on G protein-coupled receptors.	J Anesthesia	27 (2)	284-292	2013
Motoyama N, Morita K, Kitayama T, Shiraiishi S, <u>Uezono Y.</u> , Nishimura F, Kanamatsu T, Dohi T.	Pain-releasing action of platelet-activating factor (PAF) antagonists in neuropathic pain animal models and the mechanisms of action.	Eur J Pain		Epub ahead of print	2013
Yanagihara K, Takigahira M, Mihara K, Kubo T, Morimoto C, Morita Y, Terawaki K, <u>Uezono Y.</u>	Inhibitory effects of isoflavones on tumor growth and cachexia in newly established cachectic mouse models carrying human stomach cancers.	Nutr Cancer		In press	2013
Fujitsuka N, Asakawa A, Amitani H, Hattori T, <u>Inui A.</u>	Efficacy of ghrelin in cancer cachexia: clinical trials and a novel treatment by rikkunshito.	Crit Rev Oncog	17 (3)	277-284	2012
Fujitsuka N, Asakawa A, Amitani H, <u>Fujimiya M.</u> , <u>Inui A.</u>	Ghrelin and gastrointestinal movement.	Methods Enzymol	514	289-301	2012
<u>Inui A.</u>	Editorial: a new horizon of herbal medicines in anorexia-cachexia syndrome.	Curr Pharm Des	18 (31)	4747-4748	2012
Miki K, Maekura R, Nagaya N, Nakazato M, Kimura H, Murakami S, <u>Ohnishi S.</u> , 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 (5)	e35708	2012
Nahata M, Muto S, Oridate N, <u>Ohnishi S.</u> , Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M, Takeda H.	Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	303 (1)	G42-G53	2012
Takeda H, Muto S, Nakagawa K, <u>Ohnishi S.</u> , Asaka M.	Rikkunshito and ghrelin secretion.	Curr Pharm Des	18 (31)	4827-4838	2012
Takeda H, Muto S, Nakagawa K, <u>Ohnishi S.</u> , Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M.	Rikkunshito as a ghrelin enhancer.	Methods Enzymol	514	333-351	2012
Nahata M, Muto S, Nakagawa K, <u>Ohnishi S.</u> , Sadakane C, Saegusa Y, Iizuka S, Hattori T, Asaka M, Takeda H.	Serotonin 2C receptor antagonism ameliorates novelty-induced hypophagia in aged mice.	Psychoneuroendocrinology		In press	2013
Hashimoto H, <u>Uezono Y.</u> , <u>Ueta Y.</u>	Pathophysiological function of oxytocin secreted by neuropeptides: A mini review.	Pathophysiology	19 (4)	293-298	2012

Yoshimura M, Matsuura T, Ohkubo J, Ohno M, Maruyama T, Ishikura T, Hashimoto H, Kakuma T, Yoshimatsu H, Terawaki K, <u>Uezono Y</u> , <u>Ueta Y</u> .	The gene expression of the hypothalamic feeding-regulating peptides in cisplatin-induced anorexic rats.	Peptides		In press	2013
Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, Sano K, <u>Tsukada T</u> , Sakurai A.	A novel splice site mutation of the MEN1 gene identified in a patient with primary hyperparathyroidism.	Endocr J	59 (6)	523-530	2012
Nagamura Y, Yamazaki M, Shimazu S, <u>Tsukada T</u> , Sakurai A.	Application of an intracellular stability test of a novel missense menin mutant to the diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 1.	Endocr J	59 (12)	1093-1098	2012
Horiuchi K, Okamoto T, Iihara M, <u>Tsukada T</u> .	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		Epub ahead of print	2012
Ataka K, Nagaishi K, Asakawa A, <u>Inui A</u> , <u>Fujimiya M</u> .	Alteration of antral and proximal colonic motility induced by chronic psychological stress involves central urocortin 3 and vasopressin in rats.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	303 (4)	519-528	2012
<u>Fujimiya M</u> , Ataka K, Asakawa A, Chen CY, Kato I, <u>Inui A</u> .	Regulation of gastroduodenal motility: acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin and hypothalamic peptides.	Digestion	85 (2)	90-94	2012
<u>樋上賀一</u> .	脂質代謝の変化からみたカロリー制限による抗老化・寿命延長作用のメカニズム.	心身医学	52 (3)	194-200	2012
Nagai W, Okita N, Matsumoto H, Okado H, Oku M, <u>Higami Y</u> .	Reversible induction of PARP1 degradation by p53-inducible cis-imidazoline compounds.	Biochem Biophys Res Commun	421 (1)	15-19	2012
Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, Fukushima M, Yuguchi K, Mikami K, Yamauchi A, Watanabe K, Noguchi M, Nakamura M, Toda T, <u>Higami Y</u> .	Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats.	Mech Ageing Dev	133 (5)	255-266	2012
Chujo Y, Fujii N, Okita N, Konishi T, Narita T, Yamada A, Haruyama Y, Tashiro K, Chiba T, Shimokawa I, <u>Higami Y</u> .	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)		Epub ahead of print	2012
藤井波木, 沖田直之, <u>樋上賀一</u> .	カロリー制限による白色脂肪組織を中心とした脂質代謝の活性化.	基礎老化研究	36 (2)	31-38	2012
Mikami K, Okita N, Tokunaga Y, Ichikawa T, Okazaki T, Takemoto K, Nagai W, Matsushima S, <u>Higami Y</u> .	Autophagosomes accumulate in differentiated and hypertrophic adipocytes in a p53-independent manner.	Biochem Biophys Res Commun	427 (4)	758-763	2012
<u>河野透</u> , <u>上園保仁</u> .	腸管血流からみた大建中湯の役割 アメリカ臨床治験薬TU-100になった理由.	医学のあゆみ	241 (2)	163-169	2012

<u>Kono T</u> , Kaneko A, Omiya Y, Ohbuchi K, Ohno N, Yamamoto M.	Epithelial transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-dependent adrenomedullin upregulates blood flow in rat small intestine.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	304 (4)	G428-G436	2013
<u>河野透</u> .	消化器疾患に対する漢方医療の実際 イレウス.	臨床消化器内科	28 (2)	189-196	2013
Hosaka M, Watari H, Kato T, Odagiri T, Konno Y, Mitamura T, Kikawa S, Suzuki Y, <u>Sakuragi N</u> .	Clinical efficacy of paclitaxel/cisplatin as an adjuvant chemotherapy for patients who underwent radical hysterectomy and systematic lymphadenectomy.	J Surg Oncol	105 (6)	612-616	2012
Watari H, Hosaka M, Wakui Y, Nomura E, Hareyama H, Tanuma F, Hattori R, Azuma M, Kato H, Takeda N, Ariga S, <u>Sakuragi N</u> .	A prospective study on the efficacy of octreotide in the management of malignant bowel obstruction in gynecologic cancer.	Int J Gynecol Cancer	22 (4)	692-696	2012
Dong P, Karaayvazb M, Jiac N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H, Sudo S, Ju J, <u>Sakuragi N</u> .	Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis.	Oncogene		Epub ahead of print	2012
Kato T, Watari H, Endo D, Mitamura T, Odagiri T, Konno Y, Hosaka M, Kobayashi N, Todo Y, Sudo S, Takeda M, Dong P, Kaneuchi M, Kudo M, <u>Sakuragi N</u> .	New revised FIGO 2008 staging for endometrial cancer produces better discrimination in survival compared with the 1988 staging system.	J Surg Oncol	106 (8)	938-941	2012
Hosaka M, Fujita H, Hanley SJB, Sasaki T, Shirakawa Y, Abiko M, Kudo M, Kaneuchi M, Watari H, Kikuchi K, <u>Sakuragi N</u> .	Incidence risk of cervical intraepithelial neoplasia 3 or more severe lesions is a function of human papillomavirus genotypes and severity of cytological and histological abnormalities in adult Japanese women.	Int J Cancer	132 (2)	327-334	2013