

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21571

研究課題名(和文)がん悪液質における中枢機能障害の画像科学による病態機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of Pathological function of central dysfunction in cancer cachexia by imaging science

研究代表者

間賀田 泰寛(Magata, Yasuhiro)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：20209399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん悪液質の病態時におけるBBB透過性の変化、中枢神経系の循環代謝状態、中枢神経機能等を定量的に評価した報告はない。そこで本研究では、がん悪液質と中枢神経機能変化の関連性について検討することとした。

がん悪液質モデルラットを70%程度の確率で作成可能であることが確認された。[18F]FDG-PETにより測定した脳糖代謝率は、移植3、7日後で低下する傾向が認められた。BBB透過性の指標としてエバンスブルーの脳実質への漏出率は、移植14日後において上昇する傾向が認められた。さらに、がん悪液質モデルラットでは麻酔薬の効果が強くみられ、がん悪液質が脳機能もしくは薬物動態に影響する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん悪液質の概念そのものは古くから知られており、主に栄養学的な対応が検討されてきた。同時にがん悪液質時の中枢機能変化もよく知られているところであるが、これまでがん悪液質時のBBBをはじめ中枢機能の定量的評価については世界的にも報告がなく、モデルの報告例も少なく、基礎研究が進んでこなかった。ここに非侵襲的イメージング法を適用し、これまで為し得なかったがん悪液質の中枢への影響について基礎的に検討する可能性を示したことは、今後のがん悪液質病態評価や治療方針の開発に有益な知見をもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：There have been no reports quantitatively evaluating alteration in BBB permeability, cerebral blood flow and energy metabolism of the brain during the cancer cachexia. In this study, we examined the relationship between cancer cachexia and alteration of brain function. Preparation of a rat model of cancer cachexia was established with a probability of about 70%. The cerebral metabolic rate of glucose measured by [18F]FDG-PET tended to decrease at 3 and 7 days after transplantation, and the rate of Evans blue leakage into the brain parenchyma as an index of BBB permeability tended to increase at 14 days after transplantation. Furthermore, anesthetic effects were stronger in the rat model of cancer cachexia, indicating that cancer cachexia may affect brain function or pharmacokinetics in the brain.

研究分野：核薬学

キーワード：がん悪液質 ラットモデル PET 脳 IL-6

1. 研究開始当初の背景

2011年、European Palliative Care Research Collaborative (EPCRC)はがん悪液質を通常の栄養サポートでは完全に回復することが出来ず、進行性の機能障害に至る、骨格筋量の持続的な現象を特徴とする多因子性の症候群と定義した。がん悪液質の発症には、がん細胞の組織浸潤に伴い、循環血中に放出される IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインが関係する。それらのサイトカインは、末梢では肝臓におけるアルブミン合成を抑制するなど、タンパク合成を急性期タンパク質ヘシフトさせるとともに、エネルギー消費が増大する。一般的にがん悪液質はがんの終末期だけに起こると思われているが、実際には進行がん患者の80%に認められ、半数以上は初診時に既にかん悪液質である¹⁾。一方、がん悪液質の病態時には、せん妄、傾眠、うつ病や難治性がん疼痛などの中枢神経症状を併発することも多い。特にがん患者でのせん妄は多く、緩和ケア病棟では42%に上ると報告されている²⁾。また、がん悪液質の発症により中枢では血液脳関門 (BBB) を破たんさせ、本来脳移行しにくい生体内物質や薬物の脳への分布が亢進するといわれており、予期しない薬物の BBB 透過による中枢神経症状発症の予測と対応が重要である。しかしながら現状、がん悪液質の病態時における BBB 透過性の変化、中枢神経系の循環代謝状態、中枢神経機能等を定量的に評価した報告はなかった。

2. 研究の目的

がん悪液質における中枢疾患の発現は古くから知られているものの体系的な検討が遅れており、またバイオプシーによる検討の出来ない組織であるため、非侵襲的イメージングによる検討が有効で新しい研究分野なりうるのではないかと考え、本研究の着想に至った。そこで本研究では、がん悪液質と中枢神経機能変化の関連性について検討することとし、本研究によりがん悪液質の中枢神経症状発症の病態理解が進むとともに、がん悪液質における治療方針にも有益な情報を与え、新しい研究領域の勃興とその拡大を期するものである。

3. 研究の方法

【がん悪液質動物モデルの作成】

がん悪液質モデルとして、Trobec らの報告³⁾に従いラット腹腔に肝がん細胞 AH-130 を播種することで担がんラットを作成する事を試みた。EPCRC が示したがん悪液質のステージ分類を動物モデルに直接当てはめることは困難ではあるが、体重変化、摂取食卓量、と動物用 CT 装置を用いての筋肉量の変化を評価した。

【BBB 機能評価】

得られた動物モデルを用いて 3 種類の方法で脳および BBB 機能評価を行った。

1. EvansBlue による脳透過性の変化

本来 BBB を透過しない EvansBlue (EB) を腫瘍播種前、播種 3 日後、7 日後、14 日後に静脈内投与し、一定時間経過後に動物をと殺して脳を取り出し、PBS でホモジナイズして蛍光測定を行うことで、脳内へ取り込まれた EB 量を定量した。

2. ¹¹C-AIB (AIB) を用いた BBB 透過性評価

動物を殺すこと無く BBB の恒常性を評価することを目的にして AIB を用いて PET 撮像を行った。AIB は既報⁴⁾に従い、同じく本学附属のサイクロトロン施設にて製造した。上記の FDG による糖代謝評価と同様にして動物を準備し、AIB を投与後 1 時間のダイナミック撮像と動脈採血を行った。画像再構成後、BBB 透過率の指標となる Ku (uL/g/min) を求めた。

3. ¹⁸F-FDG (FDG) による脳糖代謝変化

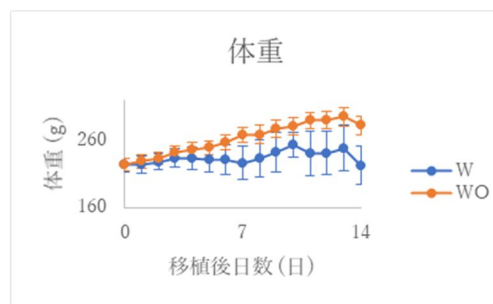


図 1 がん細胞播種後の体重変化

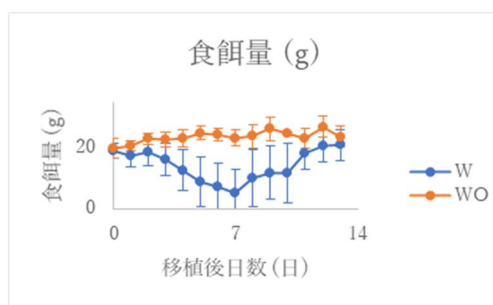


図 2 がん細胞播種後の食餌量変化

得られたラットモデルで、腫瘍播種前、播種 3 日後、7 日後、14 日後にイソフルラン麻酔下で大腿動脈に採血用カニューレを施し、尾静脈に投与用のラインを確保した。そのまま PET 装置にセットし、本学附属のサイクロトロン施設で定法に従い合成した FDG を用いて既報⁵⁾に従い同麻薬採血とダイナミック PET 撮像を行った。画像再構成後、脳糖代謝率 CMRg を求めた。

4. 研究成果

【がん悪液質動物モデルの作成】

がん細胞として AH130 および Walker256 を用いてがん悪液質モデルラット作成について検討した。その結果、種々問題点を克服し、AH130 を用いることで 70%程度の確率でがん悪液質モデルラットを作成することが可能であることが確認された。図 1 に腫瘍播種後の体重変化を示す。腫瘍細胞を播種しなければ(W0)、2 週間であっても徐々に体重が増えるにも関わらず、腫瘍播種ラット(W)ではほとんど体重増加は認められなかった。図 2 に播種後 2 週間の食事摂取量を示した。播種しない群(W0)では、当初の 1 週間に食事摂取量が大きく減少し、その後、播種前のレベルに戻った。W0 群ではこの間、ほぼ一定の食事量であった。図 3 に X 線 CT 装置を用いて大腿筋肉量を評価した結果を示した。W0 群では徐々に筋肉量の増加が認められたが、W 群では播種 1 週間後から筋肉量の低下を示した。これら、体重、食事量、筋肉量の変化はいずれも W 群が悪液質になっていることを否定しない。IL6 量についても ELISA を用いて測定を試みたものの、ばらつきが大きく今のところ IL6 量変化から悪液質の評価を行うには至っていないので、この点については今後の課題としたい。また、ラットのみならず、がん細胞として CT26 (マウス大腸腺癌) を用いてがん悪液質モデルマウス作成についても検討した。雄性 BALB/c マウスに皮下移植したところ、腫瘍サイズにばらつきはあるものの、生着率は 100%だった。筋肉量や血中 IL6 等を評価したところ、サンプル量の不足から精度が良くないと考えられたが、筋肉量の低下傾向や IL6 の増加傾向が認められ、マウスモデルについても作成の可能性が示された。引き続き今後の課題としたい。

【BBB 機能評価】

得られたラットモデルを用いて脳および BBB 機能評価を試みた。EB は分子量が大きいいため、通常の BBB であれば透過することは無く、投与後平衡状態になって脳を取り出しても、EB による蛍光強度は認められない。図 4 に本モデルで EB 投与後の脳内蛍光強度を血液比として求めたものを示す。脳内いずれの部位においても播種 14 日後に大きく蛍光強度比が増加し、BBB の一部破綻の可能性が示された。また、図 5 には AIB を用いて BBB 恒常性を評価した結果を示す。AIB は通常であれば脳内へ取り込まれず、BBB 構造が破綻した時のみ脳内に取り込まれるようなイメージング剤である。本化合物が脳内に集積するということは BBB の破綻を意味し、その取り込み量は破綻の程度に比例すると報告されているが、今回の検討では上記 EB で観察されたような AIB で評価する BBB の破綻データは得られなかった。ただ、本検討は多くて n=3 の結果であり、今後さらに個体数を増やすことで差が得られる可能性もある。脳はそのエネルギー源をグルコースに依っているので、FDG を用い既報に従い脳糖代謝率を指標として、脳糖代謝変化を評価した。図 6 にその結果を示す。同じく個体数は少ないものの、播種 2 週間後に CMRg が増加し、EB の結果とよく一致した。今回の一連の BBB 機能評価検討は各時間ポイントで PET 撮像後に EB を投与して

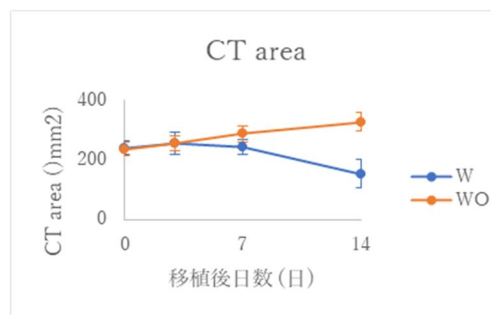


図 3 ガン細胞播種後の CT 面積を指標とする筋肉量変化

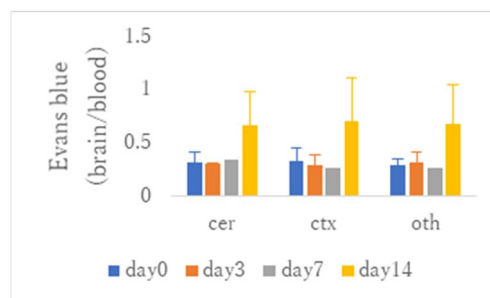


図 4 EB の蛍光強度比

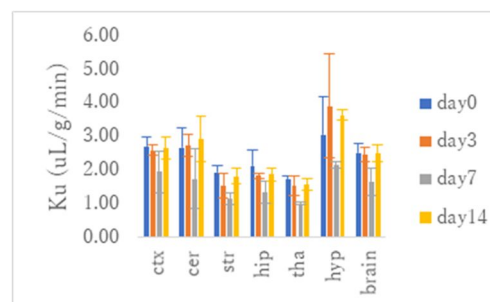


図 5 AIB による取込変化

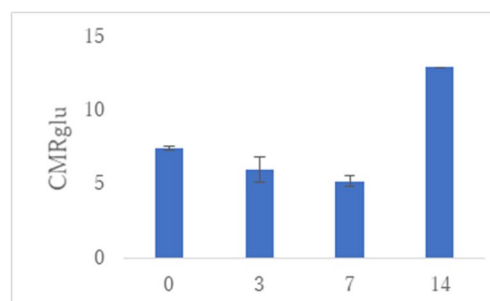


図 6 脳糖代謝率変化

と殺しているが、各点で個体数が揃っていない。その理由として、これらの実験を実施するにあたり、がん悪液質モデルラットでは麻酔薬の効果が強くみられる傾向にあり、実験直前に麻酔により死んだため脱落数が増えたことによるものである。この事は逆に、がん悪液質病態が脳機能もしくは薬物動態に影響する可能性を示すものと考えられ興味深いものと考えられる。がん悪液質時の中枢機能変化自体は古くから知られてきたところであるが、これまでがん悪液質時の BBB および脳機能変化の定量的評価について世界的にも報告が無く、モデルの報告例も少ないことから特に基礎研究が進んでこなかったものと思われる。本検討により今後のがん悪液質病態評価や治療方針の開発に有用な知見を与えたものと考えられる。

参考文献

- 1) JM Argilés, S Busquets, B Stemmler, FJ López-Soriano. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer*. 14(11):754-762, 2014
- 2) PG Lawlor, B Gagnon, IL Mancini, JL Pereira, J Hanson, ME Suarez-Almazor, ED Bruera. Occurrence, causes, and outcome of delirium in patients with advanced cancer: a prospective study. *Arch Intern Med*. 160(6):786-794 2000.
- 3) CK Trobec, KM Kerec, J Tronteli, I Grabnar, A Tschirner, S Palus, SD Anker, J Springer, M Lainscak. Influence of cancer cachexia on drug liver metabolism and renal elimination in rats. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 6(1):45-52 2015.
- 4) M Okada, T Kikuchi, T Okamura, Y Ikoma, AB Tsuji, H Wakizaka, T Kamakura, I Aoki, MR Zhang, K Kato. In-vivo imaging of blood-brain barrier permeability using positron emission tomography with 2-amino-[3-11C]isobutyric acid. *Nucl Med Commun*. 36(12):1239-1248 2015.
- 5) C Suzuki, M Kosugi, Y Magata. Conscious rat PET imaging with soft immobilization for quantitation of brain functions: comprehensive assessment of anesthesia effects on cerebral blood flow and metabolism. *EJNMMI Res*. 11(1):46 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 千恵 (Suzuki Chie) (20637285)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教 (13802)	
研究分担者	内藤 隆文 (Naito Takafumi) (80422749)	浜松医科大学・医学部附属病院・特任准教授 (13802)	
研究分担者	中村 和正 (Nakamura Katsumasa) (20284507)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	志田 拓頭 (Shida Hiroaki) (40857322)	浜松医科大学・医学部附属病院・薬剤師 (13802)	
研究分担者	八木 達也 (Yagi Tatsuya) (70719575)	浜松医科大学・医学部附属病院・副薬剤部長 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------