

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590282

研究課題名(和文)中枢性体液調節機構を中心としたがん悪液質の病態解明と新規治療法に向けた総合的解析

研究課題名(英文)Analysis of central water homeostasis in pathophysiology of cancer cachexia

## 研究代表者

横山 徹(Toru, Yokoyama)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：80425321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：がん末期の病態において合併してみられる悪液質(カヘキシア)は、患者の生活の質や予後を悪化させる重篤な病態である。しかしながら、この病因については十分に解明されていないのが現状であり、対応は急務である。がん悪液質では、食思不振、炎症、腹水などにより全身の水分バランスが変化し、中枢の体液調節系ががんの病態で変化している可能性があると考えられる。私たちは中枢神経系の水分調節機構に注目して、がん悪液質モデルラットを使用し、電気生理学的手法を用いて研究を行った。この結果、がん悪液質では、中枢神経系において浸透圧や飲水に関するペプチドへの感受性が減弱している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Cancer cachexia (CC), a syndrome characterized by anorexia and body weight loss due to low fat-free mass levels, including reduced musculature, markedly worsens patient quality of life. Body fluid balance may be changed by several conditions, such as anorexia, inflammation, dehydration and ascites in CC. Drinking behaviour and the release of arginine-vasopressin from the magnocellular neurosecretory cells in the supraoptic nucleus (SON) are crucial for body fluid homeostasis. We compared the reaction to osmotic pressure and angiotensin II of the CC model rat with the normal model rat in in vitro rat brain slice preparation, using whole-cell patch-clamp recordings. Hyperosmotic stimulation and application of angiotensin II potentiate the frequency of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) without affecting the amplitude in normal rats. However, this effect was attenuated in CC model rats. These results suggest that CC may change the sensation of mEPSCs in the SON.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：がん悪液質 電気生理学 パッチクランプ

### 1. 研究開始当初の背景

がんは我が国の死因の3分の1を占める疾患であり、多くの国民が身体的・精神的苦痛を受けているのが現状である。現在、ゲノム解析をはじめとした様々な研究が行われ、がんの発生のメカニズムや予防、早期発見や治療につながる研究が行われている。また、がん対策基本法の施行以来、早期よりがんによる痛み緩和への治療にも目が向けられるようになり始めている。しかしながら、がんについては病理診断や転移部位による病期分類や治療方針が定められている一方、がんに侵されている身体の病態の変化が、がんの病期やがんの種類によってどのように変化しているのかを的確に示されたことはない。

がん末期の病態において合併してみられる悪液質(カヘキシア)は、全身性の浮腫や腹水、胸水に加え、食思不振などがんによる痛みとともに患者の生活の質や予後を悪化させる重篤な病態である。しかしながら、この病態については十分に解明されていないのが現状であり、治療においても難渋する例が少なくはなく、対応は急務である。がん悪液質状態では、食思不振、炎症、腹水などにより全身の水分バランスが変化し、中枢の体液調節系ががんの病態で変化している可能性があると考えられる。これまで、がん悪液質の病態において、中枢性の体液調節について論じられたことはなく、この点を解明することによって患者の生活の質改善させる新たな診断・治療法など、有益な情報を与えることが出来るのではないかとと思われる。

### 2. 研究の目的

本研究では、がんモデル動物を用いて、がんの種類や病期における全身的な病態の変化、とくにがん悪液質状態における中枢性体液調節機構の感受性変化について発生機序、またがん悪液質に影響を与える因子を分子レベルから解明し、症状改善への治療法へと結びつけることを目的とした。

#### 目的1;がん悪液質状態における中枢性浸透圧・ペプチド感受性の解析-パッチクランプを用いた検討-

(1)正常ラット脳スライス(視索上核)にスライスパッチクランプ法を用いて、シナプス入力への浸透圧感受性や薬剤・ペプチド感受性を電気生理学的に検討する。

(2)がん悪液質モデルラットの脳スライス(視索上核)にパッチクランプ法を用いて、シナプス入力への浸透圧感受性や薬剤・ペプチド感受性を電気生理学的に比較・検討する。

#### 目的2;がん悪液質状態における飲水・摂食量の解析-行動科学的解析を用いた検討-

(1)正常ラットとがん悪液質モデルラットにおける体重・飲水量・摂食量・尿量・体組成など採取・記録し、がん病態ではどのような変化が生じるかを検討する。

(2)正常ラットとがん悪液質モデルラット

における、行動量を測定し、両モデル間にもどのような違いがあるか検討する。

#### 目的3;がん病期と中枢性体液調節機構の解析と治療への結びつけ

(1)正常ラットモデル、がんラットモデルの実験結果から、がん悪液質状態において中枢性浸透圧感受性などにおいて特異的な変化が認められた場合は、予め漢方薬やグレリンなどの摂食関連ペプチドなど投与し、その反応を電気生理学的、行動科学的に確認する。

(2)がんの病期、がんの種類によって中枢性浸透圧感受性・薬剤感受性に違いがあるかどうか電気生理学的、行動科学的に検討する。

(3)(1)(2)の結果から、がん病期・がんの種類を含めた新しいがん悪液質の予防・治療法を検討する。

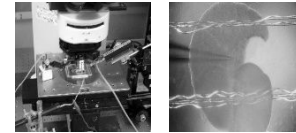
### 3. 研究の方法

がん悪液質モデルラットについては、国立がん研究センターにて、ヒト胃癌細胞 MKN-45 から樹立した細胞を用いて作製されたラットをがん悪液質モデルラットとして今回の検討を進めた(写真1の右ががん悪液質モデルラット)。



写真1

がん悪液質状態と正常の状態では中枢神経系の水分調節機構



(バゾプレッシン産生・分泌動態)にどのような違いがあるかを見極めるために、

(1)正常モデルラットとがん悪液質モデルラットの脳スライス標本を用いて、高浸透圧刺激や飲水惹起に関係するペプチドなどの投与を行い、感受性に違いがあるか視床下部視索上核大細胞性神経分泌細胞にホールセルパッチクランプ法を用いて、電気生理学的に検討を行う(写真はパッチクランプ法実験装置(左)とラット脳スライス標本(右))。

(2)正常モデルラットとがん悪液質モデルラットの飲水量・摂食量・体組成・行動量などの違いを行動科学的解析で明らかにする。

(3)がん悪液質モデルにペプチドなど投与した際の反応を電気生理学的・行動生理学的に解析する。

(4)がんの病態進行、悪液質に関係があるとされる因子が、がんの種類・病期においてどのような反応の違いがあるか検討する。

### 4. 研究成果

がん細胞移植後からの体重・摂食量・飲水量などを生食水注入ラット群と比較をした。がん細胞移植群では、移植後1~2週目で、生食注入ラット群に比べて体重・摂食量・飲水量が有意に減少しており(図1は飲水量のデータを示す)、がん悪液質状態になっていることが確認された。

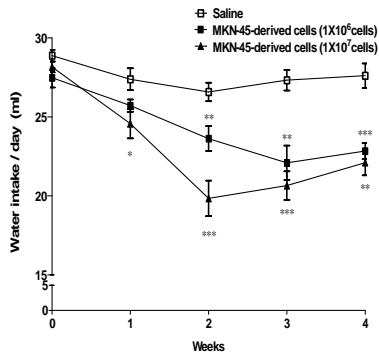


図 1: がん悪液質モデルラットでは飲水量が減少している。

がん細胞移植後 2 週目および 4 週目（生食注入後 2 週目および 4 週目）に、ラットの脳を取り出して脳スライス標本を作成して、視床下部視索上核大細胞性神経分泌細胞に対してホールセル・パッチクランプを用いて、電気生理学的に記録を採取した。テトロドトキシン (TTX) 存在下で、マンニトールによる高浸透圧刺激およびアンジオテンシンを投与した際、興奮性シナプス後電流 (mEPSCs) の頻度が、生食注入群では有意に増加したが、がん悪液質モデルラットではこの反応が抑制されていた (2 週目、4 週目ともに) (図 2)。

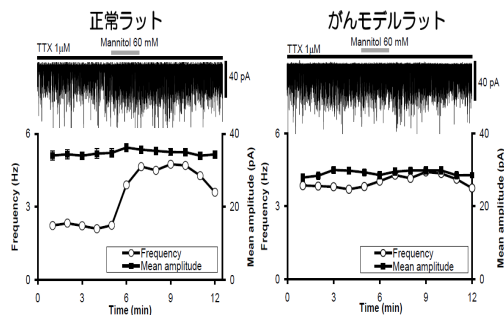


図 2: パッチクランプ法による電気生理学的解析結果。がん悪液質状態では、高浸透圧刺激による頻度の増加が減弱している。

大細胞性神経分泌細胞は、体液調節に重要な役割を果たすバゾプレッシン（またはオキシトシン）を産生する部位であり、バゾプレッシンの分泌動態は、大細胞性神経分泌細胞へのシナプス入力や血漿浸透圧などの液性因子により調節されている。我々の得た結果は、がん悪液質モデルラットでは中枢神経系において浸透圧やアンジオテンシンなどバゾプレッシン産生に関係するペプチドへの感受性が低下するなど体液調節機構が、正常な状態とは変化している可能性を示唆している。

次に、このがん悪液質モデルで生じた変化

をどのような物質が作用するのか検討を行うこととした。私たちはキスペプチンに注目した。キスペプチンはがん細胞が転移していくような時期に転移抑制因子として働くことが知られている。これまで、キスペプチンがバゾプレッシンを産生する大細胞性神経分泌細胞のシナプス入力に対してどのような反応をするか調べられたことがなかったので、正常ラットでのキスペプチンの反応を検討した。正常ラットの脳を取り出して、脳スライス標本を作成し、ホールセル・パッチクランプ法を用いて、電気生理学的に記録を採取した。キスペプチンは mEPSCs の頻度を有意に増加させた (図 3)。この反応は、キスペプチン受容体阻害薬である、キスペプチン 234 で反応が減弱した。細胞内情報伝達系についても検討を行い、キスペプチンの反応は PKC 阻害薬で抑制することが出来た。これらのことから、キスペプチンは視索上核大細胞性神経分泌細胞へのシナプス入力に関して、シナプス前に、キスペプチン受容体-PLC-DAG-PKC と作用してることが示唆された。

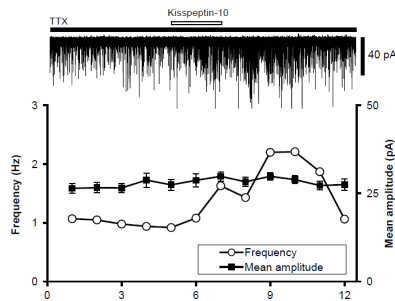


図 3: キスペプチンは mEPSCs の頻度を有意に増加させた。

がん治療に用いられる麻酔薬や鎮痛薬がどのような機序で作用しているのかについても検討を行った。手術などの際によく用いられる吸入麻酔薬のセボフルレンの体液調節機構に与える影響について、ラット脳スライス標本を作成し、ホールセル・パッチクランプ法を用いて検討した。この結果、セボフルレンは抑制性のシナプス入力に作用し、抑制性シナプス後入力 (mIPSCs) の頻度を有意に増加させることが示唆された (図 4)。セボフルレンについては、作用機序が未だ解明されていないが、アフリカツメガエル卵母細胞に数種類のナトリウムチャネルの発現させた

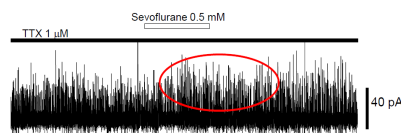


図 4: セボフルレンは mIPSCs の頻度を有意に増加させた (で囲まれた部分)。

検討では、臨床的に使用されるセボフルレンの濃度では、発現させたナトリウムチャンネルに影響を与えていないことも解明した。

また、検討の途中ではあるが、がん悪液質モデルラットでは、摂食を促進し、飲水にも影響を与えるペプチドであるグレリンに対して抵抗性、反応性の低下を示す傾向が認められている。グレリンは抗がん剤の一つであるシスプラチンの副作用によって引き起こされる食思不振では、グレリン投与により（グレリンの分泌促進を引き起こす漢方薬である六君子湯投与により）症状を改善させることを明らかにされており、がん悪液質で生じる食思不振と抗がん剤の副作用で生じる食思不振とは違う作用機序で症状が発現されていると考えられる。

（まとめ）

本研究では、がん悪液質によって生じる全身性の浮腫や腹水などが、中枢神経系の水分調節機構ががんによって影響を受けているのでは、という考えからヒト胃癌細胞 MKN-45 から樹立した細胞を用いて作製された、がん悪液質モデルラットを使用して検討を進めた。

がん悪液質モデルラットは摂食量や飲水量が低下し、電気生理学的検討では、高浸透圧刺激やアンジオテンシン への感受性が低下していた。これらのことはこれまで発表されたことはない、新しい発見といえるかもしれない。これらの現象を関連する因子について、今回の研究ではキスペプチンの作用について注目をし、キスペプチンは正常の状態ではバゾプレッシン分泌を引き起こすことで水分調節に関与している可能性が見出された。この反応が、がん悪液質を含め、がんの病期で異なった反応を示す可能性があり、今後の更なる検討が望まれる。鎮痛薬や麻酔薬の作用機序について、セボフルレンが中枢神経系の水分調節系にどのように関与するかについても検討をおこなった。正常ラットでは抑制性シナプス入力に関係する結果を得られたが、がん悪液質ではどのような反応になるのか興味のあるところである。薬剤への反応が、正常状態と悪液質で異なる反応が認められた際は、治療の方法等にも影響を及ぼす可能性がある。

がん悪液質で認められる様々な症状については、様々な因子が複雑に関係していると考えられるが、今回の研究で使用したがん悪液質モデルラットでは、採血等でコントロール群と比べて有意な変化をしているいくつかの因子が存在している。今後は、そのような因子を中心に検討を継続することで、がん悪液質を引き起こすメカニズムが明らかになる可能性がある。これらのことは、がん悪液質の患者の生活の質改善、しいてはがん悪液質予防へとつながることが期待できると思われる。

5 . 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Yokoyama T, Minami K, Sudo Y, Horishita T, Ogata J, Yanagita T, Uezono Y. Effects of sevoflurane on voltage-gated sodium channel Na(v)1.8, Na(v)1.7, and Na(v)1.4 expressed in *Xenopus oocytes*., *Journal of Anesthesia*, 査読有, 2011, 25,609-613.

doi: 10.1007/s00540-011-1167-7

Minami K, Sudo Y, Yokoyama T, Ogata J, Takeuchi M, Uezono Y, Sevoflurane inhibits the  $\mu$ -opioid receptor function expressed in *Xenopus oocytes*. *Pharmacology*, 査読有, 2011, 88:127-32.

doi: 10.1159/000330096.

Minami K, Uezono Y. The recent progress in research on effects of anesthetics and analgesics on G protein-coupled receptors. *Journal of Anesthesia*, 査読有, 2013,27(2);284-292

doi: 10.1007/s00540-012-1507-2.

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*, 査読有, 2013, 65 (4); 578-589.

doi: 10.1080/01635581.2013.776089.

Terawaki K, Sawada Y, Kashiwase Y, Hashimoto H, Yoshimura M, Suzuki M, Miyano K, Sudo Y, Shiraishi S, Higami Y, Yanagihara K, Kase Y, Ueta Y, Uezono Y. New cancer cachexia rat model generated by implantation of a peritoneal dissemination-derived human stomach cancer cell line., *Am. J. Physiol Endocrinol Metab*. 査読有, 2014, 15;306(4):E373-87

doi: 10.1007/s00540-012-1507-2.

〔学会発表〕(計 11 件)

横山徹、南浩一郎、尾方純一、上園保仁、  
竹内護、電位依存性ナトリウムチャンネル  
Nav1.8, Nav1.7, Nav1.4 におけるセボ  
フルレンの効果、日本麻酔科学会第 58  
回学術集会、2011 年 5 月 20 日、神戸市  
南浩一郎、上園保仁、横山徹、尾方純一、  
竹内護、セボフルレンの $\mu$ オピオイド受  
容体への影響、日本麻酔科学会第 58 回  
学術集会、2011 年 5 月 20 日、神戸市  
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神経分泌  
ニューロンでの浸透圧感受性が低下し  
ている、第 70 回日本癌学会学術総会、  
2012 年 10 月 5 日、名古屋市  
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、2012 年 10  
月 5 日、名古屋市  
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神経分泌  
ニューロンでの浸透圧感受性が低下し  
ている、第 89 回日本生理学会、2013 年  
3 月 30 日、松本市  
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  
感受性が低下している：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、2012 年 6 月 8 日、神戸市  
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、樋上賢一、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、2012 年 9 月 21 日、札幌市  
横山徹、南浩一郎、尾方純一、竹内護、

上園保仁、バゾプレッシン分泌ニューロ  
ンにおけるセボフルレンの効果-ラット  
を用いた検討-、日本麻酔科学会第 60 回  
学術集会、2013 年 5 月 23 日、札幌市  
南浩一郎、須藤結香、上園保仁、トラマ  
ドールはオピオイド受容体を直接刺激  
するアゴニストである、日本麻酔科学会  
第 60 回学術集会、2013 年 5 月 23 日、  
札幌市

上田陽一、橋本弘史、横山徹、上園保仁、  
シスプラチン誘発拒食ラットの摂食お  
よびグレリン分泌に対する六君子湯の  
作用、第 72 回日本癌学会学術総会、2013  
年 10 月 5 日、横浜市

横山徹、上園保仁、上田陽一、ラット視  
索上核の大細胞性神経分泌ニューロン  
へのシナプス入力に対するキスペプチ  
ンの影響、第 17 回日本心血管内分泌代  
謝学、2013 年 11 月 23 日、大阪府豊中  
市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
横山 徹 (Toru Yokoyama)

自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80425321

(2)研究分担者

南 浩一郎 (Kouichiro Minami)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70279347

上田 陽一 (Yoichi Ueta)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10232745

上園 保仁 (Yasuhito Uezono)  
国立がん研究センター・研究所・分野長  
研究者番号：20213340

寺脇 潔 (Kiyoshi Terawaki)  
国立がん研究センター・研究所・ユニット  
リーダー  
研究者番号：20572465  
(2012年10月より研究協力者)