

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790598

研究課題名(和文) 抗癌剤誘発有害反応発症におけるプロスタグランジンE2の役割解析と新規治療への応用

研究課題名(英文) Role of prostaglandin E2 in the development of cancer chemotherapeutic agents-induced side effects

研究代表者

山本 浩一 (Yamamoto, Kouichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40362694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤や手術など癌治療を受ける患者の多くは治療中や治療後に悪心・嘔吐を訴えるが、これらは主観的な症状であるため他者に理解されにくく、致死症状でもないため我慢を強いられることが多い。しかし、発症機序は不明なことが多く、適切な制吐剤がない。今回得られた知見により、悪心・嘔吐の発症には、プロスタグランジンE2、サブスタンスP、ロイコトリエンなど炎症に関係する生理活性物質が関わることを明らかにし、新たな治療薬の開発を目指すための端緒をつかんだ。

研究成果の概要(英文)：Clinical reports demonstrated that nausea and vomiting occurs in many patients receiving cancer chemotherapy and surgery under general anesthesia. However, precise etiology of these symptoms are still unclear. To elucidate a possible mechanism, we tried to make an animal model of nausea and vomiting in rats and investigated the responsible neurotransmitters attributed to development of nausea and vomiting in rats. From a series of experiments, we confirmed that pica, kaolin ingestion behavior, is useful to evaluate nausea and vomiting in rats and prostaglandin E2, substance P and leukotriene may contribute to the development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：悪心・嘔吐 発症機構 プロスタグランジン サブスタンスP ロイコトリエン

## 1. 研究開始当初の背景

癌化学療法を受ける患者の90%以上が「最もつらい有害反応」としてあげるものに、抗悪性腫瘍薬投与後に現れる悪心・嘔吐、食欲不振、疲労感であるが、これらは主観的な症状であるため他者に理解されにくく、致死症状でもないため「治療に伴うものなので仕方ない」と我慢を強いることが多い。このため、患者の生活の質を著しく低下させ、治療の継続にも影響を及ぼす重大な問題になる場合がある。

これらの有害反応で最初に現れる嘔吐の発症には迷走神経終末のセロトニン5-HT<sub>3</sub>受容体と延髄嘔吐中枢のニューロキニンNK1受容体が関与するため、それぞれの受容体遮断薬(商品名:ゾフラン、カイトリル、イメンド)が標準治療薬として用いられ、かなり抑制できるようになった。しかし、悪心、食欲不振、倦怠感には効果がなく、また治療開始24時間以降に発現する「遅発性症状」にはほとんど有効性が認められないため、問題解決に至っていない。予測できる有害反応をいかに予防するかが重要項目として求められる現代医療において、悪心、食欲不振、倦怠感も確実に抑制することは近頃の課題である。

申請者はこれまで、抗癌剤や放射線による悪心・嘔吐の発症機構を神経化学的に解析する研究を行った結果、発症経路には迷走神経終末の5-HT<sub>3</sub>受容体を介する経路、視床下部脳内グルタミン酸神経系を介する経路の異なる2経路が存在するを見いだした。

最近、申請者は抗癌剤によって延髄・視床下部で腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ が産生増加することを確認した。感染や炎症によってマクロファージなどが産生するTNF- $\alpha$ は感染防御や免疫系の調節因子として機能するが、Dantzerらは延髄や視床下部を介して神経内分泌系を調節し、食欲不振、疲労感、うつなどを主症状とするsickness behaviorを誘発すると報告している。このsickness behaviorとして現れる症状は抗癌剤による有害反応と一致するため、悪心・食欲不振・倦怠感は脳内でのTNF- $\alpha$ の作用が重要であると予想できる。

TNF- $\alpha$ は脳血管内皮細胞でシクロオキシゲナーゼ(COX)-2を誘導し、プロスタグランジン(PG)E<sub>2</sub>の産生を促進する。産生されたPGE<sub>2</sub>は細胞内cAMPを増加し、プロテインキナーゼA(PKA)の活性化とcAMP応答配列結合タンパク(cAMP response element binding protein: CREB)転写活性の誘導によりグルタミン酸遊離増加や神経細胞を賦活化する。一方で、PKAの活性化が悪心や食欲不振、倦怠感を誘発することやCOX-2阻害剤が食欲不振を改善することが明らかになった。

## 2. 研究の目的

申請者の研究で得られた成果と最近の知見を総合すると、抗癌剤による悪心・嘔吐、食欲不振、倦怠感の発症には5-HT<sub>3</sub>受容体やNK1受容体に加えて「TNF- $\alpha$ によるPGE<sub>2</sub>産生増加とそれに続くPKA/CREBの活性化が重要な役割を持つ」との仮説を立てることができる。そこで、この仮説を検証し、PGE<sub>2</sub>とPKA/CREB系を標的とした新規治療法の開発を目的に、本研究を企画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 延髄サブスタンスPの遊離増加がシスプラチン誘発性嘔吐の発症に及ぼす影響

神経ペプチドとして知られるサブスタンスPの受容体遮断薬(NK1受容体遮断薬)はシスプラチンによる嘔吐の治療薬として臨床応用されているが、シスプラチン投与後の生体内サブスタンスP遊離動態については不明なままである。そこで、シスプラチンによる嘔吐発症におけるサブスタンスPの役割を明らかにするため、延髄嘔吐中枢に挿入した透析プローブを介して経時的なサブスタンスP遊離動態の解析を行った。Wistar系雄性ラットの延髄孤束核にマイクロダイアリシス用ガイドカニューレを留置した。約1週間の回復期間を設けた後、ガイドカニューレを介してニューロペプチド用マイクロダイアリシスプローブを挿入し、プローブ内部をリンゲル液で流速1 $\mu$ L/minで灌流した。基礎遊離量測定用サンプルを回収後、シスプラチン(6mg/kg, i.p.)を投与し、投与36時間後までの透析サンプルを2時間毎回収した。サンプル中のサブスタンスP量は酵素免疫定量(ELISA)法を用いて測定した。さらに、シスプラチン投与と同時にシスプラチンによる嘔吐の標準治療薬として用いられる5-HT<sub>3</sub>受容体遮断薬のグラニセトロン(0.1mg/kg, i.p.)を投与して、グラニセトロンが延髄のサブスタンスP遊離に及ぼす影響も検討した。

### (2) 抗癌剤誘発性食欲不振発症における脳内COX-2、プロオピオメラノコルチン、インターロイキンの役割解明

抗癌剤による食欲不振は発症機序が不明であるので、適切な治療措置をとることができない。感染や炎症に伴って産生する炎症性サイトカインのIL-1はCOX-2を誘導しPGE<sub>2</sub>の産生を促すことで発熱を惹起するが、同時に、PGE<sub>2</sub>は視床下部のPGE<sub>2</sub>受容体を介して食欲不振を誘発するとの報告がある。このことから、抗癌剤による食欲不振の発症に

は「IL-1、COX-2誘導とそれに続くPGE2産生増加が関与する」との仮説をたてることができる。そこで、抗癌剤ドセタキセル投与後の摂餌量の変化に着目し、これらの変化に対して選択的COX-2阻害剤がどのような作用を有するかを検討した。また、ドセタキセル投与後の視床下部でのIL-1、COX-2 mRNA遺伝子発現量の変化についても検討した。さらに、食欲に起因する神経ペプチドのプロオピオメラノコルチン(POMC)についても遺伝子発現量を測定した。

ラットを自動摂餌量測定装置(FDM700S)内で飼育した。実験環境に馴化させた後、ドセタキセル(10mg/kg)を暗期直前に腹腔内投与し、投与24時間の摂餌量を1時間ごとに経時的記録した。また、選択的COX-2阻害剤のNS-398(30mg/kg)ならびにセレコキシブ(30mg/kg)をドセタキセル投与前に処置することで、ドセタキセルによる食欲不振に対する抑制作用を確認した。さらに、ドセタキセル投与後の視床下部でのIL-1、COX-2、POMCのmRNA発現量の経時変化をRT-PCR法を用いて解析し、その発現量の変化に対してCOX-2阻害剤が及ぼす効果を検討した。

### (3)抗癌剤誘発有害反応発症における細胞内情報伝達機構の解明(MAPキナーゼを中心に)

TNF- $\alpha$ はマクロファージ細胞においてMAPK経路の活性化を介して産生されるが、その過剰産生は生体内に様々な毒性を示す。しかし、マクロファージ細胞においてシスプラチンがどのような経路を介してTNF- $\alpha$ を産生するか不明な点が多い。そこで、マウス腹腔マクロファージ由来培養細胞(RAW264細胞)を用いてシスプラチンによるTNF- $\alpha$  mRNA発現機序に分裂促進因子活性化タンパク質(MAP)キナーゼファミリーが関与するか否かについて検討した。

RAW264細胞にMAPK経路(p38MAPK、ERK、JNK)の阻害剤(1 $\mu$ M)をそれぞれ添加し、その30分後にシスプラチン(1 $\mu$ M)を加え24時間後の細胞内TNF- $\alpha$  mRNA発現量をRT-PCR法により測定した。また、シスプラチンによるMAPキナーゼ経路のリン酸化をELISA法により検討した。最後に、シスプラチンによるラジカル生成が細胞毒性の原因の一つと考えられているため、抗酸化作用のあるジメチルチオウレア(DMTU)がTNF- $\alpha$  mRNA発現及びMAPK経路のリン酸化にどのような影響があるか調べた。

### (4)がん関連倦怠感実験動物モデルの作成とその発症機構の解明

#### モデルの作成

抗癌剤治療を受ける患者が訴える倦怠感

(がん関連倦怠感(CRF))を客観的に評価することは困難であるため発症機構は未だ解明されていない。ところで感染症や炎症時などにみられるsickness behaviorはCRFと同様の臨床症候を呈するが、この発症にはシクロオキシゲナーゼ(COX)-2が関与すること、摂食中枢である視床下部外側野(LHA)の不活化および情動中枢である扁桃体中心核(CeA)の活性化を引き起こすとの報告がある。一方、マウスの摂餌量やケージ内自発行動量は摂食行動や飲水行動食事など生命維持に不可欠な行動を反映するのに対し、輪回し運動は生命維持活動に不可欠とは考えにくい。意欲などの情動的な変化を反映しているのではないかと考えられる。そこで抗癌剤投与後の自発行動と輪回し行動の変化に対して、COX-2選択的阻害剤であるセレコキシブがどのような影響変化を与えるのか検討した。加えて抗癌剤が惹起するLHAおよびCeAの神経活性の変化を検討した。

マウスを個別ケージにて飼育し、ドセタキセル(30mg/kg, i.p.)投与後24時間の摂餌量ならびに投与後12時間のケージ内自発行動量・回転運動量を測定した。加えて、ドセタキセル投与4時間後のLHA・CeAにおけるFos蛋白陽性細胞発現を免疫組織化学染色法によって評価した。またセレコキシブ(30mg/kg, i.g.)をドセタキセル処置10分前に投与し、上記の行動指標およびFos蛋白陽性細胞発現の変化について解析を行った。

#### 担がんマウスによる検討

の実験結果で得られた倦怠感の行動指標を用いて、実際に腫瘍の成長によりCRFが現れるか否か、抗癌剤投与によってCRFの発症はどのように変化するかを担がんマウスを作成して検討した。

Lewis肺がん(LLC)細胞( $1.0 \times 10^6$ 個/匹)をマウス左後大腿部皮下に播種した。腫瘍細胞播種と同時に、フッ化ピリミジン系経口抗悪性腫瘍薬であるテガフル・ウラシル合剤(UFT)(20mg/kg)を1日1回21日間連続経口投与し、その間の腫瘍体積・自発行動量・輪回し運動量を計測した。

### (5)手術関連悪心・嘔吐動物モデルの作成とその発症機構の解明

近年の癌治療は抗癌剤療法に外科手術を併用することが多いが、手術を受ける患者も術後に悪心・嘔吐を訴える。この手術に関連する悪心・嘔吐PONVも発症機序は不明なことが多く、適切な治療法が確立されていない。ラットに抗癌剤シスプラチンを投与するとカオリンなど餌としては異常なものに食欲を示し(パイカ行動)、この行動は制吐薬として用いられる5-HT<sub>3</sub>受容体遮断薬によって抑制できるため、この行動を指標とすればラットも嘔吐の研究に応用できることを報告し

てきた。そこで、この行動指標を用いて、PONV動物モデルを作成した。ラットを水、餌、カオリンが自由に摂取できるケージで飼育し、連日24時間のカオリン摂取量を測定した。PONVの原因には皮膚切開など侵襲的な刺激ではなく麻酔薬が原因と考えられているため、静脈麻酔薬のペントバルビタール(10-50mg/kg)と吸入麻酔薬のセボフルラン(1.5% 1-6時間)を投与し、投与24、48時間後のカオリン摂取量を測定した。また、この刺激後に現れるパイク行動に対して、D2受容体遮断薬、5-HT3受容体遮断薬、NK1受容体遮断薬、副腎皮質ステロイド剤がどのような影響を与えるか検討した。さらに、COX-2阻害剤、ロイコトリエン産生阻害剤、ロイコトリエン受容体遮断薬の前投与の効果も併せて検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 延髄サブスタンスPの遊離増加がシスプラチン誘発性嘔吐の発症に及ぼす影響

延髄サブスタンスP遊離量はシスプラチン投与8時間後から増加を示し、12時間以降は有意に増加した。一方、グラニセトロンはシスプラチン投与によるサブスタンスP遊離量増加を抑制した。しかし、24時間以降に見られるサブスタンスP遊離増加はグラニセトロンを用いても抑制できなかった。

以上の結果より、延髄サブスタンスP遊離増加はシスプラチンによる急性期・遅発期いずれの嘔吐の発症に重要であることが判明したが、急性期のサブスタンスPの増加は5-HT3受容体が関与するものの、遅発期はそれ以外の系が関与することが示唆された。

##### (2) 抗癌剤誘発性食欲不振発症における脳内COX-2、プロオピオメラノコルチン、インターロイキンの役割解明

ドセタキセル投与により投与8時間後から摂餌行動が抑制され、それ以降摂餌量が増加しなかった。摂餌量が減少したドセタキセル投与8時間後、18時間後の視床下部内ではIL-1、COX-2、POMC mRNAの有意な発現増加が見られた。NS-398ならびにセレコキシブを前処置するとドセタキセルによる摂餌量減少を有意に回復させることができさらに、セレコキシブの前処置によって視床下部内IL-1、COX-2、POMC mRNAの発現増加は抑制することができた。以上の結果から、ドセタキセル投与後に惹起される食欲不振発症には視床下部でのIL-1、COX-2、POMCの発現増加が関与していることが確認され、COX-2阻害剤は抗悪性腫瘍薬抗癌剤による食欲不振有害反応の治療に応用できることが示唆

された。

##### (3) 抗癌剤誘発有害反応発症における細胞内情報伝達機構の解明(MAPキナーゼを中心に)

ERK阻害剤はTNF- mRNAの発現を有意に抑えたのに対し、p38 MAPキナーゼ及びJNK阻害剤は顕著な変化を示さなかった。また、この実験条件でMAPキナーゼ経路のリン酸化を測定したところ、ERK及びp38 MAPキナーゼのリン酸化が亢進されていた。これらのことから、シスプラチンによりERK及びp38 MAPキナーゼが活性化され、特にERKを介してTNF- mRNAが発現誘導することが示唆された。さらに、抗酸化作用のあるDMTU(1 $\mu$ M)によってシスプラチンによるTNF- mRNAの発現誘導が抑えられただけでなく、ERKのリン酸化も抑えることができた。以上のことから、マウスマクロファージ細胞がシスプラチンにより産生されたラジカルによってERKが活性化されることでTNF- mRNAを発現することが示唆された。

今回我々が明らかにしたシスプラチンによるTNF- mRNA発現メカニズムの解明は今後の抗癌剤治療における副作用軽減に有用であると考えられる。

##### (4) がん関連倦怠感実験動物モデルの作成とその発症機構の解明

###### モデルの作成

ドセタキセル投与により、摂餌量、自発行動量、輪回し運動量の低下が見られた。Fos蛋白陽性細胞はLHAでは減少し、CeAでは増加することが観察された。また、セレコキシブにより、摂餌量および自発行動量、LHAにおけるFos蛋白陽性細胞の低下は抑制された。これよりドセタキセル投与により生じる食欲不振や自発行動量の低下にはCOX-2が関与していることが示唆され、CRFの予防にセレコキシブが有用であることが示された。一方、輪回し運動の低下およびCeAのFos蛋白陽性細胞の増加はセレコキシブを投与しても改善できなかった。これは食欲が回復した後もマウスには不快感が残っていることを示しており、輪回し運動量を調べることで、通常の自発行動量では評価できない情動的な変化、つまり倦怠感までも評価できる可能性が示された。

###### 担がんマウスによる検討

LLC細胞は播種後8日で肉眼的に計測可能となる大きさに成長し、観測終了の21日目には5000mm<sup>3</sup>まで成長した。抗癌剤UFT投与をすると発育は有意に抑制され、観測終了の21日目でも2000mm<sup>3</sup>程度であった。この間、UFT非投与群では腫瘍細胞の成長とともに輪

回し運動の低下が認められたが、UFT 投与群では輪回し運動低下は認められなかった。このことから、抗癌剤治療により CRF の発症が抑制された可能性が示唆された。

#### (5)手術関連悪心・嘔吐動物モデルの作成とその発症機構の解明

いずれの麻酔薬も投与によって 24 時間後に有意なカオリン摂取の増加が見られた。D2 受容体遮断薬、5-HT<sub>3</sub> 受容体遮断薬、NK1 受容体遮断薬の前処置により麻酔薬投与によるカオリン摂取量の増加は抑制傾向をしめしたが、その作用は軽微であった。一方、副腎皮質ステロイド剤の前投与ではパイカ行動を完全に抑制することができた。副腎皮質ステロイド剤はホスホオリパーゼ A の阻害によって、PG やロイコトリエンの産生を抑制することから、COX-2 阻害剤、ロイコトリエン産生阻害剤、ロイコトリエン受容体遮断薬のいずれの薬物も麻酔薬によるパイカ行動を抑制できるのではないかと予想して実験を行ったところ、いずれの薬物も有意にパイカ行動を抑制したが、COX-2 阻害剤よりもロイコトリエン産生阻害剤、ロイコトリエン受容体遮断薬でより顕著にその作用が見られた。このことから、悪心・嘔吐の発症には PG 以外にロイコトリエンも関与することが明らかになった。

#### 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 3 件)

Yamamoto K, Asano K, Tasaka A, Ogura Y, Kim S, Ito Y, Yamatodani A. Involvement of substance P in the development of cisplatin-induced acute and delayed pica in rats. *British Journal of Pharmacology*, 査読有, (2014), In press.

Kim S, Yamamoto K, Nakamura Y, Otoyoy Y, Yamatodani A. A possible mechanism of cisplatin-induced Tumor Necrosis Factor (TNF)- production in murine macrophages. *Pharmacology & Pharmacy*, 査読有, 4 (2013) 146-151.

Yamamoto K, Asano K, Ito Y, Matsukawa N, Kim S, Yamatodani A. Involvement of hypothalamic cyclooxygenase-2, interleukin-1 and melanocortin in the development of docetaxel-induced anorexia in rats. *Toxicology*, 査読有, 302 (2012) 190-196.

##### [学会発表](計 5 件)

松川直樹、山本浩一、後藤飛鳥、大和谷厚、  
The effects of celecoxib on chemotherapy-related fatigue in mice, 第 85 回日本薬理学会年会 平成 24 年 3 月 14 日 ~ 平成 24 年 3 月 16 日、京都

Yamamoto K, Matsukawa N, Ito Y, Asano K, Yamatodani A. Involvement of hypothalamic cyclooxygenase-2 and POMC in the development of docetaxel-induced anorexia in rats. International Symposium of Multinational Association of Supportive Care in Cancer, 平成 24 年 6 月 27 日 ~ 平成 24 年 6 月 29 日 アメリカ

山本浩一、田坂礼那、金世洸、大和谷厚、  
Involvement of medullary substance P in the development of cisplatin-induced emesis in rats, 第 86 回日本薬理学会年会 平成 25 年 3 月 21 日 ~ 平成 25 年 3 月 23 日、福岡

Yamamoto K, Tasaka A, Kim S, Ito Y, Yamatodani A, In vivo monitoring of cisplatin-induced substance P release in the medulla of rats measured by brain microdialysis. International Symposium of Multinational Association of Supportive Care in Cancer, 平成 25 年 6 月 26 日 ~ 平成 25 年 6 月 28 日、ドイツ

山本浩一、杉本融、坂上卓矢、Animal model for postoperative nausea and vomiting using pica behavior in rats, 第 87 回日本薬理学会年会 平成 26 年 3 月 19 日 ~ 平成 26 年 3 月 21 日、仙台

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山本 浩一 (YAMAMOTO KOUICHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：40362694