

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08215

研究課題名(和文) がんの進行が中枢性体液調節機構に与える影響とその機序解明

研究課題名(英文) Influence of cancer progression on central fluid regulation and its mechanism

研究代表者

横山 徹 (Yokoyama, Toru)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、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への高浸透圧刺激やアンジオテンシンII投与に対する興奮性シナプス入力感受性が正常ラットに比べて有意に低下していることをホールセルパッチクランプ法を使用した検討で明らかにした。このエリアはバゾプレッシン分泌することで体液調節に重要な役割を果たし、シナプス入力の変化がバゾプレッシン分泌に影響を与えることが知られている。これらのことを考慮すると、本研究の結果は、進行がん、特にがん悪液質ではこのエリアの興奮性シナプス入力感受性が変化することで体液調節に影響を与える可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん悪液質モデルでは、中枢神経系体液調節機構で全身の体液調節に重要な役割を果たしている、視索上核大細胞性神経分泌細胞へのシナプス入力において、高浸透圧刺激やアンジオテンシンII投与に対する興奮性シナプス入力感受性が正常ラットに比べて有意に低下していることを電気生理学的手法を用いて初めて解明した研究である。本研究の結果は、がん悪液質では、このエリアの興奮性シナプス入力感受性が変化することで体液調節に影響を与える可能性を示唆しており、この機序の詳細な解明は、がん悪液質の予防や治療の分野への応用へと結びつけることで、がん患者の生活の質を大きく改善することに寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the sensitivity to excitatory synaptic inputs to hyperosmotic stimulation and angiotensin II administration to magnocellular neurosecretory cells (MNCs) of hypothalamic supraoptic nucleus is significantly reduced in cancer cachexia model rats compared with normal rats by using whole-cell patch-clamp recordings. MNCs are related to body fluids regulation by secreting arginine vasopressin (AVP). AVP secretion by MNCs is depend on both excitatory and inhibitory synaptic activity such as alterations in plasma osmolarity and various peptides, including angiotensin II. This study is the first study to clarify that the sensitivity of MNCs changes in cancer cachexia. Our results suggest that Cancer cachexia may be involved in fluid regulation by altering the sensitivity of MNCs.

研究分野：神経内分泌

キーワード：生理学 がん 体液調節 電気生理学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身の構成成分の半分をしめる水分は、全身状態のコントロールに関係する最も重要な因子の1つである。この調節機構が、様々な疾患の多岐にわたる病態において、どのような影響を及ぼすかを理解することは、その後の疾患の治療を含めた全身状態のコントロールに重要な役割を果たすことが期待される。

がんは我が国の死因の3分の1を占め、2人に1人はがんに罹り、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り、対応が急務となっている。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。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が、がんの病期やがんの種類によって、がんに侵されている身体の病態変化を的確に示された研究はない。進行がんでは、70~80%の割合にがん悪液質(カヘキシア)といわれる全身性の消耗状態が生じる。この病態では、浮腫や腹水、炎症に加え、食思不振などで全身の水分バランスに変化が生じると考えられ、日常生活の質を著しく低下させてしまうが、発生の一因には、痛みの増強によって引き起こされた疼痛ストレスが大きく関与しているなど、がんによって生じる様々な病態が引き起こす各種ストレスと中枢の体液調節機構には密接な関係があると考えられる。生体の水分バランスの恒常性を司る、バゾプレッシンは、視床下部視索上核および室傍核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から血中に分泌される。この分泌調節は、血漿浸透圧やアンジオテンシンIIなどの液性因子および細胞体へのシナプス入力によって調節されているが、急性および慢性のストレスにも影響を受け、ストレス反応の緩和に作用している。我々はこれまでに、痛みセンサーとして知られるTransient receptor potential (TRP) vanilloid type I (TRPV1)やTRP ankyrin type I (TRPA1)が視索上核大細胞性神経分泌ニューロンへの興奮性シナプス入力の活性化に関与していることを解明した(Yokoyama T et al. Journal of Neuroscience 30; 876-884, 2010) (Yokoyama T et al. European Journal of Pharmacology 655; 31-37, 2011)。また、強力な摂食惹起作用をもつグレリンも同ニューロンへの興奮性シナプス入力の終末に作用して、TRPV1を介して分泌に関与すること(Yokoyama T et al. Journal of Neuroendocrinol. 21; 910-920, 2009)、がんの転移を抑制する物質として同定されたキスペプチンがバゾプレッシン分泌に作用することも報告してきた(Yokoyama T et al. Brain Research, 1583; 45-54, 2014)。弓状核で産生されるキスペプチンは、循環調節や痛みに関係するニューロキニンB、ダイノルフィンと共存して、その分泌が調節されており、がんの病態進行と水分バランスの変化に関係している可能性がある。摂食・飲水と同様に、がんによるストレスとバゾプレッシン分泌には密接な関係、例えば、がん性疼痛コントロールの難治化には、がんの病態変化による、この部分のシナプス調節系の感受性変化が関与している可能性もある。がんにおける全身の病態変化と中枢神経系を含めた水分バランス変化について発生機序から報告されたことは殆どない。TRPやグレリンの関与を含め、この部分の解明が、疼痛コントロールや摂食促進などにも深く関わり、がん患者の生活の質向上に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は進行がんモデル動物等を使用して、がんの種類や病期における全身的な病態の変化、とくに病態の進行に伴って発生する痛みなどの様々な症状やストレス反応と中枢の体液調節系との関係、その作用機序を明らかにすることにより、がんに苦しむ患者の全身状態の改善、生活の質改善に結びつけることを目的とした。

目的1; 進行がん状態における中枢性体液調節機構の解析-電気生理学的検討-

(1) 正常ラット脳スライス(視索上核等)および進行がんモデルとしてがん悪液質を引き起こすモデル(以下、がんモデルラット)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・ペプチド感受性のほか、がん病態関連物質の感受性を電気生理学的に検討、比較して、がん病態で中枢性体液調節機構に影響を与える因子を探索する。

(2) がんモデルラットを使用し、脳スライス(視索上核等)にパッチクランプ法を用いて、シナプス入力への影響を与える因子の作用機序を解析する。

(現在、がんモデルラットの視索上核において、体液調節系を中心にスライスパッチクランプ法を用い、その電気生理学的性質を解析、検討した結果を得ている。)

目的2; 進行がん状態における行動量・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) 正常ラットとがんモデルラットにおける、痛み関連の評価や行動量を測定し、両群間どのような違いがあるかを検討する。

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、がんラットモデルの実験結果から、進行がん状態において特異的な変化を与える因子が、グレリンなどの摂食関連ペプチド、鎮痛剤や抗炎症薬等を予め投与した際、その反応がどのように変化するかを電気生理学的、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病態の進行に伴って体液調節機構の浸透圧感受性等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の全身病態悪化の予防・治療法を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、がんモデルラットについては既に国立がん研究センターにて、ヒト胃癌細胞 85As2 から樹立した細胞を移植して作製されたラットをがんモデルラットとして、検討をすすめている。

がんの進行に伴う全身状態悪化とそれと共に発生する症状が、中枢の体液調節機構の状態（バゾプレッシン産生・分泌動態）とどのような関係があるか見極めるために、

(1) 正常ラットとがんモデルラットの脳スライス標本（視索上核等）を用いて、体液調節やストレス調節等に関して感受性のあるチャンネル・受容体を検索し、がんモデルに特異的に認められる因子やチャンネル・受容体の存在について、ホールセルパッチクランプ法を用いて電気生理学的に明らかにする。

(2) 正常ラットとがんモデルラットの飲水量や摂食量、疼痛ストレス反応等の違いを行動科学的解析で明らかにする。

(3) がんモデルに摂食や疼痛に関連する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) がんのどの病期から飲水や摂食に対する反応に変化が生じてくるのか、がんの種別によって感受性に違いがあるかどうか等を、電気生理学的・行動生理学的に解析し、関係するチャンネル・受容体を TRP チャンネル・GPCR を中心に検索する。

(5) (1)～(4) で得られた電気生理学的・行動科学的解析の結果を基にして、さらにはがん病態の進行に関係するチャンネル・受容体を明らかにするため、ノックアウトマウスなどの遺伝子改変動物を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度変動、PCR 法、免疫組織化学的染色法、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた多角的解析を行う。

以上の検討を行うことで、がんによって引き起こされる病態生理と体液調節の関係を明らかにすることで、がん患者の全身状態の改善と日常生活の質向上へと結びつける計画を立てた。

4. 研究成果

がん細胞移植群（がんモデルラット）と生理食塩水注入群（正常ラット）で、移植後からの体重・摂食量・飲水量等の記録を採取した。がん細胞移植群では、移植後 1 週目から生理食塩水注入群と比較して体重・摂食量・飲水量が有意に低下しており、がん悪液質の状態になることが確認された（両群の血漿浸透圧には有意な差は認められなかった）。

移植後 2 週目と 4 週目にがんモデルラット、正常ラットの脳を採取し、視索上核を含んだ脳スライス標本を作製し、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法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 (315 mOsmol/kg および 360 mOsmol/kg)、アンジオテンシン II (0.1 μ M) 投与時の興奮性シナプス後電流 (mEPSCs)、抑制性シナプス候後電流 (mIPSCs) をがんモデルラット群、正常ラット群で検討した。正常ラット群では高浸透圧刺激やアンジオテンシン II 投与をした際に mEPSCs の頻度が有意に増加したが、がんモデルではこの反応が抑制されていた (2 週目、4 週目ともに) (図 1 : 移植後 2 週目の高浸透圧刺激 (315 mOsmol/kg) 時の mEPSCs の記録。左が正常ラット、右ががんモデルラット。がんモデルラットでは高浸透圧刺激による頻度の増加が抑制されている)。

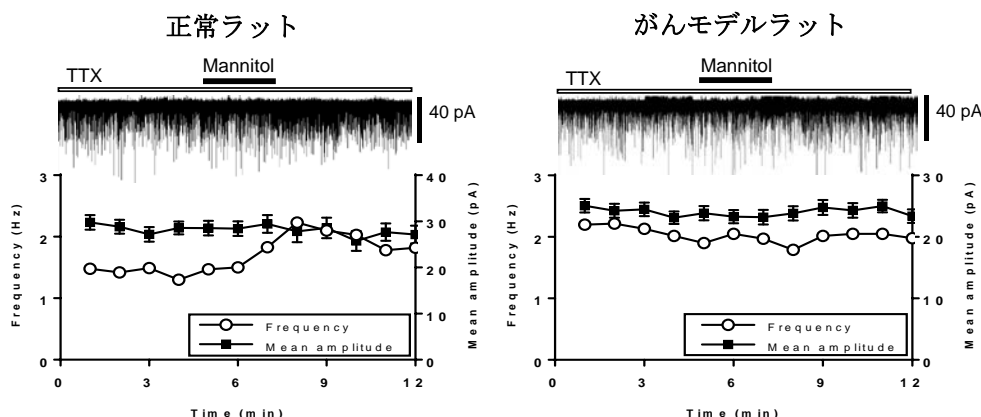


図 1

高浸透圧刺激やアンジオテンシン II 投与した際の mIPSCs の変化は正常ラット群、がんモデルラット群ともに有意な変化が認められなかった (図 2 : 移植後 2 週目の高浸透圧刺激 (315 mOsmol/kg) 時の mIPSCs の記録。左が正常ラット、右ががんモデルラット。正常ラット、がんモデルラットともに高浸透圧刺激で mIPSCs の頻度や振幅に影響を認めなかった)。

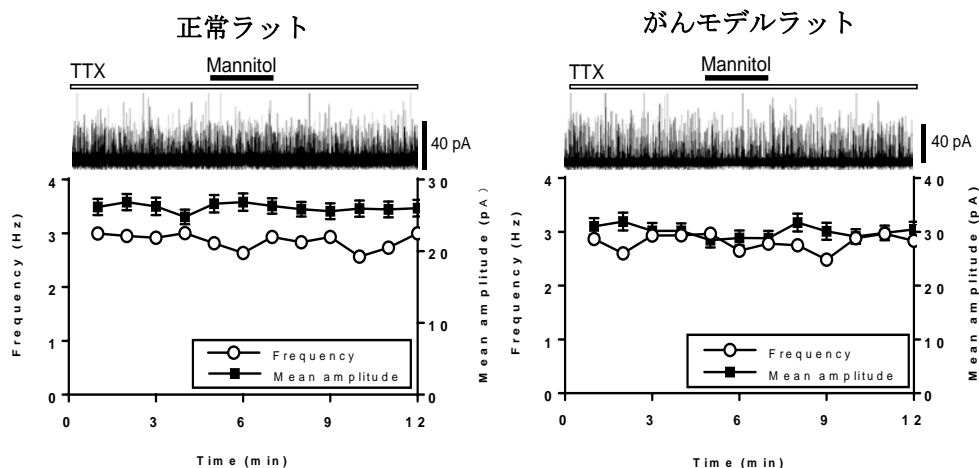


図 2

視索上核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やアンジオテンシン II 等のペプチド等の液性因子により調節されている。今回、我々の得た結果はがんモデルラットではこの部位の高浸透圧やアンジオテンシン II への感受性が低下していることから、進行がん、特に悪液質の状態では中枢神経系の体液調節機構（少なくともバゾプレッシン産生に関係する部位）が、正常な状態とは変化している可能性を示唆するものとなった。

がんの進行に伴う疼痛ストレス等もがん悪液質の発生の一因となることから、鎮痛薬の作用についての検討も行った。がん性疼痛の治療としては医療用麻薬がよく使用されているが、これに解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンを混合して使用すると鎮痛効果が増強することが報告されているが、アセトアミノフェンとその代謝産物である AM404 のオピオイド受容体への直接的な関連性については明らかにされていなかった。そこで、アセトアミノフェンならびに AM404 のオピオイド受容体に対する作用について解析を行った。オピオイド受容体の活性を評価するため、N 末端に FLAG-tag, T7-tag, Myc-tag をそれぞれ融合した MOR, DOR, KOR を安定発現させた human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞を作製した。各種オピオイド受容体の活性は、細胞内外のインピーダンス（電気抵抗）変化を測定することで GPCR 活性を評価できる CellKey™ システムを用いて評価した。MOR, DOR, KOR 安定発現 HEK293 細胞を用いて、アセトアミノフェンならびに AM404 単独処置による各種オピオイド受容体の活性評価を行ったところ、両薬物はいずれのオピオイド受容体に対してもアゴニスト活性を示さなかった。次に、医療用麻薬モルヒネによる各種オピオイド受容体活性化に対するアセトアミノフェン、AM404 の効果について解析した。その結果、アセトアミノフェンはモルヒネによる MOR, DOR, KOR 活性に無影響であった。一方、AM404 はモルヒネによる MOR, KOR 活性に対して無影響であったが、モルヒネによる DOR 活性を促進した。また、アセトアミノフェンおよび AM404 はフェンタニルによる MOR 活性を促進した。そこで、内因性オピオイドについても同様の解析を行ったが、アセトアミノフェンおよび AM404 はいずれの内因性オピオイドによる OR 活性を促進しなかった。以上の結果より、アセトアミノフェンとモルヒネ、ならびにフェンタニル併用による鎮痛作用にアセトアミノフェン代謝産物 AM404 による DOR、ならびに MOR 活性促進作用がそれぞれ関与する可能性が示唆された。また、アセトアミノフェン単剤による鎮痛作用は OR 活性を介さないことが示唆された。

（まとめ）

進行がん、特にがん悪液質（カヘキシア）といわれる病態では、全身性の消耗状態から生じる浮腫や腹水、炎症に加え、食思不振などで全身の水分バランスに変化が生じると考えられる。生体の水分バランスの恒常性を司るバゾプレッシンは急性・慢性のストレス反応にも関与することから、がん悪液質の発生の一因には、疼痛ストレスなど、がんによって生じる様々な病態が引き起こす各種ストレスと中枢の体液調節機構、どくにバゾプレッシン分泌機構に密接な関係があるのでは、と考え検討を進めてきた。

本研究では、ヒト胃癌細胞 85As2 から樹立した細胞を移植したラットをがんモデルラットとして使用し、検討を行った。電気生理学的検討では、視索上核大細胞性神経分泌細胞にパッチクランプ法を用いて記録を採取したが、がんモデルラットでは癌細胞移植後 2 週目より高浸透圧刺激やアンジオテンシン II 投与による興奮性シナプス後電流の頻度の増加が正常ラットに比べて有意に低下していることを見出した。一方で、抑制性シナプス後電流はがんの進行の影響を受けていないことを見出した。これらの結果は、海外論文投稿し、発表を行っている。本研究では、具体的な作用機序についての検討を期間内でじっくりと行うことが出来なかった。今後は、がんの進行に伴って増加する因子等がこの部位にどのように作用するか等の解析を行うことで、進行がん、とりわけがん悪液質患者の生活の質改善に結びつく治療法へ導くことが期待される。

また、実際の治療で行われている現象がどのような機序を介して効果を発揮しているのにつ

いても検討を行い、アセトアミノフェンとモルヒネ、ならびにフェンタニル併用による鎮痛効果には、アセトアミノフェン代謝産物 AM404 による DOR、ならびに MOR 活性促進作用がそれぞれ関与する可能性があることを見出した。疼痛や摂食等に関係するペプチド等を投与することで、バゾプレッシン産生の分泌動態に関係する部位の、がんの進行に伴う変化がどのようになるか（改善や予防することが出来るか等について）、今後も継続した検討が必要であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. Yoshimura M, Uezono Y. & Ueta Y. Anorexia in human and experimental animal models: Physiological aspects related to neuropeptides. Journal of Physiological Sciences 2015 65(5): 385-395. doi: 10.1007/s12576-015-0386-3. 査読有
2. Yokoyama T., Terawaki K, Minami K., Miyano K., Nonaka M, Uzu M, Kashiwase Y, Yanagihara K, Ueta Y., Uezono Y. Modulation of synaptic inputs in magnocellular neurones in a rat model of cancer cachexia. J. Neuroendocrinol. 2018 Sep;30(9):e12630. doi: 10.1111/jne.12630. 査読有
3. Terawaki K, Kashiwase Y, Uzu M, Nonaka M, Sawada Y, Miyano K., Higami Y, Yanagihara K, Yamamoto M, Uezono Y. Leukemia inhibitory factor via the Toll-like receptor 5 signaling pathway involves aggravation of cachexia induced by human gastric cancer-derived 85As2 cells in rats. Oncotarget. 2018 Oct 5;9(78):34748-34764. doi: 10.18632/oncotarget.26190. 査読有

〔学会発表〕（計 14 件）

1. 上園保仁.、宮野加奈子.、白石成二. 本邦で用いられている医療様麻薬および hydromorphone の μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体に対する特性の解析とその比較. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8~10 日、名古屋市
2. 宮野加奈子.、白石成二、上園保仁. 解熱鎮痛薬 Acetaminophen の新規薬理作用の解明 - がん性疼痛コントロールの向上を目指して -. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8~10 日、名古屋市
3. 宮野加奈子.、江藤萌子、野中美希、横山徹.、白石成二、上園保仁. がん性疼痛コントロールの向上を目指した解熱鎮痛薬 Acetaminophen およびその代謝産物 AM404 の薬理作用の解析. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6~8 日、横浜市
4. 上田陽一.、吉村充弘、園田里美、丸山崇、橋本弘史、上園保仁. シスプラチンのラット腹腔内投与後における中枢内ネスファチン-1 ニューロンの活性化. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6~8 日、横浜市
5. 江藤萌子、宮野加奈子.、野中美希、上園保仁. 漢方薬半夏瀉心湯はヒト口腔上皮細胞の損傷治癒を促進する. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6~8 日、横浜市
6. 野中美希、白石成二、宮野加奈子.、江藤萌子、岸田昭世、上園保仁. デスアシルグレリン、グレリンはドキシソルピシン心毒性に対して抑制効果を持つ. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6~8 日、横浜市
7. 大道容子、大栗宝子、川合田恵美、根本悦子、横山明信.、宮野加奈子.、山川央、松出知子、江藤萌子、佐藤汐莉、平山重人、野中美希、南浩一郎.、横山徹.、白石成二、長瀬隆弘、藤井秀明、上園保仁. オピオイド耐性に関与するオピオイド受容体インターナリゼーションへの Acetaminophen および AM404 の効果解析-可視化 Halotag[®] 融合オピオイド受容体発現細胞を用いて. 第 69 回日本薬理学会西南部会、2016 年 11 月 26 日、愛媛県松山市
8. 宮野加奈子.、松出知子、大栗宝子、荻野拓海、大道容子、江藤萌子、野中美希、横山徹.、白石成二、樋上賀一、藤井秀明、上園保仁. 解熱鎮痛薬 Acetaminophen およびその代謝産物 AM404 のオピオイド受容体活性に対する効果~がん性疼痛コントロールの向上を目指して~. 第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15~17 日、長崎県長崎市
9. 宮野加奈子.、池畑農、隠岐勝幸.、白石成二、野中美希、宇津美秋、上園保仁. 脂肪組織および臍帯組織由来ヒト間葉系幹細胞は神経障害性疼痛を改善させる. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28~30 日、横浜市
10. 上園保仁.、白石成二、宮野加奈子. 血小板活性化因子を介するペインループをターゲットとした新たな鎮痛薬創薬. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28~30 日、横浜市
11. 上田陽一.、上園保仁. シスプラチン誘発性摂食抑制に対する茶麴および紅麴抽出物の末梢投与効果. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28~30 日、横浜市
12. 荒瀬光一、橋本弘史、平田敬治、上園保仁.、上田陽一. シスプラチン末梢投与によりラット視床下部オキシトシン分泌ニューロンが活性化する. 第 76 回 日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28~30 日開催、横浜市
13. 宇津美秋、野中美希、宮野加奈子.、上園保仁. 脳内プリン代謝変化を標的とした新規がん悪液質治療法の開発基盤構築. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年 9 月 27~29 日、横浜市
14. 野中美希、宇津美秋、寺脇潔、宮野加奈子.、上園保仁. ヒト胃がん細胞株 85As2 によっておこるがん悪液質における心機能障害との関連. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年 9 月 27~29 日、横浜市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：南 浩一郎

ローマ字氏名：Kouichiro Minami

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：70279347

研究分担者氏名：上田 陽一

ローマ字氏名：Yoichi Ueta

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：10232745

研究分担者氏名：上園 保仁

ローマ字氏名：Yasuhito Uezono

所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名：研究所

職名：分野長

研究者番号（8 桁）：20213340

研究分担者氏名：宮野 加奈子

ローマ字氏名：Kanakano Miyano

所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名：研究所

職名：研究員

研究者番号（8 桁）：50597888

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。