

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590279

研究課題名（和文）がん関連倦怠感治療のターゲットとしてのヒスタミンH4受容体

研究課題名（英文）The role of histamine H4 receptor in the development of cancer-related fatigue

研究代表者

大和谷 厚（YAMATODANI ATSUSHI）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30116123

研究成果の概要（和文）：

抗悪性腫瘍薬による治療によって惹起する倦怠感の発症に腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ が重要であり、その産生機構にはヒスタミンH<sub>4</sub>受容体が関与していると考えた。今回、抗悪性腫瘍薬によってマクロファージ細胞ではTNF- $\alpha$ の産生が有意に増加され、この増加はH<sub>4</sub>受容体作動薬で抑制したが、H<sub>4</sub>受容体遮断薬ではTNF- $\alpha$ 産生が促進した。以上の結果は、TNF- $\alpha$ 産生におけるH<sub>4</sub>受容体の役割を解明し、H<sub>4</sub>受容体を標的とした新規治療薬の可能性を示唆するものとなった。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized excessive tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  production via histamine H4 receptor (H4R) is concerned in cancer-therapy related fatigue. We found that cisplatin increased TNF- $\alpha$  mRNA expressions in macrophages. Histamine H4R agonists inhibited the cisplatin-induced TNF- $\alpha$  mRNA expression, but treatment with H4R antagonist aggravated the effect. These results suggest that activation of H4R attenuates cisplatin-induced TNF- $\alpha$  mRNA expression and that H4R agonists are expected to be useful for treatment of cancer-therapy related fatigue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：ヒスタミン・ヒスタミンH4受容体・腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ ・がん治療関連倦怠感・抗悪性腫瘍薬・マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

がんは本邦の疾病対策上の最重要課題として対策が進められ、第3次対がん10か年総合戦略の実施とがん対策基本法の施行により、早期発見や標準治療法の確立とともに、予防・診断・治療に関する研究を総合的に進めることによる罹患率・死亡率の減少を目指している。急速な医療技術の発達に伴い、これまで治療が困難と言われていた悪性腫瘍に対しても積極的な治療が行われるようになった。しかし、治療によって様々な有害作用も現れる。中でも、倦怠感で代表されるがん関連倦怠感 (cancer related fatigue: CRF) は倦怠感に随伴して疲労感、虚弱、エネルギーの欠乏感、発熱、精神的な落ち込み、睡眠障害、食欲不振など複数の因子が関連した多面性をもつ症状として特徴づけられ、休息や睡眠によって回復する一般的な疲労とは区別される。がん患者さんの8割以上に認められ、積極的な対がん治療を行うほど頻発すると報告もあるため、日常生活への障害も大きく、時として耐え難い苦痛となる。

感染や炎症に伴って白血球・単球・マクロファージ・樹状細胞など免疫担当細胞で産生されるサイトカインは感染防御や免疫系の調節因子として機能するが、Dantzerらは単球・マクロファージから放出されたサイトカインの中でも特に腫瘍壊死因子

(TNF)- $\alpha$ が、迷走神経や脳室周囲器官を経由して延髄や視床下部を興奮させて、神経内分泌系および循環器系などを中心とした自律神経系の変化、発熱や食欲不振、疲労感、うつなどの病態生理的・精神的な症状に代表される病的症状 (sickness behavior) を誘発することを報告している。このような sickness behavior の症状はいずれも CRF に随伴して現れる症状と一致するものであることから、CRF の発症に抗悪性腫瘍薬や腫瘍自体の影響により免疫担当細胞で産生される TNF- $\alpha$  が極めて重要な役割を担っていることが考えられる。

近年、中枢神経系で神経伝達物質として機能する生体アミンのヒスタミンに新たな受容体の H4 受容体の存在が明らかになった。H4 受容体は単球、好酸球、肥満細胞、樹状細胞の細胞膜に存在し、遊走の制御やサイトカインの分泌など免疫系の制御に関する受容体であることが想定されている。事実、H4 受容体作動薬として作用する 4-methyl histamine がサイトカインやケモカインの産生調節に関与しているとの報告もあるので、この受容体に作用する薬物に抗炎症作用が期待できる。

つまり、申請者らは抗悪性腫瘍薬によ

て誘発される CRF の発症には H4 受容体を介して生体内で産生される TNF- $\alpha$  が重要な役割を持っていると考えた。

## 2. 研究の目的

CRF 発症時における炎症性サイトカインの産生動態を解析し、これらの生理反応に対し H4 受容体がどのような役割を担っているか明らかにする目的で、本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

(1) CRF 発症と体温・自発行動量・摂餌量の変化との連関

ラットに CRF が発症しやすいとされる白金製剤系のシスプラチン (0, 3, 6 mg/kg)、植物アルカロイド系のドセタキセル (0, 5, 10 mg/kg) を投与し、その後の体温、行動量、摂餌量の変化をバイオテレメトリー法と自動摂餌量計測装置を用いて計測し、いずれの容量によってラットは CRF を惹起するか解析した。

(2) CRF 発症に起因する炎症性サイトカインの同定

いずれの炎症性サイトカインが CRF 発症時に重要であるかを検討するため、ラットにシスプラチン (6mg/kg) ドセタキセル (10 mg/kg) 投与後 1, 3, 6, 12, 18, 24 時間後に視床下部を摘出し、組織中での TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、COX-2 mRNA 発現レベルの経時変化を RT-PCR 法を用いて解析した。

(3) シスプラチン刺激によるマクロファージ細胞からの TNF- $\alpha$  産生機序の解明

### ①ヒスタミンの関与の検討

マクロファージにおけるシスプラチン誘発 TNF- $\alpha$  産生に対してヒスタミンがどのような役割を担っているか検討した。マウス活性化マクロファージ様細胞株 (RAW264) を用い、シスプラチンが TNF- $\alpha$  mRNA 発現に及ぼす作用を解析した。同じ条件下で、ヒスタミンならびに H4 受容体作動薬・拮抗薬、ヒスタミン合成酵素 (HDC) 阻害剤で前処置しておく、TNF- $\alpha$  mRNA 発現にどのような影響されるか検討した。

## ②細胞内情報伝達機構 MAPK 系の関与の検討

MAPK 経路 (ERK、p38、JNK) の転写因子は脱リン酸化されると核内に移行し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を促進することから、シスプラチン誘発 TNF- $\alpha$  産生に対して、各種 MAPK 阻害剤 (ERK 阻害剤, p38MAPK 阻害剤, JNK 阻害剤) 及び抗酸化剤がどのような影響を及ぼすか検討した。さらに核内転写因子 NF- $\kappa$ B がシスプラチン誘発 TNF- $\alpha$  産生に及ぼす影響も検討した。

### (4) 新規 H3/H4 受容体拮抗薬の開発

H3/H4 受容体に作用するクロベンプロピットの構造を参考にして、イミダゾール、アルキルスペーサー、疎水性基から構成される化合物を新規合成開発し、その化合物が H3/H4 受容体に対してどのような薬理活性を有するか、H3/H4 受容体を強制発現させた細胞を用いて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) CRF 発症と体温・自発行動量・摂餌量の変化との関連

シスプラチン 6mg/kg ならびにドセタキセル 10mg/kg 投与によりラットには摂餌量減少・体温変化・自発行動量の減少が認められた。選択的 COX-2 阻害剤の NS-398 はドセタキセルによる体温・自発行動量・摂餌量の変化に対して抑制効果を示したが、シスプラチンによる体温・自発行動量・摂餌量の変化には影響を与えなかった。

### (2) CRF 発症に起因する炎症性サイトカインの同定

ドセタキセル 10mg/kg 投与後の視床下部において、COX-2 mRNA 発現量は増加傾向を示したが、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA は変化が認められなかった。一方、シスプラチン 6mg/kg 投与では、COX-2、IL-1 $\beta$  mRNA 発現量に変化はなく、TNF- $\alpha$  mRNA の発現増加が見られた。

### (3) シスプラチン刺激によるマクロファージ細胞からの TNF- $\alpha$ 産生機序の解明

#### ①ヒスタミンの関与の検討

シスプラチン ( $10^{-6}$ M) 投与 24 時間後、RAW264 細胞では TNF- $\alpha$  発現が有意に増加し、この発現増加と並行して培養液上清中のヒスタミン濃度は増加した。HDC 阻害剤を用いてヒスタミン産生を阻害しておくとも TNF- $\alpha$  発現は増加

したが、この TNF- $\alpha$  発現増加はヒスタミンならびに H4 受容体作動薬 (ディマプリット) の投与によって抑制することができた。一方、H4 受容体遮断薬 (JNJ7777120) を RAW264 細胞に前処置しておくとも、シスプラチンによる TNF- $\alpha$  発現作用をさらに上昇させた。これらの結果から、マクロファージ由来のヒスタミンは H4 受容体を介してシスプラチンの TNF- $\alpha$  発現を抑制し、シスプラチンによって惹起される炎症症状を弱めることが示唆された。

#### ②細胞内情報伝達機構 MAPK 系の関与の検討

RAW264 にシスプラチン ( $10^{-6}$ M) 投与前に ERK 阻害薬 (PD98059)、p38 阻害薬 (SB203580) および JNK 阻害薬 (SP600125) で前処置し、24 時間後の TNF- $\alpha$  mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、シスプラチンにより増加した TNF- $\alpha$  mRNA 発現量は ERK 阻害薬の投与でのみ抑制することができた。

また、NF- $\kappa$ B の活性増加は TNF- $\alpha$  産生増加よりも早くからみられること、抗酸化剤 (ジメチルチオウレア) の前処置で ERK のリン酸化や NF- $\kappa$ B 活性の低下と TNF- $\alpha$  産生低下が見られた。これらの結果から、シスプラチンは始めに活性酸素種 (ROS) を生成し、その ROS が NF- $\kappa$ B と ERK を活性化させることで TNF- $\alpha$  の産生を促すと考えた。最近、NF- $\kappa$ B の活性調節に H4 受容体が関与するとの報告もあるため、シスプラチンによる NF- $\kappa$ B の活性化ならびに ERK のリン酸化など細胞内情報伝達系にヒスタミン H4 受容体が関与しているのではないかと考えられる。

### (4) 新規 H3/H4 受容体拮抗薬の開発

ヒトの H3 受容体を強制発現させた CHO-K1 細胞 (ES-392-C) を 384 ウェルプレートに播種し、新規に合成した化合物を添加し、細胞内の cAMP 産生動態を計測することで、この化合物が H3 受容体に対して作動活性があるのか、遮断活性があるのかを判定するシステムを構築した。このシステムを用いて、今回新規合成に成功した化合物を検定したところ、既存の H3 受容体遮断薬であるクロベンプロピットと同程度またはそれ以上の H3 受容体遮断活性が得られる化合物 (OUP-181、OUP-188) を見いだした。

H4 受容体は H3 受容体と類似しており、H3 受容体関連薬の多くは H4 受容体にも作用することから、合成できた新規化合物が CRF の治療薬として応用できると考えられる。

一連の研究成果から、CRF の新規治療薬として H4 受容体をターゲットとした薬剤が応用可能であることが判明した。

## 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1件)

① Yamamoto K, Asano K, Matsukawa N, Imaizumi M, Yamatodani A, Time-course analysis of pica in rats using an automatic feeding monitoring system, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 査読有, 63 (2011) 30-34  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2010.04.011>

[学会発表] (計4件)

① Hiroki Yoneyama, Takuji Magata, Yoshiheide Usami, Shinya Harusawa, Kouichi Sawada, Kouichi Yamamoto, Atsushi Yamatodani  
Synthesis and Evaluation of Potent Nonimidazole Histamine H<sub>3</sub> Antagonists Based on *S*-Alkyl-*N*-alkylisothioureia Structure, T IMECS11, 2011年11月29日, 東京

② 金世洸, 山本浩一, 中村侑亮, 大豊裕一, 大和谷厚  
シスプラチン刺激によるRAW264細胞のTNF- $\alpha$  mRNA発現機序の解明, 第119回日本薬理学会近畿部会, 2011年7月8日, 愛知

③ 山本浩一, 松川直樹, 小倉由布子, 今泉正洋, 大和谷厚  
摂餌量測定装置によるラットのシスプラチン誘発急性・遅発性パイカ行動の解析, 第84回日本薬理学会年会, 2011年3月24日, 神奈川

④ 大豊裕一, 山本浩一, 室谷知孝, 中村侑亮, 浅野景子, 大和谷厚  
Involvement of histamine in cisplatin-induced TNF- $\alpha$  expression in RAW264 cells, 第83回日本薬理学会年会, 2010年3月16日, 大阪

[その他]

ホームページ等

<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~pharmacology/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和谷厚 (YAMATODANI ATSUSHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 30116123

(2) 研究分担者

春沢信哉 (HARUSAWA SHINYA)  
大阪薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90167601

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