



## Rikkunshito Ameliorates Cancer Cachexia Partly through Elevation of Glucarate in Plasma

Ohbuchi, Katsuya

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6533号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006533>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Rikkunshito Ameliorates Cancer Cachexia Partly through Elevation of Glucarate in Plasma

六君子湯は血中グルカル酸の上昇を介して癌悪液質を改善させる

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

病因病態解析学

(指導教員：吉田 優 准教授)

大渕 勝也

## 要旨

がん性悪液質は、食欲不振、体重減少と全身性の炎症の発症を特徴としており、がん患者の病態悪化や死亡率の増加に関与している。我々は、以前に、医療用漢方製剤である六君子湯が悪液質に対して有効性を示すことを明らかにした[1]。その作用機序には、グレリンシグナルを介した食欲不振の改善が関与していることが証明されている。その一方で、六君子湯は、グレリンシグナル非依存的に抗炎症作用を発揮できることも報告されている[2]。そこで、このグレリン非依存的な作用機序について新たな手がかりを得るために、AH-130 腹水肝がん細胞播種モデルラットを用いた血漿メタボローム分析を実施した。メタボローム分析では、生体サンプル内の低分子代謝物に対して、網羅的な解析を行う。代謝物は DNA、RNA やタンパク質の下流に位置しているため、ある刺激に対する一連の生体反応の結果であると捉えることができ、その時点での生体の状態を最も反映する指標になる可能性が考えられる。さらに、メタボローム分析は、漢方製剤のように多成分で構成され、マルチターゲットに作用する薬剤に対する作用評価という観点においても有用な技術であると期待されている。

本研究では、AH-130 腹水肝がん細胞をラット腹腔内へ播種し、引き続き、7 日間、飼育した悪液質モデルラットに対して水、または、1 g/kgBW の六君子湯を強制経口投与した。投与後 3 時間で血漿を回収し、血漿中から代謝物の抽出、ならびに、誘導化前処理を行い、ガスクロマトグラフ質量分析計によるメタボローム分析を実施した。メタボローム分析の結果、血漿中から合計 110 の代謝物を検出し、23 代謝物が悪液質モデルに対する六君子湯の投与によって有意に変動していた。そのうち、アラニンや乳酸といったピルビン酸代謝に関わる代謝物は、悪液質モデルでのみ六君子湯の投与によって上昇していた。これは、がん細胞では嫌気的解糖経路が積極的に利用されるという ‘Warburg effect’ を反映した結果であると考えられる。一方、3 つの代謝物（グルカル酸、アラビトール、ラウリン酸）については、正常ラット、悪液質モデルとともに、六君子湯の投与による変動（グルカル酸、アラビトールは上昇、ラウリン酸は減少）が観察された。アラビトールに関しては、その生理的意義は分かっていない。脂肪酸の一つであるラウリン酸については、六君子湯の投与によって減少していた。先行研究では、六君子湯がインスリン分泌の促進を介して食後血中遊離脂肪酸の上昇を抑制するということが報告されている[3]。このことから、同様の効果が血中ラウリン酸の減少として検出された可能性が示唆される。また、一部の悪液質においては、血中脂質代謝が変化しているという報告[4]もあることから、六君子湯による血中脂質プロファイルの変化が、悪液質に対する改善効果に関与している可能性も考えられる。グルカル酸は、悪液質、および、正常ラットにおいて、六君子湯投与によって有意に上昇した。グルカル酸は、血中において、強力なβ-グルクロニダーゼ阻害剤であるラクトン体と平衡状態をとることが知られている[5]。また、グルカル酸は発がん物質による発がんモデル動物に対して制がん作用を示す。これは、β-グルクロニダーゼ阻害に伴う発がん物質のクリアランス促進によるものであると考えられている。そこで、血中グルカル酸の上昇が悪液質の改善に寄与しているのか否かを検証するため、グルカル酸の AH-130 腹水肝がん細胞誘発モデルに対する効果を検討した。

AH-130 腹水肝がん細胞をラット腹腔内へ播種後 7 日間、3 用量 (4, 12, 36 mmol/kgBW/day)

のグルカル酸、または、水を強制経口投与した。その結果、グルカル酸の投与によって、投与 7 日目の血中グルカル酸量は用量依存的に増加し、血中 $\beta$ -グルクロニダーゼ活性は有意に抑制されていた。そして、グルカル酸は悪液質に伴う体重低下の発現を遅らせ、最高用量群においては、腹水量、および、骨格筋萎縮に対して有意な抑制効果が観察された。さらに、グルカル酸投与により、悪液質モデルラットの血中インターフェロン $\gamma$ レベルが有意に低下していた。先行研究より、グルカル酸ががん細胞の増殖を抑制できると報告されている[6]ことから、本試験で観察された腹水量の抑制に関しては、腹水中のがん細胞の増殖を抑制した結果ではないかと考えられる。また、骨格筋の萎縮に対する効果については、骨格筋中のタンパク質代謝酵素の発現バランスに有意な変化は見られておらず、その機序は不明のままである。一方、グルカル酸は、ラット脾臓から調製した脾細胞に対してもリボ多糖刺激によるインターフェロン $\gamma$ 遺伝子の発現誘導を抑制できることを見出し、グルカル酸の悪液質モデルへの抗炎症効果は、免疫系への直接作用を介している可能性が示された。

今回の検討から、グルカル酸は悪液質に対して有効性を示すことが明らかとなった。また、グルカル酸は果物や野菜に多く含まれることが知られており[7]、酵素法を用いた検出では六君子湯にもグルカル酸が豊富に存在することが証明できた。これより、メタボローム分析で明らかにできた血中グルカル酸の上昇は、六君子湯に含まれるグルカル酸が体内に吸収された結果ではないかと考えられる。本研究から、六君子湯のグレリンシグナル非依存的な抗炎症作用は、血中グルカル酸の上昇が関与している可能性が示された。また、メタボローム分析は漢方製剤のように複雑な薬理作用に対して有望なツールであることが明らかにできた。

- [4] P. Costelli, L. Tessitore, B. Batetta, M. F. Mulas, O. Spano, P. Pani, F. M. Baccino, and S. Dessì, "Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin," *J. Nutr.*, vol. 129, no. 3, pp. 700–6, Mar. 1999.
- [5] Z. Walaszek, "Potential use of D-glucaric acid derivatives in cancer prevention," *Cancer Lett.*, vol. 54, no. 1–2, pp. 1–8, 1990.
- [6] T. E. Webb, H. Abou-Issa, P. C. Stromberg, R. C. Curley, and M. H. P. Nguyen, "Mechanism of growth inhibition of mammary carcinomas by glucarate and the glucarate: Retinoid combination," *Anticancer Res.*, vol. 13, no. 6 A, pp. 2095–2099, Jan. 1993.
- [7] Z. Walaszek, J. Szemraj, and M. Hanousek, "D-glucaric acid content of various fruits and vegetables and cholesterol-lowering effects of dietary D-glucarate in the rat," *Nutr. Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 673–681, 1996.

#### 参考文献

- [1] N. Fujitsuka, A. Asakawa, Y. Uezono, K. Minami, T. Yamaguchi, A. Niijima, T. Yada, Y. Maejima, U. Sedbazar, T. Sakai, T. Hattori, Y. Kase, and A. Inui, "Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival," *Transl. Psychiatry*, vol. 1, no. 7, p. e23, Jan. 2011.
- [2] H. Tsubouchi, S. Yanagi, A. Miura, S. Iizuka, S. Mogami, C. Yamada, T. Hattori, and M. Nakazato, "Rikkunshito ameliorates bleomycin-induced acute lung injury in a ghrelin-independent manner," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 306, no. 3, pp. L233–45, Feb. 2014.
- [3] K. Tanaka, Y. Urita, K. Nara, O. Miura, and M. Sugimoto, "Effects of the traditional Japanese medicine Rikkunshito on postprandial glucose and lipid metabolism," *Hepatogastroenterology*, vol. 58, no. 109, pp. 1112–1118, 2011.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 2558 号	氏名	大渕 勝也
論文題目 Title of Dissertation	<p>Rikkunshito Ameliorates Cancer Cachexia Partly through Elevation of Glucarate in Plasma</p> <p>六君子湯は血中グルカル酸の上昇を介して癌悪液質を改善させる</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 平井 みどり 眞理子</p> <p>副査 Vice-Examiner 眞坂 敏朗</p> <p>副査 Vice-Examiner 眞坂 敏朗</p>		
審査終了日	平成 28 年 1 月 27 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

がん性悪液質は、食欲不振、筋肉量の減少と全身性の炎症の発症を特徴しており、がん患者の病態悪化や死亡率の増加に関与している。医療用漢方製剤である六君子湯は基礎研究レベルにおいては癌悪液質動物モデルに対して有効性を示すことが報告されている。六君子湯による食欲不振の改善についてはグレリンシグナルへの作用を介していることが分かっているものの、抗炎症効果についてはその有効性は示されているものの、作用機序については明らかとなっていない。そこで、六君子湯のホストに与える効果について包括的に評価を行うため、AH-130 腹水肝がん細胞播種モデルラットを用いた血漿メタボローム分析を実施した。

AH-130 腹水肝癌細胞を腹腔内に播種後 7 日目に 1g/kgBW の六君子湯を経口投与し、3 時間後の血漿に対してメタボローム分析を行った。その結果、血漿中から 110 の代謝物を検出し、23 代謝物が悪液質モデルにおいて六君子湯の投与によって有意な変動を示した。その中の一つ、グルカル酸は、悪液質および正常ラットにおいて六君子湯投与によって有意に上昇していた。グルカル酸はグルクロニダーゼ阻害作用による発がん物質等のクリアランス促進作用を持ち、制癌作用が報告されている。そこで、血中グルカル酸の上昇が悪液質の改善に寄与しているのか否かを検証するため、グルカル酸の AH-130 腹水肝がん細胞誘発モデルに対する効果を検討した。

AH-130 腹水肝がん細胞をラット腹腔内へ播種後 7 日間、3 用量 (4, 12, 36 mmol/kgBW/day) のグルカル酸、または水を強制経口投与した。その結果、グルカル酸は悪液質に伴う体重低下の発現を遅らせ、最高用量群においては、腹水量および肺動脈の萎縮に対して有意な抑制効果が観察された。炎症性サイトカインに対する効果については、グルカル酸投与により悪液質モデルラットの血中インターフェロン  $\gamma$  レベルが有意に低下していた。また、グルカル酸はラット脾臓から調製した脾細胞に対してもリボ多糖刺激によるインターフェロン  $\gamma$  遺伝子の発現誘導を抑制できることを見出し、グルカル酸の悪液質モデルへの抗炎症効果は、免疫系への直接作用を介している可能性が示された。

本研究の結果、グルカル酸は悪液質に対して有効性を示すことが明らかとなった。また、グルカル酸は果物や野菜に多く含まれることが知られており、酵素法を用いた検出では六君子湯にもグルカル酸が豊富に存在することが証明できた。これより、メタボローム分析で明らかとなった血中グルカル酸の上昇は、六君子湯に含まれるグルカル酸が体内に吸収された結果ではないかと考えられる。

本研究から、六君子湯のグレリンシグナル非依存的な抗炎症作用は、血中グルカル酸の上昇が関与している可能性が示された。また、メタボローム分析は漢方製剤のように複雑な薬理作用の表現形解析に対して有望なツールであることを示すことができた。これらは価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。