

抗がん剤起因性腸炎に対する大建中湯，柴苓湯および 関連方剤の効果に関する研究

申請代表者 加藤 伸一 京都薬科大学病態薬科学系薬物治療学分野 准教授
所内共同研究者 林 周作 病態制御部門消化管生理学分野 助教

【報告セミナー要旨】

【背景】 抗がん剤は副作用として激しい下痢を伴う腸炎 (intestinal mucositis) を高頻度に誘起することから、がん化学療法を行う上で大きな問題となっているが、腸炎の病態については未だ不明な点が多い。近年、抗がん剤の副作用を軽減する目的で、種々の漢方方剤の有用性が注目されている。我々は最近、5-フルオロウラシル (5-FU) 誘起腸炎の病態に TNF- α 発現の増大に起因した小腸腺窩のアポトーシスが重要であることを明らかにした。

【目的】 そこで本研究では、炎症性腸疾患などに対する効果が報告されている柴苓湯および大建中湯の5-FU誘起腸炎に対する効果について、小腸腺窩におけるアポトーシス誘導の観点を中心に検討を行った。

【方法】 雄性 C57BL/6 マウスに5-FU (50 mg/kg) を1日1回6日間腹腔内投与し、7日目に小腸傷害を評価した。また、5-FUの初回投与24時間後における小腸腺窩 (crypt) のアポトーシスを TUNEL アッセイにより、caspase-3の活性化を免疫組織学的に、さらに TNF- α mRNA 発現をリアルタイム RT-PCRにより測定した。柴苓湯 (100~1000 mg/kg) および大建中湯 (1750 mg/kg) は1日2回6日間経口投与した。

【結果】 5-FUの6日間連続投与は、4日後から顕著な下痢を伴う体重減少が認められ、7日目には小腸絨毛の短縮ならびに腺窩の破壊を特徴とする腸炎の発生が観察された。柴苓湯の1日2回投与は、用量依存的に5-FU投与による下痢および体重減少、ならびに腸炎を抑制し、その効果は1000 mg/kgの用量で特に顕著に認められた。一方、大建中湯の1日2回投与もまた5-FUによる下痢および体重減少を有意に抑制したが、腸炎に対する抑制効果は柴苓湯と比較して弱いものであった。5-FUの初回投与24時間後における小腸腺窩では caspase-3の活性化を伴う TUNEL陽性アポトーシス細胞の増加が観察された。5-FUによる caspase-3の活性化およびアポトーシス細胞の増加は柴苓湯の投与によりいずれも有意に抑制されたが、大建中湯の投与によってはほとんど影響を受けなかった。同様に、5-FU初回投与24時間後に観察された小腸における TNF- α mRNA 発現の増大もまた柴苓湯の投与により有意に抑制されたが、大建中湯によってはほとんど影響を受けなかった。

【結論】 5-FU誘起腸炎に対して柴苓湯は明らかな改善効果を発揮することが判明した。その効果は、5-FUによる TNF- α 発現の増大を阻害することで小腸腺窩のアポトーシスを抑制したことによるものと推察される。大建中湯もまた5-FUによる下痢および体重減少に対しては抑制効果を示したが、腸炎およびアポトーシス誘導にはほとんど影響を与えなかった。ゆえに、大建中湯の下痢および体重減少の抑制効果の機序は柴苓湯とは異なっているものと考えられる。いずれにせよ、柴苓湯は抗がん剤起因性腸炎の予防および治療に有用であることが期待される。

■背景および目的

抗がん剤は副作用として激しい下痢を伴う腸炎 (intestinal mucositis) を高頻度に誘起することから、がん化学療法を行う上で大きな問題となっている^{1,2)}。5-フルオロウラシル (5-FU) は臨床において繁用される抗がん剤の一つであるが、50-80%の患者で腸炎を誘起することが知られている^{1,3)}。しかし、抗がん剤誘起腸炎の病態については未だ不明な部分が多く、また予防および治療法についても確立されていない。我々は最近、代表的な抗がん剤の一つである5-フルオロウラシル (5-FU) により誘起される腸炎の発生には腸腺窩 (intestinal crypt) におけるアポトーシスの誘導が関与していること、さらにその過程にはTNF- α 発現の増大に起因したcaspase-8 およびcaspase-3 の活性化が関与していることを明らかにした⁴⁾。実際、5-FU の投与により誘起されるTNF- α 発現の増大を抑制することで、腸炎の発生が抑制されることも観察している⁵⁾。

近年、抗がん剤の副作用を軽減する目的で、種々の漢方方剤の有用性が注目されている。大建中湯は腸運動を亢進させることで腸閉塞などを改善することが知られているが、最近抗炎症作用を有することや炎症性腸疾患などに有効であることが報告されている^{6,7)}。柴苓湯もまた抗炎症作用を有することや炎症性腸疾患に対する有効性が示されている^{8,9)}。

そこで本研究では、柴苓湯および大建中湯の5-FU 誘起腸炎に対する効果について、小腸腺窩におけるアポトーシス誘導の観点を中心に検討を行った。

■実験方法

使用動物

雄性C57BL/6マウス (20 ~ 24g, SLC) を使用した。

腸炎の作製

マウスに5-FU (50 mg/kg) を1日1回6日間腹腔内投与し、7日目に小腸を摘出した。5-FU投与期間中の体重の変化および下痢の程度を経目的に評価した。摘出した小腸組織をホルマリンで固定した後、パラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。腸炎の評価は、小腸絨毛の短縮および腸腺窩の傷害 (単位長さあたりの腺窩数および腺窩あたりの構成細胞数を測定) により行った。柴苓湯 (100~1000 mg/kg) および大建中湯 (1750 mg/kg) は1日2回6日間経口投与した。

アポトーシスの誘導

5-FUの初回投与24時間後に小腸を摘出し、ホルマリン固定後パラフィン包埋薄切切片を作製した。小腸腺窩のアポトーシスはin situ Apoptosis Detection Kit (タカラ) を用いてTUNELアッセイにより評価した。

Caspase-3の活性化

5-FUの初回投与24時間後に小腸を摘出し、ホルマリン固定後パラフィン包埋薄切切片を作製した。小腸腺窩におけるcaspase-3の活性化は、それぞれcleaved caspase-3に対する特異的抗体 (Cell Signaling Technology) を用いて免疫組織染色 (VECSTATIN Elite ABC Kit, VECTOR) により評価した。

TNF- α mRNA発現

5-FUの初回投与24時間後に小腸を摘出し、Sepasol RNA I (ナカライ) を用いて全RNAを抽出した後、PrimeScript RT Kit (タカラ) を用いて逆転写反応を行った。リアルタイムPCRは、マウスTNF- α (Primer set ID: MA097070) および β アクチン (Primer set ID: MA025939) に対する特異的プライマーおよびSYBR Premix ExTq (タカラ) を用いて7500 real-time PCRsystem (ABI) により行った。

■実験結果および考察

5-FUの投与は下痢を伴う顕著な体重減少を引き起こすことが知られている^{1-3, 5)}。本研究においても、5-FU (50 mg/kg) の6日間連続投与は、投与開始後4日目から明らかな下痢を伴う体重減少が観察された。柴苓湯 (100 ~ 1000 mg/kg) の1日2回投与は、用量依存的に5-FU投与による下痢および体重減少を抑制した (図1)。大建中湯 (1750 mg/kg) の投与もまた5-FU投与による体重減少および下痢を有意に抑制した。柴苓湯の1000 mg/kgと大建中湯の1750 mg/kgの下痢および体重減少に対する抑制効果はほぼ同定であった。5-FUにより誘起される腸炎では、小腸絨毛の短縮や腺窩の傷害が特徴的に認められるが、これは非特異的炎症、アポトーシス、ならびに細胞増殖抑制により生じるものと考えられている¹⁰⁻¹²⁾。実際、本研究においても、5-FUの6日間連続投与は顕著な小腸絨毛の短

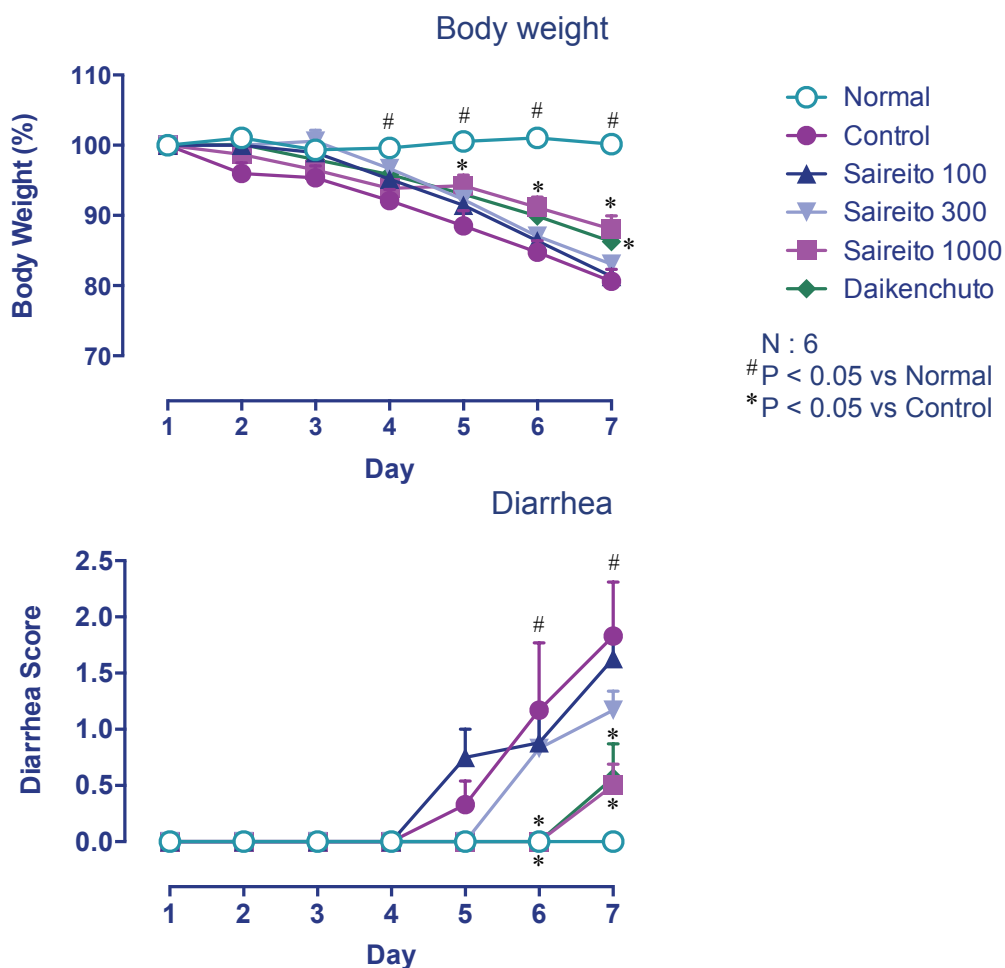


図1. 5-FU 投与期間中の体重減少および下痢に対する柴苓湯および大建中湯の効果

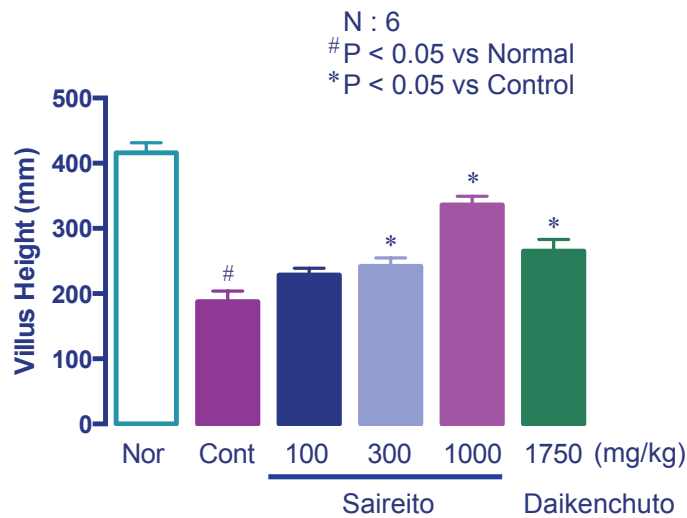
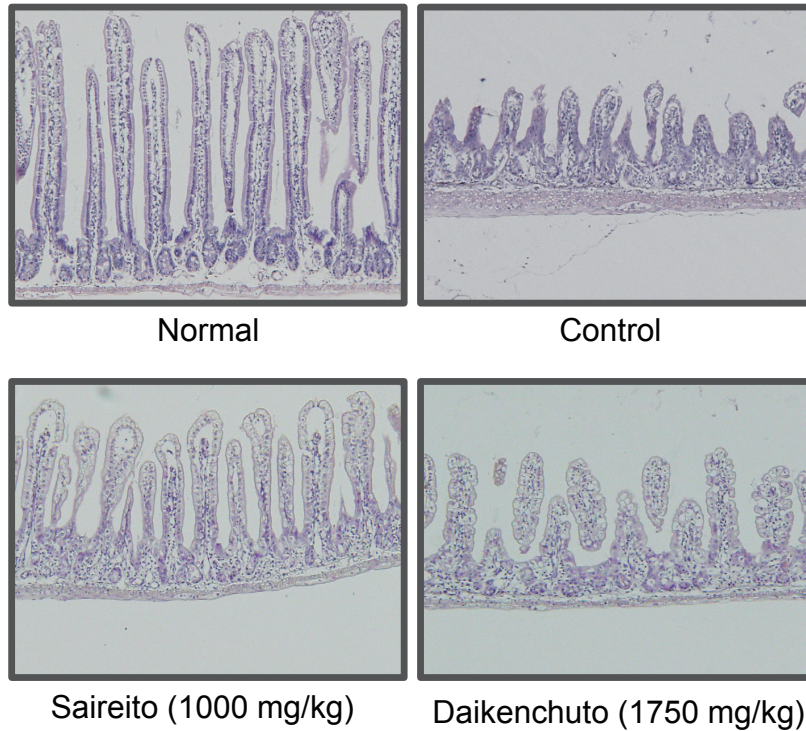


図2. 5-FU による小腸絨毛の短縮に対する柴苓湯および大建中湯の効果

縮と腺窩の傷害(腺窩およびその構成細胞数の減少)が観察された(図2および3)。柴苓湯の投与は用量依存的に5-FU誘起腸炎を抑制し、その効果は300mg/kg以上の用量で有意なものであった。一方、大建中湯の投与は5-FU誘起腸炎に対して有意な抑制効果を示したものの、その効果は柴苓湯と比較して明らかに弱いものであった。これらの結果は、柴苓湯は5-FU誘起腸炎に対して抑制効果を発揮することを示唆している。一方、大建中湯は下痢や体重減少に対しては改善効果を示したが、その効果は腸炎を抑制したことによるものではないと推察される。

さらに本研究では、5-FUの投与が腸炎の成立より早い段階から小腸腺窩にアポトーシスを誘導することを観察した。5-FUの初回投与24時間後においては、絨毛の短縮や腺窩の傷害はほとんど認め

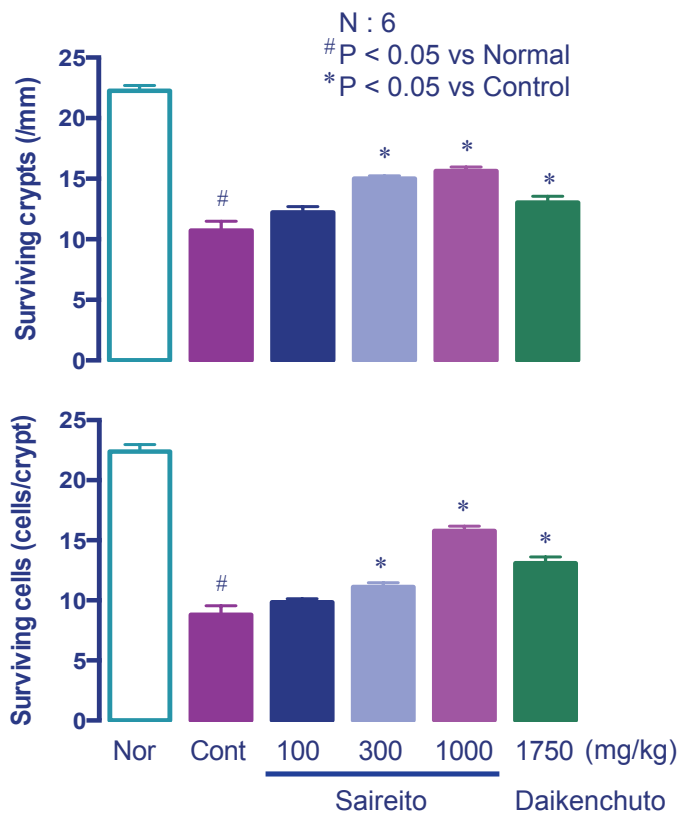
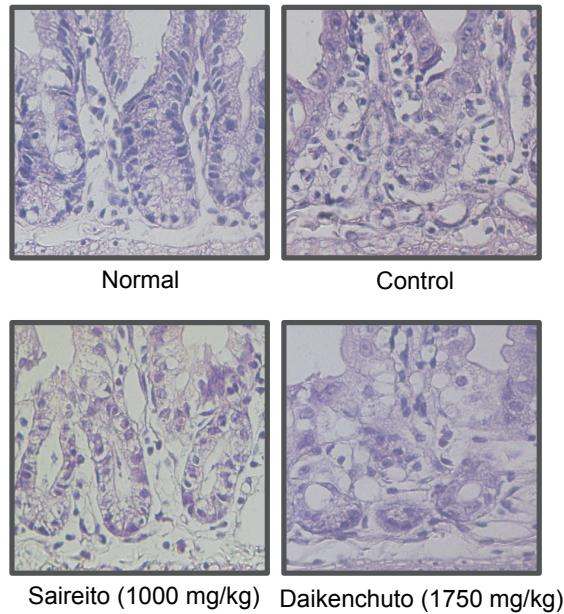
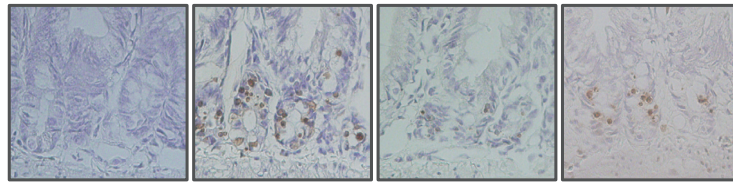


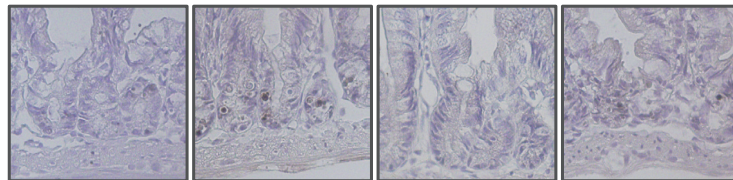
図3. 5-FU による小腸腺窩の傷害に対する柴苓湯および大建中湯の効果

られないが、腺窩を中心にTUNEL陽性アポトーシス細胞の増大が観察された(図4)。我々は以前の検討で5-FUによるアポトーシスの誘導がcaspase-8およびcaspase-3の活性化が関与していることを報告している⁴⁾。そこで、本研究では5-FUによるアポトーシスの誘導およびcaspase-3の活性化に対する柴苓湯および大建中湯の効果についても検討した。5-FUの投与により誘起される腺窩のアポトーシスの誘導およびcaspase-3の活性化は柴苓湯および大建中湯の投与によりいずれも有意に抑制

Apoptotic cells (TUNEL assay)



Activation of caspase-3



Normal Control Saireito (1000 mg/kg) Daikenchuto (1750 mg/kg)

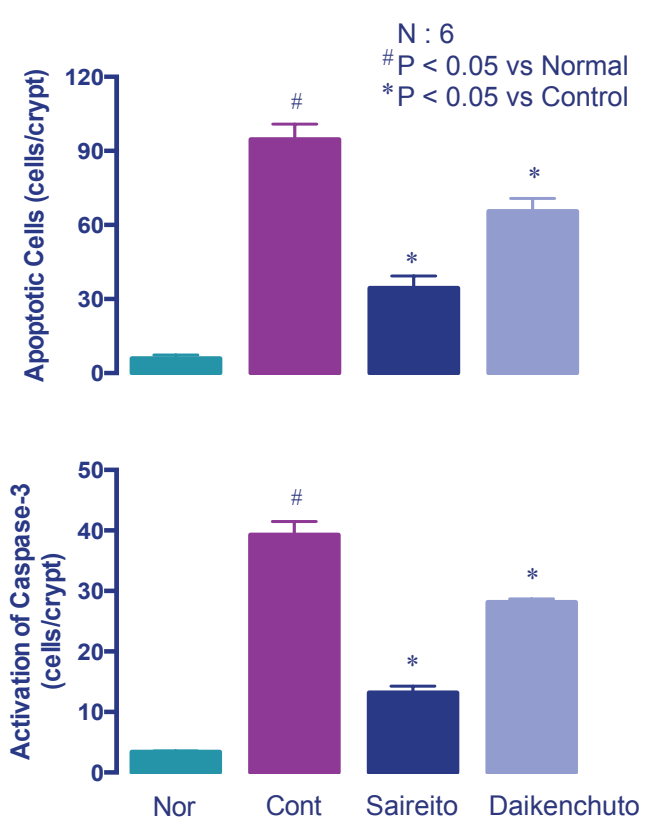


図4. 5-FU によるアポトーシスの誘導および caspase-3 の活性化に対する柴苓湯および大建中湯の効果

されたが、大建中湯の効果は柴苓湯と比較して明らかに弱いものであった。これらの結果は、柴苓湯の腸炎に対する抑制効果は caspase-3 の活性化を阻害することでアポトーシス誘導を抑制したことによることを示唆している。また、大建中湯のアポトーシス誘導に対する効果が弱かったことは、腸炎に対する抑制効果が弱かったことと一致している。

我々は5-FU誘起腸炎におけるアポトーシス誘導には主としてTNF- α 発現増大に起因したアポトーシス経路が関与していることを明らかにしている⁴⁾。そこで、5-FUにより誘起される小腸粘

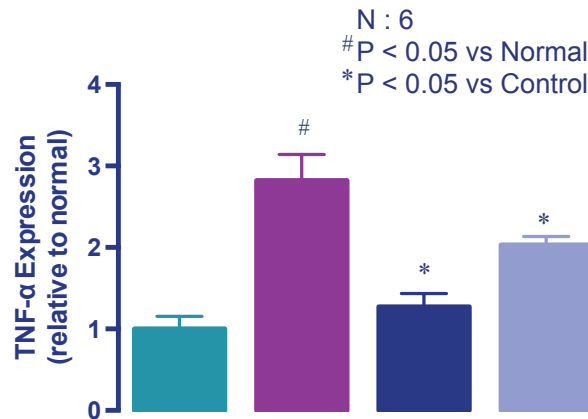


図5. 5-FU による小腸粘膜 TNF- α 発現の増大に対する柴苓湯および大建中湯の効果

膜 TNF- α mRNA 発現の増大に対する柴苓湯および大建中湯の効果を検討した。予想通り、柴苓湯は TNF- α 発現の増大を強く抑制したのに対し、大建中湯は有意な抑制効果を示したものの、その効果は柴苓湯と比較して明らかに弱いものであった (図5)。これらの結果は、柴苓湯が 5-FU による TNF- α 発現の増大を抑制することでアポトーシスの誘導、さらには腸炎の発生を抑制することを強く示唆している。一方、大建中湯は 5-FU による下痢や体重減少といった臨床症状を改善させるが、その効果は腸炎の抑制とは異なった機序に起因しているものと推察される。

■結論

柴苓湯は 5-FU 誘起腸炎に対して抑制効果を発揮することが判明した。その効果は 5-FU の投与による TNF- α 発現の増大を抑制したことで阻害したことで、アポトーシス誘導過程を抑制したことによるものと推察される。従って、柴苓湯は抗がん剤誘起腸炎の予防および治療に有用である可能性が期待される。一方、大建中湯は 5-FU の投与による下痢や体重減少などの臨床症状の改善には有効であるが、腸炎自体には抑制効果を示さなかったことから、柴苓湯とは異なった作用を有しているものと考えられる。

■参考文献

- 1) Wadler S, Benson AB, 3rd, Engelking C, Catalano R, Field M, Kornblau SM, Mitchell E, Rubin J, Trotta P, Vokes E: Recommended guidelines for the treatment of chemotherapy-induced diarrhea. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **16**, 3169-3178 (1998).
- 2) Benson AB, 3rd, Ajani JA, Catalano RB, Engelking C, Kornblau SM, Martenson JA, Jr., McCallum R, Mitchell EP, O'Dorisio TM, Vokes EE, Wadler S: Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **22**, 2918-2926 (2004).
- 3) Symonds RP: Treatment-induced mucositis: an old problem with new remedies. *British journal of cancer*, **77**, 1689-1695 (1998).
- 4) Yasuda M, Kato S, Yamanaka N, Iimori M, Utsumi D, Kitahara Y, Iwata K, Matsuno K,

- Amagase K, Yabe-Nishimura C, Takeuchi K: Potential role of the NADPH oxidase NOX1 in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **302**, G1133-1142 (2012).
- 5) Yasuda M, Kato S, Yamanaka N, Imori M, Matsumoto K, Utsumi D, Kitahara Y, Amagase K, Horie S, Takeuchi K: 5-HT₃ receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells. *British journal of pharmacology*, **168**, 1388-1400 (2013).
- 6) Iwasa T, Ogino H, Nakamura K, Ihara E, Akiho H, Takayanagi R: Feeding administration of Daikenchuto suppresses colitis induced by naive CD4⁺ T cell transfer into SCID mice. *Digestive diseases and sciences*, **57**, 2571-2579 (2012).
- 7) Kono T, Kaneko A, Hira Y, Suzuki T, Chisato N, Ohtake N, Miura N, Watanabe T: Anti-colitis and -adhesion effects of daikenchuto via endogenous adrenomedullin enhancement in Crohn's disease mouse model. *Journal of Crohn's & colitis*, **4**, 161-170 (2010).
- 8) Kishida Y, Miki H, Nishii T, Inoue T, Nishida S, Yoshikawa H, Sugano N: Therapeutic effects of Saireito (TJ-114), a traditional Japanese herbal medicine, on postoperative edema and inflammation after total hip arthroplasty. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, **14**, 581-586 (2007).
- 9) Watanabe T, Yamamoto T, Yoshida M, Fujiwara K, Kageyama-Yahara N, Kuramoto H, Shimada Y, Kadowaki M: The traditional herbal medicine saireito exerts its inhibitory effect on murine oxazolone-induced colitis via the induction of Th1-polarized immune responses in the mucosal immune system of the colon. *International archives of allergy and immunology*, **151**, 98-106 (2010).
- 10) Daniele B, Secondulfo M, De Vivo R, Pignata S, De Magistris L, Delrio P, Palaia R, Barletta E, Tambaro R, Carratu R: Effect of chemotherapy with 5-fluorouracil on intestinal permeability and absorption in patients with advanced colorectal cancer. *Journal of clinical gastroenterology*, **32**, 228-230 (2001).
- 11) Duncan M, Grant G: Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **18**, 853-874 (2003).
- 12) Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG, Keefe DM: Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, **14**, 713-731 (2006).