

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 京都薬科大学薬物治療学分野 教授
(所内共同研究者) 林 周作 病態制御研究部門消化管生理学分野 助教

【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。我々は初年度(2013年度)の共同研究において、5-フルオロウラシル(5-FU)により誘起される腸炎に対して柴苓湯が有効であること、またその機序としてTNF- α 発現の増大を介した小腸腺窩のアポトーシスを抑制したことに起因していることを明らかにした。

【目的】そこで本継続研究では、5-FU誘起腸炎に対する柴苓湯の効果について、5-FUの抗がん作用に対する影響および腸炎抑制機序を中心に検討を行った。

【方法】雄性C57BL/6マウスにマウス結腸がんcolon38細胞を皮下に移植することにより担癌マウスを作製し、移植後7日目から21日目までの14日間1日毎の腫瘍体積、体重変化および下痢の程度を測定した。5-FU(15 mg/kg)は移植後7日目から1日1回6日間腹腔内投与した。柴苓湯(1000 mg/kg)は移植後7日目から21日目までの14日間1日2回経口投与した。一方、マウス単球・マクロファージ系細胞株RAW264.7を12wellプレートに播種し、24時間後にLPS (0.1 μ g/ml)を添加し、6時間後に細胞から全RNAを抽出した。各種サイトカインおよび誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS) mRNA発現はリアルタイムRT-PCRにより測定した。柴苓湯(0.01~1 mg/ml)はLPSと同時に添加した。

【結果】皮下移植されたcolon38細胞は時間依存的に増殖し、移植後21日目には腫瘍体積は1400 mm³に達した。5-FUの連続投与はcolon38細胞の増殖を著明に抑制し、移植後21日目の腫瘍体積は5-FU非投与群の1/5程度であった。柴苓湯の投与は、5-FUによる腫瘍増殖抑制効果に対して何ら影響を及ぼさなかった。また、5-FUの連続投与は下痢を伴う体重減少を引き起こしたが、柴苓湯の投与はこれらの症状を有意に改善した。一方、RAW264.7細胞におけるLPS刺激は、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6およびiNOS発現を著明に増大させた。柴苓湯の併用処置は、LPS刺激によるIL-1 β 、IL-6およびiNOS発現の増大を濃度依存的に抑制したが、TNF- α 発現の増大に対しては何ら影響を及ぼさなかった。

【結論】柴苓湯は5-FU起因性腸炎に対して抑制効果を発揮するが、5-FUの腫瘍細胞増殖抑制作用に対しては影響を与えないことが判明した。柴苓湯の5-FU起因性腸炎に対する抑制効果には、少なくとも一部、腸管マクロファージからのサイトカイン発現抑制が関与している可能性が推察される。したがって、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) は臨床において頻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。

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。我々は初年度 (平成24年度) の本研究助成において、5-FUにより誘起される腸炎に対して抗炎症および大腸炎改善効果などが報告されている柴苓湯[4, 5]および腸運動改善効果などが報告されている大建中湯[6, 7]の効果について検討し、いずれも有意な腸炎抑制効果を有することを見出したが、その効果は特に柴苓湯でより顕著であった。我々は以前、5-FU誘起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サイトカイン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報告している[8]。実際、我々は初年度の研究において、5-FU初回投与24時間後の腸腺窩においてcaspase-3の活性化を伴う顕著なアポトーシスを誘導し、その現象が柴苓湯の前投与により有意に抑制することを観察した。

そこで本年度の継続研究では、抑制効果が顕著であった柴苓湯について、5-FU誘起腸炎の対する効果の機序を明らかにするため、サイトカイン発現に対する効果を中心にin vivoおよびin vitro条件下で検討した。また、5-FUの抗がん作用に及ぼす柴苓湯の影響についても併せて検討を行った。

実験材料および方法

使用動物および細胞

in vivo動物実験には雄性C57BL/6マウス (20~24 g, SLC) を使用した。また、in vitro細胞実験には、マウスの単球・マクロファージ系細胞株であるRAW264.7細胞を用いた。RAW264.7細胞は10%FBS含有D-MEM培地で培養した。

5-FU投与によるサイトカイン発現

マウスに5-FU (50 mg/kg) を腹腔内投与し、24時間後に小腸を摘出した。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)、IL-1 β (Primer set ID: MA025936) および β アクチン (Primer set ID: MA050368) 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 PCR system (ABI) により行った。柴苓湯 (1000 mg/kg) は5-FU投与30分および8時間後に経口投与した。

Colon 38担がんマウスの作製

ペンタバルビタール麻酔下にマウス結腸腫瘍細胞Colon_38の約5 mm角の細胞片をマウスの腹部皮下へ移植針を用いて移植し、経日的に腫瘍体積を移植後21日目まで観察した。腫瘍体積は次式を用いて算出した。 $V = L \times W^2$ [V: 腫瘍体積 (mm³)、L: 長さ (mm)、W: 幅 (mm)]。移植後7日目から5-FU (20 mg/kg) を1日1回6日間腹腔内投与し、また柴苓湯 (1000 mg/kg) は1日2回14日間経口投与した。

RAW264.7細胞におけるLPS刺激サイトカイン発現

RAW264.7細胞を10⁶ cells/wellで12ウェル・マイクロプレートに播種し、24時間後にLPS (100 ng/mL) を添加し、6時間後にSepasol RNA I (ナカライ) を用いて全RNAを抽出した。各種サイトカインmRNA発現は先述の方法によりリアルタイムRT-PCRにより測定した。特異的プライマーは、マウスTNF- α (Primer set ID: MA097070)、IL-1 β (Primer set ID: MA025936)、iNOS (Primer set ID: MA029558)、IL-6 (Primer set ID: MA039013) および β アクチン (Primer set ID: MA050368) を用いた。また、細胞生存率はトリパンブルー染色により測定した。柴苓湯 (0.1~3 mg/mL) はLPSと同時に添加した。

実験結果および考察

我々は初年度の検討において、5-FUの連続投与による下痢および体重減少、ならびに6日目における小腸絨毛丈の短縮および腸腺窩の破壊に特徴付けられる腸炎の発生を柴苓湯が有意に抑制することを明らかにした。また、5-FU初回投与24時間後には腸腺窩にcaspase-3の活性化を伴うアポトーシスの誘導を観察したが、これらもまた柴苓湯の投与により有意に抑制された。我々は以前の検討で、5-FU投与による腸腺窩のアポトーシス誘導には、TNF- α やIL-1 β などのサイトカインによるcaspase-8の活性化が関与していることを報告した[8, 9]。そこでまず、5-FU投与によるサイトカイン発現に対する柴苓湯の効果について検討した。5-FU初回投与24時間後にTNF- α およびIL-1 β mRNA発現の著明な増大を観察したが、これらのサイトカイン発現の増大は柴苓湯の投与により有意に抑制された (図1)。これらの結果から、柴苓湯の腸炎ならびに腸腺窩のアポトーシス誘導抑制効果は、これらサイトカイン発現の抑制によるアポトーシス誘導の阻害が関与しているものと推察される。

柴苓湯が5-FU誘起腸炎を抑制することは興味深い、5-FUの抗がん効果、すなわち腫瘍増殖抑制効果に影響を及ぼす可能性が懸念される。そこで、マウス結腸腫瘍細胞colon 38を皮下移植することにより作製した担がんマウスを用いて、5-FUの腫瘍増殖抑制効果に対する柴苓湯の影響を検討した。腫瘍移植後、経日的に腫瘍体積の増大を観察されたが、その増大は5-FU (20 mg/kg) を移植後7日目から6日間連続投与することで著明に抑制された (図2)。柴苓湯 (1000 mg/kg) の連続投与は、5-FUによる腫瘍増殖抑制効果には何ら影響を与えなかった。これらの結果から、柴苓湯は5-FUの腫瘍増殖抑制効果に影響を及ぼすことなく、腸炎を改善することが判明した。

柴苓湯のサイトカイン発現抑制機序を明らかにする目的で、マウス単球・マクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞においてLPS刺激サイトカイン発現に対する効果を検討した。LPS刺激6時間後には、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6およびiNOS mRNA発現を著明に増大させた (図3)。柴苓湯の併用添加は、LPS刺激によるIL-1 β 、IL-6およびiNOS発現の増大を濃度依存的に抑制したが、興味深いことにTNF- α 発現の増大に対しては何ら影響を及ぼさなかった。柴苓湯の添加はいずれの濃度においても細胞生存率には影響を与えなかった。LPS刺激による各種サイトカイン発現は、NF- κ B経路の活性化が最もよく知られているが、その代表的サイトカインの1つであるTNF- α に対して柴苓湯が影響を与えなかったことから、柴苓湯の作用にはその他の経路が関与している可能性が推察される。最近、予試験において、柴苓湯がLPSによるSTAT1のリン酸化を抑制することを観察したことから、STAT経路の関与についてさらに検討する必要がある。一方、in vivo動物実験レベルの検討では、柴苓湯は5-FU投与によるIL-1 β のみならずTNF- α 発現の増大も有意に抑制したことから、in vitro細胞レベルでの検討結果と矛盾している。今後、TNF- α に対する効果がin vivoとin vitroで異なっている原因も含めて、柴苓湯のサイトカイン発現抑制効果の分子メカニズムの解明を行っていく予定である。

結論

柴苓湯は5-FUの抗腫瘍作用に影響を及ぼすことなく、腸炎の発生を抑制することが判明した。その効果は5-FUの投与によるTNF- α およびIL-1 β 発現の増大を抑制することで、アポトーシス誘導を抑制したことに起因しているものと推察される。柴苓湯のアポトーシス誘導抑制効果は、マクロファージレベルでのサイトカイン発現抑制作用が一部関与している可能性が推察される。ゆえに、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。

参考文献

1. Benson AB, 3rd, Ajani JA, Catalano RB, Engelking C, Kornblau SM, Martenson JA, Jr., et al. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2004;22:2918-26.
2. Wadler S, Benson AB, 3rd, Engelking C, Catalano R, Field M, Kornblau SM, et al. Recommended guidelines for the treatment of chemotherapy-induced diarrhea. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1998;16:3169-78.

3. Symonds RP. Treatment-induced mucositis: an old problem with new remedies. *British journal of cancer*. 1998;77:1689-95.
4. Kishida Y, Miki H, Nishii T, Inoue T, Nishida S, Yoshikawa H, et al. 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*. 2007;14:581-6.
5. Watanabe T, Yamamoto T, Yoshida M, Fujiwara K, Kageyama-Yahara N, Kuramoto H, et al. 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*. 2010;151:98-106.
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*. 2012;57:2571-9.
7. Kono T, Kaneko A, Hira Y, Suzuki T, Chisato N, Ohtake N, et al. Anti-colitis and -adhesion effects of daikenchuto via endogenous adrenomedullin enhancement in Crohn's disease mouse model. *Journal of Crohn's & colitis*. 2010;4:161-70.
8. Yasuda M, Kato S, Yamanaka N, Iimori M, Utsumi D, Kitahara Y, et al. 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*. 2012;302:G1133-42.
9. Yasuda M, Kato S, Yamanaka N, Iimori M, Matsumoto K, Utsumi D, et al. 5-HT(3) receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells. *British journal of pharmacology*. 2013;168:1388-400.

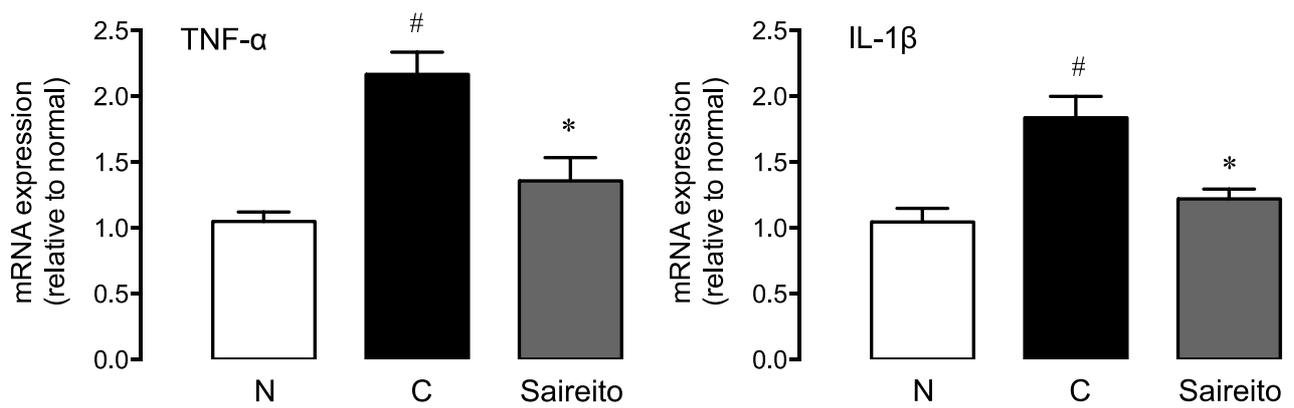


図1. 5-FU投与によるサイトカイン発現に対する柴苓湯の効果
 N: 正常群 (5-FUなし)、C: 対照群 (5-FUあり)、Saireito (柴苓湯 1000 mg/kg)

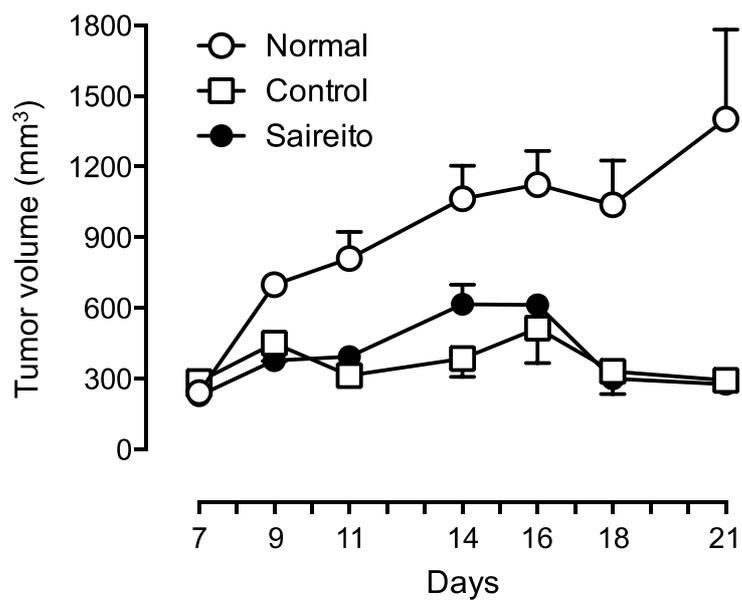


図2. 5-FU連続投与による抗腫瘍作用に対する柴苓湯の影響
 N: 正常群 (5-FUなし)、C: 対照群 (5-FUあり)、Saireito (柴苓湯 1000 mg/kg)

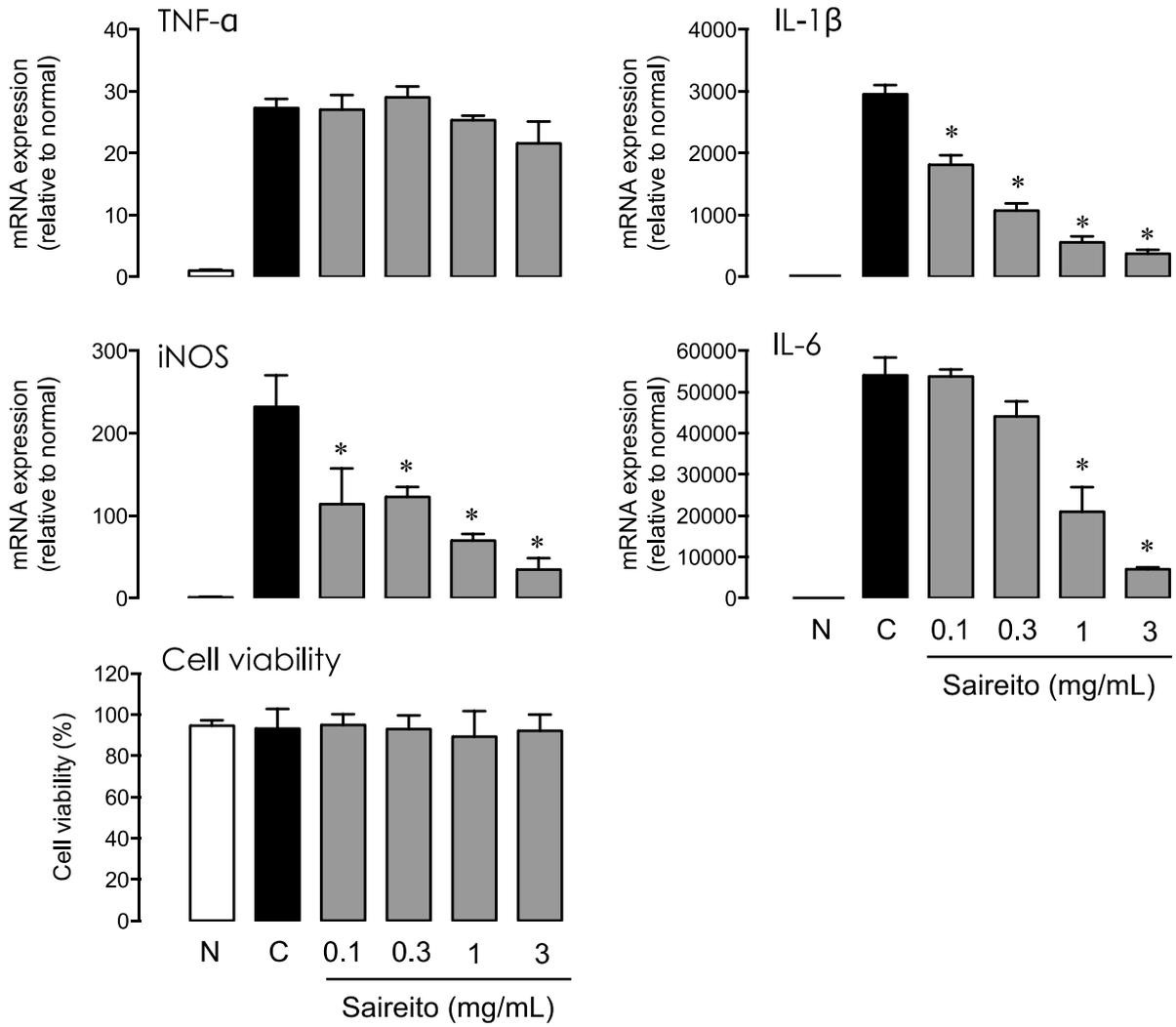


図3. RAW264.7細胞におけるLPS刺激サイトカイン発現に対する柴苓湯の効果
 N: 正常群 (LPSなし)、C: 対照群 (LPSあり)、Saireito (0.1~3 mg/mL)