

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：がん患者のせん妄発症を予防する抑肝散、および口腔粘膜炎の早期治癒に資する半夏瀉心湯のメタボローム解析によるレスポンドーバイオマーカーの開発ならびに「証」の可視化とその臨床応用

Development of responder markers through metabolomic analysis of Yokukansan, which prevents the onset of delirium in cancer patients, and Hankashashinto, which contributes to early healing of oral mucositis, as well as visualization of pathophysiological status, so called "Sho", and its clinical application

研究開発実施期間：令和3年5月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：上園 保仁
Yasuhito Uezono

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
学校法人慈恵大学 東京慈恵会医科大学 疼痛制御研究講座 特任教授
Department of Pain Control Research, The Jikei University School of Medicine, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の目的および意義

本邦では、超高齢化に伴い術後せん妄患者数は増加の一途をたどっており、また、せん妄対処に費やされる「医療費」およびせん妄に伴う「入院期間」は増加していることから、せん妄予防は医療経済の改善に貢献しうる。またせん妄は認知機能の低下ももたらすことから、せん妄予防は認知機能低下の予防を通して健全な超高齢社会の継続に貢献する。

申請者らは、術後せん妄の予測バイオマーカーを同定する AMED 研究において、過活動型せん妄を 96%の確率で予測できるバイオマーカーを開発し特許申請を行った（革新的がん医療実用化研究事業「外科的がん切除後のデクスメデトミジンによる鎮静に不応な重症せん妄発症を予測するバイオマーカーの開発」H30-R2 年度、特願 2021-008936）。また層別解析により、抑肝散は高齢者の重症せん妄の発症を減少させることを明らかにした（Sadahiro R, et al. Jpn J Clin Oncol. 2022, 52 (11): 1276-1281）。そこで今回、せん妄発症の予防に貢献する抑肝散の奏効性について、抑肝散奏効レスポンドーマーカーを血液メタボローム解析技術を用いて同定し、患者にとって最適な抑肝散使用処方を開発する。抑肝散の効果的な使用に有効なバイオマーカーを抑肝散の「証」の可視化として利活用することで、点滴の自己抜去、看護師への暴力行為等のせん妄予防法の開発につなげる。

また、がん患者は高い確率（40～60%）で口腔粘膜炎を生じる。その重症化によりがん治療を中止することもあり、予防および治療は重要である。半夏瀉心湯は抗がん剤に起因する口腔粘膜炎への奏効性（治癒期間が 10.5 日から 5.5 日へ減少）は示されるも、放射線治療による効果は確立されていない。特に頭頸部がん患者では両治療の併用も多く見られる。そこで、「がん口腔支持医療における半夏瀉心湯の有用性を明らかにするための基礎及び臨床研究」にて臨床試験を実施し、付随試験として血液サンプルのメタボローム解析により半夏瀉心湯が奏効する「証」の可視化を行う（前向き試験）。加えて国立がん研究センター中央病院において口腔粘膜炎を発症し半夏瀉心湯を処方されたがん患者のバイオバンクに保存された試料を用いて、半夏瀉心湯の有効性を検証できるバイオマーカーの同定を目的としてメタボローム解析を行う（後ろ向き試験）。さらに、同定されたレスポンドマーカの生物学的意義を動物実験により検証する実験を計画した。

本研究開発により得られた成果

1) 抑肝散に関する研究

- ・抑肝散を用いた臨床データ二次解析ならびに血液サンプルを用いたメタボローム解析

抑肝散の有効性を示す臨床的特徴を明らかにするため、抑肝散臨床試験で得られた情報（149 名）について株式会社ツムラよりそれらの提供を受け、二次解析を生物統計家と共同して行った。抑肝散は 75 歳以上の高齢者において、過活動症状を伴うせん妄を予防することを見出した（Figure 1）（Sadahiro R, et al. Jpn J Clin Oncol. 2022, 52 (11): 1276-1281.）。

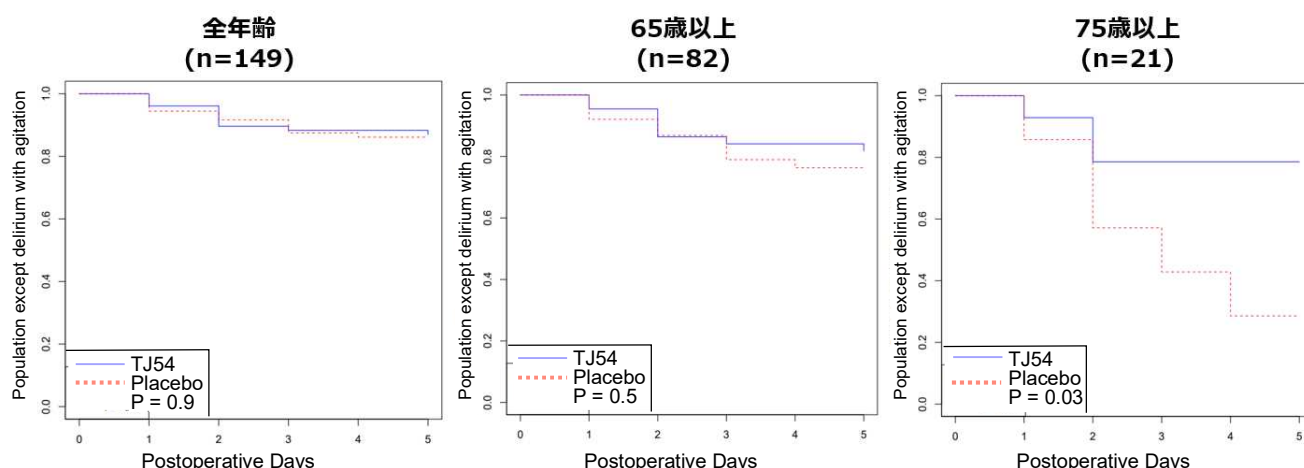


Figure 1: 抑肝散の年齢別によるせん妄抑制効果の違い ——— : TJ-54 抑肝散 : プラセボ

また、血液サンプルを用いたメタボローム解析および分析を行い、199 の代謝物（アミノ酸、有機酸、脂肪酸、脂質メディエーターおよびリン脂質）および 20 の抑肝散由来成分/代謝物（推定を含む）を検出した。さらに、65 歳以上の研究対象者を対象とし手術日の血漿メタボロームデータから術後せん妄の発症に関わる血漿中代謝物の探索を行い、加えて抑肝散の有効性が認められた 75 歳以上の研究対象者を対象とし、抑肝散服用に伴って変動する血漿中代謝物の探索、すなわちレスポンドマーカの検索を行った。その結果、抑肝散服用群とプラセボ服用群との比較で、有意差のある 13 代謝物 ($p<0.05$) を同定できた。

次いで、抑肝散の奏効性に関連する血漿中代謝物の探索のため、75 歳以上、抑肝散服用群を対象とし、術後せん妄発症の有無を指標とした群間比較を行い、抑肝散の奏効性に関与する血漿中代謝物（レスポンドマーカ）の探索を行った。その結果、抑肝散の奏効性を示すと考えられる 9 代謝物 ($p<0.05$) を見出すことができた。また、その中のいくつかは腸内細菌により生成され血中へ移行する代謝物であることを見出し、抑肝散の奏効性を

発揮できる環境では、腸内環境、特に腸内細菌を取り巻く環境も関連する可能性が示唆された。

・抑肝散に関する動物実験

抑肝散の有効性が75歳以上の患者集団で示されたことから、モデルとして老化マウスを用いた実験を行った。老齢のマウス（～23ヵ月齢）に対して抑肝散エキス（2g/kg）を5日間経口投与し、最終投与翌日に血漿及び全脳をサンプリングしメタボローム測定を行い、投与-非投与群の比較を行ったところ、有意な差を認める6代謝物を見出した。マウスでの脳内代謝物の変化は特に実臨床における患者の中枢での作用を推定する有益な手がかりとなることが期待された。若齢マウスを用いた同様の実験では、抑肝散投与の有無で有意差のある代謝物は得られておらず、臨床試験での結果と同様、抑肝散に対しては老齢マウスが特異的に反応を示している可能性があると考えられた。

2) 半夏瀉心湯に関する研究

・半夏瀉心湯服用者の臨床データ分析およびバイオバンク血液を用いたメタボローム解析・分析

平成29年2月1日から令和2年9月30までに国立がん研究センター中央病院にて、上咽頭、中咽頭、口腔がんの放射線治療を行い、かつ放射線治療開始前にバイオバンク血清サンプルが保存されている患者で、半夏瀉心湯の処方無し（コントロール）群を19名、半夏瀉心湯処方群50名を抽出できた。この2群において、有害事象共通用語基準CTCAE v3.0（Gr.0-4で評価し、Gr.の値が大きくなる程重症度が上がる）を用いて口腔粘膜炎の評価を行ったところ、コントロール群では治療開始後3週間程でGr.2に至るのに対し、半夏瀉心湯群は治療開始後から5週目程でGr.2に至ること、つまり、半夏瀉心湯はGr.2発症に至るまでの期間を延長することが明らかとなった。

それらの患者のがん放射線療法前に採血した診療余剰血液検体（control群：19検体、半夏瀉心湯群：50検体）を用いて、88種の水溶性アミノ酸を測定したところ、半夏瀉心湯群において高値を示すアミノ酸を同定した。

次に、半夏瀉心湯服用群において奏効群（治療開始からGr.2までに5週以上かかった群）と無効群（治療開始から3週以下で早期にGr.2に至った群）で比較解析を行ったところ、奏効群で明らかに差のある代謝物が認められた。現在、口腔粘膜炎症状と代謝物との関連を解析中である。

・臨床試験付随研究サンプルを用いたメタボローム解析・分析

頭頸部がん患者を対象とした放射線療法／化学療法併用療法で発症した口腔粘膜炎に対する半夏瀉心湯の有効性を検討する前向き二重盲検無作為化比較第Ⅱ相臨床試験を開始し、現在30例を登録しさらに登録を継続している（70例予定）。臨床試験完遂後に付随研究である血漿のメタボローム測定およびデータ分析を行う予定である。

・半夏瀉心湯の奏効性を示すレスポンドーマーカーを検証するための動物実験

口腔粘膜炎モデルを確立させた。同モデルを用いて、半夏瀉心湯を投与したところ、半夏瀉心湯群では、投与後11日目で口腔粘膜炎の治癒が促進された。

次に、半夏瀉心湯投与における治療奏効群と無効群の群間を比較したところ、半夏瀉心湯奏効群においては炎症性マーカーであるCOX-2およびIL-1 β mRNAの発現上昇が無効群と比較し上昇が見られず、またある種のアミノ酸が無効群では低値となるものの、奏効群では低下が見られないこともわかった。今後は実験結果と実臨床サンプルを用いた結果の統合を行っていく。

研究開発結果のサマリー

抑肝散試験において、抑肝散は75歳以上の高齢者において過活動症状を伴うせん妄を予防することを見出し、*Jpn J Clin Oncol* (2022, 52: 1276) にて報告した。また、抑肝散が奏効する患者レスポンドーマーカーとして9種を見出した。

また、半夏瀉心湯試験においては、臨床データ解析から半夏瀉心湯処方群は口腔粘膜炎が悪化(Gr.2)する期間を延長すること、バイオバンク血液メタボローム解析において半夏瀉心湯処方群で奏効例のみに変化するアミノ酸2種を見出した。加えて動物実験において、半夏瀉心湯が奏効する例で特異的に変化するアミノ酸を見出した。今後は半夏瀉心湯の二重盲検臨床試験の完遂をめざすとともに、付随研究として行うメタボローム解析を終了させ、現時点でバイオバンクサンプルおよび動物実験で得られているバイオマーカーと比較解析を進め、半夏瀉心湯においても「証」の可視化をめざす。

Purpose and significance of research and development

In Japan, the number of patients with postoperative delirium continues to increase due to the super-aging population. Since delirium also causes a decline in cognitive function, prevention of delirium contributes to the continuation of a healthy super-aging society by preventing impaired cognitive function.

In the AMED study to identify predictive biomarkers for postoperative delirium, the applicants developed a biomarker that can predict hyperactive delirium with a 96% probability and filed a patent application. Project “Development of a biomarker to predict the onset of severe delirium refractory to dexmedetomidine sedation after surgical cancer resection” (2018-2020, patent application 2021-008936). Furthermore, stratified analysis revealed that a kampo medicine yokukansan reduced the incidence of severe delirium in the elderly (Sadahiro R, et al. *Jpn J Clin Oncol.* 2022, 52 (11): 1276-1281). We therefore attempted to use blood metabolome analysis technology to identify responder markers for yokukansan that contribute to the prevention of delirium, and develop the optimal prescription methods for yokukansan for patients. Utilizing biomarkers that are effective for use of yokukansan as visualization of the individual status of pathophysiology, so-called "Sho", yokukansan will lead to the development of optimal methods to prevent delirium.

Additionally, cancer patients have a high probability (40-60%) of developing oral mucositis. Although hangeshashinto has been shown to be effective against oral mucositis caused by anticancer drugs, the effectiveness of radiation therapy has not been established. We therefore conducted a clinical trial in "Clinical research to clarify the usefulness of hangeshashinto in cancer oral supportive care", along with metabolome analysis of blood samples to show the effectiveness of hangeshashinto to visualize "Sho". Metabolome analysis will be performed to identify responder markers with retrospective and prospective studies. Furthermore, we planned an experiment to verify the biological significance of the identified responder markers using animal experiments.

Results obtained through this research and development

1) Research on yokukansan

- Secondary analysis of clinical data using yokukansan and metabolome analysis using blood samples

Yokukansan prevented delirium with hyperactive symptoms in elderly people aged 75 years and older (Figure 1) (Sadahiro R, et al. *Jpn J Clin Oncol.* 2022, 52 (11): 1276-1281).

We also performed metabolome analysis using blood samples and detected 199 metabolites, and 20 yokukansan-derived components/metabolites. We further conducted a search for metabolites in plasma that fluctuate with the use of yokukansan, that is, a search for responder markers. As a result, we were able to identify 13 metabolites with significant differences ($p < 0.05$) between the yokukansan group and the placebo group.

We next conducted a group comparison using the presence or absence of postoperative delirium as an index for people aged 75 years or older and those taking yokukansan. We searched for plasma metabolites (responder markers) that are involved in the effectiveness of yokukansan. As a result, we found 9 metabolites ($p < 0.05$) that are thought to show the effectiveness of yokukansan. In addition, we discovered that some of these metabolites are produced by intestinal bacteria and transferred to the blood, and in an environment where yokukansan can be effective.

- Animal experiments regarding yokukansan

Since the effectiveness of yokukansan was demonstrated in elderly patient populations, we conducted an experiment using aged mice as a model. Yokukansan extract (2g/kg) was orally administered to aged mice for 5 days, and then, plasma and whole brain samples were applied for metabolome analyses. We found several numbers of metabolites that showed

significant differences both in blood and brain samples. Changes in brain metabolites in mice were expected to provide useful clues for estimating central effects in patients. In similar experiments using young mice, no significant differences in metabolites were obtained between the presence and absence of yokukansan administration.

2) Research on hangeshashinto

- Clinical data analysis of patients proscribing hangeshashinto and metabolome analysis using the Biobank blood

Radiation therapy for nasopharynx, oropharynx, and oral cavity cancer was performed at the National Cancer Center Hospital, and blood samples stored in the Biobank before the start of radiation therapy were used. Of the patients' samples saved at the Biobank, we were able to extract 19 patients from the control group who were not prescribed hangeshashinto and 50 patients who were prescribed hangeshashinto. In these two groups, oral mucositis was evaluated using the Common Terminology Criteria for Adverse Events CTCAE v3.0 (Gr. 0-4; 4 worst). In the control group, Gr. 2 was reached about 3 weeks after the start of treatment, whereas in the hangeshashinto group, Gr. 2 was reached about 5 weeks after the start of treatment, indicating that hangeshashinto was found to prolong the onset of symptoms.

When we measured 88 types of water-soluble amino acids using blood samples (control group: 19, hangeshashinto group: 50), we identified some amino acids were high levels in hangeshashinto group.

Next, in the group taking hangeshashinto in the responder group and the non-responder group to hangeshashinto, we found clear differences in metabolites.

- Metabolome analysis using samples associated with a prospective clinical trial

We have started a prospective, double-blind, randomized, comparative phase II clinical trial to evaluate the effectiveness of hangeshashinto for oral mucositis developed by combined radiation therapy/chemotherapy in head and neck cancer patients. Currently, 30 cases have been registered and further registration is continuing (70 cases planned). After the completion of the clinical trial, we plan to conduct plasma metabolome analysis.

- Animal experiments

An oral mucositis model was established. Using the model, administration of hangeshashinto promoted healing of oral mucositis.

We next compared metabolites between high responder and non-responder group after administration of hangeshashinto, and found that the expression of inflammatory markers increased in the non-responder group. It was also found that although the levels of certain amino acids were low in non-responder group, no decrease was observed in the responder group as in the control group.

Summary of research and development results

In the yokukansan trial, yokukansan prevented delirium accompanied by hyperactive symptoms in elderly people aged 75 years or older. In addition, nine types of patient responder markers were found for which yokukansan was effective.

In the hangeshashinto trial, retrospective clinical data analysis showed that the onset of oral mucositis was prolonged by hangeshashinto. With blood samples in the Biobank with hangeshashinto prescription group, we found some of amino acids changed only in the high-responder group. Further, in animal experiments, we discovered that several amino acids were also specifically changed in cases where hangeshashinto was effective. In the future, we aim to complete the double-blind clinical trial of hangeshashinto, and also complete metabolome analysis from blood samples in the prospective clinical study. We will proceed the comparative analysis with the biomarkers currently obtained from the Biobank samples and animal experiments. We aim to visualize "Sho" in hangeshashinto as well as yokukansan.