

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12585

研究課題名(和文) パフォーマンスステータス改善のための栄養・物理療法を併用した画期的補助療法の開発

研究課題名(英文) Development of an adjuvant therapy with combination of nutrition and physical modalities for improvement of performance status in cancer cachexia

研究代表者

山田 崇史 (Yamada, Takashi)

札幌医科大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：50583176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グルタミン(GLN)投与及び電気刺激(ES)の併用が、Colon-26(C-26)癌性筋萎縮を防止するかを、グルココルチコイド系の下流因子であるグルタミン合成酵素(GS)の発現に着目して検討した。C-26群では、腓腹筋の重量が減少するとともにGSの発現量が増大した。一方、ES、GLNおよびその併用は、C-26誘因性の腓腹筋の萎縮、GSの発現量の増加を防止しなかった。これらの知見から、本研究で用いた条件では、ES、GLN投与及びそれらの併用のいずれによっても、癌性筋萎縮およびグルココルチコイドシグナリングの活性化は防止されないことが示された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate whether the combination of glutamine (GLN) administration and neuromuscular electrical stimulation (ES) prevents cancer-induced muscle atrophy with a special focus on the role of glutamine synthetase (GS), a downstream regulator of glucocorticoid signaling. ES was performed to the left gastrocnemius (Gas) muscles every other day starting one day after injection of C-26. After 28 days of C-26 injection, the weight of Gas muscle were decreased in C-26 group. This change was accompanied by a marked increase in the expression of GS. Neither GLN administration, nor ES training, nor combination of these prevented the loss of muscle weight and increased expression levels of GS in C-26 Gas muscles. These data suggest that the combination of nutrition and physical modalities used in the present study could not prevent muscle atrophy and the activation of glucocorticoid signaling in cachectic muscles of C-26 mice.

研究分野：筋機能制御学

キーワード：癌性カヘキシア 筋萎縮 グルタミン 神経筋電気刺激 グルココルチコイド グルタミン合成酵素

1. 研究開始当初の背景

カヘキシアは、骨格筋量の低下を主体とした体重減少を特徴とする全身性の衰弱状態である。末期の癌患者において、カヘキシアは高い頻度 (>50%) で認められ、生命予後不良と密接に関連することが疫学的に示されている (Tisdale, Nat Rev Cancer, 2002)。カヘキシアでは、主要な筋タンパクであるミオシン分子の分解が、グルタミン合成酵素の活性化を伴い、その結果、筋からグルタミンが放出される。これは、カヘキシアによるストレス状態に対し、免疫細胞、消化管、肝臓などにおけるグルタミン需要量が増加するために生じると考えられている。一方、興味深いことに、担癌ラットに対するグルタミンの投与が、腫瘍のタンパク合成を促進することなく、筋タンパク分解を抑制することが報告されている (Austgen, Ann Surg, 1992)。また、トレーニングは、カヘキシアのメディエーターである、グルココルチコイドにより誘引される筋萎縮を防ぐとともに、グルタミン合成酵素の活性化を抑制することが示されている (Falduto, Am J Physiol, 1992)。これらの知見から、癌性カヘキシアに伴う筋量・筋力の低下に対し、グルタミン代謝に着目した栄養・運動の併用が効果的であると考えられるが、これまで十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、大腸癌マウスにおいて、「グルタミン投与と神経-筋電気刺激を用いたトレーニングの併用が、グルタミン合成酵素の活性化を効果的に抑制することで、癌性カヘキシアに伴う筋量・筋力の低下を防止する」と仮説を立て、以下の課題に取り組んだ。

課題 1: 癌性カヘキシア誘因性の筋量・筋力低下におけるグルタミン代謝の役割

大腸癌 (colon-26, C-26) マウスを用い、カヘキシアに伴う筋量・筋力低下のメカニズムをグルタミン合成酵素の役割に着目して検討するとともに、グルタミン投与の効果を検証した。

課題 2: 癌性カヘキシアに対するグルタミン投与と神経-筋電気刺激 (NMES) の併用効果の検討

C-26 モデルマウスにおいて、グルタミン投与及び NMES の併用効果を検証するとともに、その分子メカニズムについて、グルタミン合成酵素とタンパク分解系の関連性に着目し検討した。

3. 研究の方法

課題 1.

(1) 倫理的配慮

実験動物の生命を尊重し、最小限の動物数を使用した。また、麻酔 (イソフルラン 2%, 2 L/min) により実験中の除痛を行うとともに、

実験終了後には苦痛の遮断として、頸椎脱臼により、安楽死処置を行った。本研究は、札幌医科大学動物実験委員会の承認を受け、実施した (承認番号: 15-044)。

(2) 実験動物及びプロトコール

5 週齢の雄性マウス (コンジェニック系: CD2F1) を対照群及び癌性カヘキシア群に分け、さらにそれらをグルタミン投与群とグルタミン非投与群に分けた (各群 10 匹)。癌性カヘキシア群には、5 x 10⁶ 個のマウス大腸癌細胞株 (Colon-26, C-26) を接種する。また、グルタミン投与群には、生理食塩水に溶解した 3% L-glutamine 溶液 (500 mg/kg) を、グルタミン非投与群には等量の生理食塩水を毎日投与した。本研究課題では、C-26 接種 4 週後に長趾伸筋、前脛骨筋、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋を採取し実験に供した。

(3) ウェスタンブロッティング

採取した筋をホモジナイザーにて 40 倍のトリス溶液 (10 mM Tris Maleate, 35 mM NaF, 1 mM NaVO₄, 1% Triton X 100, 1 tablet of Protease Inhibitor/50 ml) 内で均質化した。タンパク質濃度の定量化は、Bradford 法により行った。全筋タンパク質を、ゲル (4-20% Mini-PROTEAN TGX Precast Gel, BIO-RAD 社製) に、1 レーンあたり 20 µg ずつのせ、150 V で 55 分間通電した。その後、セル (Mini PROTEAN Cell, BIO-RAD 社製) を用い、100 V で 180 分間通電し、タンパク質をゲルからメンブレン上に転写した。メンブレンは、3% (w/v) スキムミルクを含む洗浄液 (40.3 mM Tris-HCl, 9.7 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0.02% Tween 20) 中にて 1 時間ブロッキングした後、1 次抗体 (anti-GS 抗体: 20,000 倍希釈, Gene Tex 社製; anti-total troponin (TnI) 抗体: 3,000 倍希釈, Millipore 社製; anti-fast type troponin (fTn) T 抗体: 1000 倍希釈, Sigma 社製; anti-GAPDH 抗体: 2000 倍希釈, Wako 社製) と 4 に保った冷蔵庫内で一晚反応させた。洗浄液で 10 分間ずつ 3 回洗浄後、10,000 倍に希釈した 2 次抗体 (Goat anti-mouse 及び Goat anti-rabbit 抗体, BIO-RAD 社製) と室温で 1 時間反応させ、さらに洗浄を行った。GS, TnI, fTnT, GAPDH の可視化には化学発光試薬 (Immobilon, Millipore 社製) を用い、化学発光検出装置 (ChemiDoc MP, BIO-RAD 社製) によりバンドの検出及び定量を行った。MyHC 及び各レーンの総タンパク質量の可視化には MemCode 染色 (Thermo 社製) を用い、同様に化学発光検出装置により定量化した。なお、GS の発現量は、GAPDH の発現量に対する相対値、MyHC, TnI, fTnT の発現量は各レーンに含まれる総タンパク質量に対する相対値にて表した。

(4) 筋原線維タンパク質濃度

先行研究に準じ、ホモジナイズした筋を 4 , 14,000 g にて 15 分間遠心分離後、上清

を捨て、ペレットを high-salt buffer(300 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 10 mM Na₄P₂O₇, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 1 tablet of protease inhibitor cocktail (Roche) per 50 ml, pH 6.5) で再懸濁した。その後、Bradford 法を用い、タンパク質濃度を測定した。

(5) 統計学的解析

各データは、平均±標準誤差で示した。CNT マウスと C-26 マウスの比較には対応のない t 検定を、各群間の比較には Tukey-Kramer の方法で Post-hoc テストを行った。なお、有意水準は 5% とした。

課題 2.

(1) 倫理的配慮

本研究は、札幌医科大学動物実験委員会の承認を受け、実施した(承認番号: 15-044)。

(2) 実験動物及びプロトコール

CD2F1 雄性マウスを以下の 8 群に分けた; CNT, CNT+ES, CNT+GLN, CNT+ES+GLN, C-26, C-26+ES, C-26+GLN, C-26+ES+GLN。また、ES は左下腿三頭筋に対し、最大底屈トルクの 60% の負荷を、2 秒刺激/4 秒休息で 1 日 3 セット、1 日おきに負荷した。一方、GLN は、毎日 1 g/kg ずつ投与した。

(3) ウェスタンブロッティング

課題 1 に準じ行った。

(4) 筋原線維タンパク質濃度

課題 1 に準じ行った。

(5) 統計学的解析

課題 1 に準じ行った。

4. 研究成果

以下に、研究課題ごとの研究成果の要旨を記載する。

課題 1.

C-26 播種 4 週間後において、腫瘍の重量は、C-26 群と C-26+GLN 群の間で差異が認められなかった。したがって、GLN 投与は、癌細胞の増殖に影響を及ぼさないものと考えられる。一方、C-26 群及び C-26+GLN 群では、CNT 群に比べ、除癌体重が 20% 程度減少した。この体重の減少は、長趾伸筋、前脛骨筋、腓腹筋の重量の減少を伴っていた。さらに、CNT 群に対し、C-26+GLN 群において、ヒラメ筋の重量の低下が認められた。したがって、本研究の結果から、我々の予想に反して、GLN の投与は、癌性筋萎縮を防止しないことが明らかとなった。

課題 2.

C-26 群では、除癌体重及び腓腹筋の筋湿重量が約 20% 減少するとともに、活動量が低下した。ES は C-26 誘因性の腓腹筋の萎縮を防

止する傾向を示したが、統計学的な差はなかった。また、GLN の投与は、ES 併用の有無に関わらず、腓腹筋の萎縮を防止しなかった。したがって、本研究で用いた条件では、ES、GLN 投与及びそれらの併用のいずれによっても、癌性筋萎縮は防止されないことが示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 12 件)

1. 檜森弘一, 館林大介, 大山友加, 青木達彦, 山田崇史: 神経筋電気刺激誘引性の筋肥大における負荷強度と力積の役割. 日本基礎理学療法学雑誌, 印刷中 (Medical*Online にて公開予定)(査読有)
2. Kanzaki K, Watanabe D, Kuratani M, Yamada T, Matsunaga S, Wada M. Role of calpain in eccentric contraction-induced proteolysis of Ca²⁺-regulatory proteins and force depression in rat fast-twitch skeletal muscle. J. Appl. Physiol. 122: 396-405, 2017 (DOI: 10.1152/jappphysiol.00270.2016)(査読有)
3. Himori K, Abe M, Tatebayashi D, Lee J, Westerblad H, Lanner JT, Yamada T. Superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-134 prevents diaphragm muscle weakness in monocrotalin-induced pulmonary hypertension. PLoS One 12: e0169146, 2017 (DOI: 10.1371/journal.pone.0169146)(査読有)
4. Llano-Diez M, Sinclair J, Yamada T, Zong M, Fauconnier J, Zhang SJ, Katz A, Jardemark K, Westerblad H, Andersson DC, Lanner JT. The role of reactive oxygen species in α -adrenergic signaling in cardiomyocytes from mice with the metabolic syndrome. PLoS One 11: e0167090, 2016 (DOI: 10.1371/journal.pone.0167090)(査読有)
5. Yamada T and Lanner JT. Free radical signaling behind the muscle weakness associated with rheumatoid arthritis. EMJ Rheumatology 3.1: 87-89, 2016 (査読無)
6. Cheng AJ, Yamada T, Rassier DE, Andersson DC, Westerblad H, Lanner JT. ROS/RNS and contractile function in

skeletal muscle during fatigue and recovery. *J. Physiol.* 594: 5149-5160, 2016 (査読有)

7. 舘林大介, 檜森弘一, 阿部真佐美, 李宰植, 山田崇史: 神経-筋電気刺激療法が癌性カヘキシアに伴う筋量低下に及ぼす影響. *物理療法科学*, 23:35-43, 2016 (URL: <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cq2eleaf/2016/002300/006&name=0035-0043j&UserID=163.130.14.49>) (査読有)
8. 阿部真佐美, 李宰植, 舘林大介, 檜森弘一, 山田崇史: 熱刺激がモノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットの横隔膜における収縮機能に及ぼす影響. *日本基礎理学療法学雑誌*, 19: 55-64, 2016 (Medical*Onlineにて公開予定) (査読有)
9. 李宰植, 阿部真佐美, 舘林大介, 檜森弘一, 山田崇史: 熱刺激負荷がアジュバント関節炎ラットの長趾伸筋における収縮機能に及ぼす影響. *日本基礎理学療法学雑誌*, 19: 39-47, 2016 (Medical*Onlineにて公開予定) (査読有)
10. Lee J, Himori K, Tatebayashi D, Abe M, Yamada T. Response of heat shock protein 72 to repeated bouts of hyperthermia in rat skeletal muscle. *Physiol. Res.* 64: 935-938, 2015 (URL: http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/64/64_935.pdf) (査読有)
11. Yamada T, Abe M, Lee J, Tatebayashi D, Himori K, Kanzaki K, Wada M, Bruton JD, Westerblad H, Lanner JT. Muscle dysfunction associated with adjuvant induced-arthritis is prevented by antioxidant treatment. *Skeletal Muscle* 5: 20, 2015 (DOI: 10.1186/s13395-015-0045-7) (査読有)
12. Yamada T, Fedotovskaya O, Cheng AJ, Cornachione AS, Minozzo FC, Aulin C, Fridén C, Turesson C, Andersson DC, Glenmark B, Lundberg IE, Rassier DE, Westerblad H, Lanner JT. Nitrosative modifications of the Ca²⁺ release complex and actin underlie arthritis-induced muscle weakness. *Ann. Rheum. Dis.* 74: 1907-1914, 2015 (DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-205007) (査読有)

[学会発表](計 24 件)

1. 山田遼太郎, 檜森弘一, 舘林大介, 山田崇史. プレコンディショニングは伸張性収縮後の酸化ストレスを防止し機能回復を促進する. 2017年3月3-5日. 第5回骨格筋生物学研究会. 東京大学, 東京都文京区.
2. 檜森弘一, 舘林大介, 山田遼太郎, 山田崇史. 伸張性収縮トレーニングはアジュバント関節炎ラットの筋機能とオートファジー動態を改善する. 2017年3月3-5日. 第5回骨格筋生物学研究会. 東京大学, 東京都文京区.
3. 舘林大介, 檜森弘一, 山田遼太郎, 山田崇史. 伸張性収縮トレーニングが colon 26 癌モデルマウスの筋萎縮に及ぼす影響. 2017年3月3-5日. 第5回骨格筋生物学研究会. 東京大学, 東京都文京区.
4. 山田崇史, 山田遼太郎, 檜森弘一, 舘林大介, 升田好樹, 今井富裕. 神経-筋電気刺激トレーニングは重症疾患ミオパチーモデルラットにおける筋弱さを改善する. 2017年3月3-5日. 第5回骨格筋生物学研究会. 東京大学, 東京都文京区.
5. 舘林大介, 檜森弘一, 山田崇史. 神経-筋電気刺激及びグルタミン投与の併用が癌性筋萎縮に及ぼす影響. 2016年9月23-25日. 第71回日本体力医学会大会. いわて県民情報交流センター・盛岡地域交流センター市民文化ホール, 岩手県盛岡市.
6. 檜森弘一, 舘林大介, 大山友加, 青木達彦, 山田崇史. 神経-筋電気刺激による筋の限界肥大率は負荷強度に規定される. 2016年9月23-25日. 第71回日本体力医学会大会. いわて県民情報交流センター・盛岡地域交流センター市民文化ホール, 岩手県盛岡市.
7. Tatebayashi D, Himori K, Abe M, Lee J, Yamada T. Effects of electrical stimulation training on muscle atrophy and glucocorticoid signaling in colon 26 tumor bearing mice. 45th European Muscle Conference. Montpellier, France. September 2-6, 2016
8. Himori K, Abe M, Tatebayashi D, Lee J, Yamada T. Neuromuscular electrical stimulation prevents skeletal muscle dysfunction in adjuvant-induced

- arthritis rat. 45th European Muscle Conference. Montpellier, France. September 2-6, 2016
9. Yamada T, Himori K, Abe M, Tatebayashi D, Lee J, Westerblad H, Lanner JT. Pulmonary hypertension-induced diaphragm muscle weakness was prevented by treatment with antioxidant. 45th European Muscle Conference. Montpellier, France. September 2-6, 2016
 10. Tatebayashi D, Himori K, Abe M, Lee J, Yamada T. Effects of electrical stimulation training on muscle atrophy in a mouse model of cancer cachexia. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Sapporo, March 22-24, 2016.
 11. Himori K, Abe M, Tatebayashi D, Lee J, Yamada T. Antioxidant treatment prevents pulmonary hypertension-induced diaphragm dysfunction. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Sapporo, March 22-24, 2016.
 12. Aibara C, Watanabe D, Yamada T, Wada M. Contribution of calstabin1 binding to impaired ryanodine receptor with prolonged low-frequency force depression. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Sapporo, March 22-24, 2016.
 13. 舘林大介, 檜森弘一, 阿部真佐美, 李宰植, 山田崇史. 癌性カヘキシアに伴う筋量低下は神経-筋電気刺激により防止されるか? 2016年3月4-6日. 第4回骨格筋生物学研究会. 松本大学, 長野県松本市.
 14. 檜森弘一, 阿部真佐美, 舘林大介, 李宰植, 山田崇史. 肺高血圧症ラット横隔膜の収縮機能低下に対する抗酸化剤投与の効果. 2016年3月4-6日. 第4回骨格筋生物学研究会. 松本大学, 長野県松本市.
 15. 山田崇史. 神経-筋電気刺激トレーニングはアジュバント関節炎ラットにおける筋弱さを防止する. 2016年3月4-6日. 第4回骨格筋生物学研究会. 松本大学, 長野県松本市.
 16. 山田崇史, 大山友加, 青木達彦, 舘林大介, 檜森弘一. 神経 筋電気刺激トレーニング誘発性の筋肥大における力積の役割. 2015年11月14-15日. 第2回日本基礎理学療法学会学術大会および日本基礎理学療法学会第20回学術大会合同学会. 神奈川県立保健福祉大学, 神奈川県横須賀市.
 17. 檜森弘一, 舘林大介, 李宰植, 阿部真佐美, 山田崇史. P-1. アジュバント関節炎ラットの長趾伸筋における収縮機能の低下は神経 筋電気刺激により防止されるか? 酸化還元動態に着目して. 2015年10月24-25日. 第23回日本物理療法学会. 神戸学院大学有瀬キャンパス, 兵庫県明石市.
 18. 舘林大介, 檜森弘一, 阿部真佐美, 李宰植, 山田崇史. 神経-筋電気刺激が癌性カヘキシアに伴う筋量低下に及ぼす影響. 2015年10月24-25日. 第23回日本物理療法学会. 神戸学院大学有瀬キャンパス, 兵庫県明石市.
 19. 檜森弘一, 舘林大介, 李宰植, 阿部真佐美, 山田崇史. 神経 筋電気刺激がアジュバント関節炎ラットの長趾伸筋における収縮機能に及ぼす影響. 2015年9月18-20日. 第70回日本体力医学会大会. 和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国, 和歌山県和歌山市.
 20. 舘林大介, 檜森弘一, 阿部真佐美, 李宰植, 山田崇史. 癌性カヘキシアにおける骨格筋のグルタミン合成酵素の発現動態. 2015年9月18-20日. 第70回日本体力医学会大会. 和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国, 和歌山県和歌山市.
 21. 阿部真佐美, 李宰植, 舘林大介, 檜森弘一, 山田崇史. 抗酸化剤 EUK-134 は肺高血圧症ラットの横隔膜における収縮機能低下を抑制する. 2015年9月18-20日. 第70回日本体力医学会大会. 和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国, 和歌山県和歌山市.
 22. Yamada T, Abe M, Lee J, Tatebayashi D, Himori K, Kanzaki K, Wada M, Bruton JD, Westerblad H. and Lanner JT. Antioxidant treatment prevents skeletal muscle dysfunction in adjuvant-induced arthritis rats. 44th European Muscle Conference. Warsaw, Poland. September 21-25, 2015
 23. 山田崇史, 阿部真佐美, 李宰植, 舘林大介, 檜森弘一, 神崎圭太, 和田正信, Bruton JD, Westerblad H, Lanner JT. 抗酸化剤の投与はアジュバント関節炎ラットにおける筋機能低下を防止する.

2015年8月8日・第1回日本筋学会・国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター，東京都小平市。

24. 木村剛英，金子文成，山田崇史，岩本えりか，片寄正樹，齋藤重幸・大腿四頭筋への神経筋電気刺激が血清脳由来神経栄養因子濃度に及ぼす影響。2015年6月13日・第40回日本運動療法学会・埼玉県県民健康センター，埼玉県日高市。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 崇史(YAMADA, Takashi)

札幌医科大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：50583176