

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18880

研究課題名(和文) 抗がん剤誘発筋萎縮作用の多角的解析

研究課題名(英文) Analysis of anti-cancer drugs-induced muscle atrophy

研究代表者

酒井 寛泰 (Sakai, Hiroyasu)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00328923

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)：C2C12 筋芽細胞 および筋管細胞を用いて種々の抗がん薬処置によるMuRF1ならびにAtrogin-1の発現を比較検討したところ、シスプラチンは両者ともにMuRF1ならびにAtrogin-1の発現亢進作用がみられ、パクリタキセルにおいては、C2C12筋芽細胞において発現亢進が観察された。シスプラチンによるマウス筋萎縮時の大腿四頭筋におけるDNA microarrayにより、proteasome degradation 経路の発現亢進、横紋筋収縮経路因子の発現低下が引き起こされていた。また、シスプラチンによる筋萎縮、MuRF1およびAtrogin-1の発現亢進は運動負荷により抑制された。

研究成果の概要(英文)：We recently suggested that the administration of cisplatin could increase levels of MuRF1 and Atrogin-1, leading to muscle atrophy in the mouse. We therefore examined effects of various anti-cancer drugs on the gene expression of MuRF1 and Atrogin-1 in C2C12 cells. Cisplatin increased in MuRF1 and Atrogin-1 in both C2C12 myoblasts and myotube, while paclitaxel increased in MuRF1 and Atrogin-1 in only C2C12 myoblasts. On the other hand, the gene expression profiling in quadriceps muscle showed enhancement of proteasome degradation pathway and inhibition of striated muscle contraction pathway in model of cisplatin-induced muscle atrophy. In addition, the cisplatin-induced upregulation of MuRF1 and Atrogin-1 was attenuated by treadmill exercise. Although the detailed mechanism is unknown, it is possible that sensitivity to treadmill exercise is enhanced in the conditions associated with cisplatin-induced muscle atrophy in the quadriceps muscle.

研究分野：薬理学

キーワード：Cisplatin muscle atrophy MuRF1 Atrogin-1

1. 研究開始当初の背景

近年日本の社会は、急速に高齢社会へと変貌を遂げた。がんの発生は加齢と共に増加するため、がんの罹患率が急速に増加している。適切な抗がん剤選択により生存効果の延長が見込まれるようになっているが、副作用の強い抗がん剤治療では、副作用による患者の quality of life (QOL) の著しい低下により、治療を中断するケースが多い。最近の報告より、抗がん剤副作用経験者のうち副作用対策への薬剤が処方された患者は半数程度に留まり、その効果も限定的であるため、がん患者の副作用軽減に対するアンメットメディカルニーズは非常に高いことが明らかとなった (QLife[®] 抗がん剤の副作用とその軽減方法』に関する調査)。

現在、申請者は抗がん剤の副作用の中でも、疲労感/倦怠感、下痢、味覚障害、食欲不振などを研究し、成果を出している (Sakai et al., *PLoS ONE*. 2013; *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014; Sakai et al., *Pharmacol Res*. 2014)。がん化学療法中には、体がだるい、ひどく疲れるといった疲労感/倦怠感が頻発し、抗がん剤治療を受けた患者の 7 割以上が体験すると言われている。この疲労感/倦怠感は、QOL の著しい低下を招く大きな要因にもかかわらず、医学的根拠に基づく対応策は無いといっても過言ではない。抗がん剤による疲労感/倦怠感は、中枢および末梢組織の機能低下など、多くの原因で起こると考えられるが、詳細な機序は不明である。これまで、申請者は、この疲労感/倦怠感の発症メカニズム解明の一環として、新たな視点から抗がん剤が骨格筋組織に影響を及ぼすことにより引き起こされるのではないかと仮説を立て、抗がん剤投与時の骨格筋組織への影響を検討している。申請者らは、5-fluorouracil (5-FU)、シクロフォスファミド、シスプラチンおよびビンクリスチンをマウスに 1 日 1 回、4 日間投与し、大腿四頭筋と後肢筋の重量ならびに筋線維断面の直径を測定したところ、特にシスプラチン投与により骨格筋質量ならびに筋線維断面の直径が有意に減少していることを明らかにした。この両者の低下はシスプラチンの体重減少と同等にまで体重を減少させた食事制限モデルマウスよりもさらに減少していた。この結果は、シスプラチンによる摂食量/栄養摂取低下により引き起こされる筋萎縮だけでなく、シスプラチン自体が骨格筋に対し、直接作用し筋萎縮を引き起こす可能性が考えられる。そこで、定量的 RT-PCR にて筋原性制御因子、筋分化マーカー、筋萎縮原因遺伝子および炎症性サイトカイン等、多種の遺伝子発現変動を解析したところ、食事制限コントロールと比べて、シスプラチン投与群では筋萎縮原因

遺伝子として分類される Muscle RING Finger-1 (MuRF1) ならびに muscle-specific E3 ubiquitin ligases (MAFbx, atrogin-1) [両者ともに E3 Ubiquitin Ligases] の遺伝子発現が著明に増加していた。さらに、種々の解析結果より、シスプラチンを投与したマウスの骨格筋では、Foxos を介した signaling が活性化され、MuRF1 および Atrogin-1 の転写が亢進している結果を得ている。(Sakai et al., *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014)。

2. 研究の目的

現在、臨床現場において、疲労感/倦怠感が出現しやすい抗がん剤としてシスプラチン、パクリタキセル、イリノテカン等が挙げられている。そこで、本研究では、臨床上、患者の QOL を著しく低下させる疲労感/倦怠感の発症においてこれらの薬物の C2C12 筋芽細胞 (myoblasts) および 筋管細胞 (myotube) への筋萎縮原因遺伝子 (MuRF1 および Atrogin-1) 発現への影響を検討した。さらに、以前より、筋萎縮作用を明らかにしているシスプラチン投与マウスの筋萎縮におけるトレッドミルを用いた運動負荷の効果を検討した。

3. 研究の方法

C2C12 myoblast の培養および薬物処置

12well プレートにマウス骨格筋由来細胞株 C2C12 myoblasts を 1×10^5 cell/well になるように播種した。パクリタキセル (0.1、0.3 μ M)、イリノテカン (1、10 μ M)、シタラビン (3、30 μ M)、5-フルオロウラシル (1.5、50 μ M) およびシスプラチン (15、50 μ M) を処置し、24 時間後、細胞を回収した。

Myotube への分化誘導および薬物処置

Collagen coating solution (TOYOBO) を用いて、コラーゲンコートをした 12 well プレートに C2C12 myoblasts を 1×10^5 cell/well、96 well プレートに C2C12 myoblast を 1×10^6 cell/well 播種し、80% confluent になった状態で、2% horse serum (Sigma) に培地交換を行い、Day0 とした。その後、37、5% CO₂ に維持されたインキュベーター内で培養し、一日おきに培地を交換した。Day9 に 12 well プレートにはシタラビン (3、30 μ M)、シスプラチン (15、50 μ M)、パクリタキセル (0.1、0.3 μ M)、イリノテカン (1、10 μ M) および 5-フルオロウラシル (1.5、50 μ M) を処置し、Day10 に回収した。

Real-time RT-PCR 法

培養細胞ならびに薬物処置後のマウスから摘出した quadriceps muscle (大腿四頭筋) から TRI Reagent (Sigma-Aldrich) を用いて total RNA を回収した。次に、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて total RNA から cDNA を合成し、Fast SYBR Green を用いた real-time PCR 法にて各種遺伝子発現量を定量した。また、データ解析は、 2^{-CT} 法にて行った。

動物実験

本研究を遂行するにあたり、科学的にはもとより、動物福祉の観点からも適正な動物実験の実施を促すことを目的として制定された星薬科大学動物実験指針に従い、本学の動物実験委員会で承認を得たうえで、動物に対する倫理面を十分に考慮し、使用動物数を最小限にしてすべての実験を行った。

マウスにおける cisplatin の投与スケジュール

実験には 8-9 週齢の c57BL/6J 系雄性マウスを使用し、cisplatin (3 mg/kg)、saline をそれぞれ Day0、1、2、3 と 4 日間連続で腹腔内投与し、Day4 に quadriceps muscle を摘出した。

DNA microarray

シスプラチン投与群、食事制限群、溶媒処置群から大腿四頭筋を摘出し、total RNA を抽出し、Toray 3D-Gene を用いた DNA microarray (GO 解析および pathway 解析) を Toray に依頼した。

トレッドミルを用いた運動負荷

トレッドミルによる運動負荷は、20 分間 15 m/min の速度で計 9 日間においてマウスに運動負荷を課し、運動負荷の最後の 4 日間、1日1回シスプラチン (3 mg/kg, i.p.) を投与した。

体重測定

Cisplatin 投与開始後のマウスの体重変化を control 群と比較して検討した。

大腿四頭筋 myofiber diameter の測定

バイオ病理研究所に標本作製を依頼した。得られた標本を光学顕微鏡下で観察し、撮影を行い、Image J を用いて筋線維の直径を測定した。

4. 研究成果

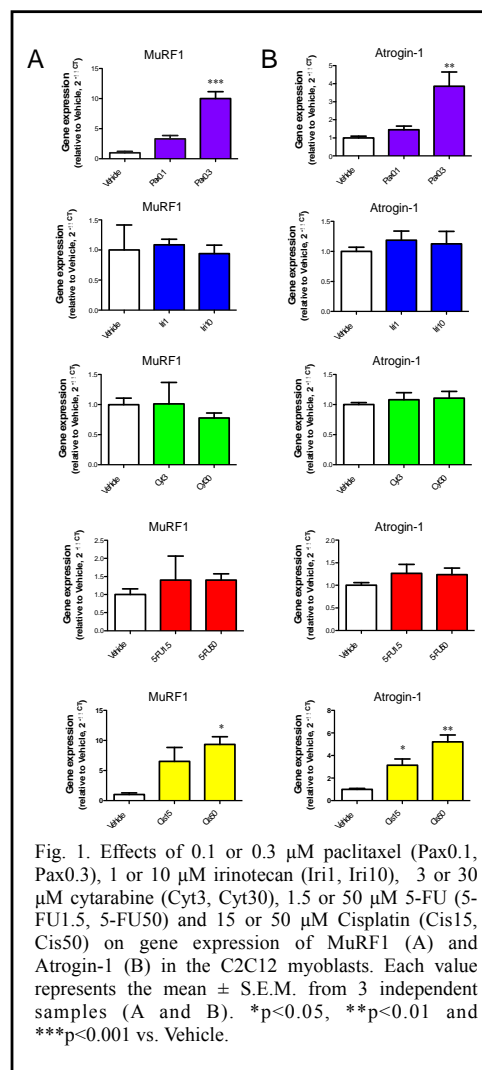


Fig. 1. Effects of 0.1 or 0.3 μ M paclitaxel (Pax0.1, Pax0.3), 1 or 10 μ M irinotecan (Iri1, Iri10), 3 or 30 μ M cytarabine (Cyt3, Cyt30), 1.5 or 50 μ M 5-FU (5-FU1.5, 5-FU50) and 15 or 50 μ M Cisplatin (Cis15, Cis50) on gene expression of MuRF1 (A) and Atrogin-1 (B) in the C2C12 myoblasts. Each value represents the mean \pm S.E.M. from 3 independent samples (A and B). * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. Vehicle.

C2C12 myoblasts にパクリタキセル、イリノテカン、シタラピン、5-フルオロウラシル (5-FU) およびシスプラチンを 24 時間処置したところ、パクリタキセルおよびシスプラチンの処理により濃度依存的な筋萎縮原因遺伝子である MuRF1 および Atrogin-1 の遺伝子発現上昇が引き起こされた (Fig. 1)。さらに、MuRF1 および Atrogin-1 のタンパク質レベルでの発現変化を Western blot にて検出したところ、mRNA と同様にパクリタキセルおよびシスプラチンの処理により発現上昇が引き起こされていた (Fig. 2)。

MuRF1 および Atrogin-1 の転写制御因子の1つに Foxo3a が知られている。この Foxo3a はリン酸化状態では核内へ移行でき

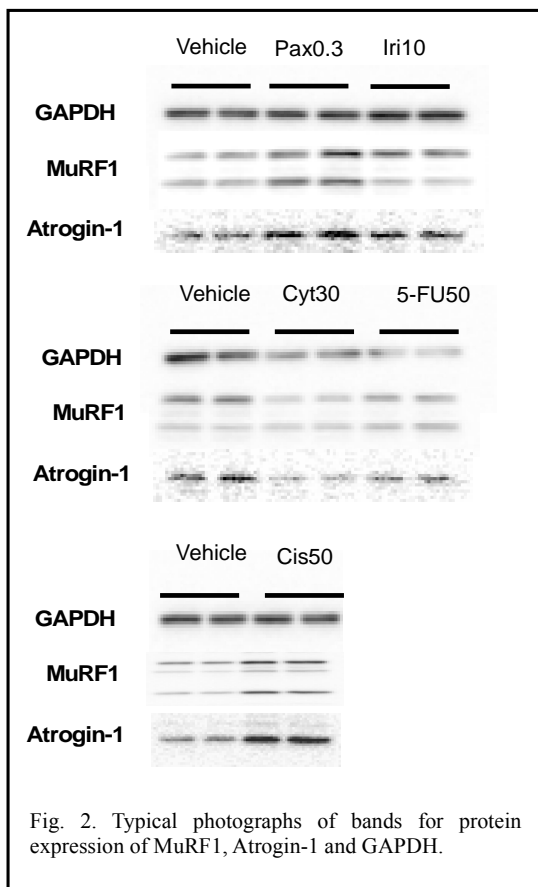


Fig. 2. Typical photographs of bands for protein expression of MuRF1, Atrogin-1 and GAPDH.

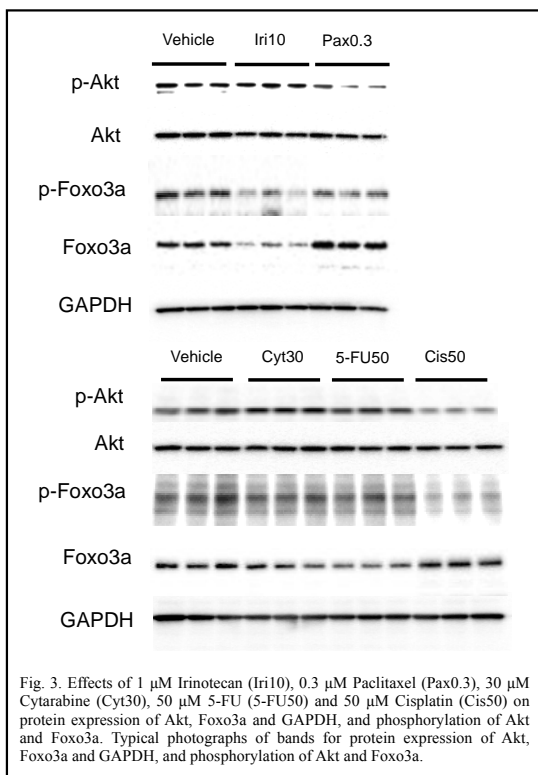


Fig. 3. Effects of 1 μ M Irinotecan (Iri10), 0.3 μ M Paclitaxel (Pax0.3), 30 μ M Cytarabine (Cyt30), 50 μ M 5-FU (5-FU50) and 50 μ M Cisplatin (Cis50) on protein expression of Akt, Foxo3a and GAPDH, and phosphorylation of Akt and Foxo3a. Typical photographs of bands for protein expression of Akt, Foxo3a and GAPDH, and phosphorylation of Akt and Foxo3a.

ないため、リン酸化体は MuRF1 および Atrogin-1 の転写不活性体となる。このリン酸化を制御しているのが、Akt であり、リン酸化 Akt は Foxo3a をリン酸化させ、

MuRF1 および Atrogin-1 の転写を制御している。そこで、これらのリン酸化状態を Western blot 法にて検出したところ、パクリタキセルおよびシスプラチン処置はリン酸化 Akt (p-Akt) およびリン酸化 Foxo3a (p-Foxo3a) が減少していた。また、イリノテカン処置も p-Foxo3a を減少させたが、Foxo3a 自体の発現も減少させていた。以上のことより、パクリタキセルおよびシスプラチンは C2C12 myoblasts において Akt のリン酸化体を減少させることにより Foxo3a のリン酸化体が減少し、MuRF1 および Atrogin-1 の転写活性を上昇させている可能性が示唆できた (Fig. 3)。

次に、C2C12 myoblasts を myotube に分化させ、同様にパクリタキセル、イリノテカン、シタラピン、5-FU およびシスプラチンの効果を検討したところ、シスプラチン処置のみ MuRF1 および Atrogin-1 の遺伝子発現上昇が引き起こされた (Fig. 4)。以前より、我々はシスプラチンをマウスに投与すると筋萎縮が引き起こされることを示唆しているが、本研究によりシスプラチンは骨格筋に直接作用し、MuRF1 および Atrogin-1 の発現上昇を伴った筋萎縮を引き起こしていることを示唆している。

我々は以前より、シスプラチン投与により

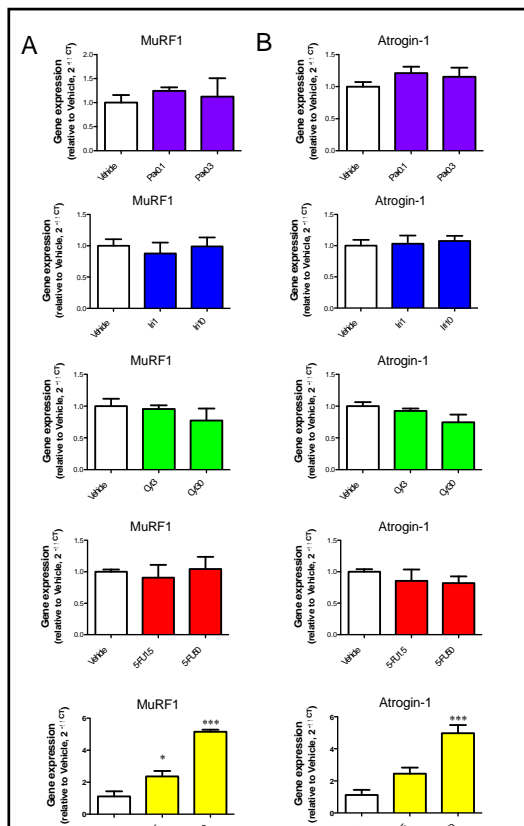


Fig. 4. Effects of 0.1 or 0.3 μ M Paclitaxel (Pax0.1, Pax0.3), 1 or 10 μ M Irinotecan (Iri1, Iri10), 3 or 30 μ M Cytarabine (Cyt3, Cyt30), 1.5 or 50 μ M 5-FU (5-FU1.5, 5-FU50) and 15 or 50 μ M Cisplatin (Cis15, Cis50) on gene expression of MuRF1 (A) and Atrogin-1 (B) in the C2C12 myotube cells. Each value represents the mean \pm S.E.M. from 3 independent samples. * p <0.05 and *** p <0.001 vs. Vehicle.

マウスの大腿四頭筋や後肢筋において筋萎縮を引き起こすことを明らかにしている。シスプラチンによる筋萎縮時における gene expression profiling および pathway 解析の結果、筋萎縮原因遺伝子である MuRF1 および Atrogin-1 だけでなく proteasome degradation pathway の 26s proteasome の構成分子の遺伝子発現増加、横紋筋収縮 pathway 因子の遺伝子発現低下も引き起こされていた。したがって、タンパク質分解機序の亢進および横紋筋収縮因子の発現低下が引き起こされ、この状況を介して疲労感/倦怠感を惹起している可能性が示唆できた。

一方、運動による骨格筋負荷は、筋肥大を引き起こすことが知られている。そこで、これらの新たな治療戦略を検討する一環としてシスプラチン筋萎縮モデルにおいて、運動負荷の効果を検討した。トレッドミルによる運動負荷はシスプラチンによる体重減少には影響を与えなかったが、大腿四頭筋の重量ならびに筋線維径の減少を有意に回復させた (Fig. 5)。次に、シスプラチン誘発 MuRF1 および Atrogin-1 の遺伝子発現亢進における運動負荷の影響を検討した結果、運動負荷はシスプラチンによる MuRF1 および

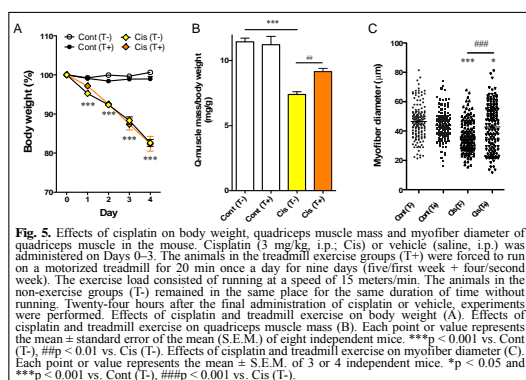


Fig. 5. Effects of cisplatin on body weight, quadriceps muscle mass and myofiber diameter of quadriceps muscle in the mouse. Cisplatin (3 mg/kg, i.p., Cis) or vehicle (saline, i.p.) was administered on Days 0-3. The animals in the treadmill exercise groups (T+) were forced to run on a motorized treadmill for 20 min once a day for nine days (five/first week + four/second week). The exercise load consisted of running at a speed of 15 meters/min. The animals in the non-exercise groups (T-) remained in the same place for the same duration of time without running. Twenty-four hours after the final administration of cisplatin or vehicle, experiments were performed. Effects of cisplatin and treadmill exercise on body weight (A). Effects of cisplatin and treadmill exercise on quadriceps muscle mass (B). Each point or value represents the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) of eight independent mice. ***p < 0.001 vs. Cont (T-), ##p < 0.01 vs. Cis (T-), ###p < 0.001 vs. Cont (T-), #p < 0.05 and ***p < 0.001 vs. Cont (T-), ###p < 0.001 vs. Cis (T-).

Atrogin-1 の発現亢進を有意に抑制した (Fig. 6)。

がん患者の悪液質による骨格筋量の減少は、倦怠感/疲労感に関与し、さらには、予後不良因子となり得ることが最近、報告されている (Prado et al., *Am J Clin Nutr.* 2013)。本研究結果より、がん患者の化学療法にシスプラチンを用いると筋萎縮作用が亢進され、QOL を下げるだけでなく、予後も悪化する可能性がある。したがって、シスプラチンを用いた化学療法中の患者の骨格筋量のチェックは非常に重要な診断因子になることが示唆できた。また、シスプラチンによる筋萎縮機序にはタンパク質分解機序の亢進および横紋筋収縮因子の発現低下が引き起こされていることが示唆できた。また、この筋萎縮を抑制する対策の1つとして運動負荷が有効であることも示唆できた。さらに、パクリタキセルも C2C12 myoblasts において筋萎縮遺伝子の発現亢進を示すため、シスプラチンだけではなくパクリタキセルも筋萎縮を引き起こす可能性がしさできたが、

in vivo での効果は今後の検討課題である。

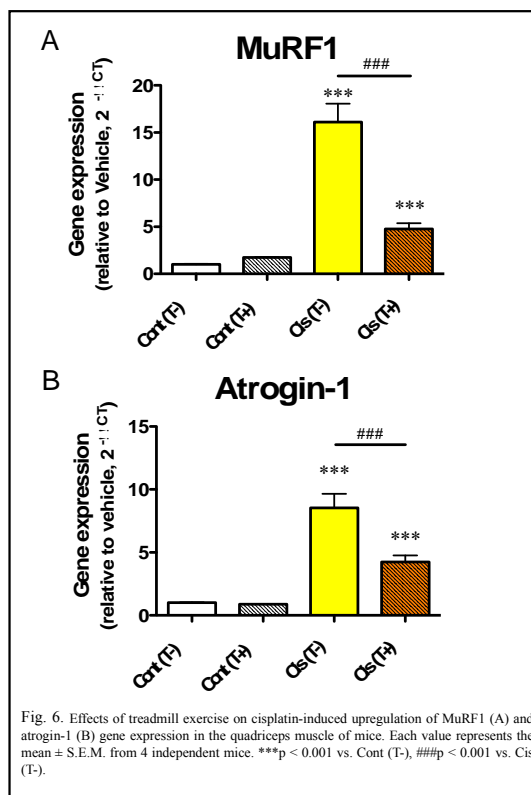


Fig. 6. Effects of treadmill exercise on cisplatin-induced upregulation of MuRF1 (A) and atrogin-1 (B) gene expression in the quadriceps muscle of mice. Each value represents the mean \pm S.E.M. from 4 independent mice. ***p < 0.001 vs. Cont (T-), ###p < 0.001 vs. Cis (T-).

引用文献

- QLife 『抗がん剤の副作用とその軽減方法』に関する大規模患者調査. 監修: 上園 保仁生. <http://www.qlife.co.jp/news/4136.html>
- Sakai H, et al. 5-Fluorouracil induces diarrhea with changes in the expression of inflammatory cytokines and aquaporins in mouse intestines. *PLoS One.* 2013;8:e54788.
- Sakai H, et al. Neutrophil recruitment is critical for 5-fluorouracil-induced diarrhea and the decrease in aquaporins in the colon. *Pharmacol Res.* 2014;87:71-9.
- Sakai H, et al. Mechanisms of cisplatin-induced muscle atrophy. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;278:190-9.
- Prado et al., Central tenet of cancer cachexia therapy: do patients with advanced cancer have exploitable anabolic potential? *Am J Clin Nutr* 2013; 98:1012-9.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

- Sakai H, Sato K, Sato F, Kai Y, Mandokoro K, Matsumoto K, Kato S, Yumoto T, Narita M, Chiba Y. Curcumin inhibits epigen and amphiregulin upregulated by 2,4,6-trinitrochlorobenzene associated with attenuation of skin swelling. *Inflamm Res.* in press
- Chiba Y, Tanoue G, Suto R, Suto W, Hanazaki M, Katayama H, Sakai H.

Interleukin-17A directly acts on bronchial smooth muscle cells and augments the contractility. Pharmacol Rep. 2016;69:377-385.

3. Sakai H, Kai Y, Oguchi A, Kimura M, Tabata S, Yaegashi M, Saito T, Sato K, Sato F, Yumoto T, Narita M. Curcumin Inhibits 5-Fluorouracil-induced Up-regulation of CXCL1 and CXCL2 of the Colon Associated with Attenuation of Diarrhoea Development. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2016 ;119:540-7.
4. Sakai H, Kai Y, Takase K, Sato K, Kimura M, Tabata S, Yaegashi M, Sato F, Yomoto T, Narita M. Role of peptide YY in 5-fluorouracil-induced reduction of dietary intake. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2016;43:753-9.
5. Sakai H, Sato K, Kai Y, Chiba Y, Narita M. Denatonium and 6-n-Propyl-2-thiouracil, Agonists of Bitter Taste Receptor, Inhibit Contraction of Various Types of Smooth Muscles in the Rat and Mouse. Biol Pharm Bull. 2016;39:33-41.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 矢部早織、伊佐洋佑、丸山明秀、鶴野結花理、田端祥子、木村三奈美、甲斐友規、里 史明、湯本哲郎、山田岳史、酒井寛泰: シスプラチン誘発筋萎縮作用におけるエイコサペンタエン酸の抑制効果、第 137 回日本薬学会年会、仙台、2017 年 3 月
2. 丸山明秀、鶴野結花理、木村三奈美、矢部早織、伊佐洋佑、田端祥子、甲斐友規、里 史明、湯本哲郎、千葉義彦、酒井寛泰: 各種抗がん薬における MuRF1 および Atrogin-1 発現変化、第 137 回日本薬学会年会、仙台、2017 年 3 月
3. 伊佐洋佑、丸山明秀、鶴野結花理、矢部早織、田端祥子、木村三奈美、甲斐友規、里 史明、湯本哲郎、千葉義彦、酒井寛泰: シスプラチン誘発筋萎縮作用における運動負荷の効果、第 137 回日本薬学会年会、仙台、2017 年 3 月
4. 木村三奈美、田端祥子、矢部早織、伊佐洋佑、丸山明秀、鶴野結花理、甲斐友規、里 史明、湯本哲郎、千葉義彦、酒井寛泰: デキサメタゾンによるシスプラチン誘発筋萎縮の増強作用、第 137 回日本薬学会年会、仙台、2017 年 3 月

5. 酒井寛泰、甲斐友規、里 史明、湯本哲郎、山田岳史: シスプラチン誘発ユビキチン-プロテアソーム系を介する筋萎縮亢進機序、第 32 回日本静脈経腸栄養学術集会、岡山、2017 年 2 月

6. 酒井寛泰、矢部早織、甲斐友規、伊佐洋佑、木村三奈美、田端祥子、鶴野結花理、丸山明秀、里 史明、湯本哲郎、吉澤一巳、山田岳史: シスプラチン誘発筋萎縮作用におけるエイコサペンタエン酸の効果、第 10 回日本緩和医療薬学会年会、浜松、2016 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

星薬科大学 薬剤師職能開発研究部門 / 疾患 病 態 解 析 学
(http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsutsu/yokunokai/zhi_neng_kai_fa/HOME.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 寛泰 (SAKAI HIROYASU)
星薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00328923