

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19424

研究課題名(和文) 呼吸器悪液質発症に関与する脂肪細胞由来因子の同定とグレリンの抗悪液質作用機序解明

研究課題名(英文) Exploratory research of adipocyte related pulmonary cachectic factor and investigation of ghrelin's effect on cachexia

研究代表者

坪内 拓伸 (Hironobu, Tsubouchi)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：60573988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸器悪液質は癌やCOPD等の呼吸器疾患により、進行性に体重減少を伴う筋萎縮をきたす病態である。既存の薬物療法に有効性は無く、悪液質病態の解明と有効な治療法の解明は急務の医療課題である。本研究では、悪液質病態におけるグレリンの意義と脂肪組織の機能変化について検討を行った。その結果、呼吸器悪液質病態において、脂肪組織にはUCP1活性が亢進していること、グレリンの発現が相対的に不足していること、視床下部におけるAgRP/NPYシグナルの活性が低下していることを確認した。また、グレリンの投与が癌の増殖に直接影響するか検討した結果、肺腺癌細胞株へのグレリン添加は、癌細胞の増殖能へ影響しなかった。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary cachexia is a frequent complication in patients with respiratory failure, such as lung cancer or COPD. The key features of cachexia are reductions in body weight and skeletal muscle mass. The development of therapeutic strategies for cachectic conditions are needed in patients with these respiratory diseases.

Compared with the control mice, the pulmonary cachexia model mice had higher expression level of UCP1 in white adipose tissue, lower expression level of ghrelin in plasma and stomach, and lower activity of AgRP/NPY signaling in hypothalamus. In addition, treatment with ghrelin did not affect cell viability or proliferation in human lung adenocarcinoma cell line.

研究分野：呼吸器

キーワード：悪液質 グレリン 肺癌

1. 研究開始当初の背景

悪液質は癌、COPD 等の基礎疾患により、進行性に体重減少を伴う筋萎縮をきたす病態である。既存の薬物療法に有効性は無く、癌においては死因の約 30%を占める。このため悪液質病態の解明と有効な治療法の解明は急務の医療課題である。

悪液質病態では、基礎疾患の炎症に伴って誘導される液性因子 (IL-1、IL-6、TNF- α 等) を介した NF- κ B や p38 MAPK の活性化により、悪液質の特徴である骨格筋の萎縮や摂食運動関連分子の視床下部における発現が低下する。これらの悪液質病態における変化は、未知の脂肪細胞由来因子によってもたらされている可能性がある。

また、グレリンは抗悪液質作用を有する生理活性ペプチドであるが、癌の増殖に与える影響は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、悪液質病態モデル動物において白色脂肪組織 (WAT) の網羅的遺伝子発現差異解析を行い、白色脂肪組織由来の悪液質関連因子を探索する。

また、抗悪液質作用を有するグレリンについて、悪液質病態における発現と癌細胞への増殖能への影響を検討する。

3. 研究の方法

ブレオマイシン (BLM) を気管内投与することで、肺線維症悪液質モデルを作成した。また、肺上皮特異的 Pten 欠損マウスを用いて、肺腺癌悪液質モデルを作成した。2 種の呼吸器悪液質動物モデルを用いて、WAT 由来の悪液質関連因子、悪液質におけるグレリンの発現を解析した。また、ヒト由来肺腺癌細胞株 (HLC-1) を用いて、グレリンが直接的に癌増殖能へ影響するかを検討した。

4. 研究成果

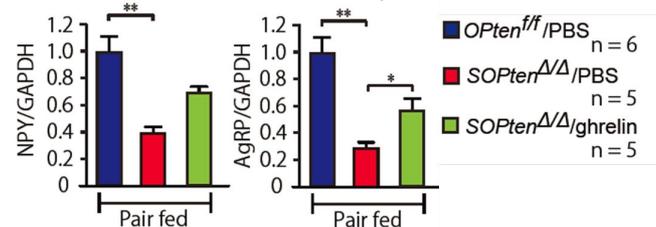
BLM 肺線維症モデルマウスとコントロールマウスの WAT を回収し、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、BLM 肺線維症モデルにおいて、TNF- α 、IL-6、IL-1 などの悪液質関連サイトカインの発現が亢進していた。また、BLM 肺線維症マウスにおいて、WAT 中の UCP1 の発現が亢進していたことから、呼吸器悪液質病態において、白色脂肪細胞のベージュ細胞化が亢進していることが示唆された。今後は DNA マイクロアレイにおいて見出された分子において、直接的に骨格筋を萎縮させる分子を探索する。

肺上皮特異的 Pten 欠損マウスを用いて、肺腺癌悪液質モデルマウス (Pten-KO マウス) を作成した。コントロールマウス (肺上皮 Pten 野生型マウス) と比較し、Pten-KO マウスでは、胃および血漿中のグレリンの発現の低下、視床下部における NPY および AgRP シグナルの機能低下が認められた (図 1)。こ

の現象は、BLM 肺線維症モデルマウスにおいても認められた。

また、野生型マウスへ悪液質関連サイトカイン (IL-6、TNF- α) を腹腔内投与した結果、胃および血漿中のグレリンの発現が低下したことから、肺癌または肺線維症が存在することにより、恒常的に悪液質関連サイトカインが分泌されることが、グレリンの発現低下に影響すると考えられた。

図 1



ヒト由来肺腺癌細胞株 (HLC-1) の培養液中へグレリン (10⁻², 10⁻¹, 1, 10 μM) を添加し、細胞増殖能、ミトコンドリア機能、アポトーシス抵抗性を確認した。その結果、グレリン添加による増殖能 (図 2) やミトコンドリア機能の亢進 (図 3)、パクリタキセルへの細胞死抵抗性の亢進 (図 4) は認められなかった。

図 2

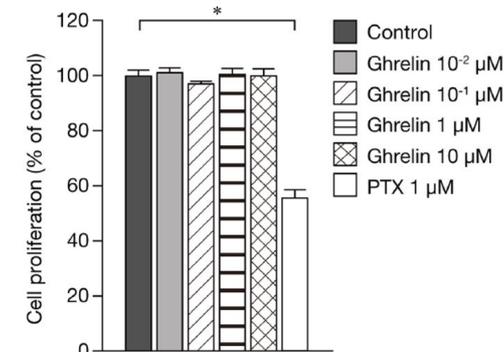


図 3

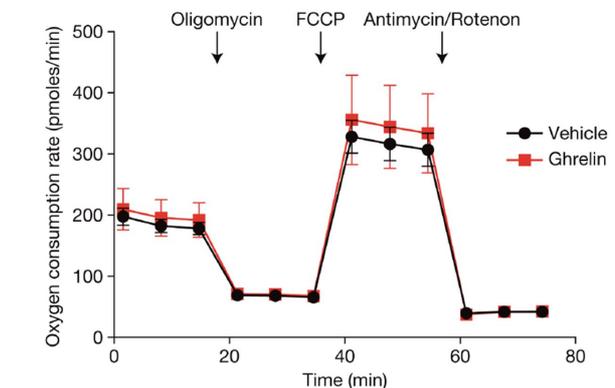
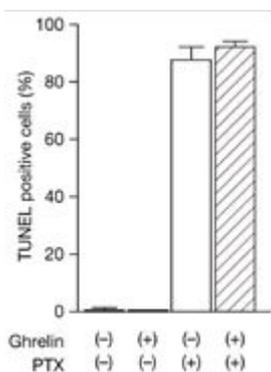


図 4



本研究の実施により、呼吸器悪液質病態において、白色脂肪細胞のベージュ化が亢進されている可能性が示唆された。本研究期間においては、悪液質に直接的に影響する脂肪細胞由来因子の同定に至らなかったが、BLM 肺線維症モデルの肺において、グレリン受容体のアンタゴニスト作用を有するペプチドの発現が亢進していた。肺癌患者5名の血漿を用いて検討した結果、このペプチドの濃度が健常人の平均値と比較して高値であったことから、悪液質病態においてはグレリンが相対的に不足すること、グレリンの作用を阻害するペプチドの発現が亢進することが、体重減少や骨格筋の萎縮に寄与していることが示唆された。

また、グレリンは癌の増殖に対して、促進作用または抑制作用を有するのか結論が得られていない。本研究の結果から、グレリンは直接的には肺腺癌の増殖へ影響しないことが示唆された。グレリンの抗悪液質作用は、将来的に臨床応用が期待されるものであるが、癌の増殖能への影響は十分に検討する必要がある。今後は長期的なグレリン投与が肺癌へもたらす影響を *in vivo* で検討する予定である。

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 4 件)

1. Ishii N, Tsubouchi H, Miura A, Yanagi S, Ueno H, Shiomi K, Nakazato M. Ghrelin alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathy by reducing oxidative stress and enhancing mitochondrial anti-oxidant functions in mice. *Eur J Pharmacol.* 819:35-42. (2018) 査読有

2. Tsubouchi H, Onomura H, Saito Y, Yanagi S, Miura A, Matsuo A, Matsumoto N, Nakazato M. Ghrelin does not influence cancer progression in a lung adenocarcinoma cell line. *Endocrine J* 64, S41-S46, (2017) 査読有

3. Matsumoto N, Tsubouchi H, Imazu Y, Arimura Y, Yanagi S, Iiboshi H, Nakazato M. Clinical application of ghrelin for chronic respiratory failure. *Endocrine J* 64, S1-S3, (2017) 査読有

4. Naznin F, Sakoda H, Okada T, Tsubouchi H, Waise TM, Arakawa K, Nakazato M. Canagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, attenuates obesity-induced inflammation in the nodose ganglion, hypothalamus, and skeletal muscle of mice. *Eur J Pharmacol.* 794:37-44. (2017) 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 坪内 拓伸, 柳 重久, 三浦 綾子, 松尾 彩子, 松元 信弘, 中里 雅光. グレリンによる肺腺癌の増殖への影響と抗悪液質作用の検討. 第 58 回日本肺癌学会学術集会. 2017 年 10 月 14 日 ~ 10 月 15 日.

2. H. Tsubouchi, S. Yanagi, A Miura, et al. Ghrelin Protects Against Airway Eosinophilic Inflammation in Asthma. The 22st Congress of Asian Pacific Society of Respiriology 2017 (Sydney).

3. H. Tsubouchi, S. Yanagi, A. Miura, et al. Ghrelin attenuates lung cancer cachexia through mediating the expression of energy homeostasis related molecules. 21nd Congress of the Asia Pacific Society of Respiriology 2016 (Bangkok).

4. 小野村仁美, 坪内 拓伸, 三浦綾子, 他. 肺癌悪液質における摂食関連分子の発現の検討. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会. 2016 年 04 月 08 日 ~ 2016 年 04 月 10 日.

5. Tsubouchi H, Yanagi S, Miura A, et al. Ghrelin Ameliorates Cancer Cachexia Associated with the Development of Lung Adenocarcinoma in Mice. *European Respiratory Society International Congress*, 2015 (Amsterdam).

6. 坪内 拓伸, 柳重久, 松元信弘, 中里雅光. マウス肺腺癌悪液質モデルにおいて Ghrelin 投与は癌悪液質を抑制する. 第 55 回 日本呼吸器学会学術講演会. 2015 年 04 月 17 日 ~ 2015 年 04 月 19 日.

〔図書〕(計 1 件)

1. 坪内 拓伸, 柳重久, 中里雅光. グレリンの炎症メカニズム-免疫応答調節の役割. 医学のあゆみ, 総ページ数 6P, 医歯薬出版社 (2017).

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪内 拡伸 (Hironobu, Tsubouchi)

宮崎大学医学部 助教

研究者番号: 6 0 5 7 3 9 8 8