

令和元年6月14日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21645

研究課題名(和文) グレリン・デスアシルグレリンによる癌悪液質の心機能改善評価と治療法確立を目指して

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for cancer cachexia induced cardiac dysfunction

研究代表者

野中 美希 (Nonaka, Miki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：60758077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：当研究分野で確立したヒト胃がん細胞株85As2細胞を用いてマウス皮下に移植することにより、ヒトと同様のがん悪液質症状を発症するモデルの作製に成功した。同モデルを用いて、がん悪液質における心機能評価と、心機能改善を目指した新規治療法の探索を行った。本研究により、85As2細胞を移植したがん悪液質モデルマウスは、心筋重量の低下とともに心機能障害を伴っていることが明らかとなった。組織学的、生化学的解析より、心機能障害は骨格筋委縮とは異なる経路で起こっている可能性が示唆され、今後さらに検討が必要と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんサバイバーの増加とともに、今まで顕在化していなかったがんサバイバーのQOLと心疾患についての関連性が近年指摘されている。がんサバイバーのフォローアップも含めた循環器系動態の把握、ならびにがん治療の有効性とがん治療に伴って起こる心機能障害を予防するために腫瘍循環器学という新しい学際領域が誕生した。本研究課題はこの腫瘍循環器学領域での研究の先駆けとなるものであり、がん悪液質によって心機能障害が起こること、さらにそのメカニズムの一端を明らかにすることができた。今後はがん悪液質で起こる心機能障害に対する予防薬や治療法についても詳細な検討を行っていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We established a novel murine model of cancer cachexia by implantation of human stomach cancer cell line 85As2 presenting anorexia, weight loss and low fat-free mass similar to those observed in patients. By using this model, we evaluated the effect of cachexia on cardiac function. At 2 weeks after implantation (pre-cachexia group), the mice began to show symptomatic cachexia; decreased body, skeletal muscle, and heart weight. The cachexia group (at 8 weeks after inoculation) developed severe cardiac atrophy in heart weight compared to controls. In addition, left ventricular ejection fraction was significantly decreased in pre-cachexia and cachexia group compared with age-matched controls. Histological and biochemical analyzes suggest that cardiac dysfunction may be caused by a pathway different from that of skeletal muscle atrophy. Further study is considered to be needed.

研究分野：薬理学

キーワード：がん悪液質 Cardio-oncology

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

国立がん研究センターがん対策情報センターの推計によると、今や日本人の2人に1人が生涯でがんになるといわれている。不治の病と恐れられていたがんは、医療技術の進歩により治療可能な疾患となってきた。その結果がんサバイバーは年々増加の一途をたどっている。加えて、治療中、治療後の様々な問題を抱えているがんサバイバーが多いのが現実である。新薬の開発や多種多様な治療法が選択できる中、今まで顕在化していなかった抗がん剤による晩期性障害やがん自身によって起こる心機能障害が近年問題となっている。

抗がん剤や近年その使用が増加している分子標的薬の中にもその副作用として心毒性を生じるものがあり、このような副作用は抗がん剤治療の継続を制限するばかりか、生命維持そのものに直結する場合も多い。また、進行がん患者の約80%に出現し、がん死因の約20%を占めるとされる悪液質では心不全を発症することが近年報告されていることから (Eur J Cancer. 42: 31-41, 2006.; J Cachexia Sarcopenia Muscle. 5: 95-104, 2014)、心機能とがんの予後との相関など心臓とがんとの関係が注目されている (J Am Coll Cardiol. 62: 881-886, 2013.; Heart. 101: 1874-1880, 2015)。

こうした背景に鑑み、がんサバイバーのフォローアップのための循環器系動態の把握、ならびにがん治療の有効性と心機能の関連を研究する腫瘍循環器学 Cardio-oncology という学際領域が確立し、臨床現場においても取り組みが開始されている。一方、がん悪液質病態下では心機能低下が起こるとされているが、ヒトと同様のがん悪液質を発症する適切なモデルが少ないため、がん悪液質と心機能の関係については未だ不明な点が多く、解析はほとんど行われていない。がん患者の心機能低下はQOL低下の大きな要因の一つであることから、がん悪液質の新規治療薬開発にはモデルの確立が重要な課題となっている。

### 2. 研究の目的

申請者が所属している国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野では最近、ヒト胃がん細胞株 85As2 をラットまたはマウスの皮下に移植することにより、摂食量低下、体重減少、筋肉量減少を伴う除脂肪量低下などのヒトと類似したがん悪液質症状を呈する動物モデルを確立した (Am J Physiol Endocrinol Metab. 306: E373-387, 2014)。临床上、がん悪液質

の病態下では筋肉量の低下をきたし、心筋が萎縮するため、心機能障害を起こすことが知られている。別のがんモデル動物でも心筋障害が惹起されることは報告されている (Int J Oncol. 39: 1321-1326, 2011.; Life Sci. 88: 406-410, 2011) が、当研究分野の有する 85As2 誘発がん悪液質モデルでも、心機能低下が予想される。しかし、同モデルを用いた心機能評価は行われていない (図1)。そこで申請者は、当研究分野で開発したヒトと同様の

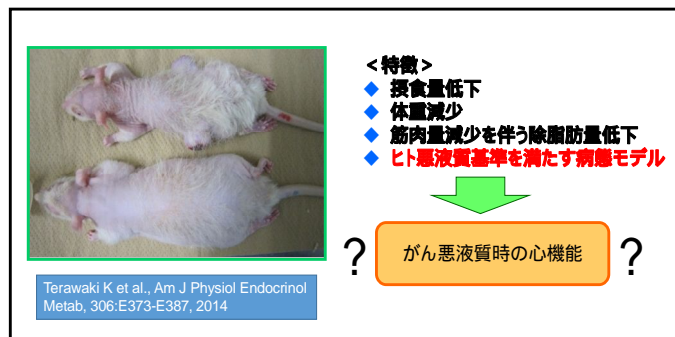


図1 85As2 誘発がん悪液質モデル

がん悪液質を発症するモデルを用い、がん悪液質病態下での心機能障害発症の分子機構を解明し、心機能とがん悪液質との相関関係を明らかにする。さらに悪液質モデル動物で起こる心不全に対する薬物治療の効果を *in vivo* 系および *in vitro* 系で評価し、がん悪液質性心不全に対する新規治療法の開発を目指すための基盤を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) がん悪液質モデルマウスの作製

国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野で確立された方法に従い、イソフルラン吸入麻酔下にて BALB/cAJcl-nu/nu nude マウスの両腹皮下にヒト胃がん細胞株 85As2 ( $1 \times 10^6$  cells/site) を移植しがん悪液質モデルマウスを作製した (Am J Physiol Endocrinol Metab. 306: E373-387, 2014)。

#### (2) がん悪液質モデルマウスの悪液質評価

悪液質は近年、“前悪液質 (precachexia)”、“悪液質 (cachexia)”、“不応性悪液質 (refractory cachexia)” の3段階のステージ分類が提唱されている。本分類に従い、作製するがん悪液質モデルの摂食量および体重を経時的に測定し、悪液質症状の判定を行い、前悪液質と悪液質の2つのステージに分類し、心機能の評価を行った。悪液質症状の判定には、屠殺後の筋肉量・脂肪量 (腓腹筋、精巣上体周りの脂肪など) を測定するとともに、血液採取を行った。

#### (3) 異なる悪液質ステージにおける心機能評価

移植したマウスと移植前のベースライン時の心エコー、心電図を測定し、移植後もそれらを経時的に測定した。また、心不全の有用な指標であるホームケージ内での行動量測定も併せて行った。

#### (4) 生化学的・組織化学な解析による心機能評価

前悪液質、悪液質のがん悪液質マウスの心臓を安楽死後摘出し、重量測定後、生化学的解析

と組織学的解析を行うためのサンプル作製を行った。

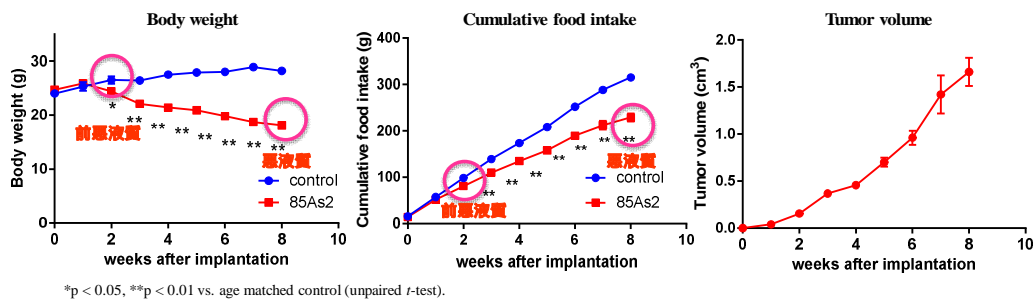
#### 4. 研究成果

##### (1) がん悪液質による自発活動量への影響

ホームケージ内での自発活動量は、移植後週齢が進むにつれ減少し、移植後5週より同齢の対照群と比較して有意に低下していた。通常マウスは暗期の活動量が総活動量の50%以上を占めているが、興味深いことにがん悪液質モデルでは移植後2週より暗期に比べ明期での活動量が増えることが明らかとなった。がん悪液質により、概日リズム異常を生じている可能性が示唆された。

##### (2) がん悪液質モデルに対する体重、摂餌量、腫瘍径の経時変化

がん悪液質の臨床症状として、体重減少ならびに食思不振が起こることが知られているが、85As2 移植がん悪液質マウスでは腫瘍の増大とともに移植後2週目より体重減少ならびに摂餌量の低下が認められた(図2)。この結果から体重ならびに摂餌量の低下が始まる移植後2週目を前悪液質群、移植後8週を悪液質群と分類し心機能の評価を行った。



\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. age matched control (unpaired t-test).

図2 体重、摂餌量、腫瘍径の経時変化

##### (3) 心臓・骨格筋重量への影響

同齢の対照群と比較し、前悪液質群ならびに悪液質群では心重量が有意に減少し、特に悪液質群では減少が顕著であった。また、大胸筋、腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、足底筋、長趾伸筋といった骨格筋重量も同様にがん移植群において有意に減少しており、悪液質群では前悪液質群に比し重量低下が顕著であった。

##### (4) 心エコー、心電図による心機能評価

心エコーによる心機能の評価を行ったところ、前悪液質群、悪液質群ともに左室駆出率(LVEF)の低下が認められ、悪液質群ではLVEFが50%以下まで下がる結果が得られた。さらに心電図解析では伝導遅延の発生も認められた。

##### (5) 心筋、骨格筋における病理学的解析

心筋重量の低下がおこっていることから、心臓の萎縮や線維化が起こっていると考え、Azan染色による心筋組織標本の作製を行った。移植前および対照群の心筋においては目立った線維化や組織学的な変化は観察されなかったものの、がん悪液質群は線維化ではなく、細胞が融解しているような明らかな心筋変性が観察され、前悪液質でもその前段階であることが考えられる所見が得られた。この結果については筋原線維の状態を把握するPTAH染色にて引き続き評価を行う。一方、骨格筋(腓腹筋)では心筋の病理組織で認められた細胞の融解等の変性は認められなかったものの、骨格筋重量の低下と比例して筋細胞の萎縮が起こっていることが明らかとなった。

##### (6) 心機能不全関連マーカーへの影響

心機能不全のマーカーとして知られるANP、BNP、 $\alpha$ -MHC、 $\beta$ -MHCについてRT-PCRにて解析を行った。心不全ではANPやBNPの発現量の増加が認められることが広く知られているが、このモデルでは移植後8週ではANPは増加する傾向が見られる一方で、BNPについては移植後週齢が経過するにつれて有意に減少する結果となった。また、マウスでは心不全時に増加することが知られている $\alpha$ -MHCについては、前悪液質群で発現量が有意に増加し、悪液質群でも発現量の増加が認められる結果が得られた。BNPが減少するメカニズムはまだ明らかとなっていないため、今後検討したいと考えている。

##### (7) 心筋、骨格筋におけるユビキチンリガーゼ発現量の検討

筋肉量低下や萎縮に関与するユビキチンリガーゼについて解析を行ったところ、骨格筋では悪液質群においてAtrogin-1、MuRF-1といったユビキチンリガーゼの発現量が対照群に比べ顕著に上昇していることが明らかとなった。この結果から、骨格筋においてはユビキチンプロテアソーム系が亢進しており筋重量低下との相関が示唆された。一方、心筋においては、Atrogin-1は前悪液質群、悪液質群ともに有意な差は認められなかったが、MuRF-1については前悪液質群で有意に増加し、悪液質群でも増加傾向が認められた。心筋での病理所見では細胞が融解しているような所見が得られたこと、さらにユビキチンプロテアソーム系などの分解系の亢進は骨格筋に比べ顕著ではないことから、心筋での萎縮や重量低下は、タンパク質分解系の亢進は考えられるものの、骨格筋とは別の経路によって生じている可能性が考えられた。以上の結果より悪液質による骨格筋ならびに心筋の萎縮は異なる経路で惹起されている可能性が示唆された。

さらに詳細なメカニズムについて現在解析中であり、新規の治療法として摂食亢進ホルモンであるグレリンと、アシル化修飾のないデスアシルグレリンによる治療効果の検討も計画していたが、助成を受けている期間に動物実験室の改装工事が入り実験をストップしており最近完成したため、引き続き実験を行っているところである。グレリン、デスアシルグレリンに関しては抗がん剤であるドキシソルピシンによって起こる心機能障害に対して、治療効果が得られること、さらにその効果はデスアシルグレリンが高いことを、この研究成果の中で検討し報告を行っている (Nonaka M, et al. *Endocr J.* 2017; 64: S35-39)。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. K Terawaki, Y Kashiwase, M Uzu, **M Nonaka**, Y Sawada, K Miyano, Y Higami, K Yanagihara, M Yamamoto, and Y Uezono. "Leukemia inhibitory factor via the Toll-like receptor 5 signaling pathway involves aggravation of cachexia induced by human gastric cancer-derived 85As2 cells in rats." *Oncotarget.* 2018; 9: 34748-34764.
2. T Yokoyama, K Terawaki, K Minami, K Miyano, **M Nonaka**, M Uzu, Y Kashiwase, K Yanagihara, Y Ueta, Y Uezono. "Modulation of synaptic inputs in magnocellular neurones in a rat model of cancer cachexia." *J Neuroendocrinol.* 2018; 30: e12630.
3. Y Meguro, K Miyano, S Hirayama, Y Yoshida, N Ishibashi, T Ogino, Y Fujii, S Manabe, M Eto, **M Nonaka**, H Fujii, Y Ueta, M Narita, N Sata, T Yada, Y Uezono. "Neuropeptide oxytocin enhances  $\mu$  opioid receptor signaling as a positive allosteric modulator." *J Pharmacol Sci.* 2018; 137: 67-75.
4. K Hayamizu, S Morimoto, **M Nonaka**, S Hoka, T Sasaguri. "Cardiotonic actions of quercetin and its metabolite tamarixetin through a digitalis-like enhancement of Ca<sup>2+</sup> transients." *Arch Biochem Biophys.* 2017; 637: 40-47.
5. T Mori, N Kuzumaki, T Arima, M Narita, R Tateishi, T Kondo, Y Hamada, H Kuwata, M Yamauchi, K Higashiyama, **M Nonaka**, K Miyano, Y Uezono, M Narita. "Usefulness for the combination of G protein- and  $\beta$ -arrestin-biased ligands of  $\mu$ -opioid receptors: Prevention of antinociceptive tolerance." *Mol Pain.* 2017; 13: 1744806917740030.
6. **M Nonaka**, N Kurebayashi, T Murayama, M Sugihara, K Terawaki, S Shiraishi, K Miyano, H Hosoda, S Kishida, K Kangawa, T Sakurai and Y Uezono. "Therapeutic potential of ghrelin and des-acyl ghrelin against chemotherapy-induced cardiotoxicity." *Endocr J.* 2017; 64: S35-39.

他 1 件

### 〔学会発表〕(計 23 件)

1. **Miki Nonaka**, Masami Sugihara, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Seiji Shiraishi, Kanako Miyano, Moeko Eto, Hiroshi Hosoda, Shosei Kishida, Kenji Kangawa, Takashi Sakurai and Yasuhito Uezono. "Cardioprotective effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on doxorubicin-induced cardiotoxicity", The International and Interdisciplinary Symposium 2016 "Towards a New Era of Cardiovascular Research" (ISC2016), 2016.7.11-13 (Tokyo) **BEST POSTER AWARD.**
2. **Miki Nonaka**, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Masami Sugihara, Seiji Shiraishi, Kanako Miyano, Hiroshi Hosoda, Shosei Kishida, Kenji Kangawa, Takashi Sakurai and Yasuhito Uezono. "Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on doxorubicin-induced cardiotoxicity", The 61th Annual Meeting of the Biophysical Society, 2017.2.11-15 (New Orleans).
3. **Miki Nonaka**, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Masami Sugihara, Seiji Shiraishi, Kanako Miyano, Hiroshi Hosoda, Shosei Kishida, Kenji Kangawa, Takashi Sakurai and Yasuhito Uezono. "Therapeutic potential of ghrelin and des-acyl ghrelin for the chemotherapy-induced cardiotoxicity", International Symposium on Ghrelin and Energy Metabolism Homeostasis, 2017.4.22-23 (Kyoto).

4. **Miki Nonaka**, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Masami Sugihara, Seiji Shiraishi, Kanako Miyano, Hiroshi Hosoda, Shosei Kishida, Kenji Kangawa, Takashi Sakurai and Yasuhito Uezono. “Therapeutic effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on doxorubicin-induced cardiotoxicity”, The 62th Annual Meeting of the Biophysical Society, 2018.2.17-21 (San Francisco).
5. **Miki Nonaka**, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Masami Sugihara, Hiroshi Hosoda, Shosei Kishida, Miaki Uzu, Kenji Kangawa, Takashi Sakurai and Yasuhito Uezono. “Therapeutic effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on anthracycline doxorubicin-induced cardiac toxicity”, The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018.7.1-6 (Kyoto).
6. Ueno Susumu, **Miki Nonaka**, Ryo Kakigi, Nagomi Kurebayashi, Takashi Murayama, Kiyoshi Terawaki, Takashi Sakurai and Yasuhito Uezono. “Therapeutic effects of voluntary wheel running on cardiac dysfunction induced by cancer cachexia”, The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018.7.1-6 (Kyoto).
7. 野中美希、上園保仁 “腫瘍循環器学 - がん治療ならびにがん悪液質によって起こる心機能障害発現メカニズムの解明 - (シンポジウム: Cardio-oncology の潮流 と新たな展開)”, 第 92 回日本薬理学会年会、2018.3.14-16, 大阪

他 16 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。