

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10788

研究課題名(和文) がん性サルコペニアに対する特異的マーカーの確立とHMGB1標的化による抑制

研究課題名(英文) Study on marker and control of cancer sarcopenia

研究代表者

藤井 澄 (Fujii, Kiyomu)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60284189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん性サルコペニアにおけるHMGB1のサルコペニア誘導機序を解明し、ヒトにおけるがん性サルコペニアの血中マーカーとして有用であることを示した。さらに、HMGB1が中鎖脂肪酸による食事介入により低下し、がん性サルコペニアを軽減することを見出した。これらのことは、がん患者における血中HMGB1を測定することががん性サルコペニアの予測と程度の評価に有効であるとともに、HMGB1の食事介入による制御ががん性サルコペニアの予防・改善に繋がることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で示唆されたHMGB1によるがん性サルコペニアの予測・評価はがん性サルコペニアを簡便に評価・治療することを可能にする。さらに、中鎖脂肪酸という栄養成分を用いた食事介入がHMGB1を制御できることは、簡便かつ低価格ながん性サルコペニアの予防・改善をもたらす。今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the mechanism of HMGB1 inducing sarcopenia in cancer sarcopenia and showed that it is useful as a blood marker for cancer sarcopenia in human patients. Furthermore, we found that HMGB1 was reduced by dietary intervention with medium-chain fatty acids and reduced cancer sarcopenia. For these reasons, measuring blood HMGB1 in cancer patients is effective in predicting and evaluating the degree of cancer sarcopenia. It has been also suggested that control of HMGB1 by dietary intervention leads to prevention and improvement of cancer sarcopenia.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：がん性サルコペニア HMGB1 中鎖脂肪酸 炎症性サイトカイン 悪液質

1. 研究開始当初の背景

がん性サルコペニアは、がん悪液質に共通する病態から惹起されると考えられるが、このような異化が亢進した状態は、がん患者の 80% に認められ、30% では死因に深く関係する。また、がん性サルコペニアは、がん患者の社会活動性を制限すると同時に、がん治療への忍容性を低下させ予後を不良にする。このため、がん性サルコペニアの予防・軽減は、がん患者の活動性保持と抗がん治療の改善に直結する。しかし、

一方、がん性サルコペニアの診療は、診断と治療の両面に問題を有している。がん性サルコペニアの診断は、現在、多くの場合画像診断による骨格筋面積・面積率や骨格筋脂肪変性率から行われている。しかし、がん患者のほとんどは高齢者であり、老化やメタボリック症候群などがん以外の原因により種々の程度サルコペニアを既に有する可能性があり、がん発症後の評価を健常人と比較するサルコペニアの診断では、真のがん性サルコペニアを正確に評価することは困難である。このように、個人の病前の生活歴・病歴の影響を受けない、第一義的ながん性サルコペニアのマーカーは確立されておらず、適切な介入を困難にしている。有効で適切な治療を行うためには、がん性サルコペニアの病態に基因した特異的なマーカーの確立が必要である。

2. 研究の目的

がん性筋萎縮の原因には、がん細胞が散在する炎症性サイトカインが重視されており、これまでも TNF- α 、IL-6 や TGF- β が重視されている (Patel HJ, Life Sci. 2017; VanderVeen BN, Oxid Med Cell Longev. 2017)。申請者らは、炎症性サイトカイン・ネットワークの活性化に強く関与する HMGB1 が、がん細胞から放出され骨格筋細胞に対して直接オートファジーを誘導すること、および、筋組織が分解されて放出されたアミノ酸をがん細胞がエネルギー源として利用していることを報告している (右図、Luo Y, Cancer Res, 2014)。HMGB1 は、壊死細胞から放出されることが知られており (Scaffidi P, Nature. 2002)、化学療法による腫瘍壊死に伴い血中濃度が著増し、残存腫瘍細胞の活性化と宿主免疫の抑制をもたらす (Luo Y, Eur J Cancer, 2014)。さらに、申請者らは担癌マウスモデルを用い、担癌動物の 5-FU 処理によるサルコペニアの増悪を見出した (森拓也、川原勲 他、日本癌学会総会、2017)。実際の臨床において、化学療法に伴ってサルコペニアが増悪することはしばしば経験され、胃食道癌で術前化学療法を受けた患者の 57% にサルコペニアが認められたとされる (Awad S, Clin Nutr. 2012)。その原因として HMGB1 が重要な役割を果たしていることが考えられる。

本研究では、筋代謝障害に基づく特異性の高い血中がん性サルコペニア・マーカーをプロテオーム解析やミトコンドリア活性解析などにより抽出する。治療についても、がん細胞から分泌され骨格筋にオートファジーを誘導することからがん性サルコペニアの原因として重視される HMGB1 を標的として、これに抑制作用を有する小分子化合物を同定し治療応用の可能性を検討する。本研究の成果は、がん性サルコペニアの治療のみならず、がん治療有効性促進、治療後のがん患者の社会活動性の改善にも有効と考えられる。

3. 研究の方法

以下のような計画に従って研究を行った。

がん性サルコペニアの血中マーカーの検討

HMGB1 の標的化

4. 研究成果

マウス結腸癌発癌モデルと皮下腫瘍モデルを使用し HMGB1 のがん性サルコペニアとの関連を検討した。結腸癌発癌モデルは C57BL/6 マウス (5 週令・オス) を使用し、1,2-dimethylhydrazine (DMH) を 40 mg/kg を腹腔内に週 1 回を 10 週間注射にて播種し作成した。皮下腫瘍モデルにおいては、BALB/c マウスの肩甲骨間の皮下に同系の大腸癌細胞株である CT26 を $1 \times 10^7 / 0.2$ mL を投与し作成した。各モデルには PBS を使用した対照群も作成し、比較検討した。各モデルの骨格筋萎縮と HMGB1 の関係を検証するため、腫瘍内、血中、筋内の炎症性サイトカイン、HMGB1 の濃度を測定した。また骨格筋特異的には HMGB1 レセプターである HMGB1 受容体 (RAGE) や TLR4、骨格筋萎縮の指標とし

てオートファジー関連タンパクの検索やミトコンドリアの代謝を検索した。またこれらの実験は適宜培養実験においても検証を実施した。骨格筋には発癌モデル、腫瘍モデルで萎縮が誘導された。腹水中の HMGB1、TNF- α は高値を示した。オートファジー誘導ストレスタンパク質 HMGB1 の発現は、マウス悪液質モデルの筋肉において増加した。この効果は、終末糖化産物最終産物に対する HMGB1 受容体 (RAGE) を介した、筋肉中のピルビン酸キナーゼ PKM1 およびピルビン酸キナーゼ活性の発現低下と関連していた。骨格筋では、HMGB1 の添加によりリン酸化 mTOR の低下とオートファジー実行タンパク質発現増加によりオートファジーが誘導された。その結果、血漿グルタミンは増加し、癌細胞におけるグルタミン取込みとグルタミ

ンからの Warburg 効果が促進された。本実験結果より、腫瘍から放出される HMGB1 が骨格筋のオートファジーを促進し、癌におけるエネルギー代謝を促進することが確認された。これらの所見は、HMGB1 ががん関連骨格筋萎縮と癌進展をもたらす原因である可能性を示唆すると考えられた。

昨年度実施した動物実験の結果を踏まえ、本年度は結腸直腸癌死後の患者の骨格筋とバイオマーカーを分析することにより、悪液質における骨格筋萎縮のパラメーターを同定した。本研究

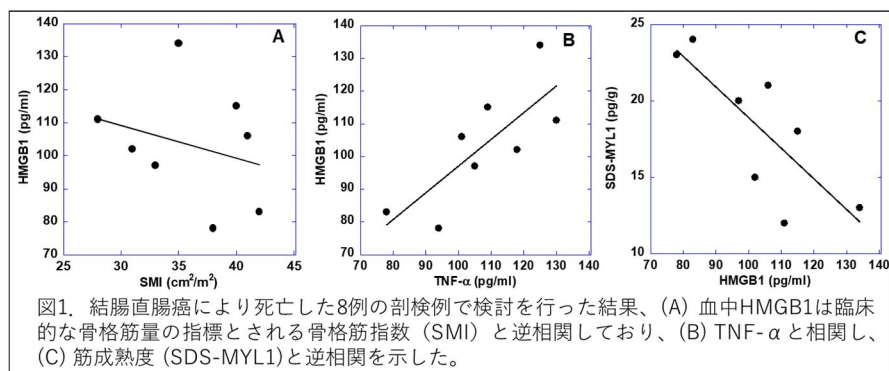


図1. 結腸直腸癌により死亡した8例の剖検例で検討を行った結果、(A) 血中HMGB1は臨床的な骨格筋量の指標とされる骨格筋指数 (SMI) と逆相関しており、(B) TNF- α と相関し、(C) 筋成熟度 (SDS-MYL1) と逆相関を示した。

では、臨床的な悪液質のマーカーである、体重減少、ボディマスインデックス、骨格筋指数 (SMI)、腫瘍量の指標として血清 CEA、悪液質関連サイトカインとして血清 TNF- α 、血清 IL-6、血清 HMGB-1、および、骨格筋成熟度のマーカーである腰筋の SDS 可溶性ミオシン軽鎖 I (SDS-MYL1) について、結腸直腸癌 (CRC) により死亡した 8 例の剖検例で検討を行った (図 1)。この結果、SMI と MYL1、HMGB1、および TNF- α の間に有意な正の相関が認められた。MYL1 と TNF- α 、MYL1 と HMGB1、SMI と TNF- α の間には有意な負の相関が確認された。さらに、TNF- α の増加もマウス悪液質モデルで確認され、これは SDS-MYL1 の減少と関連していた。これらの結果は、TNF- α が HMGB1 などと相関してがん性悪液質における骨格筋萎縮の関連バイオマーカーとなることが示唆された。

近年、中鎖脂肪酸 (MCFA) は、高カロリーにおいても、生体内の代謝が速く体内蓄積も無いことから、サルコペニアの栄養介入において注目されているが、HMGB1 に対する作用は明らかではない。また、MCFA の骨格筋における直接的効果を検証した報告も見られない。本年度は BALB/c マウスを用い 2%、5%、10% の濃度別ラウリン酸 (LAA) 食が骨格筋に及ぼす影響を検証した。体重と骨格筋重量は 5% 群、10% 群で対照群と比較し減少した。2% 群にて酸化ストレスの減少、ミトコンドリア量の増加が確認され、10% 群にてミトコンドリア量、SDS 可溶性ミオシン軽鎖の減少が確認された。次に、マウス骨格筋細胞株である C2C12 筋芽細胞と分化誘導した筋管細胞を用い、対照群、LAA 処理群の 48 時間培養での増殖能とミトコンドリア量を検証した。筋芽細胞の増殖能は対照群と比較し LAA 低濃度群で増加、LAA 高濃度群で低下し、ミトコンドリア量は LAA 低濃度群で増加、LAA 高濃度群では低下した。筋管細胞は LAA 高濃度群でミトコンドリア量が低下した。また、LAA と同時に HMGB1 を投与し C2C12 筋芽細胞の成熟度を検討すると、LAA 処理によりオートファジーは抑制され SDS 可溶性ミオシン軽鎖の減少も認められなかった。これらの知見から、至適濃度における MCFA はミトコンドリアを活性化し、HMGB1 感受性を低下し、骨格筋萎縮を抑制した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 12件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Mori Takuya, Ohmori Hitoshi, Luo Yi, Mori Shiori, Miyagawa Yoshihiro, Nukaga Shota, Goto Kei, Fujiwara Tani Rina, Kishi Shingo, Sasaki Takamitsu, Fujii Kiyomu, Kawahara Isao, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 110
2. 論文標題 Giving combined medium chain fatty acids and glucose protects against cancer associated skeletal muscle atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3391 ~ 3399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujiwara-Tani Rina, Sasaki Takamitsu, Ohmori Hitoshi, Luo Yi, Goto Kei, Nishiguchi Yukiko, Mori Shiori, Nakashima Chie, Mori Takuya, Miyagawa Yoshihiro, Kawahara Isao, Fujii Kiyomu, Kishi Shingo, Tatsumoto Naokuni, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 86
2. 論文標題 Concurrent Expression of CD47 and CD44 in Colorectal Cancer Promotes Malignancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 182 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000496027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kusuoka O, Fujiwara-Tani R, Nakashima C, Fujii K, Ohmori H, Mori T, Kishi S, Miyagawa Y, Goto K, Kawahara I, Kuniyasu H	4. 巻 52
2. 論文標題 Intermittent calorie restriction enhances epithelial-mesenchymal transition through alteration of energy metabolism in a mouse tumor model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 413-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2017.4229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakashima C, Yamamoto K, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Matsushima S, Fujii K, Ohmori H, Sasahira T, Sasaki T, Kitadai Y, Kirita T, Kuniyasu H	4. 巻 109
2. 論文標題 Expression of cytosolic malic enzyme (ME1) is associated with disease progression in human oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2036-2045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishi S, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Kawahara I, Goto K, Fujii K, Ohmori H, Nakashima C, Sasaki T, Kuniyasu H	4. 巻 15
2. 論文標題 Pro-metastatic signaling of elaidic acid, a trans fatty acid, is associated with lipid rafts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 4423-4426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.7817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakashima C, Kishi S, Fujiwara-Tani R, Luo Y, Kawahara I, Goto K, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H	4. 巻 15
2. 論文標題 Expression of the long-chain fatty acid receptor GPR40 was associated with cancer progression in colorectal cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 8641-8646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsushima-Otsuka S, Fujiwara-Tani R, Sasaki T, Ohmori H, Nakashima C, Kishi S, Nishiguchi Y, Fujii K, Luo Y, Kuniyasu H	4. 巻 9
2. 論文標題 Significance of intranuclear angiotensin-II type 2 receptor in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget 9(93): , 2018	6. 最初と最後の頁 36561-36574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyagawa Y, Mori T, Goto K, Fujiwara-Tani R, Kishi S, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kawahara I, Kuniyasu H	4. 巻 17
2. 論文標題 Intake of medium-chain fatty acids induces oxidative stress and to atrophy the myocardium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lipids in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12944-018-0908-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara-Tani R, Sasaki T, Luo Y, Ohmori H, Nishiguchi Y, Kishi S, Mori S, Goto K, Kondoh M, Kuniyasu H*	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-claudin-4 extracellular domain antibody enhances the antitumoral effects of chemotherapeutic and antibody drugs in colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 37367-37378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasaki Takamitsu, Mori Shiori, Kishi Shingo, Fujiwara-Tani Rina, Ohmori Hitoshi, Nishiguchi Yukiko, Hojo Yudai, Kawahara Isao, Nakashima Chie, Fujii Kiyomu, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 21
2. 論文標題 Effect of Proton Pump Inhibitors on Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3877 ~ 3877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyagawa Yoshihiro, Nukaga Shota, Mori Takuya, Fujiwara-Tani Rina, Fujii Kiyomu, Mori Shiori, Goto Kei, Kishi Shingo, Sasaki Takamitsu, Nakashima Chie, Ohmori Hitoshi, Kawahara Isao, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation of cancer-derived myocardial impairments using a mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 3712 ~ 3722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Mori Shiori, Kishi Shingo, Honoki Kanya, Fujiwara-Tani Rina, Moriguchi Takuma, Sasaki Takamitsu, Fujii Kiyomu, Tsukamoto Shinji, Fujii Hiromasa, Kido Akira, Tanaka Yasuhito, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 21
2. 論文標題 Anti-Stem Cell Property of Pterostilbene in Gastrointestinal Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9347 ~ 9347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21249347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nukaga Shota, Mori Takuya, Miyagawa Yoshihiro, Fujiwara Tani Rina, Sasaki Takamitsu, Fujii Kiyomu, Mori Shiori, Goto Kei, Kishi Shingo, Nakashima Chie, Ohmori Hitoshi, Kawahara Isao, Luo Yi, Kuniyasu Hiroki	4. 巻 111
2. 論文標題 Combined administration of lauric acid and glucose improved cancer derived cardiac atrophy in a mouse cachexia model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4605 ~ 4615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮川良博, 森 拓也, 後藤 桂, 川原 勲, 藤井 澄, 大森 斉, 國安弘基
2. 発表標題 がん悪液質は心筋細胞内の酸化ストレスの蓄積、オートファジーを亢進し、細胞の萎縮を誘導する
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakashima C, Yamamoto K, Kishi S, Sasaki T, Ohmori H, Fujiwara-Tani R, Mori S, Fujii K, Nishiguchi Y, Kondoh M, Tadaaki K, Kuniyasu H
2. 発表標題 Clostridium perfringens enterotoxin activates YAP in oral squamous cell carcinomas
3. 学会等名 79th Annual Meeting of Japanese Association for Cancer, Hiroshima (ハイブリッド開催), 2020.10.1-3
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良県立医科大学分子病理学HP
<http://www.naramed-u.ac.jp/~molepath/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	國安 弘基 (Kuniyasu Hiroki) (00253055)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	羅 奕 (Luo Yi) (30633797)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	
研究分担者	川原 勲 (Kawahara Isao) (80524975)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関