

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591674

研究課題名(和文) アディポネクチンの肺癌及び肺疾患に与える影響

研究課題名(英文) The effects of adiponectin on lung cancer and lung disease

研究代表者

土谷 智史 (TSUCHIYA TOMOSHI)

長崎大学・病院・講師

研究者番号：30437884

研究成果の概要(和文)：肺癌及び肺疾患に与える影響について、ヒト由来アディポネクチンを高発現しているトランスジェニック(Tg)マウスを使用して、エラスターゼ吸入モデル、VEGF 受容体阻害モデル、LPS(lipopolysaccharide)投与による急性肺障害モデルを作成したが、アディポネクチンによる抑制効果はみられなかった。肺癌の皮下移植モデルでは、予想に反して自由摂食群の Tg マウスの腫瘍だけが有意に増大した。この原因として、病理組織像では、Tg マウスの脂肪細胞は wild type に比べ小さく、遺伝子発現では p 21、p 16 の mRNA 発現は抑制され、p 21、p 53 の蛋白発現も抑制されていたことから、Tg マウスでは、脂肪組織内の恒常性が、“若い状態”に保たれ、そのため肺癌細胞株が Tg マウス皮下に移植された場合、腫瘍がむしろ増殖してくるのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：In order to find out the effect of adiponectin on lung cancer and lung disease, we made elastase inhalation model, VEGF receptor blocker model, and LPS administration model. However obvious inhibitive effects were not observed. In the subcutaneous lung cancer cell injection model, the regular diet group of Tg mice showed increase tumor size and weight. Because the size of adipocytes were small and mRNA expressions of p21 and p16 and protein expressions of p21 and p53 were suppressed in adipose tissue of Tg mice, we presume the tissues of Tg mice are kept homeostasis in “young”, which might induce cancer growth in adipose tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2600,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1430,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：胸部外科学

科研費の分科・細目：

キーワード：アディポネクチン、リポポリサッカライド、小胞体ストレス、肺気腫、肺癌

1. 研究開始当初の背景

現代人は栄養多寡の状態にある。近年、肥満(特に内臓のまわりに付着した脂肪)がさまざまな生活習慣病を引き起こすことが分

かり、このような状態はメタボリックシンドロームとされ、治療の対象とされるようになってきた。このメタボリックシンドロームの元凶であるとされる脂肪は、TNF- α 、レプチン、アディポネクチン(Adiponectin)等の幾

つかの成長因子を産生しているが、これらの因子は発癌に密接に関係しているとの報告がなされている (Brakenhielm et al. Proc Natl Acad Sci 2007)。

アディポネクチンは、豊富に存在する血清タンパク質で、現在までにインスリンの効果を高めて血糖値を下げる働き、糖代謝に関わる AMP-activated protein kinase(AMPK)を活性化し、食欲を増加させる働き等が報告されている(Kubota et al. Cell Metab 2007)。また、肥満者の脂肪で産生能が低下し血中濃度も低下しており(Arita et al. Biochem Biophys Res Commun 1999)、レプチン、TNF- α の働きへ抑制的であると考えられている。

最近、小田部らにより、ヒト由来アディポネクチンを高発現しているトランスジェニック(Tg)マウスの報告がなされたが、驚いたことに、このマウスは摂食量に関係なく寿命が延長し、特に高カロリー脂肪食の場合で著しかった(Otobe et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007)。

この理由はまだ良くわかっていないが、その一つとして腫瘍の発生率が Tg マウスで低いことが挙げられた。この機序としては、高カロリー脂肪食で酸化ダメージの指標である尿中 8-OHdG レベルが低いことから、DNA ダメージが低いのではないかと推測されている。一方で、アディポネクチンの血管新生抑制効果が、癌の成長抑制に働いているとする報告もある(Brakenhielm et al. Proc Natl Acad Sci 2007)。

アディポネクチンの抗炎症作用も分かってきた。ヒト由来アディポネクチン Tg マウスでは、脂肪中へのマクロファージ浸潤が殆ど見られなかった。ELISA による解析では、アディポネクチンは TNF- α で誘導される単球の大動脈内膜への接着と IkB の活性化を抑え、VCAM-1、selectin E、ICAM-1 の発現も抑えていた (Otobe et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007)。しかし一方で、アディポネクチンノックアウトモデルでは腎臓や肝臓の線維化が起きることも知られている。

アディポネクチンは大腸癌、乳癌、子宮内膜癌、前立腺癌、皮膚癌など種々の癌を抑制効果するとされるが、肺癌との関係について研究されたものは皆無である。また、肺の嚢胞性線維症の患者で血清アディポネクチンが上昇していることが分かっているが(Moriconi et al. J Clin Endocrinol Metab 2006)、実際にアディポネクチンの上昇が、嚢胞性線維症の原因なのか、あるいは結果なのかははっきりしない。

このような観点から、ヒト由来アディポネ

クチン Tg マウスを使用して、肺癌モデル、肺気腫、肺線維症モデルを作製し、コントロール群と比較して、どれだけその病態に抑制的に働くか、あるいは誘導的に働くのか評価したいと考えた。

2. 研究の目的

この研究では、このヒト由来アディポネクチン Tg マウスを使用し、幾つかのモデルを作製し、病理組織学的検討、遺伝子学的検討を行った。

- (1) 肺線維症モデルおよび肺気腫モデルの作製；コントロールおよび Tg マウス気道内にブレオマイシンあるいはエラスターゼを投与し、肺線維症または肺気腫抑制効果をみる。
- (2) 肺癌発生モデルの作製；コントロールおよび Tg マウスに発癌物質を投与し、肺癌の発生率を比較。
- (3) 肺癌発育モデルの作製；コントロールおよび Tg マウス皮下または胸腔内に肺癌細胞を移植し、肺癌の増殖を比較。

以上から、下記を具体的な目的とした。

- (1) 肺において、アディポネクチンが実際に癌や線維化に対して抑制的に働くのか、病理組織学的に明らかにする。
- (2) どのような機序で発癌や癌の発育を抑えるのか、また線維化を抑制するのか、採取した組織より遺伝子、蛋白を抽出し、網羅的解析を行う。
- (3) 細胞培養系を使用し、網羅的解析より予想されるシグナル伝達経路が、実際に動いているのか証明する。

3. 研究の方法

(1) ヒト由来アディポネクチン Tg マウス肺気腫モデル、急性肺障害モデルの作製と病理学的検討、遺伝子学的検討

① 雄 12 週齢 C57BL/6N マウス(コントロール)と Tg マウス各群 6~7 匹の気道内に、ブタ腺エラスターゼ 50 単位を生食 50 μ l に溶解して経気管的に散布し、21 日経過したものを肺気腫モデル(早期)とし (各群 n=5~7)。コントロール群に対しては、同様にして生食 50 μ l を経気管的に散布(各群 n=5)。さらに、ブタ腺エラスターゼ 5 単位を生食 50 μ l に溶解して経気管的に散布し、3 ヶ月経過したものを肺気腫モデル(慢性期)とした (各群 n=5)。

同様に雄 12 週齢 C57BL/6N マウス(コントロール)と Tg マウス各群 6~7 匹に VEGF 阻害剤 SU5416 を 20mg/kg 皮下注射した。投与から 21 日経過したものを肺気腫モデルと

した。

両モデルとも3週目に病理学的変化が現れるとされており、その時点で屠殺し、それぞれのモデルの病理学的検索を行った。

②LPS 誘発急性肺障害モデルに対するアディポネクチン過剰発現の影響を調べた。これは、アディポネクチンが小胞体にかかるストレス(ER stress)を抑制して、蛋白発現をスムーズに行わせるという働きが分かかってきたことから、LPS 投与で ER stress を増加させた場合、Tg マウスではこのストレスが抑制され、これが生存に寄与するのではないかと考えたからである。

実験としては、雄 24 週齢 C57BL/6N マウス(コントロール)の自由摂食群、食事制限群 Tg マウス自由摂食群、食事制限群の各 4 群 6~7 匹に LPS(10mg/kg)を腹腔内投与した。

(2)ヒト由来アディポネクチン Tg マウス肺癌発生モデルの作製

雄 6 週齢 C57BL/6N マウス(コントロール)と Tg マウス各群 10~15 匹を非発癌群と発癌群の 2 群に分け、発癌群に Urethane(1mg/g)(2 型肺胞上皮やクララ細胞において代謝され、肺腫瘍を発生させる)を週 1 回、全 10 回腹腔内投与し、初回投与後 36 週目で屠殺、腫瘍の発生・増殖を調べた。

(3) ヒト由来アディポネクチン Tg マウス肺癌発生モデルの作製と病理学的検討、遺伝子学的検討

皮下移植モデル：雄 24 週齢 C57BL/6N マウス(コントロール)の自由摂食群、食事制限群、高脂肪食群、Tg マウスの自由摂食群、抗脂肪食群の各 5 群 6~7 匹に、Lewis 肺癌細胞株(5×10⁵ 個)を皮下に注入した。2 週間連日腫瘍径をモニターし、投与 2 週間後に屠殺、腫瘍を摘出し、形態学および分子生物学的検索を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト由来アディポネクチン Tg マウス肺気腫モデル、急性肺障害モデルの作製と病理学的検討、遺伝子学的検討

①早期肺気腫モデル(エラスターゼ投与 21 日目)と慢性期肺気腫モデル(エラスターゼ投与 3 ヶ月目)は、いずれも Tg 群で肺気腫による平均肺胞径の増加は抑えられていたものの、有意差はなかった。

このモデルで、AMPK pAMPK Akt pAkt の蛋白発現、PCNA Ki-67 による増殖能の比較、TUNEL assay、cleaved caspase-3 の蛋

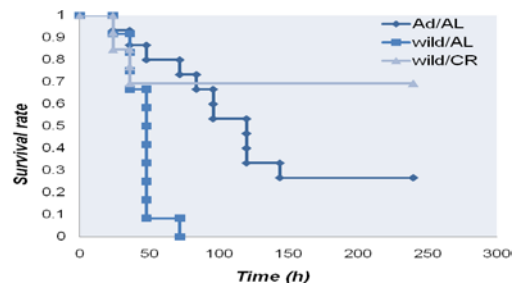
白発現の比較によるアポトーシスの差を測定したが、有意差は認められなかった。

②VEGF 阻害剤(SU5416)使用、肺気腫モデル(投与後 21 日目)でもやはり Tg 群で肺気腫による平均肺胞径の増加は抑えられていたものの、有意差はなかった。

このモデルでも、TNF- α MMPs AMPK pAMPK Akt pAkt の蛋白発現、PCNA Ki-67 による増殖能の比較、TUNEL assay、cleaved caspase-3 の蛋白発現の比較によるアポトーシスの差を測定したが、有意差は認められなかった。

③LPS 誘発急性肺障害モデルでは、Tg マウスはコントロールに比べ、有意に予後良好(0 vs. 25%)で、さらに食事制限群は 100%生存した。小胞体ストレスに関する SEAP activity は、全ての群で 4 時間から 8 時間で最低値を示したが、各群に有意差はなかった。

0、6、24 時間後の BALF と血清の TNF- α と adiponectin、GRP78、XBP-1、CHOP、eIF2 α 、ASK-1、JNK、p38、cleaved caspase-3 の western blot による蛋白発現、AdipoR1、AdipoR2 の mRNA 発現に有意差はなかった。

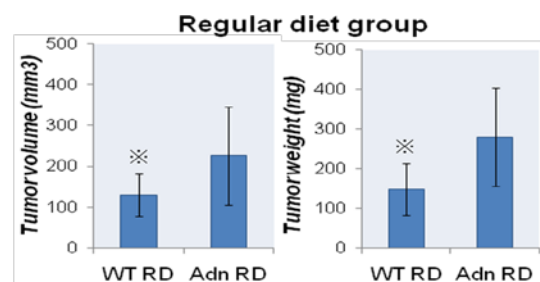


(2)ヒト由来アディポネクチン Tg マウス肺癌発生モデルの作製

Urethane(1mg/g)腹腔内投与では、コントロール群を含め、腫瘍は発生しなかった。

(3) ヒト由来アディポネクチン Tg マウス肺癌発生モデルの作製と病理学的検討、遺伝子学的検討

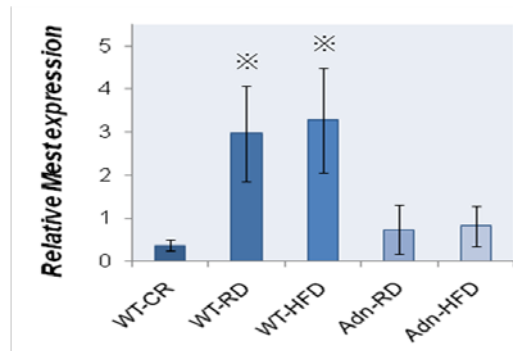
Lewis 肺癌細胞株皮下投与後 2 週間後に屠殺、腫瘍を摘出したところ、予想に反して自由摂食群の Tg マウスの腫瘍だけが腫瘍容積・重量計測ともに有意に増大した。



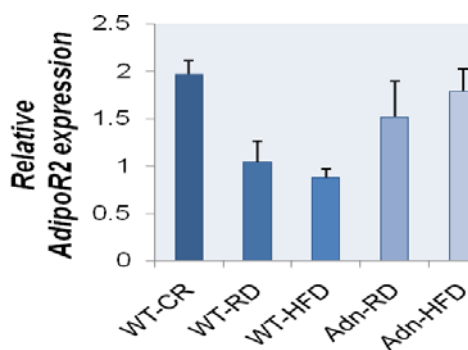
組織学的には、腫瘍細胞そのものには差はなかったが、脂肪組織のサイズが Tg マウスで有意に小さく、周囲の環境が腫瘍の発育に関連しているのではないかと仮説をたてた。

脂肪組織のいろいろな遺伝子の mRNA の発現を測定したところ、遺伝子発現は主に 3 パターンに分けられた。まず、寿命延長モデルと考えられる、野生型の食餌制限群、アディポネクチンの自由摂食群と高脂肪食群で発現が増加し、野生型の自由摂食群と高脂肪食群で発現が低下するパターン 1。次に、その逆の野生型の食餌制限群、アディポネクチンの自由摂食群と高脂肪食群で発現が低下し、野生型の自由摂食群と高脂肪食群で発現が増加するパターン 2。いずれも有意にならないパターン 3

まず脂肪細胞のサイズに関連した Mest/Peg1 の発現、老化関連遺伝子では、p21、p16 の発現、脂肪から出されるアディポサイトカインでは、レプチン、Ccl2、CD68 の発現が、パターン 1 を示し、蛋白発現でも、免疫沈降で、p53、p21 の発現が同様の動きをしていた。また脂肪酸経路の UCP2 がパターン 1 の動きを示した。



アディポサイトカインのレジスチンとマウス由来アディポネクチン、ミトコンドリア関連遺伝子では PGC1、脂肪酸経路では、adipoR2、PPAR α がパターン 2 を示した。



ER stress 関連の spliced Xbp1、CHOP 遺伝子の発現に有意差はなく、蛋白発現では

Western blot で、eIF2a、p-eIF2a、アポトーシス関連の cleaved caspase-3 の発現に差はなかった(パターン 3)。分化増殖シグナルでは、PPAR γ 、Erk-1、p27、mtTFA で、一定の傾向を示さなかった。ストレス反応遺伝子では、Gadd45 発現が野生型食餌制限群で有意に高い以外は、catalase、spliced Xbp1 等、一定の傾向を示さなかった。

以上を 3 年で行い、細胞培養系の実験には到達できなかった。現在、Tg 群、コントロール群の腫瘍成分の遺伝子発現の網羅的解析を行っている。また、脂肪についても同様に網羅的解析を行っている。

まとめと考察

まず、ヒト由来アディポネクチン Tg マウス肺気腫モデル、急性肺障害モデルの作製と病理学的検討、遺伝子学的検討では、エラストラーゼ吸入モデルと VEGF 受容体阻害モデルの 2 つの肺気腫誘発モデルを作成し、Tg マウスと野生型の反応の形態学的変化を比較したが、差はみられなかった。アディポネクチンは肺気腫変化に対しては、効果がないのかもしれない。

一方で、LPS(lipopolysaccharide) 投与による急性肺障害モデルでは、Tg マウスで有意に生存率が改善しており、分泌蛋白作成の場である小胞体へのストレスが低下していると考えられたが、それを直接示す SEAP activity は、全ての群で 4 時間から 8 時間で最低値を示したものの、各群に有意差はなかったため、小胞体ストレスとは別の機序が働いていると考えられた。

アディポネクチンは一般に抗腫瘍効果があるとされているが、Tg マウス肺癌発育モデルの作製と病理学的検討、遺伝子学的検討では、予想に反して肺癌腫瘍は Tg マウスの自由摂食群で有意に増大していた。

病理組織像では、Tg マウスの脂肪細胞は、wild type に比べ、小さい。遺伝子学的解析では、Tg マウスでは自由摂食群も高脂肪食群でも p 21、p 16 の mRNA 発現は抑制され、p 21、p 53 の蛋白発現も抑制されていた。これは、Tg マウスでは、脂肪組織内の恒常性が保たれ、“若い状態”であり、そのため肺癌細胞株が Tg マウス皮下に移植された場合、腫瘍がむしろ増殖してくるのではないかと考える。現在、網羅的解析を行って、その推論を支持するカスケードがあるか、解析中である。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）

蒲原涼太郎、下川功 Overexpression of regulators/ senescence-related signals in adipose tissue The 1st Nagasaki-Pusan Joint Seminar on Aging Research February 18-19, 2011 福岡

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 智史 (TSUCHIYA TOMOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：30437884

(2) 研究分担者

永安 武 (NAGAYASU TAKESHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80284686

下川 功 (SHIMOKAWA ISAO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70187475

田川 努 (TAGAWA TSUTOMU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：20363492

(3) 連携研究者

樋上 賀一 (HIGAMI YOSHIKAZU)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：30437884