

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07787

研究課題名（和文）Gut-muscle axisに着目したがんサルコペニアの病態解明と新規治療開発

研究課題名（英文）Pathological study of cancer-related sarcopenia focusing on the Gut-muscle axis and development of new treatments

研究代表者

石川 剛（ISHIKAWA, TAKESHI）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：90372846

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がんサルコペニア病態形成における腸内細菌叢の関与をマウスモデルで検討した。マウスを腫瘍移植の有無及び食餌における水溶性食物繊維含有の有無で4群にわけ検討を行なった。体重と腓腹筋重量は腫瘍移植により有意に低下したが、水溶性食物繊維の摂取はそれらの減少を有意に抑制した。腸内細菌叢、腸内代謝産物、血中生理活性物質、骨格筋遺伝子発現の解析から、水溶性食物繊維の摂取は担がんに伴う腸内環境の乱れを是正し、腸管バリア機能の是正や短鎖脂肪酸産生増加などを介して、担がんに伴う全身性の炎症反応を抑制し、骨格筋での蛋白異化を抑制することによってがんサルコペニア進展を抑制することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんサルコペニアはがん患者の生活の質(QOL)を低下させ、様々な治療に抵抗性を示し、予後にも悪影響を与えていることが報告されているが、未だ有効な治療法はない。本研究は、がんサルコペニアの病態形成においてgut-muscle axisが存在することを証明し、担がんに伴う腸内細菌叢の変化が腸内環境・腸内代謝産物を変化させ、全身性の炎症を惹起することで骨格筋異化を亢進しているというメカニズムを明らかにした。さらに水溶性食物繊維による腸内環境の是正ががんサルコペニアの進展を抑制することを示し、gut-muscle axisが新たながんサルコペニア治療の標的となる可能性を示した点で臨床的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：The involvement of the intestinal microbiota in the pathogenesis of cancer sarcopenia was investigated in a mouse model. Mice were divided into four groups according to the presence or absence of tumor transplantation and the presence or absence of soluble dietary fiber in the diet. Body weight and skeletal muscle weight were significantly decreased by tumor transplantation, but the intake of soluble dietary fiber significantly suppressed these reductions. Analysis of intestinal microbiota, metabolites, circulating bioactive substances, and gene expression in muscle revealed that soluble dietary fiber intake improves the intestinal environment in tumor-bearing mice, suppresses the systemic inflammatory response through the correction of intestinal barrier function and increased production of short chain fatty acids, resulting in suppression of protein catabolism in skeletal muscle. These results indicate that the gut-muscle axis is a potential therapeutic target for cancer sarcopenia.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がんサルコペニア 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

がんサルコペニアは患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、がん治療における副作用の増加や予後不良との関連が報告されている。有効な治療法はなく、加齢性サルコペニアと異なった角度での研究・治療法開発が必要と考えられている。一方、腸内細菌叢は代謝・炎症・免疫など広く生体の恒常性維持に関わり、多様な疾患の発症・増悪に関わっている可能性が指摘されているが、がんサルコペニアとの関連に焦点をあてた研究はない。加齢性サルコペニア病態形成と腸内細菌叢の構成変化(dysbiosis)との関連性について少数の報告がなされ、gut-muscle axis という観点から加齢性サルコペニアを理解する試みが精力的に進められている。がんサルコペニアの病態を” gut-muscle axis” という観点から解明しようとする試みはないが、加齢に伴う dysbiosis、慢性炎症・免疫低下などは、進行がんにおいても認める病態であり、がんサルコペニアにおける gut-muscle axis の存在を仮定することには十分な科学的合理性があり、本研究課題を発案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが有するマウスがんサルコペニアモデルを用いて、①gut-muscle axis の観点から腸内細菌叢が骨格筋蛋白の同化/異化にどのように影響しているのか、腸管バリア機能・炎症・免疫・代謝の側面から解析し、サルコペニア病態形成への腸内細菌叢による攪乱機序を解明することである。さらに、②腸内細菌叢 dysbiosis や腸管バリア破綻への是正効果を有することを申請者らが確認済の各種介入法によるがんサルコペニア新規治療法開発の可能性を探ることである。

3. 研究の方法

〈がんサルコペニア マウスモデル〉

7 週齢 Balb/c マウスを水溶性食物繊維グァーガム分解物 (PHGG) 含有の食餌群(fiber rich diet; FR 群)と食物繊維を含まない食餌群 (fiber free diet; FF 群) にわけ、マウス結腸がん由来細胞株 colon-26 を皮下移植しがんサルコペニアモデルを作成した。これらの体重、両側腓腹筋重量の測定、筋肉内のタンパク代謝関連の網羅的遺伝子解析、免疫組織学的な結腸上皮の粘液層の評価、血中サイトカイン解析、腸内細菌叢の 16S rRNA 解析、便中短鎖脂肪酸(short chain fatty acid: SCFA)解析を行なった。

〈解析項目〉

- ✓ 腸管バリア機能：ex vivo バリア機能測定、粘液量、tight junction 蛋白の定量。
- ✓ 細菌叢代謝産物：盲腸内容物の短鎖脂肪酸の分析
- ✓ 血中サイトカインの測定 (BioPlex サイトカインアレイ) ・生理活性物質 (myostatin, activinA)、菌体成分 (LPS) の測定
- ✓ 骨格筋における遺伝子発現解析 (Affymetrix GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array)
- ✓ 腸内細菌叢の構成比較：16S rRNA メタゲノム解析

〈筋管細胞株を用いた in vitro の検討〉

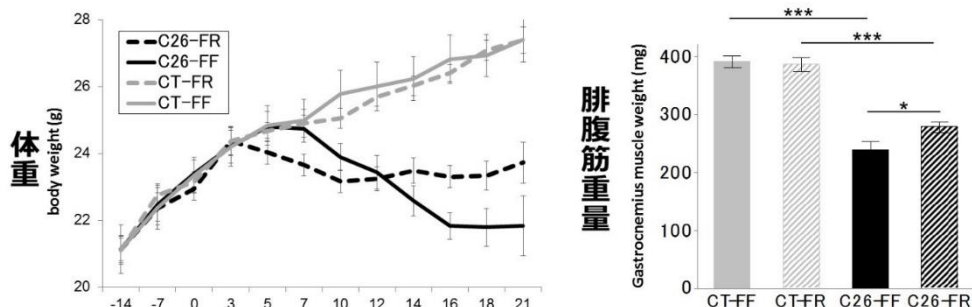
SCFA の骨格筋に及ぼす影響を検証するため、C2C12 myoblast を筋管細胞に分化させ in vitro 実験を行なった。筋管細胞を短鎖脂肪酸存在/非存在下で培養し、筋萎縮関連遺伝子などの発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 食物繊維の多寡ががんサルコペニア病態形成に影響する

がん細胞を移植していないコントロール (CT) マウスにおいては、食餌中の水溶性食物繊維の多寡は体重および腓腹筋重量に影響を及ぼさなかった。一方、大腸がん細胞を移植したマウス (C26) においては、食物繊維を含まない食餌で飼育された CR-FF 群で顕著な体重および腓腹筋重量の減少を認め、C26-FR 群ではそれらの減少が抑制された (図 1)。腫瘍のサイズには両群間で差は認めなかった。

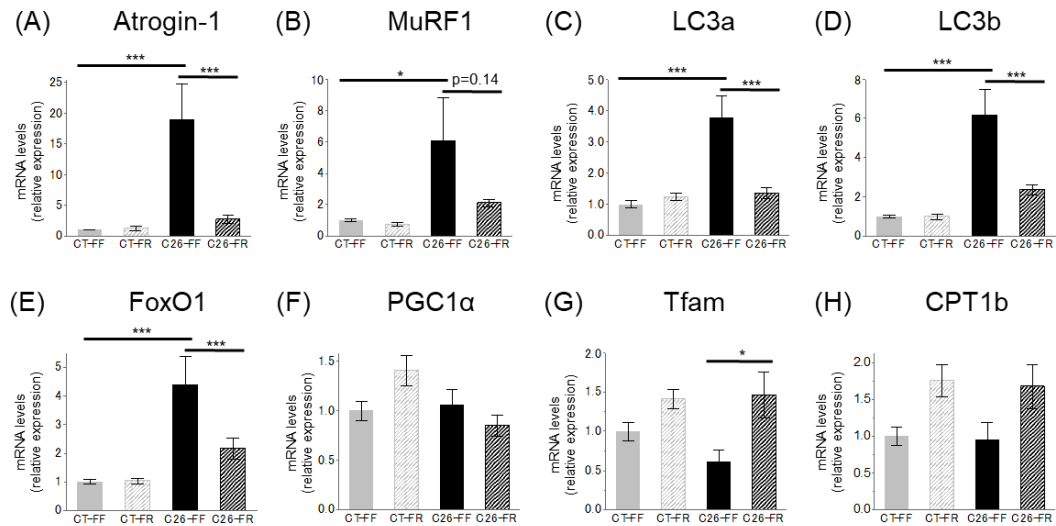
図 1



(2) 水溶性食物繊維含有の食餌は担がんマウス骨格筋における筋萎縮関連遺伝子発現亢進を抑制する

腓腹筋におけるがん移植後 day21 における遺伝子発現を RT-PCR で解析すると、代表的な筋萎縮関連ユビキチンリガーゼ Atrogin-1, MuRF1, オートファジー関連遺伝子 LC3a, b, FoxO1 は、FR 群では FF 群と比較して顕著に低下していた。ミトコンドリア生合成マーカーである Tfam は C26-FR 群で C26-FF 群に比し有意に上昇していた(図 2)。骨格筋を用いた包括的マイクロアレイ解析においても、がん細胞移植により MuRF1 や Atrogin-1 などのユビキチンリガーゼや LC3b, Bnip3, Cathepsin L などのオートファジーマーカーとその制御因子である FoxO3 の発現が亢進し、水溶性食物繊維投与によりこれらの発現が抑制されていることが確認された。

図2



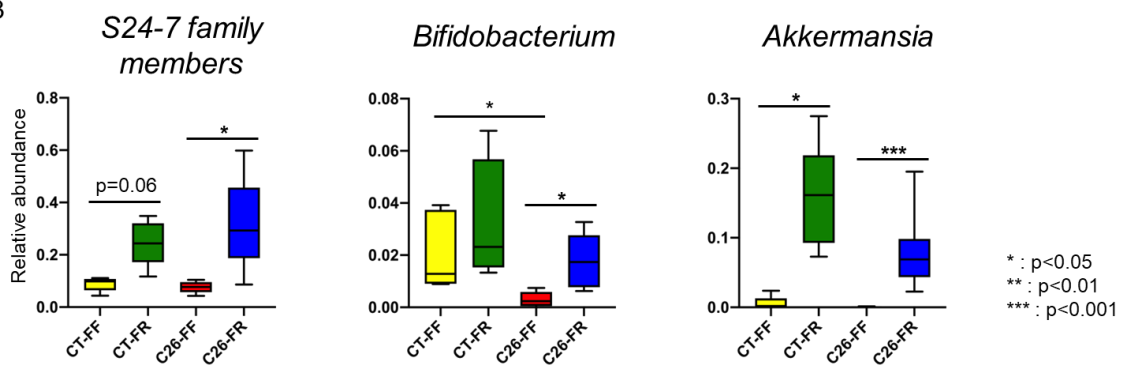
(3) 水溶性食物繊維の欠乏は腸管粘液層を減少させ細菌の上皮内への浸潤・循環 LPS (LBP) /IL-6 を惹起する

FF 群の結腸上皮では、粘液層の菲薄化および細菌の上皮内への侵入像が観察された。さらに、FF 群では血中 lipopolysaccharide binding protein (LBP) および IL-6 は有意に上昇していたが、C26-FR 群ではそれらは部分的に抑制されていた。がん悪液質の関連性が報告されている TNF- α , IFN- γ , IL-1 β については、各群間で有意な差は認めなかった。

(4) 水溶性食物繊維食は粘液産生菌や SCFA 産生菌を増加させる

腸内細菌叢の解析では、FR 群 FF 群と比較して、Bifidobacterium 属、Akkermansia 属といった腸管粘液層の維持に必要とされる菌種、S24-7 科といった SCFA 産生菌の増加が見られた。

図3



(5) 便中の SCFAs と筋管細胞への影響

便中 SCFA 解析では、FR 群は FF 群と比較して、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、総 SCFA 濃度は有意に高かった(図 4)。C2C12 筋管細胞を用いた in vitro 実験では、C2C12 細胞を LPS 刺激し、SCFA 存在下/非存在下で培養したところ、LPS 刺激により誘導される筋管細胞径の縮小(萎縮)は、SCFA を添加することで抑制された。遺伝子発現解析では、Atrogin-1 は LPS+SCFA 群では LPS 単独群と比較して有意に低下し、ミトコンドリア生合成のキー遺伝子である PGC1 α は有意に上昇していた(図 5)。

図4

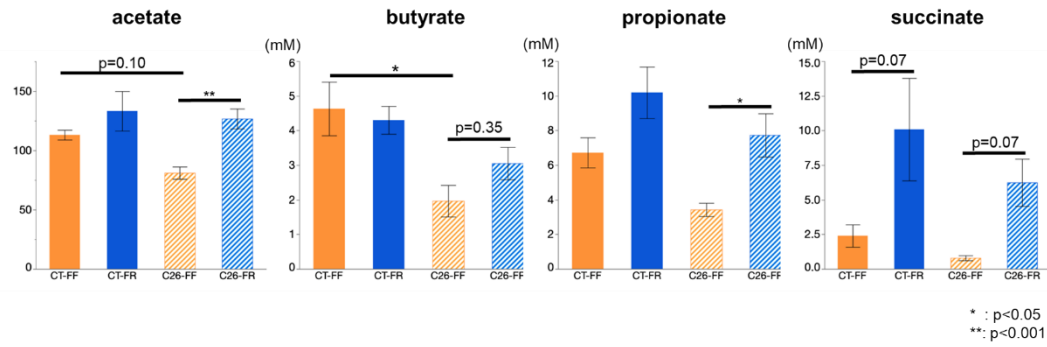
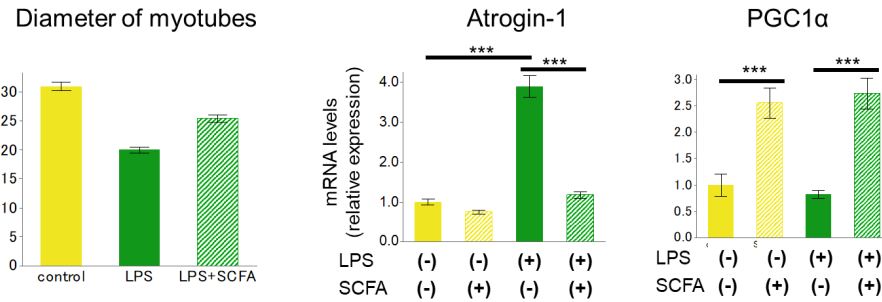


図5



以上の結果より、担がん状態が腸内環境を変化させ、それによる腸管バリア機能の変化を介して全身性の炎症作用を誘導し、がん起因する骨格筋減少を増強させることが示唆された。さらに、水溶性食物繊維の摂取は、腸管バリア機能の修復および SCFA 産生増加など腸内環境を是正することで、がんサルコペニアの病態改善に寄与することが明らかとなった。

本研究は、がんサルコペニアの病態形成において Gut-muscle axis が存在することを証明し、それが新たながんサルコペニアの治療標的となる可能性を示した点で、臨床的意義の大きい研究成果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Ota Takayuki, Ishikawa Takeshi, Sakakida Tomoki, Endo Yuki, Matsumura Shinya, Yoshida Juichirou, Hirai Yasuko, Mizushima Katsura, Oka Kaname, Doi Toshifumi, Okayama Tetsuya, Inoue Ken, Kamada Kazuhiro, Uchiyama Kazuhiko, Takagi Tomohisa, Konishi Hideyuki, Naito Yuji, Itoh Yoshito | 4. 巻 70 |
| 2. 論文標題 Treatment with broad-spectrum antibiotics upregulates Sglt1 and induces small intestinal villous hyperplasia in mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition | 6. 最初と最後の頁 21~27 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.21-42 | 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 Sakakida Tomoki, Ishikawa Takeshi, Doi Toshifumi, Morita Ryuichi, Endo Yuki, Matsumura Shinya, Ota Takayuki, Yoshida Juichiro, Hirai Yasuko, Mizushima Katsura, Higashimura Yasuki, Inoue Ken, Okayama Tetsuya, Uchiyama Kazuhiko, Takagi Tomohisa, Abe Aya, Inoue Ryo, Itoh Yoshito, Naito Yuji | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Water soluble dietary fiber alleviates cancer induced muscle wasting through changes in gut microenvironment in mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15306 | 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 Yoshida J, Ishikawa T, Endo Y, Matsumura S, Ota T, Mizushima K, Hirai Y, Oka K, Okayama T, Sakamoto N, Inoue K, Kamada K, Uchiyama K, Takagi T, Naito Y, Itoh Y | 4. 巻 44(1) |
| 2. 論文標題 Metformin inhibits TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transition and liver metastasis of pancreatic cancer cells. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncol Rep | 6. 最初と最後の頁 371-381 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7595 | 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 - |

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Sakakida T, Ishikawa T, Uchino J, Tabuchi Y, Komori S, Asai J, Arai A, Tsunozuka H, Kosuga T, Konishi H, Hongo F, Inoue M, Hirano S, Ukimura O, Taguchi T, Takayama K, Itoh Y. | 4. 巻 20(4) |
| 2. 論文標題 Safety and tolerability of PD-1/PD-L1 inhibitors in elderly and frail patients with advanced malignancies. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncol Lett | 6. 最初と最後の頁 14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11875 | 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 Sakakida T, Ishikawa T, Chihara Y, Harita S, Uchino J, Tabuchi Y, Komori S, Asai J, Narukawa T, Arai A, Tsunozuka H, Kosuga T, Konishi H, Moriguchi M, Yasuda H, Hongo F, Inoue M, Hirano S, Ukimura O, Itoh Y, Taguchi T, Takayama K. | 4. 巻 22(6) |
| 2. 論文標題 Safety and efficacy of PD-1/PD-L1 blockade in patients with preexisting antinuclear antibodies. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clin Transl Oncol | 6. 最初と最後の頁 919-927 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12094-019-02214-8 | 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 - |

〔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 Tomoki Sakakida, Takeshi Ishikawa, Ryuichi Morita, Katsura Mizushima, Yasuko Hirai, Tetsuya Okayama, Toshifumi Doi, Kazuhiro Katada, Kazuhiko Uchiyama, Tomohisa Takagi, Yuji Naito and Yoshito Itoh |
| 2. 発表標題 Potential of targeting the gut-muscle axis for the treatment of cancer related sarcopenia |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 榊田智喜, 石川剛, 伊藤義人 |
| 2. 発表標題 Gut-muscle axisを標的としたがんサルコペニア治療の可能性 |
| 3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

| | | |
|---|------------------------------------|----------------------------|
| 産業財産権の名称 ユビキチンリガーゼ阻害組成物、及びこれを含むガンによって誘導されたカヘキシアを改善するための予防及び / 又は治療用組成物 | 発明者 石川 剛、小関 誠、安部 綾、内藤 裕二、高木 智久、 | 権利者 京都府立大学 法人、太陽化学 株式会社 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特開2022-111399 | 取得年 2022年 | 国内・外国の別 国内 |

〔その他〕

-

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 | 内藤 裕二 (Naito Yuji) (00305575) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303) | |
| 研究 分 担 者 | 岡山 哲也 (Okayama Tstsuya) (30636535) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303) | |

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 |
|---------|---------|
| | |