

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19405

研究課題名(和文) がん性骨格筋萎縮の機構解明に基づくビタミンD投与の有用性検討

研究課題名(英文) Usefulness of vitamin D administration based on elucidation of the mechanism of cancerous skeletal muscle atrophy

研究代表者

宮川 良博 (Miyagawa, Yoshihiro)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・ジェロサイエンス研究センター・研究員

研究者番号：70867291

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)：がん悪液質(CC)は進行期がん患者において頻繁に発症するが具体的な治療法は開発されていない。本研究では、まずin vitro CCモデルを作製したところ、このモデルにおいて筋管細胞の萎縮、Vdr発現の増加を認めた。次に骨格筋特異的Vdr欠損マウスを用いてCCモデルを作製したところ、CCにおいて骨格筋のVdrをノックアウトすることで、筋重量の減少、筋線維横断面の縮小が認められた。さらに、Vdrのノックアウトにより前脛骨筋において筋萎縮関連因子の発現量が増加した。これらの結果より、CCにおいて骨格筋ではVdrの発現が亢進するが、これは筋萎縮に抵抗するための防御的な反応である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん悪液質でのVDRの役割について骨格筋特異的VDR欠損マウスとがん悪液質モデルを組み合わせた初めての報告であり、VDRの発現増加が筋萎縮に抵抗するための反応である可能性を示す重要な知見である。今後、他のがん細胞を用いた悪液質モデルにおいても同様の反応を示すか検証していく必要があるが、本研究結果はがん悪液質による骨格筋萎縮に対し、VDRを標的とした治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer cachexia frequently develops in patients with advanced-stage cancer and is an important prognostic factor, but no specific treatment has been developed to date. In this study, we first generated an in vitro model of cancer cachexia, which showed atrophy of myotubular cells and increased Vdr expression. Next, we generated a cancer cachexia model using skeletal muscle-specific Vdr-deficient mice, and found that knockout of Vdr in skeletal muscle in cancer cachexia resulted in a decrease in muscle weight and a reduction in myofiber cross-sectional area. Furthermore, knockout of Vdr markedly increased the expression of muscle atrophy-related factors in the tibialis anterior muscle. These results suggest that the increased expression of Vdr in skeletal muscle in cancer cachexia may be a protective response to resist muscle atrophy.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん悪液質 骨格筋 ビタミンD 骨格筋萎縮 がんリハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

悪液質は基礎疾患に関連して生ずる、筋肉量の減少を特徴とした複合的代謝異常症候群と定義される (Evans, et al. (2008) *Clin Nutr*, 27 (6): 793-9.)。中でもがん由来する悪液質は、進行期がん患者の約 80%に発症し、そのうち約 30%において直接の死因となることが報告されている (Fearon, et al. (2013) *Nat Rev Clin Oncol*, 10 (2): 90-9.)。このような悪液質では患者の日常生活動作が制限され QOL が低下し、さらに化学療法などの治療に対する耐性も低下することが予後の悪化に寄与するが (Argiles, et al. (2014) *Nat Rev Cancer*, 14: 754-762.)、現在までに具体的な治療法は開発されていない。

骨格筋萎縮は、がん悪液質の最も重要な特徴の一つである。これは主に、様々なタンパク質分解系、特にユビキチン-プロテアソーム依存性経路 (Baracos, et al. (1995) *Am J Physiol*, 268: E996-1006.) とオートファジーを含むタンパク質異化反応の活性化に由来する。しかし、他のメカニズム、例えばタンパク質合成のダウンレギュレーション、および筋原性反応の障害も筋量の減少に寄与することが示唆されている。骨格筋萎縮と予後の関係に着目すると、アクチビンレセプタータイプ b 阻害剤により骨格筋においてミオスタチンシグナルを阻害し筋量を増加させることで、腫瘍の成長に関わらず生存率が改善することが動物実験レベルで報告されている (Zhou, et al. (2010) *Cell*, 20;142(4): 531-43.)。また、ヒトにおいても筋量と生命予後は相関することが示されており、がん悪液質において筋量を維持、改善することが治療を継続し予後を改善する上で重要である。

骨格筋萎縮に対する介入としては運動療法と栄養介入が挙げられ、がん悪液質に対する栄養介入の有効性については科学的エビデンスが蓄積されつつある。このことは、がん悪液質で生じる骨格筋の質的变化に着目した栄養介入の確立が、その後のリハビリの有効性をも改善することを示唆しており、さらに筋萎縮に対する栄養と運動の相乗効果も期待される。

体内で産生される栄養素の一つであるビタミン D は、加齢に伴ってその血中レベルが低下し、その受容体であるビタミン D 受容体 (VDR) の発現も減少することから加齢性筋萎縮との関連が強く疑われており、ビタミン D 補充療法は加齢に伴う骨格筋萎縮 (サルコペニア) に対する治療・予防剤として期待されている。しかしその一方で、がん悪液質患者におけるビタミン D 投与の筋萎縮予防効果は限定的であることも知られている。現状、がん悪液質患者に対するビタミン D 補充療法の有効性の低さを説明し得る明確な理由は明らかではないが、がん細胞を皮下移植して作出したがん悪液質マウスモデルでは、血中ビタミン D 濃度に関わらず骨格筋 VDR の発現が亢進しており、がん悪液質患者における VDR の発現調節不全の可能性が示されている (Camperi, et al. (2017) *Oncotarget*, 8 (13): 21778-21793.)。これらの知見は、がん悪液質に由来する筋萎縮にビタミン D - VDR シグナルの変調が関与することを示唆しており、VDR 発現と筋萎縮の関連性を明らかにすることは新たな治療法の開発に貢献すると期待される。

2. 研究の目的

ビタミン D は既に加齢性筋萎縮に対する一定の予防効果が示されており、ビタミン D をがん悪液質に対するリハビリに併用することが出来れば、“加齢”と“がん”を併発する「がんサルコペニア患者」に対しても強力な治療手段となり得る。そこで本研究では、サルコペニアにおける有用性が示されているビタミン D 補充療法のがん悪液質患者への適用の可能性を示すため、遺伝子組換えマウスを用いた実験手法により「がん悪液質によって誘発される骨格筋での VDR 発現亢進とがん悪液質性筋萎縮との関連性」を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

筋萎縮モデルとして、マウス骨格筋細胞株 Ric10 とマウス大腸がん細胞株 C26 を用いて *in vitro* がん悪液質モデルを作製した。12well プレート (well 底面積: 3.8cm²) に Ric10 を 2.0×10^4 個ずつ播種し、増殖培地 (20%FBS 混合 DMEM) でサブコンフルエントとなるまで CO2 インキュベーター内 (37 °C, 10% CO2) で 48 時間培養した。サブコンフルエントを確認した後、分化培地 (2% Horse Serum 混合 DMEM) に交換し筋管細胞への分化を誘導した。さらに 48 時間後、筋管細胞の形成を確認した後に介入培地に交換し、その 48 時間後に筋細胞径を測定、また RNA を回収した。筋管細胞径は、1well あたり 100 細胞の最大膨隆部とその両側 200 μ m の細胞径を測定し、平均値を算出した。介入培地は Ric10 と C26 をそれぞれサブコンフルエントで分化培地を用いて 48 時間培養した培養液を回収し、C26 の培養液を悪液質誘導培地 (Cachexia)、Ric10 の培養液をコントロール培地 (Control) としてそれぞれ使用した。

マウスがん悪液質モデルは、C26 を腹腔内に播種することで作製した。C26 は RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich, MO, US) に FBS を 10% 混合したものをを用いて培養した。

(2) 実験動物

まず *Myf6*^{CreERT2} マウスと *Vdr*-floxed (*Vdr*^{flox}) マウスを交配することで *Myf6*^{CreERT2/CreERT2} : *Vdr*^{flox/flox} マウスを作出した。その後、*Myf6*^{CreERT2/CreERT2} : *Vdr*^{flox/flox} マウスと *Vdr*^{flox} マウスを交配することで *Myf6*^{CreERT2/wt} : *Vdr*^{flox/flox} マウスを作出し、これを実験に用いた。マウスは通常の明暗サイクル (12 時間 - 12 時間) で飼育され、餌・水については自由摂取とした。

(3) 筋線維特異的 VDR 欠損マウスがん悪液質モデルの作製

作出した *Myf6*^{CreERT2/wt} : *Vdr*^{flox/flox} マウスについて、*Vdr* をノックアウトせず C26 を接種しない (Ctrl+NC)、*Vdr* をノックアウトし C26 を接種しない (cKO+NC)、*Vdr* をノックアウトせず C26 を接種する (Ctrl+C26)、*Vdr* をノックアウトし C26 を接種する (cKO+C26) の 4 群に分けた (n=5~6)。cKO+NC 群、cKO+C26 群については生後 5 週の時点でタモキシフェン (Tam; 1 mg/10 g body weight) を腹腔内に 5 日間連続投与することで、筋線維での *Vdr* ノックアウトを誘導した。その後 6 週齢時に Ctrl+C26、cKO+C26 群のマウスに対し、C26 を 2.0×10^7 個ずつ腹腔内に播種しがん悪液質モデルを作製した。C26 の接種後、体重、食餌の摂取量、飲水量を毎日測定し、がん細胞の接種から 7 日後に安楽殺した。安楽殺後、前脛骨筋 (TA)、長趾伸筋 (EDL)、腓腹筋 (Gast)、ヒラメ筋 (Sol)、精巣上体脂肪を採取しその重量を測定した。重量を測定した後、液体窒素中で急速凍結し -80 で保存した。一連の動物実験は、国立長寿医療研究センター動物実験取扱規程に則り実施した。

(4) 筋線維横断切片解析

マウスがん悪液質モデルにおいて採取した前脛骨筋を、冷却したイソペンタン中で凍結し、OCT コンパウンドに包埋した後に液体窒素中で凍結した。凍結した組織は、7- μ m に薄切し 4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で固定した。その後免疫染色のために、10% NGS / PBS で室温にて 1 時間ブロッキングし、さらに一次抗体として Anti-Laminin (1:1000; Sigma-Aldrich) と 4 で一晩インキュベートした。一次抗体とのインキュベーションの後、二次抗体として anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor-488 (1:1000; Thermo Fisher Scientific, MA, US) を使用し室温にて 1 時間インキュベートした。また、核染色には DAPI in anti-fading reagent (Thermo Fisher Scientific) を使用した。組織像は蛍光顕微鏡 (BZ-X810, Keyence, Osaka, Japan) を用いて撮影し、ImageJ ソフトウェア (Bharti Airtel, New Delhi, India) を用いて各筋線維の断面積 (CSA) を算出した。

(5) Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis

マウスがん悪液質モデルから採取した前脛骨筋において、TRI Reagent (Cosmo Bio, Ltd) を用いて全 RNA を抽出した。その後、PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio) を用いて、全 RNA 2 μ g から cDNA を合成した。qPCR 反応は、SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Inc.)、Nuclease-free water、Forward primer、Reverse primer、cDNA 1 μ l を混合し、CFX-96 Real-Time System (BioRad) を用いて行った。得られた結果は、*Gapdh* をリファレンス遺伝子とし、CT 法により各因子の発現量を定量した。

(6) Western blotting

採取した TA について、SDS-HBSS (1% SDS, 150mM NaCl, 10mM HEPES) 可溶化バッファーによりパイオマッシャーを用いて組織を破碎した。破碎したサンプルを 5 分間ソニケーションし、4, 12,000rpm, 15 分間冷却遠心し上清をタンパク質抽出サンプルとして回収した。その後タンパク質抽出液：試料緩衝液 (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を 5:1 の比率で混合し 95 で 5 分加熱処理した。電気泳動には PowerPac HC (Bio rad, CA, US)、SuperSep Ace 10% (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を用い、タンパク質を 30 μ g アプライし 200V、0.03A、6W で泳動した。泳動が完了した後に、Trans-blot TurboTransfer system (Bio rad) を用いてメンブレンへ転写し、その後 5% スキムミルクによりブロッキングを行った。一次抗体には Fbx32 (Abcam, Cambridge, UK)、p70S6K (Cell Signaling Technology, MA, US)、phospho p70S6K (Cell Signaling Technology)、GAPDH (Mouse monoclonal antibody, Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation) を用いて 5% スキムミルクにて 1/1,000 (Fbx32, p70S6K, phospho p70S6K)、1/10,000 (GAPDH) に希釈し 4 で一晩インキュベートした。二次抗体には Anti-Rabbit IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology)、Anti-Mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling Technology) を使用し、5% スキムミルクにて 1/2,500 に希釈し室温で 1 時間インキュベートした。その後 Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, MA, US) を使用し Amersham Imager 680 (GE Healthcare) でシグナルを検出した。

4. 研究成果

(Ric10 悪液質モデルにおいて筋管細胞は萎縮し *Vdr* の発現が上昇した)

Ric10 において C26 の培養上清を用いた悪液質の誘導により、筋管細胞径は対照群と比較し周

図に縮小した。また、このモデルから全 RNA を抽出し qPCR により遺伝子発現を定量したところ、Myh2 の有意な発現低下、Vdr の有意な発現上昇が確認された。

(Vdr cK0 マウスががん悪液質モデルは、顕著な脂肪と骨格筋の萎縮を示した)

本実験に使用したマウスについて、TA から RNA を抽出し、遺伝子発現量を定量した。その結果、タモキシフェンを投与したマウスにおいて Vdr 発現の有意な減少が確認された。C26 を播種したがん悪液質モデルでは、悪液質でないマウスと比較し脂肪重量が有意に減少しており、またこの傾向は cK0+C26 群でより強かった。さらに骨格筋の重量については、EDL では cK0+C26 群で、Sol では cK0+NC、cK0+C26 群で、TA、Gast については cK0+NC、Ctrl+C26、cK0+C26 群でそれぞれ Ctrl+NC 群と比較し有意に減少した。加えて Sol、TA、Gast については Ctrl+C26 群と cK0+C26 群の間にも有意差を認めた。

(筋線維横断面積は C26 悪液質モデルで萎縮傾向にあり、Vdr cK0 マウスでより顕著であった)

採取した TA について横断切片を作製し、Laminin 免疫染色像をもとに ImageJ を用いて筋線維横断面積を算出した結果、Vdr cK0 と C26 による悪液質の誘導でそれぞれ縮小する傾向が認められ、さらに cK0+C26 群では Ctrl+NC 群と比較し有意に CSA が縮小した。

(Vdr cK0 ががん悪液質モデルにおいて、筋萎縮関連因子の発現が顕著に増加した)

採取した TA から RNA を抽出し qPCR により各因子の発現量を定量した結果、*Murf1*、*Atrogin1*、*Foxo1*、*Gdf8* の発現が cK0+C26 群において有意に増加した。一方で、筋タンパク質合成に関与する因子については発現量の変化はなかった。また、TA からタンパク質を抽出しウェスタンブロッティングにより *Murf1*、*Fbx32*、*p70S6K*、phospho-p70S6K の発現量を定量した結果、*p70S6K* と phospho-p70S6K の発現量に差はなかったが、cK0+C26 群において *Fbx32* の有意な増加が確認された。

本研究より、がん悪液質において 骨格筋での Vdr 発現が上昇すること、さらに Vdr をノックアウトすることで筋重量、筋線維横断面積が減少すること、加えてこの変化の背景に 筋萎縮関連因子の発現が上昇していることが示された。

がん悪液質モデルにおいて骨格筋 Vdr の発現が上昇することは Camperi らの報告と一致する。Vdr の発現は循環ビタミン D レベルにより正に制御されることがよく知られているが、がん悪液質における骨格筋 Vdr 発現の上昇は循環ビタミン D レベルに関わらず引き起こされることが示されており、VDR シグナル伝達経路のリガンド非依存的な調節変化ががん悪液質による骨格筋萎縮に関与している可能性が示唆される。骨格筋において VDR は未分化な細胞で発現レベルが高く、分化が進むにつれその発現は減少し、成体筋や分化した筋管における VDR の発現は非常に低いことが報告されている。加えて BaCl₂ による筋損傷後にビタミン D を注入すると筋再生が遅延することも報告されており、筋の成熟のためには VDR シグナルが抑制される必要があるとされる。これらの知見を考慮すると、がん悪液質により骨格筋で VDR の発現が増加することで、筋再生の最終段階での成熟が阻害され筋萎縮を誘導している可能性がある。つまりがん悪液質での骨格筋において VDR シグナルは筋量を負に制御していると考えられ、我々は筋線維特異的に Vdr をノックアウトすることで筋萎縮を抑制できるか検討した。

しかしながら、がん悪液質での Vdr のノックアウトは筋重量のさらなる減少、加えて筋線維径の縮小も助長する結果となった。骨格筋において Vdr をノックアウトすることで、筋力、筋重量が低下することが過去に報告されている。本研究で作製したがん悪液質モデルの骨格筋では、横断切片の解析結果より炎症や筋再生を示す所見は観察されず、このモデルでの筋萎縮が VDR の発現亢進による筋線維の成熟阻害の結果である可能性は低いと考えられる。筋線維での Vdr のノックアウトは Myostatin の発現を増加させ、さらにビタミン D の欠乏により筋組織で Myostatin や *Murf1*、*Atrogin1* の発現増加、ミトコンドリアの機能低下が誘導されることが示されている。このように Atrogene の発現が増加する背景には、Vdr のノックアウトにより *Foxo1* の発現が増加することが示されており、ビタミン D を補充することで *Foxo1* の発現は抑制される。つまり VDR シグナルは *Foxo1*-Atrogene を介した筋タンパク質異化経路に対し抵抗性に作用する。本研究のがん悪液質モデルにおいて Vdr をノックアウトすることにより、*Foxo1* の発現は有意に増加し、さらに *Murf1*、*Atrogin1* の発現量についても顕著な増加が確認された。この結果は、がん悪液質での骨格筋における *Foxo1*-Atrogene シグナルの亢進に対し、VDR が抑制的に作用していることを示唆している。つまり、がん悪液質における骨格筋での VDR の発現亢進は、筋タンパク質異化経路の亢進に対する防御反応である可能性がある。がん悪液質の進展に伴い、骨格筋での *Murf1*、*Atrogin1* の発現量が増加することは良く知られているが、その増加量は対照群と比較し 2~5 倍程度である。一方で本研究における Vdr cK0 マウスががん悪液質モデルでは、*Murf1*、*Atrogin1* の発現量の増加はおよそ 20 倍であり、タンパク質レベルにおいても *Fbx32* の有意な増加が確認され、悪液質での筋萎縮に抵抗する上での VDR シグナルの重要性を示唆している。

本研究は、がん悪液質での VDR の役割について骨格筋特異的 VDR 欠損マウスとがん悪液質モデルを組み合わせた初めての報告であり、VDR の発現増加が筋萎縮に抵抗するための反応である

可能性を示す重要な知見である。本研究で作製したマウスモデルでは、筋組織においてがん悪液質による筋再生所見を認めなかったが、HeらやColettiらが作製したがん悪液質モデルでは、筋細胞膜の損傷を含むリモデリングや筋再生所見を観察しており、これらのモデルではCamperiらの報告が示すようにVDRの発現増加が筋再生過程の最終段階の成熟を阻害している可能性がある。このように、がん悪液質モデルを作製するがん細胞の種類やマウスの系統により筋組織での反応が異なり、それぞれにおいてVDRの作用も異なることが考えられ、本研究の限界はその点について検証できていないことである。今後C26による悪液質モデルのみでなく、他のがん細胞を用いた悪液質モデルにおいても*Vdr*のノックアウトによりAtrogeneの発現増加や筋萎縮の増大が認められるかについて検証していく必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------