

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K09314  
研究課題名（和文）腸内フローラをターゲットとした新規がん悪液質治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new therapeutic strategies for cancer cachexia targeting gut microbiota

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、広域抗生剤投与により、マウスの空腸腺管に過形成が生じ、空腸粘膜におけるグルコーストランスポーターであるSglt1の発現が亢進し、抗生剤投与マウスにおいては空腹時血糖が上昇することを確認した。また、マウスがん悪液質モデルでの検討では、食餌中の水溶性食物繊維は、がん悪液質進展に対して抑制的に働いており、prebioticsなどによる腸内細菌叢を標的とした新規がん悪液質治療開発の可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
がん悪液質は進行がん患者の80%に認められ、骨格筋減少を主とする体重減少と食欲不振といった症状を呈し、患者の生活の質を著しく損ない、さらには生存率に悪影響を及ぼすことが報告されているが有効な治療法は開発されていない。本研究では、腸内細菌叢を標的とした治療戦略が、がん悪液質進展を制御できる可能性をマウスモデルで提示した。水溶性食物繊維の経口投与による腸内細菌叢への介入が、がん悪液質にみられる骨格筋減少を抑制する可能性を示したことは、有効な治療法がないこの領域においてその臨床的意義は極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that the administration of broad-spectrum antibiotics induced intestinal hyperplasia in jejunum and enhanced the expression of intestinal glucose transporter, Sglt1, resulting in elevation of fasting blood glucose in broad-spectrum antibiotics-treated mice. Furthermore, in our mouse cancer cachexia model, we have shown that the water-soluble dietary fiber had a suppressive effect on the development of cancer cachexia. These results indicate the possibility of developing a new cancer cachexia treatment targeting the gut microbiota by prebiotics.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん悪液質 腸内細菌叢

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

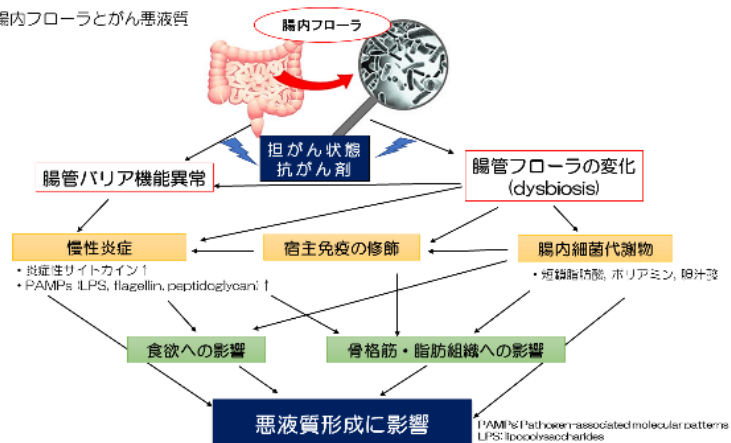
### 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトと腸内細菌の共生関係に関する研究が進展し、腸内フローラは代謝・炎症・免疫など広く生体の恒常性維持に関わっている事実が解明されてきた。がんの発生・進展との関連においても、腸内フローラの関与について多くの研究が行われているが、がん悪液質に焦点をあてた腸内フローラ研究はほとんどない。

がん悪液質は患者のQOLを著しく損ね、生命予後にも関わることから、その解決は極めて重要な臨床的課題であるが、有効な治療法はなく、新規治療法開発が望まれる。われわれは、がん悪液質進展の主要因と考えられる”炎症”に着目して、基礎的・臨床的研究を行ってきた。その中で、がん悪液質マウスモデルにおいて、がん微小環境における炎症の質的・量的差異が循環サイトカイン量を変化させ、脂肪重量および筋肉重量といった悪液質の表現型にも影響を及ぼすことを証明した(引用文献①)。また、がん悪液質患者の血清を用いた検討において、がん悪液質に伴う様々な症状が炎症性サイトカインと関連していることを実証した(引用文献②)。われわれも含め多くの研究者が、がん悪液質は全身の炎症反応を基盤とする複合的代謝異常と考えており、腸内フローラが全身の免疫・炎症・代謝に大きく影響を及ぼすとの知見から、腸内フローラはがん悪液質の形成・進展にも影響を及ぼす可能性が高いと考えた(図1)。

われわれの担がん悪液質マウスモデルと腸内フローラ研究手法を発展させれば、がん悪液質治療の新たな治療法開発につながる基盤的研究になると考え、本研究を立案した。

図1. 腸内フローラとがん悪液質



### 2. 研究の目的

- (1) 抗生剤の投与は肥満や糖尿病などの代謝異常のリスクであることが報告されているが、そのメカニズムの詳細は明らかにされていない。がん悪液質モデルにおける検討を始めるに際し、非担がんマウスにおける広域抗生剤投与が糖吸収および小腸上皮に及ぼす影響を検討する。
- (2) マウスがん悪液質モデルを用いて、広域抗生剤を投与することにより dysbiosis を惹起し、がん悪液質の表現型がどのように変化するかを検討し、腸内フローラががん悪液質形成に及ぼす影響を明らかにする。
- (3) 腸内細菌より食物繊維などから分解・産生されるいくつかの短鎖脂肪酸 (butyrate, propionate) は抗炎症作用、ミトコンドリア機能修飾、インスリン感受性の亢進など多彩な生理活性を有し、骨格筋での蛋白合成を促進する。われわれは水溶性食物繊維グアーガム分解物 (PHGG) に腸内細菌叢改善作用、抗炎症作用があることを見出しており (Inoue, et al. J Clin Biochem Nutr. 2019, Yasukawa, et al. Nutrients, 2019)、本研究では担がんマウスモデルを用いて、prebiotics (PHGG) によるがん悪液質への介入効果を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗生剤投与による糖吸収および小腸上皮の変化

7週齢雌性 C57/BL6 マウスにアンピシリン (1g/L)+ネオマイシン (1g/L)+バンコマイシン (500mg/L) を4週間・自由飲水にて投与し、空腹時血糖および耐糖能を OGTT で評価した。さらに小腸上皮の変化を組織学的に評価するとともに、グルコース・トランスポーターである sodium-dependent glucose transporter 1 (Sglt1) と facilitative glucose transporter 2 (Glut2) の発現を RT-PCR で評価した。さらに、小腸上皮の増殖・分化に関わる caudal-related homeobox transcription factors (cdx1, cdx2) の発現も併せて RT-PCR にて検討した。

#### (2) BALB/c と C57/BL6 マウス皮下腫瘍移植モデルへの抗生剤投与のがん悪液質形成に及ぼす影響

担がん悪液質モデルに対する antibiotics 投与の影響を検討するため、各6週齢雌性 BALB/c および C57/BL6 マウスにアンピシリン (1g/L)+ネオマイシン (1g/L)+バンコマイシン (500mg/L) を4週間・自由飲水にて投与した。投与開始2週間後に、BALB/c マウスには大腸がん細胞株 colon26 ( $3.0 \times 10^6$  cells/匹) を、C57/BL6 マウスには膵臓がん細胞株 Pan02 ( $5.0 \times 10^6$  cells/匹) を皮下移植し、体重・腹腔内脂肪重量・腓腹筋重量の変化を検討した。

(3) 担がんマウスモデルにおける水溶性食物繊維グアーガム分解物(PHGG)が がん悪液質に及ぼす影響

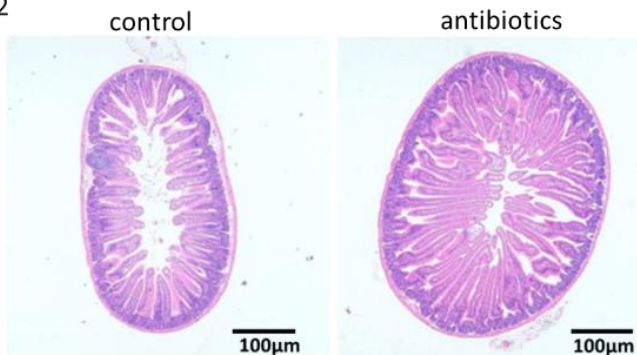
担がんマウス悪液質モデルにおいて、食餌中の食物繊維の多寡が悪液質形成に影響を及ぼすのかを検討した。7 週齢雄性 BALB/c マウスの皮下に大腸がん細胞株 colon26 ( $5.0 \times 10^6$  cells/匹) を移植した。マウスには腫瘍移植 2 週間前より fiber free (AIN93G) 食または fiber rich (AIN93G+partially hydrolyzed guar gum<PHGG>5%) 食を投与し、腫瘍移植 3 週後の悪液質表現型を比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 広域抗生剤投与は小腸上皮の過形成を誘導し、小腸におけるグルコース・トランスポーターの発現を亢進させる

広域抗生剤を投与したマウスでは抗生剤非投与マウスと比較して有意に空腹時血糖が上昇していた ( $P < 0.05$ )。糖負荷後の血糖推移は両群間で差は認めなかった。組織学的検討では、抗生剤投与群で空腸上皮に過形成が生じており、絨毛長が有意に延長していることを確認した (図 2、 $P < 0.001$ )。空腸上皮でのグルコース・トランスポーターの発現を比較すると、抗生剤投与群で Sglt1 の発現は有意に上昇していたが ( $P = 0.009$ )、glut2 の発現には差を認めなかった。

図2



Intestinal transcription factors 発現については、cdx1 は抗生剤投与群で有意に発現上昇していたが ( $P = 0.028$ )、cdx2 の発現には差はなかった。本検討では、抗生剤投与期間は 4 週間と比較的短期間での検討であり、空腹時血糖の上昇を抗生剤投与群で認めるものの、耐糖能には抗生剤投与群と非投与群間に差はみられなかった。しかし、より長期間抗生剤投与することで耐糖能にも影響を及ぼす可能性も考えられる。本研究により、広域抗生剤投与が小腸上皮の過形成を惹起し、グルコース・トランスポーターの発現を誘導することを明らかにした。さらにこれらの変化は、糖吸収・代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(2) 抗生剤投与による dysbiosis はがん悪液質を増悪させる

C57/BL6 担がんマウスでは抗生剤投与の有無によって体重変化に差は認めなかったが、BALB/c 担がんマウスにおいては抗生剤非投与のコントロール群に比し広域抗生剤投与群で有意に体重が減少した (図 3)。腹腔内脂肪重量は BALB/c, C57/BL6 マウスともに抗生剤投与により減少したが、BALB/c マウスで抗生剤非投与群と比し有意に減少した (図 4)。腓腹筋重量については、両マウスともに抗生剤投与群で有意に減少した (図 5)。

図3

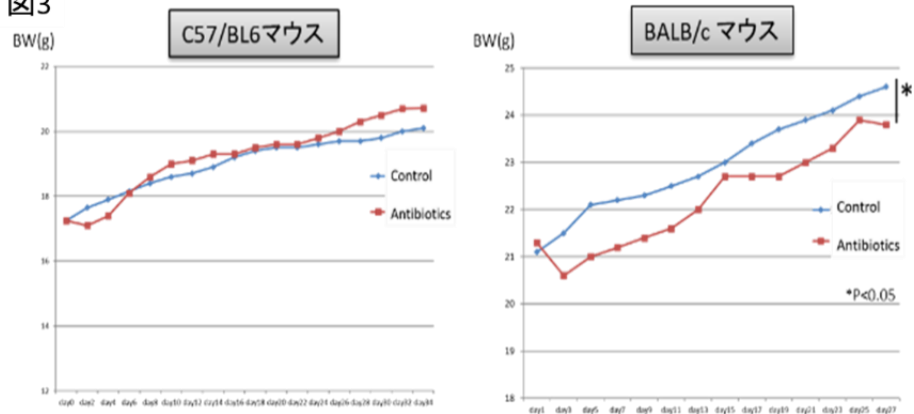


図4

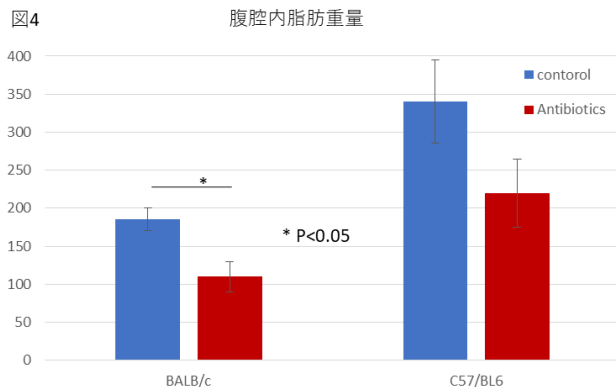
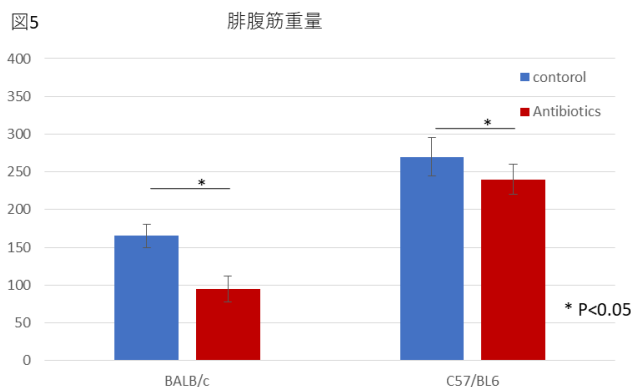


図5



マウス種により、がん移植モデルにおける悪液質形成に差異はあるものの、広域抗生剤投与による dysbiosis は悪液質を悪化させる方向に働くことが本実験より示唆された。

(3) 食餌中の食物繊維の多寡はがん悪液質形成に影響を与える

食餌中の水溶性食物繊維 (PHGG) の多寡は腫瘍の発育に影響を与えなかったが、fiber-free 食のマウスの体重は fiber-rich と比較し有意に低下していることを確認した ( $P < 0.001$ )。精巣上体脂肪重量については両群とも非担がんマウスと比較して減少していたが、fiber-free vs fiber-rich の 2 群間で差は認めなかった。腓腹筋重量については、fiber-free のマウスで fiber-rich と比較し有意に減少していた ( $P = 0.025$ )。腓腹筋内のユビキチン・リガーゼの発現を検討すると、MuRF-1 および atrogin-1 とともに fiber-free 群で有意に発現量が高く、fiber-free 食による腸内細菌叢の dysbiosis が腓腹筋のユビキチン・リガーゼ発現量を亢進させ、その結果としてサルコペニアを誘導する可能性が示唆された。

<引用文献>

- ① Matsuyama T, Ishikawa T, et al. *Int J Cancer*. 2015 Dec 1;137(11):2558-6
- ② Ishikawa T, et al. *Clin Biochem*. 2012 Feb;45(3):207-11.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                  |
|---|------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshida J, Ishikawa T, Doi T, Ota T, Yasuda T, Okayama T, Sakamoto N, Inoue K, Dohi O, Yoshida N, Kamada K, Uchiyama K, Takagi T, Konishi H, Naito Y, Itoh Y. | 4. 巻<br>36(7)    |
| 2. 論文標題<br>Clinical significance of soluble forms of immune checkpoint molecules in advanced esophageal cancer  | 5. 発行年<br>2019年  |
| 3. 雑誌名<br>Medical Oncology  | 6. 最初と最後の頁<br>60 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>doi: 10.1007/s12032-019-1285-x.  | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>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<br>-        |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>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<br>44(1)         |
| 2. 論文標題<br>Metformin inhibits TGF- 1 induced epithelial mesenchymal transition and liver metastasis of pancreatic cancer cells  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Oncology Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>371-381 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>doi: 10.3892/or.2020.7595  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>太田崇之, 石川剛, 松村晋也, 遠藤雄基, 水島かつら, 平井素子, 吉田寿一郎, 井上健, 鎌田和浩, 内山和彦, 高木智久, 内藤裕二, 伊藤義人 |
| 2. 発表標題<br>マウスへの抗生剤投与による腸内細菌叢の変化がグルコース代謝に及ぼす影響についての検討                                   |
| 3. 学会等名<br>第61回日本消化器病大会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鎌田和浩, 安田律, 井上亮, 水島かつら, 井上健, 岡山哲也, 堅田和弘, 内山和彦, 石川剛, 高木智久, 内藤裕二, 伊藤義人 |
| 2. 発表標題<br>母子分離ストレスによる粘膜透過性と腸内細菌叢の変化の関連  |
| 3. 学会等名<br>第61回日本消化器病大会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鎌田和浩, 安田律, 井上亮, 水島かつら, 井上健, 岡山哲也, 堅田和弘, 内山和彦, 石川剛, 高木智久, 内藤裕二, 伊藤義人 |
| 2. 発表標題<br>ラット母子分離ストレスモデルにおける粘膜バリア機能に対するアスタキサンチンの影響                            |
| 3. 学会等名<br>第15回アスタキサンチン研究会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Juichiro Yoshida, Takeshi Ishikawa, Yuki Endo, Shinya Matsumura, Takayuki Ota, Katsura Mizushima, Yasuko Hirai, Tetsuya Okayama, Naoyuki Sakamoto, Ken Inoue, Kazuhiro Kamada, Kazuhiko Uchiyama, Tomohisa Takagi, Yuji Naito, Yoshito Ito |
| 2. 発表標題<br>Metformin inhibits epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cell lines   |
| 3. 学会等名<br>American Association for Cancer Research(AACR) Annual Meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>石川剛、岡山哲也、坂元直行                               |
| 2. 発表標題<br>消化器癌に対する抗体薬の治療効果増強および治療抵抗性克服を目指した新たな細胞療法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第105回日本消化器病学会総会                             |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>太田 崇之、石川 剛、吉田 寿一郎、遠藤 雄基、松村 晋矢、井上 健、土肥 統、吉田 直久、鎌田 和浩、内山 和彦、高木 智久、小西 英幸、内藤 裕二、伊藤 義人、塩崎 敦、藤原 斉 |
| 2. 発表標題<br>進行食道癌におけるサルコペニアが化学療法に及ぼす影響と治療介入の可能性   |
| 3. 学会等名<br>第105回日本消化器病学会総会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 内藤 裕二<br><br>(Naito Yuji)<br><br>(00305575)       | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授<br><br><br>(24303)                 |    |
| 研究分担者 | 岡山 哲也<br><br>(Tetsuya Okayama)<br><br>(30636535)  | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教<br><br><br>(24303)                  |    |
| 研究分担者 | 坂元 直行<br><br>(Naoyuki Sakamoto)<br><br>(40547981) | 公益財団法人レイ・パストゥール医学研究センター・その他<br>部局等・研究員(移行)<br><br><br>(74329) |    |