

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09037

研究課題名(和文) ファルネシル化に着目した胃癌悪液質に対する新規治療開発に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for development of new treatment for cachexia by gastric cancer focusing on protein farnesylation

研究代表者

能城 浩和 (Noshiro, Hirokazu)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：90301340

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)：研究成果の概要として、高頻度腹膜播種形成胃癌細胞株を用いて腹膜播種および腹水貯留を伴う胃癌悪液質マウスモデルの作成に成功。対照群に比して骨格筋重量や脂肪組織重量の低下、腫瘍を除く体重の減少を確認。悪液質マウスモデルで血清中炎症性サイトカインが上昇する傾向を確認。ファルネシル変換酵素阻害薬(FTI)によって、の変化を是正する傾向を確認。in vitroでFTI添加によって胃癌細胞株培養上清中の炎症性サイトカインに変化はなかったものの、胃癌細胞株における炎症性サイトカインは低下した。胃癌悪液質骨格筋in vitroモデルにおいて、癌培養上清の添加で筋管細胞が萎縮する傾向を確認。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現段階では、胃癌悪液質マウスモデルおよびin vitroモデルにおけるファルネシル変換酵素阻害薬(FTI)の効果は明確ではないが、悪液質特有の変化を是正する傾向はみられた。さらなる実験データの集積により、未だ有効な治療法や治療薬が存在しない悪液質に対する新規の治療戦略となることが期待される。また、癌悪液質とファルネシル化の関連性についての既報はなく、本研究の成果によって今後の癌悪液質の発症機序解明にも影響を及ぼすことが期待される。また、一部のFTIは既に臨床現場で治療薬として使用されており、その安全性が確認されていることから、本研究の成果によって早期に癌悪液質の診療に導入できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：As an overview of the research results, (1) we succeeded in creating a gastric cancer cachectic mouse model with peritoneal dissemination and ascites using a high-frequency peritoneal dissemination gastric cancer cell line. (2) A decrease in skeletal muscle weight and adipose tissue weight and a decrease in body weight excluding tumors were confirmed compared to the control group. (3) A tendency to increase serum inflammatory cytokines was confirmed in cachectic mouse model. (4) A tendency to reverse the changes in (2) and (3) by farnesyltransferase inhibitor (FTI) was confirmed. (5) in vitro, administration of FTI did not change inflammatory cytokines in gastric cancer cell line culture supernatant, but decreased inflammatory cytokines in gastric cancer cell lines. (6) in vitro model of gastric cancer cachectic skeletal muscle, administration of cancer culture supernatant confirmed the tendency of myotube to atrophy.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌悪液質 ファルネシル化 ファルネシル変換酵素阻害薬 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌悪液質は、進行癌患者の約 80%にみられ (Wallengren O. Support Care Cancer 2013)、中でも胃癌はその発症率が特に高い消化器癌である。癌悪液質は、薬物治療への忍容性低下や治療抵抗性、また有害事象の原因となり、約 30%の患者で癌悪液質自体が直接死因となる (von Haehling S. JCSM 2010)。以上の背景から、癌悪液質に対する治療法確立の必要性は自明であるが、現時点で有効な治療法がない点は大きな臨床的課題である。癌悪液質は、癌の進行に伴って発症する進行性機能障害と筋組織の著しい減少であり、癌患者の QOL を低下させるだけでなく、根治を目的とした治療の耐用性や治療効果を著しく低下させる。分子標的薬や免疫関連治療など、癌に対する薬物療法は大きく進歩しているが、その恩恵を最大に活用するためには、癌悪液質を予防あるいは是正しなければならない。

癌悪液質発生の機序は未だ不明な点が多いが、骨格筋量減少を中心とした代謝異常がその主体と考えられる。研究申請者は、癌特有のエネルギー代謝やミトコンドリア機能障害、さらにそれらを惹起するタンパク修飾の一種であるファルネシル化 (炎症反応やインスリン抵抗性などに関与) に着目した胃癌基礎研究を行い、その成果を報告してきた。本申請者は、癌悪液質の根底に全身炎症反応やエネルギー代謝変容が存在し、それらがインスリン抵抗性や脂肪代謝異常、骨格筋分解亢進などを引き起こしているものと考ええる。よって、胃癌悪液質に対するファルネシル化制御が有効な新規治療となる可能性に期待している。本申請研究は、これまでの研究成果を胃癌悪液質の基礎的研究に応用し、その発症や進展におけるファルネシル化の意義、またファルネシル化阻害による胃癌悪液質の抑制、改善効果を検証し、さらにその機序解明に挑み、悪液質への新規治療戦略の確立を最終的な目標とする。

2. 研究の目的

癌悪液質において、炎症性サイトカインやグレリン (食欲増進作用を持つホルモン) などに関連する因子の既報は存在するが、ファルネシル化の修飾状況やその意義を評価した報告はない。また、ファルネシル化は炎症によって惹起され、そのファルネシル化がさらに炎症を助長するという malignant cycle を有することを考慮すると、全身性炎症やインスリン抵抗性、骨格筋量減少や脂質代謝異常を病態とする癌悪液質においても、ファルネシル化が重要かつ特異的なファクターである可能性がある。よって、ファルネシル化が癌悪液質の病勢マーカー、治療標的として臨床応用可能か否かについての検証を目標とする。

本研究の目的の骨子は「胃癌悪液質の発症、進展におけるファルネシル化の意義を分子レベルで解明すること」、「FTI による胃癌悪液質の発症予防および既に発症した悪液質の是正効果の検証とその作用機序を解明すること」である。

3. 研究の方法

<マウスモデルを用いた FTI の悪液質発症抑制効果および悪液質是正効果の検証>

高頻度腹膜播種形成胃癌細胞株である 58As9 をヌードマウスに移植し、腹膜播種および腹水貯留を伴う胃癌悪液質マウスモデルを作成し、骨格筋重量や腫瘍を除く体重、炎症性サイトカイン産生などを対照群と比較し、悪液質モデルの成立を確認する。

同モデルを用いて、FTI の悪液質発症抑制効果 (腫瘍形成後より FTI 投与開始) と是正効果 (腫瘍形成かつ悪液質発症後に FTI 投与開始) を評価する (項目: 体重、fat & lean mass、臓器・筋肉重量、白色・褐色脂肪重量比、血漿中炎症性サイトカインなど)。

<胃癌悪液質におけるファルネシル化と関連因子の評価、および FTI のそれらに対する是正効果の in vitro モデルでの検証>

悪液質誘導胃癌細胞株として 58As9 を使用し、細胞のファルネシル化や FTase 発現を評価、また、培養上清中の炎症性サイトカイン (TNF- や LIF (leukemia inhibitory factor)、IL-1&6 など) を測定する。さらに FTI 添加によるそれらの変化を評価する。

胃癌悪液質骨格筋 in vitro モデルとして、C2C12 横紋筋由来細胞株に 58As9 培養上清を添加、脂肪組織 in vitro モデルとして、3T3-L1 脂肪細胞株に同培養上清を添加する。本モデルにて、インスリン抵抗性 (IGF/IGF-1 シグナル、PTP-1B、PTEN など)、酸化ストレス (アディポカインやレプチン測定、活性酸素産生の変化など)、免疫反応シグナル (NF- B、FOXO3、MuRF1、Atrogin1 など)、さらにオートファジー (p62/Keap1/Nrf2 経路、LC3 など) への影響を検証する。他方、それらに対する FTI による是正効果を検証する。

<外科切除標本のファルネシル化評価および臨床データとの関連性評価>

外科切除標本におけるファルネシル化の程度を免疫組織染色で評価し、データベース化した臨床情報との相関性を検証する。

4. 研究成果

まず、胃癌悪液質とファルネシル化との関連性の評価、およびファルネシル化が治療標的となり得るかについての検証として、初年度に計画していた「胃癌悪液質マウスモデルを用いた

FTI の悪液質発症抑制効果および悪液質是正効果の検証」に取り組んだ。まず、高頻度腹膜播種形成胃癌細胞株である 58As9 をヌードマウスの腹腔内に投与し、対象群に対して腹膜播種および腹水貯留を伴う胃癌悪液質マウスモデルが作成されたことを確認した。さらに、対照群と比較して骨格筋重量（ヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋）や脂肪組織重量（皮下（鼠径部）や腹腔内（生殖器周囲、後腹膜）の脂肪組織）が低下していること、腫瘍を除く体重が減少していることを確認した。採取した血液血清成分の炎症性サイトカイン（TNF- および IL-6 など）を測定したところ、胃癌悪液質マウスモデルにおいて上昇する傾向が確認された。胃癌悪液質マウスモデルを用いて、ファルネシル変換酵素阻害薬（FTI）の悪液質発症抑制効果（腫瘍形成後より FTI 投与開始）の評価を行ったところ、FTI 投与群において、骨格筋重量および脂肪組織重量の低下が抑制される傾向を認めた。また、腫瘍を除く体重に関しても、その減少率が抑制される傾向を示した。なお、腹膜播種形成および腹水貯留に関しては、FTI 投与群における変化は明らかではなかった。

次いで「胃癌悪液質におけるファルネシル化と関連因子の評価、および FTI のそれらに対する是正効果の *in vitro* モデルでの検証」に取り組んだ。*in vitro* 実験として、悪液質誘導胃癌細胞株として 58As9 を使用し、細胞のファルネシル化や FTase 発現を評価、また、培養上清中の炎症性サイトカインの測定、さらには FTI 添加によるそれらの変化を評価した。その結果、FTI 添加によって培養上清中の炎症性サイトカイン（TNF- および IL-1&6）に変化はなかったものの、胃癌細胞株における炎症性サイトカインは低下した。なお、細胞のファルネシル化は明らかに阻害されたが、FTase 発現には変化は認めなかった。胃癌悪液質骨格筋 *in vitro* モデルとして、C2C12 横紋筋由来細胞株に 58As9 培養上清を添加した。その結果、58As9 培養上清の添加によって筋管細胞は萎縮する傾向にあった。

現在、同モデルにおけるインスリン抵抗性、酸化ストレス、免疫反応シグナル、オートファジーへの影響を検証中であり、さらに FTI 添加による変化も確認する予定である。また、上記モデルに加え、脂肪組織 *in vitro* モデルとして、3T3-L1 脂肪細胞株に 58As9 培養上清を添加する予定である。

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
研究分担者	田中 智和 (Tanaka Tomokazu) (60781903)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	

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