

令和 6 年 4 月 27 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07140

研究課題名（和文）臨床応用を指向したがん悪液質病態解明

研究課題名（英文）Elucidating the pathophysiology of cancer cachexia

研究代表者

小島 康（Kojima, Yasushi）

愛知県がんセンター（研究所）・がん病態生理学分野・主任研究員

研究者番号：30464217

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）：がん悪液質モデルマウスを解析したところ、悪液質肝臓ではNAD（nicotinamide adenine dinucleotide）濃度が半減して、そしてNAD分解酵素であるCD38の発現が上昇することが特徴的であった。NAD前駆体を含むビタミンB製剤を投与したが、がん悪液質モデルマウスの生存期間は延長しなかった。CD38阻害剤Compound 78cはSEK1がん悪液質モデルマウスの肝臓および骨格筋重量を増加させることが示唆された。マウスがん悪液質モデルおよびヒト胃がん悪液質患者血液ではNAD前駆体であるトリプトファン濃度の低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん悪液質は、進行性の体重減少・骨格筋萎縮・食思不振を主徴とする複合的な代謝性症候群である。多くの進行がん患者が、悪液質を発症し、がん悪液質はがん患者の約20%にとって直接死因であるとされる。紀元前の文献にも、悪液質に関する記録が残されているが、現在に至るまで、悪液質の本態は不明である。がん悪液質の本態は依然として不明で、実効性のある早期診断方法や治療介入法の開発が望まれている。本研究成果はがん悪液質の代謝学的側面の解明に関して一定の貢献をすることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer cachexia is characterized by significant weight loss, reduced appetite, and muscle wasting. The underlying mechanisms of cancer cachexia are not yet fully understood, and there is currently no effective treatment. In studies involving mouse models of cancer cachexia, we observed that NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) levels were reduced by about 50%, and the expression of CD38, an enzyme that degrades NAD, was significantly increased. Vitamin B cocktails containing NAD precursors did not prolong survival in the SEK1 cancer cachexia mouse models. Administering compound 78c, a CD38 inhibitor, increased their liver and skeletal muscle mass. Additionally, we observed a decrease in blood levels of tryptophan, a precursor for NAD, in both mice with cancer cachexia and patients with gastric cancer cachexia. These findings provide crucial insights into the metabolic disturbances associated with cancer cachexia and could guide the development of future therapies.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん悪液質 ビタミンB NAD

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

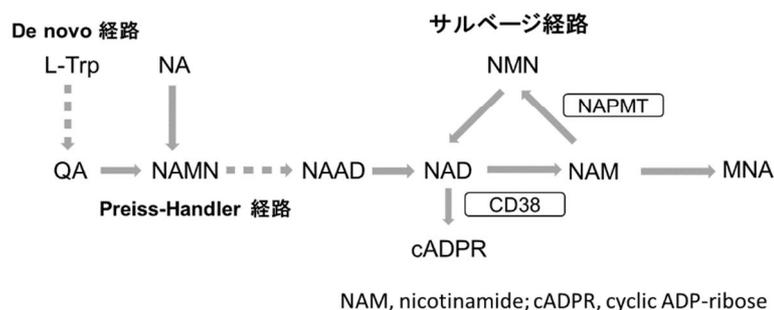
がん悪液質は、進行性の体重減少・骨格筋萎縮・食思不振を主徴とする複合的な代謝性症候群である。多くの進行がん患者が、悪液質を発症し、世界では年間900万人近くのがん患者が悪液質を発症している (Lok C., Nature, 2015)。がん悪液質はがん患者の約20%にとって直接死因であるとされる。紀元前の文献にも、悪液質に関する記録が残されているが、現在に至るまで、悪液質の本態は不明である。悪液質の主徴である骨格筋の萎縮は、患者のPerformance Status (PS) やQuality of Life (QOL) を著しく低下させる。PSが低下した患者では、標準的な抗がん治療からの脱落せざるえなくなる。実効性のある早期診断方法や治療介入法の開発が望まれている。

研究代表者らは、がん悪液質の病態解明を目指して、慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我教授らと共同で、がん悪液質発症モデルマウスの骨格筋および肝臓メタボローム解析を実施した。結果、骨格筋より肝臓でより激しい代謝変化を認めた。がん悪液質の重症度と相関する代謝産物を検索したところ、NADを含むナイアシンの低下が、がん悪液質の重症度に呼応して低下することを見出した。

NADは地球上のさまざまな生物においてさまざまな酵素反応の補酵素として働くビタミンの1つである (Canto C. et al., 2015, Cell Metabolism)。NADは、また特定の酵素の基質でもあり、その細胞内濃度はさまざまな細胞機能の調節に重要な役割を果たす。近年、ヒトの骨格筋萎縮や神経変性などのさまざまな病態において、NADの濃度維持が重要であることを示唆する報告が相次いでいた (Verdin E., 2015, Science)。

図1 肝臓NAD代謝経路

Nakagawa T. & Guarente L., 2014, Cell Metabを参考に作成



肝臓は、生体のNAD代謝の中心であり、全身にNADの前駆体であるニコチンアミドを提供している (Liu L. et al., 2018, Cell Metabolism)。また一日に生体が必要とするNADの80%が肝臓で合成されている。肝臓NAD代謝の概略は図1の通りである。NAMPTがNAD合成の律速酵素とされる。CD38は、NADサルベージ回路から、それぞれNADを取り除き、生体のNAD分解系の主要酵素であるとされている。Cd38ノックアウトマウスでは、全身レベルでNAD濃度が上昇することが報告されている (Aksoy P. et al., 2006, BBRC)。CD38に関して、プロテオームおよびウエスタンブロッティングにてがん悪液質モデルマウス肝臓での発現上昇を確認した。

### 2. 研究の目的

本研究では、肝臓NAD代謝の変化が悪液質病態に与える影響を検証する。さらに悪液質を好発する胃がん患者の血清を解析して、NAD代謝経路の変動の有無を検証する。将来の悪液質治療薬の開発基盤を構築することを、本研究計画は目指している。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物・培養細胞

BALB/c nu/nu (BALB/cAJcl nu/nu)マウスを日本クレア(東京)より購入した。愛知県がんセンターSPF飼育施設で馴化させたのち実験に供した。マウスの飼育・管理およびそれらを用いた実験は全て愛知県がんセンター研究所動物実験規程に基づいて、愛知県がんセンター研究所動物実験委員会の承認を得てから行った。JCRBバイオバンクより入手したヒトメラノーマ細胞株SEKI (JCRB1041; RRID: CVCL\_3162)を使用した。SEKI細胞は、10%FBSを含有するRPMI-1640培地 (Sigma) にて培養した。

## (2) 薬剤

NAD 前駆体を含む臨床静脈注射用ビタミン B 製剤ビタミンカクテル (大塚 MV 注射 No.1 バイアル、3179513A1026、大塚製薬株式会社、東京、日本) の 4 分の 1 バイアルの用量を各マウスに毎日投与した (塩化チアミン塩酸塩、49 mg/kg、リポフラビンリン酸ナトリウム、58 mg/kg、ピリドキシン塩酸塩、61 mg/kg、シアノコバラミン、0.06 mg/kg、ニコチンアミド、500 mg/kg 葉酸、5 mg/kg、アスコルビン酸、1250 mg/kg、ビオチン、0.75 mg/kg)。CD38 阻害剤は、Compound 78c (CAS#1700637-55-3, Merck) を使用した。Compound 78c は、溶媒 (ジメチルスルホキシド (DMSO, Sigma)、5% (v/v); ポリエチレングリコール 300 (PEG300, 和光純薬) 40% (v/v); Tween 80 (東京化成工業)、5% (v/v); 精製水、50% (v/v)) に溶解して、用時調製した。

## (3) ビタミン B 投与実験

ビタミン B 群治療実験では、8 週齢のメス BALB/c nu/nu マウスをランダムに 2 つのグループに割り当て、SEKI 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  細胞) を皮下移植した。移植に際しては、三種混合麻酔薬 (塩酸メドトミジン 0.75 mg/kg、ミダゾラム 4mg/kg、酒石酸ブトルファノール 5mg/kg) を腹腔に投与して、十分な麻酔深度に到達したことを確認した後に腫瘍細胞移植操作を実施した。移植完了後は、ただちにアンチセダン (0.3~0.75 mg/kg) を腹腔から投与して覚醒状態になるまでモニタリングを実施した。低体温症には特に留意した。移植後、6 日後に臨床静脈注射用ビタミン B 製剤を腹腔内注射した (ビタミン B 処理、N = 12 匹の雌マウス; 生理食塩水処理、N = 12 匹の雌マウス)。

## (4) CD38 阻害剤投与実験

SEKI 細胞を  $1.0 \times 10^5$  細胞数をヌードマウスの皮下に移植した。移植に際しては、三種混合麻酔薬 (塩酸メドトミジン 0.75 mg/kg、ミダゾラム 4mg/kg、酒石酸ブトルファノール 5mg/kg) を腹腔に投与して、十分な麻酔深度に到達したことを確認した後に腫瘍細胞移植操作を実施した。移植完了後は、ただちにアンチセダン (0.3~0.75 mg/kg) を腹腔から投与して覚醒状態になるまでモニタリングを実施した。低体温症には特に留意した。移植後 11 日目にランダムに割り振り、投与群と非投与群に分けた (それぞれ N = 5)。移植後 12 日目から 30mg/kg の Compound 78c を 1 日 1 回、連日、1 週間腹腔投与した。投与実験完了後、マウスは安楽死後、病理解剖およびサンプル採取に供した。

## (5) 臨床検体

愛知県がんセンター倫理審査委員会の承認を得てから、試料の入手、管理、使用を行った (No. 2019-1-540)。採血時の臨床病期に応じて早期胃がんと進行がんを分類しました。悪液質の診断は Fearon K. et al., 2011, Lancet Oncology に従った。悪液質の重症度はグラスゴー予後スコアを使用した (Forrest LM. Et al., 2003, British Journal of Cancer)。

## 4. 研究成果

NAD 補充を目的として、がん悪液質モデルマウス (SEKI 細胞株ヌードマウス移植モデル) に臨床用ビタミン B 製剤を投与した (図 2)。投与期間中、マウスの全身状態などに関してはコントロール群とビタミン B 群で明らかな差異は認めなかった。ビタミン B 製剤は、がん悪液質モデルマウスの生存期間に影響を及ぼさなかった (Log rank test、P = 0.65、中央生存期間、コントロール群、22 日、ビタミン B 群投与群、23.5 日)。肝臓 NAD 合成経路の律速酵素である NAMPT 酵素のタンパク量は悪液質モデルマウス肝臓では大きな変化を認めなかった。

図2 ビタミンB製剤投与実験

Kojima Y, et al., 2023, Nature communications を改変

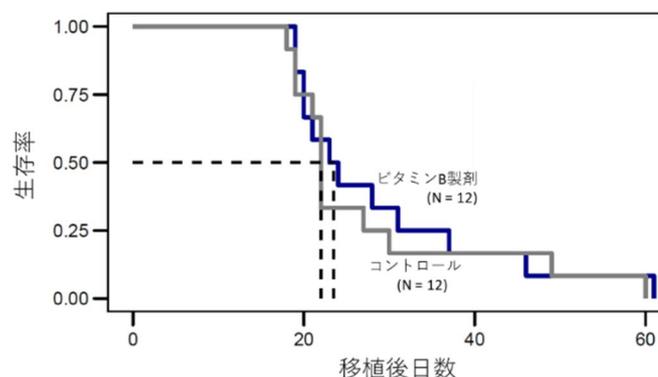
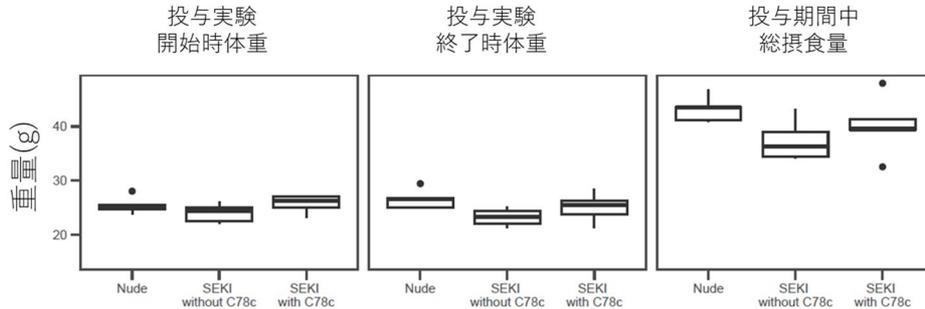
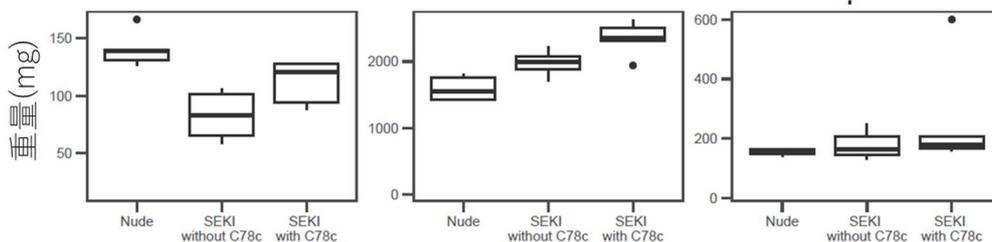


図3 CD38阻害剤Compound 78c投与実験



がん悪液質モデルにおける CD38 阻害効果を検証する目的、がん悪液質モデルマウス (SEKI 細胞株ヌードマウス移植モデル) に CD38 阻害剤である Compound 78c 投与実験を実施した (非担がんマウス (Nude; N = 5)、Compound 78c 非投与担がんマウス (SEKI without C78c; N = 5)、Compound 78c 投与担がんマウス (SEKI with C78c; N = 5))。非担がんマウス (Nude) と Compound 78c 非投与担がんマウス (SEKI without C78c) の 2 群を比較すると、投与開始前の体重には有意差がなかったが、実験終了時には統計学的有意に低下していた (図 3; Welch t-test, P = 0.024)。くわえて実験期間中の摂食量が非投与担がんマウスで統計学的有意に低下しており、がん悪液質を発症していることが強く示唆された (Welch t-test, P = 0.024)。体重に関しては Compound 78c 投与群と非投与群では統計学的有意な差は認められなかった (Welch t-test, P = 0.25)。Compound 78c 投与期間中の総摂食量についても統計学的差異は認めなかった (Welch t-test, P = 0.38)。

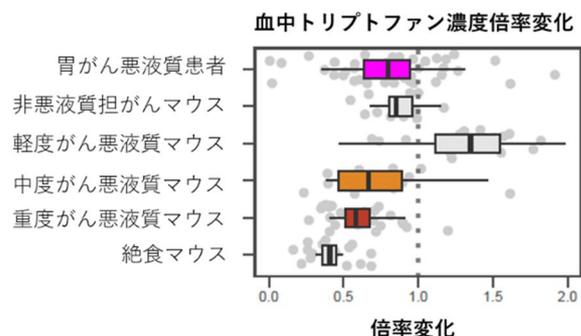
図4 Compound 78cの臓器重量に与える影響

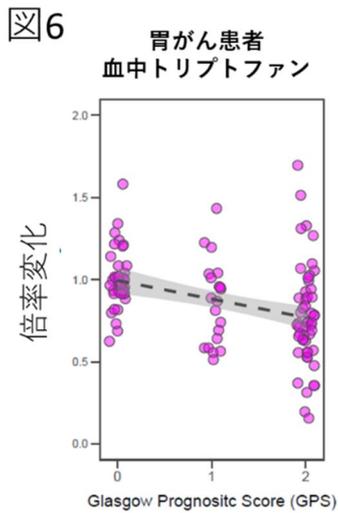


骨格筋重量に関しては、Compound 78c 投与群と非投与群では統計学的有意な差は認められなかった (図 4; Welch t-test, P = 0.057)。しかしながら投与群で骨格筋重量が高い傾向を認めた。肝臓重量に関しては、Compound 78c 投与群と非投与群では統計学的有意に投与群で肝臓重量の増加を認めた (Welch t-test, P = 0.037)。薬剤性肝障害を疑って、肝臓と腫瘍組織に関して、病理学的検索を実施したが、あきらかな Compound 78c の肝細胞および腫瘍細胞に対する細胞傷害作用を示唆する形態病理学的所見は認められなかった。具体的には肝細胞壊死像や免疫系細胞の集積所見などは確認しなかった。CD38 は免疫系細胞で主に発現している。免疫系細胞が多く集積している脾臓重量に関しては、Compound 78c 投与群と非投与群に関しては有意差を認めなかった。まとめると CD38 阻害剤である Compound 78c には、がん悪液質モデルマウスの骨格筋および肝臓重量を増加させる効果を有する可能性が示唆された。

がん悪液質モデルマウスで特定された NAD 代謝異常のヒトへの外挿性を検証する目的で、ヒト胃がん悪液質患者の血液メタボロームデータを取得して検討した。解析した胃がん患者のプロファイルは表 1 (次ページ参照) に示した。マウスの重度がん悪液質マウスと胃がん悪液質患者の血液メタボロームデータを比較したところトリプトファン濃度がともに低下していることを見出した (図 5、重症がん悪液質モデル、N = 13; 胃がん悪液質患者、N = 25)。トリプトファンは、肝臓の NAD の De

図5 血中トリプトファン濃度





novo 合成経路の出発点となるアミノ酸である (図 1)。胃がん患者のメタロームデータの臨床関連性をさらに実証する目的で、グラスゴー予後スコア (GPS) と血中トリプトファン濃度の関係を調べた。GPS は、がん患者の予後予測スコアリングシステムの 1 つで、2 つの肝臓由来血漿タンパク質、CRP とアルブミンによって求められる。臨床研究から GPS と悪液質の重症度は正の相関、がん患者と負の相関があることが認められていることが報告されている (Forrest LM. Et al., 2003, British Journal of Cancer)。血中トリプトファン濃度と GPS スコアの間には負の相関が示唆された (図 6, Jonckheere trend one-sided test,  $P = 0.0001$ )。

以上の結果をまとめると、1) ビタミン B 製剤投与は SEKI がん悪液質モデルマウスには無効であること、2) CD38 阻害剤 Compound 78c は SEKI がん悪液質モデルマウスの肝臓および骨格筋重量を増加させる可能性があること、3) マウスがん悪液質モデルおよびヒト胃がん悪液質患者血液では NAD 前駆体であるトリプトファン濃度の低下を認めた。

表 1 患者背景情報

	早期胃がん (n = 16)	進行胃がん (n = 41)	P value	
年齢中央値 (範囲)	62 (51-73)	67 (40-80)	Welch 0.0258	
性別			Fisher 0.753	
	女性	4	13	
	男性	12	28	
臨床ステージ				
	Stage I and II cancer	16 (100%)	0 (0%)	
	Stage IV cancer	0 (0%)	41 (100%)	
Cancer Cachexia	2/16 (13%)	25/30 (83%)	Fisher $1.61 \times 10^{-4}$	
Glasgow Prognostic Score				
	GPS = 0	16 (100%)	4 (10%)	
	GPS = 1	0 (0%)	10 (24%)	
	GPS = 2	0 (0%)	27 (66%)	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kojima Yasushi, Mishiro-Sato Emi, Fujishita Teruaki, Satoh Kiyotoshi, Kajino-Sakamoto Rie, Oze Isao, Nozawa Kazuki, Narita Yukiya, Ogata Takatsugu, Matsuo Keitaro, Muro Kei, Taketo Makoto Mark, Soga Tomoyoshi, Aoki Masahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Decreased liver B vitamin-related enzymes as a metabolic hallmark of cancer cachexia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-41952-w	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 青木正博 小島康	4. 巻 42
2. 論文標題 がん悪液質に伴う代謝臓器変容のマルチオミクス解析	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 528 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/7427-00001-0001354-00	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kojima, Y., Mishiro E., Taketo, M.M., Soga T. & Aoki M.
2. 発表標題 Metabolomic and proteomic landscape of cancer cachexia
3. 学会等名 The 81th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Sep. 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aoki, M., Soga T., Kojima, Y
2. 発表標題 The landscape of systemic metabolic alterations in cancer cachexia
3. 学会等名 The 7th JCA-AACR Special Joint Conference. The Latest Advances in Pancreatic Cancer Research, Kyoto, Jul. 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木正博 曾我朋義 小島康
2. 発表標題 メタボロミクス・プロテオミクスを用いたがん悪液質に伴う代謝異常の解析
3. 学会等名 がんと代謝研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aoki, M., Soga T., Kojima, Y
2. 発表標題 The landscape of systemic metabolic alterations in cancer cachexia
3. 学会等名 The 7th Cancer Cachexia Conference, Edingburgh, Scotland (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木正博 曾我朋義 小島康
2. 発表標題 がん悪液質における全身性代謝異常の解析
3. 学会等名 がんと代謝研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小島康 三城恵美 武藤誠 曾我朋義 青木正博
2. 発表標題 がん悪液質における肝臓代謝変化の特徴
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小島康
2. 発表標題 がん悪液質の代謝学的特徴としての肝臓ビタミンB関連酵素群の減少
3. 学会等名 第11回 日本サルコペニア・悪液質・消耗性疾患研究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔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	三城 恵美 (佐藤恵美)	名古屋大学・ITbM・特任講師	
	(Emi Mishiro)		
	(00455544)	(13901)	

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