

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：32680

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560061

研究課題名(和文)糖尿病マウスに接種したがん細胞の増殖：マウスに与える食餌の効果

研究課題名(英文)Effects of the diet on tumor growth in diabetic mice inoculated with cancer cells

研究代表者

小浜 智子 (KOHAMA, Tomoko)

武蔵野大学・薬学研究所・客員研究員

研究者番号：00364703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病(DM)は生活習慣と関連したがんの発症の高リスク群である。ストレプトゾトシン(STZ)によりDM化したBALB/cマウスにColon26大腸癌細胞(5x10⁴)を皮下移植し担がんマウスを作り、n-3系不飽和脂肪酸としてイコサペンタ酸エチル(EPA)を100mg/bodyで連日経口投与した。EPA投与による腫瘍進展は抑制傾向にあるが、免疫担当細胞数には差異はなかった。一方、DM/担がんマウスにEPA投与を行った群に選択的なNK細胞活性の顕著な低下が見られた。DM併発がん患者におけるEPAの摂取は腫瘍進展を促進するものではないが、NK細胞の活性低下による免疫監視低下には注意が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：In recent years, diabetes mellitus (DM) has been shown to be associated with a high cancer risk. We investigated whether the intake of omega-3 fatty acid may promote cancer progression in DM concomitant with cancer-bearing conditions. DM-induced BALB/c mice were generated by the injection of STZ, and then they were inoculated subcutaneously with 5x10⁴ Colon26 tumor cells (CT26DM mice). CT26DM mice were daily treated with ethyl icosapentate as omega-3 fatty acid (100 mg/body). The oral administration of EPA in those mice suppressed the tumor size but the number of immune cells (T, B and NK cells) in the spleen showed no difference compared to non-inoculated DM mice. Interestingly, the activity of NK cells significantly decreased in the spleens of CT26DM mice. It is necessary to consider that these patients be handled as immune compromised hosts due to their possibly lowered NK cell activity.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 担がん n-3系不飽和脂肪酸 宿主免疫系

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本の平均寿命は世界有数の水準に達しているが、その一方で生活習慣病が医療費の3割を占め、国民の健康に関する大きな課題となっている。特に糖尿病においては、20歳以上の「糖尿病が強く疑われる者」、「糖尿病の可能性を否定できない者」の合計の推計人数は約2,050万人とされており、男性の27.1%、女性の21.8%が糖尿病に罹患している可能性がある。

その一方で、がんの生涯罹患リスクは男性で54%、女性で41%とする統計データがあり、日本人の2人に1人はがん罹患する可能性が指摘されている。これらは、糖尿病とがんの両方に罹患する可能性のみならず、糖尿病状態における異常な糖代謝ががん罹患リスクを上昇させることも明らかにされてきている。

(2)糖尿病における高血糖状態は大腸癌、膵癌、乳癌、子宮体癌の発症のリスク群であり、がん転移や再発率が高いことが指摘されている。これまでに妊婦及び糖尿病妊婦における食に関する研究が行なわれ、糖尿病妊婦ラットが摂取する魚脂(n-3系不飽和脂肪酸)はインスリン・シグナル伝達の修飾を介して胎仔心筋代謝を顕著に変え、胎児を高血圧から護る働きがあることが示唆されている。興味深いことに、そのシグナルは多くの進行がん恒常的に活性化されているAKT-mTOR経路と重複するものである。さらに摂取脂肪酸の種類が宿主免疫機能監視機構にも影響することが知られつつあるが、糖尿病状態におけるがん進展との関連についても一定の結論は得られていないのが現状である。

これらのことから、糖尿病合併した癌患者においては、摂取脂肪酸の種類によってがん進展に与える役割が異なることが考えられ、当該患者における食事内容を見直さなければならない可能性がある。

2. 研究の目的

(1) ストレプトゾチン誘発性糖尿病モデルマウスにがん細胞を移植し、動物個体レベルでの

糖尿病に依存的ながんの進展並びに転移の評価を行い、糖尿病(DM)状態におけるがん進展の特徴を分析した。

(2) 糖尿病併発がんマウスにn-3系不飽和脂肪酸を与えることで、がん進展にどのような影響を及ぼすかを検討し、併せて糖尿病状態における腫瘍進展とn-3系不飽和脂肪酸摂取における宿主免疫との関係を検討した。

3. 研究の方法

(1) BALB/cマウス由来乳がん細胞株4T1を用い、in vitroにおけるglucose濃度と細胞増殖の関係を評価した。

(2) 乳がん細胞株4T1にホタル由来 luciferase (luc)を発現する細胞株4T1-luc (2×10^5)を糖尿病化したBALB/cマウスの乳腺脂肪組織内に移植し、腫瘍に由来する luc 発光を定量化した。なお、マウスの糖尿病発症はストレプトゾチン(STZ: 200mg/kg)を接種後、4日目の血糖値が400mg/dL以上のものとした(平均糖尿病血糖値は531 mg/dL [n=29])。

(3) 乳腺腫瘍モデルマウスの乳がん細胞に由来するルミネセンス発光は、イメージング装置 IVIS[®] Lumina (Caliper社)により経過観察を行った。その際、イソフルラン(Abbot Japan)で麻酔されたマウスの腹腔内に発光基質となるD-luciferin(Biosynth)を1.5 mg/body (200 μ L)投与し、4T1-luc細胞のルシフェラーゼ活性(発光量)を測定した。測定結果はIVIS[®] Lumina 付属のソフトウェアである Living Imageにて解析を行った。

(4) 免疫担当細胞数の評価は、マウスの脾細胞を用い、各種細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体(mAb)で染色し、Tali[™] image-based cytometer (Invitrogen)による解析を行った。また、NK細胞活性の評価は、マウス由来リンパ腫細胞株Yac-1に luc を発現する Yac-1-luc を用い、マウスの脾細胞と 1:0、1:1、1:10、1:33

の割合で 24hr 混合培養したのち、D-luciferin (2.25 mg/well)を加え、IVIS® Lumina を用いて Luc-YAC-1 の発光量を定量した。

4. 研究成果

(1) Glucose 濃度の違いによる 4T1-luc 細胞の増殖能への影響

培地中の glucose 濃度が細胞増殖に与える影響について、glucose 濃度を low-glucose 条件(1000 mg/L:5.5 mM)と high-glucose 条件(4500 mg/L:25 mM)の 2 種類の条件で培養し、細胞数による増殖能の評価を実施した。その結果、培養後 24hr、48hr では low-glucose 条件下と high-glucose 条件下での増殖能の差はみられなかったが、72hr では low-glucose 条件下に比べ、high-glucose 条件下では増殖能が増加する結果となった(Fig 1)。

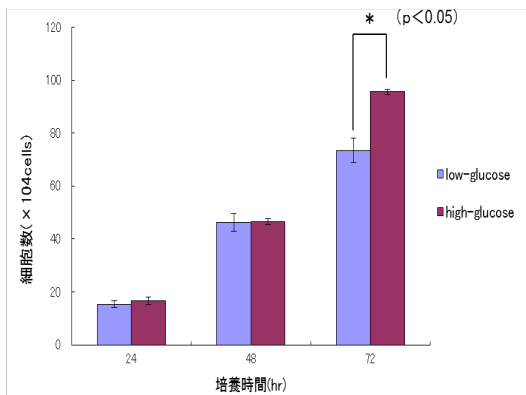


Fig 1. 培地中の glucose 濃度の違いによる 4T1-luc 細胞の増殖能への影響

(2) 糖尿病罹患の有無による 4T1-luc 細胞の腫瘍形成能への影響

DM マウス群と対照マウス群のそれぞれに、4T1-luc 細胞接種日を 0 日として経時的に体重測定(Fig 2)と IVIS® Lumina による経過観察(Fig 3)を行った。

その結果、DM/Cancer 併発群のマウスでは腫瘍形成の後期(5 週目)顕著な発光が観察できたが、Cancer 単独群のマウスでは DM/Cancer 併発群のマウスほどの腫瘍形成能の増加は観察できなかった(Fig 3)。このことから、糖尿病の罹患により 4T1-luc 細胞の局所の腫瘍形成能は、亢進することが判明した。

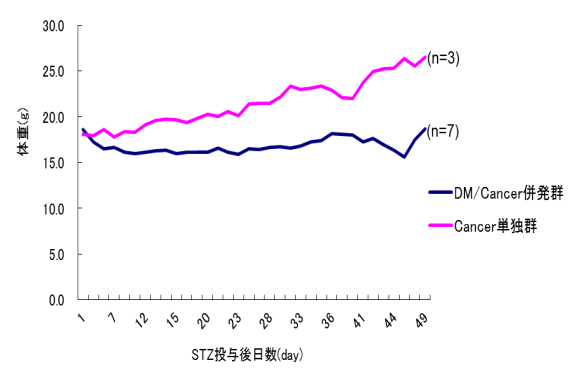


Fig 2. 糖尿病罹患の有無による体重変化への影響

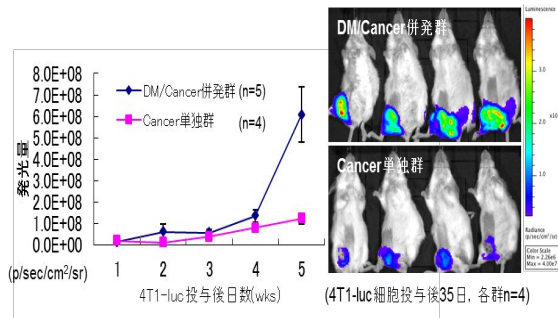


Fig 3. 糖尿病の罹患の有無による 4T1-luc 細胞の腫瘍形成能への影響

(3) 糖尿病罹患の有無による 4T1-luc 細胞の遠隔転移への影響

DM/Cancer 併発群と Cancer 単独群のそれぞれの 4T1 担がんマウスについて、肺を摘出し転移巣の検出を行った。その結果、DM/Cancer 併発群のマウスでは肺の結節数、ルシフェラーゼ発光量ともに Cancer 単独群のマウスと比較すると減少した(Fig 4)。このことから、4T1-luc 細胞の遠隔転移能は糖尿病の罹患状態では抑制される傾向にあった。

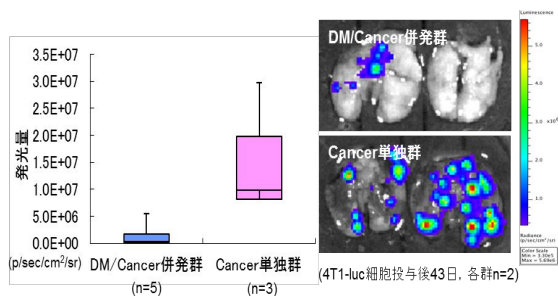


Fig 4. 糖尿病の罹患の有無による 4T1-luc 細胞の遠隔転移能への影響

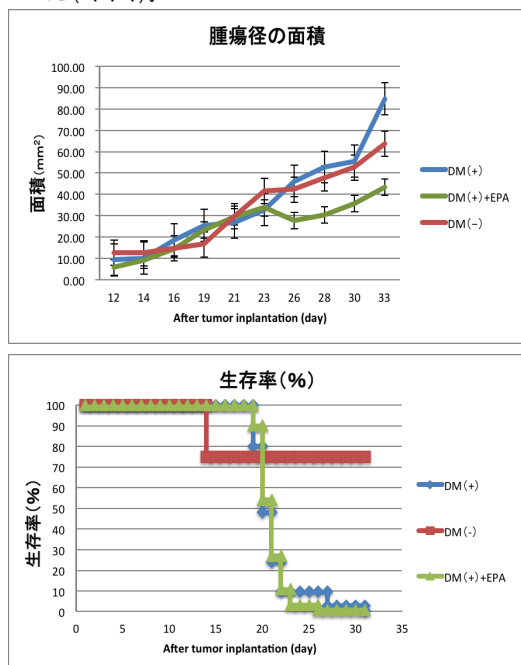
(4) 糖尿病の罹患の有無による担がんマウスの生存日数への影響

DM/Cancer 併発群と Cancer 単独群のそれぞれの 4T1 担がんマウスについて、それぞれの群のマウスの生存個体数を観察した。Cancer 単独群のマウスと比較して DM/Cancer

併発群のマウスでは 4T1-luc 細胞接種後早期より生存率の顕著な低下がみられ、42 日目までの観察で Cancer 単独群のマウスでは 73.2%、のマウスでは 54.6%まで低下した。このことから担がんマウスの生存日数は糖尿病の罹患により顕著に短縮していることが明らかになった。

(5) 糖尿病併発担がんマウスにおけるn-3系不飽和脂肪酸の腫瘍進展への影響

次に Colon26 大腸がん細胞を用いた試験を実施した。本実験では Colon26-luc 細胞 (5x10⁴)を BALB/c マウスの皮下移植し、その腫瘍系を測定した。4T1 乳がん細胞とは異なり、Colon26 腫瘍の進展について、DM状態の有無で大きな違いは観察されなかった。このモデルを用いて、n-3 系不飽和脂肪酸としてのイコサペンタ酸エチル(EPA)は Colon26-luc の個体への生着を確認後、0.1 mL/body (薬物量として 100mg)で連日経口投与 (同時刻)し、EPA の造腫瘍性に対する効果を検討した。マウスの群分けは cancer/ 通常食群 [DM(-)]、Cancer/DM/ 通常食群 [DM(+)]、cancer/DM/EPA [DM(+)+EPA]の3群で行ない、マウスが死亡するまで腫瘍サイズ測定を行った(下図)。

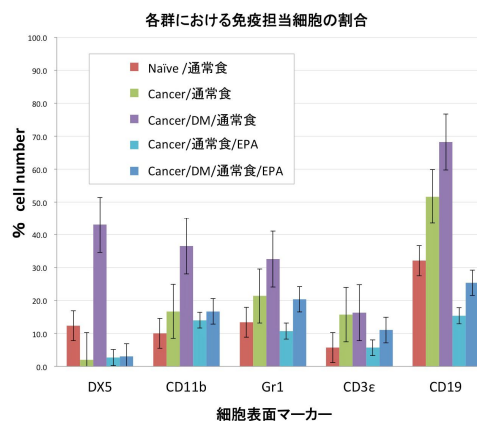


これらの結果は、DM 状態における EPA 摂取が腫瘍進展をある程度抑制するものの、生存率

には影響せず、DM 状態の有無が個体生存に大きく寄与する事が示唆された。

(6) 糖尿病併発担がんマウスにおける n-3 系不飽和脂肪酸の免疫系への影響

Colon26 担がんマウスを用い、DM状態の有無およびn-3系脂肪酸の有無の免疫系への影響を解析するため、マウス脾臓における免疫担当細胞数を測定した(各群 n=3~4; 下図)。

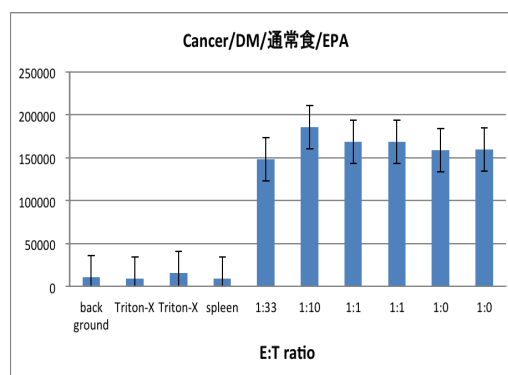
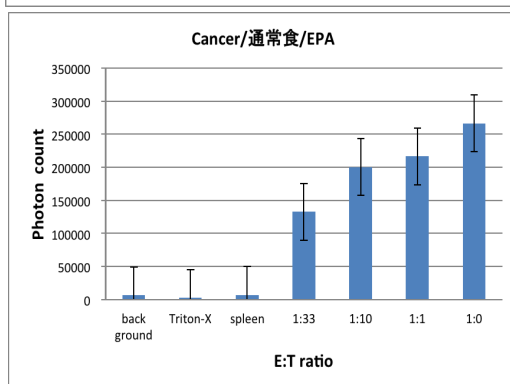
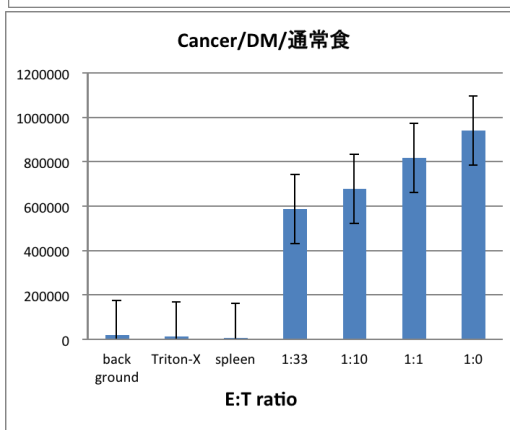
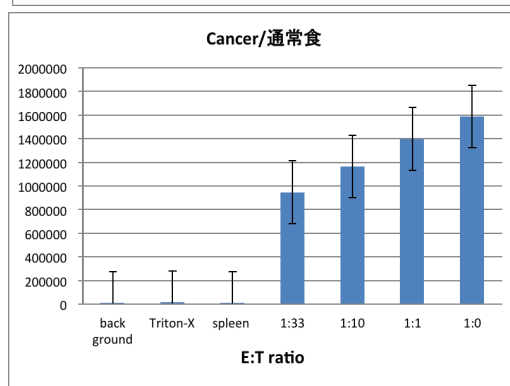
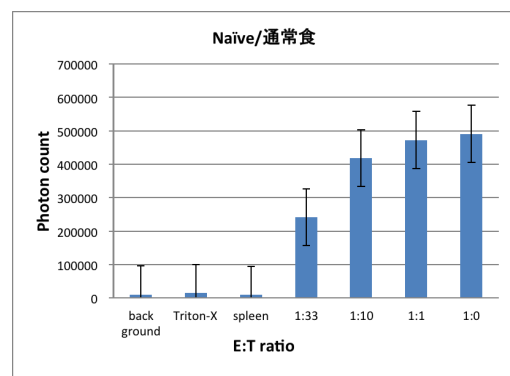


担がん状態のすべての群で CD11b、Gr1が増加傾向を示し、Cancer/DM/通常食群のみDX5 (NK細胞)の顕著な増加が見られた。また、Cancer/DM/通常食群では未熟骨髄細胞 CD11b⁺Gr1⁺細胞は、担がん単独群 (Cancer/通常食)に比べて増加が顕著であった。興味深いことに、EPA 投与によりこれらの未熟骨髄細胞集団の出現が抑制されていた。尚、未熟骨髄細胞集団は免疫抑制によって出現する myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)の亜集団である。特に、がん細胞が異常分泌する走化性因子 CXCL17 に応答し、がん微小環境や転移促進に関与することが示唆されている(研究分担者村上の報告)。

これらの結果は、担がん状態においてがん進展を促進する myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)の出現は EPA 投与によって抑制できることを示唆していると考えられた。

MHC class 抗原陰性の NK 細胞感受性細胞株 YAC-luc を用いた細胞傷害活性についてルシフェラーゼ活性を指標に評価したモデルマウスの群分けは前述の通りの5群とした(各群 n = 3~4)。その結果、Cancer/DM/通常食/EPA 群のみ NK 細胞の活性が抑制されて

いた(下図)。その他の Naïve/通常食群、Cancer/通常食群、Cancer/DM/通常食群、Cancer/通常食/EPA 群の4群では、NK 細胞の活性は保持されていた。これらの結果は、担当がん DM 状態における EPA 摂取は NK 活性を低下させる可能性を示唆した。



(7)まとめ

EPA は、炎症性サイトカインの産生抑制など抗炎症作用があり、がんの悪化や進展を抑制し、正常組織や臓器の機能を改善する効果が報告されている。

今回の研究では、EPA 投与による腫瘍進展は抑制傾向にあったが、恐らく EPA 投与により未熟骨髄細胞集団の出現抑制が寄与している可能性が高いと考えられた。高度の炎症や免疫不全状態では未熟骨髄細胞集団が出現し、担当がん宿主の免疫抑制にかかわることが知られている。この観点からは EPA ががん悪液質の改善において未熟骨髄細胞集団の出現抑制を介している可能性も考えられた。

一方、Cancer/DM マウスに EPA 投与を行った群に選択的な NK 細胞活性の顕著な低下が見られることが明らかになった。DM 併発がん患者における EPA の摂取は腫瘍進展を促進するものではないが、NK 細胞の活性低下による免疫監視低下には注意する必要があることが示された。

<引用文献>

厚生労働省(2014).平成 24 年 国民健康・栄養調査報告 結果の概要 第 1 部 糖尿病に関する状況. 厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyoudl/h24-houkoku.pdf>).

厚生労働省(2010).平成 22 年度版厚生労働白書資料編. 厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/wp/hakusyo/kousei/10-2/kousei-data/PDF/22010222.pdf>).

Richardson LC, Pollack LA. Therapy Insight:

influence of type 2 diabetes on the development, treatment and outcomes of cancer. Nature Clinical Practice Oncology. 2005. 2. 48-53.

Pandey A, Forte V, Abdallah M, Alickaj A, Mahmud S, Asad S, Mcfarlane SI. Diabetes mellitus and the risk of cancer. Minerva Endocrinologica 2011; 36(3):187-209.

Kohama, et al. The 44th Annual Meeting of the Diabetes Pregnancy Study Group (DPSG). 2012.

Matsui A, et al. CXCL17 expression by tumor cells recruits CD11b⁺Gr1^{high}F4/80⁻ cells and promotes tumor progression. PLoS ONE 2012; 7(8): e44080.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

河原田律子、小浜智子、中村彰男; 糖尿病母ラットの EPA 摂取は新生児心臓のシグナル異常を改善できるか? 糖尿病と妊娠, 査読有, 15,122-126, 2015,
<http://search.jamas.or.jp/>

小浜智子、永尾俊弘、篠崎哲也; 携帯型末梢神経検査装置 PNS-7000 により痛覚欠損が確認された 2 型糖尿病の 1 例, 医学と薬学, 査読有, 73,196-199,2016.

<http://www.medicalonline.jp/search?target=all&query=%BE%AE%C9%CD%C3%D2%BB%D2&x=0&y=0>

[学会発表] (計 3 件)

Rituko Kawaharada, Sayo Ichikawa, Akio Nakamura. Eicosapentaenoic acid may improve signaling pathway of the cardiac muscle infant Asian Congress of Nutrition, 2015 年 5 月 15 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

吉田 文, 河原田律子, 小浜智子, 大室弘美, 小濱一弘, 村上 孝. *In Vivo* 発光イメージングを用いた糖尿病状態にお

けるマウス 4T1 乳がん細胞の主要進展の特徴, 第 10 回日本分子イメージング学会, 2015 年 5 月 20 日, タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

中村貴史, 吉田 文, 原田 恩, 河原田律子, 小浜智子, 大室弘美, 小濱一弘, 村上 孝. 糖尿病併発がんマウスにおける n-3 系不飽和脂肪酸の宿主免疫系への影響, 第 136 回日本薬理学会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[図書] (計 1 件)

村上 孝. 生物発光モデル動物作製によるがん生物学研究「27 章がんの分子イメージング」, 化学同人, 2015, 300 (7)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小浜 智子 (KOHAMA, Tomoko)
武蔵野大学・薬学研究所・客員研究員
研究者番号: 00364703

(2) 研究分担者

村上 孝 (MURAKAMI, Takashi)
高崎健康福祉大学・薬学部・教授
研究者番号: 00326852

河原田 律子
(KAWAHARADA, Ritsuko)
高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助教
研究者番号: 60383147

大室 弘美
(TAKANO-OHMURO, Hiromi)
武蔵野大学・薬学研究所・教授
研究者番号: 00124470

小濱 一弘 (KOHAMA, Kazuhiro)
武蔵野大学・薬学研究所・客員教授
研究者番号: 30101116