

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 6 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560375

研究課題名(和文)がんカヘキシ-の骨格筋萎縮におけるオートファジーの解明と運動による改善

研究課題名(英文)Autophagy is involved in muscle wasting in tumor-bearing cachectic mice.

研究代表者

安納 弘道 (Anno, Hiromichi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80258392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト直腸癌を継代可能な免疫不全マウス系統を用い、骨格筋萎縮とオートファジーの関係について検討した。移植後3ヶ月時点で、腓腹筋を摘出しLC3とp62について免疫蛍光染色を行い観察した。対照と比較して担癌マウスでは体重・筋重量の有意な減少が認められた。担癌マウス筋線維内には、多くの点状又はリング状のLC3陽性反応が認められ、その数は対照に比し有意に増加した。p62陽性の点状構造も担癌マウス筋線維内に認められ対照より多い傾向を示し、その多くはLC3陽性構造と共局在を示した。これらの結果は、オートファジーが癌悪液質における骨格筋萎縮進行過程に関与する可能性を強く示唆する。

研究成果の概要(英文)：Cancer cachexia is a highly complex metabolic disorder. Patients exhibit a significant loss of skeletal muscle mass. Recent studies propose the contribution of autophagy-lysosome system to this process. However, its underlying mechanisms are still largely unknown. We established an experimental system using human-to-mouse xenotransplantation models of human colorectal cancer to investigate muscle wasting in cachexia. The successfully grown in NOG mice were fixed for immunofluorescence microscopy. An autophagosome marker LC3 was detected as several fine dots in the muscle fibers in control muscle. In tumor-bearing mice, the LC3-dots were significantly increased and often observed as ring or cup-shaped structures, indicating typical autophagosomes. When double-stained with LC3 and p62, p62-dots were largely colocalized with LC3-dots. This study supports the idea that autophagy plays important roles in the muscle wasting in cancer cachexia, and suggests that p62 might mediate this process.

研究分野：解剖学・組織学

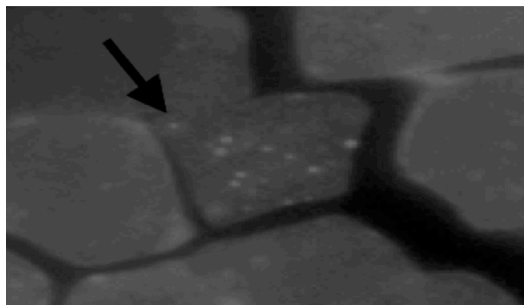
キーワード：悪液質 オートファジー 骨格筋 萎縮

1. 研究開始当初の背景

がんは我が国における死因の最上位であり、今後、高齢化社会に伴い患者数の増加が予測される。がんの発見や治療の進捗は目覚ましいが、がん患者の半数で認められるカヘキシアのメカニズムに関する研究は少なく未だ一致した見解はない。カヘキシアは単なる体重の減少ではなく、複雑な代謝経路の異常に付随する著しい骨格筋萎縮により特徴付けられ、がん治療の効果阻害や、患者のQOLを著しく低下させることが報告されている。従って、がん誘発性カヘキシアによる骨格筋萎縮のメカニズム解明と改善は、がん患者の治療効果と生活の質向上(QOL)にとって極めて意義あることである。

一方、骨格筋の形態・機能は、筋タンパク質の合成と分解の均衡によって保持されている。筋タンパク質の分解が合成を大きく上回るような環境下即ち、加齢・骨格筋の不使用・除神経などの様々な生理的条件において骨格筋は著明な萎縮を引き起こすことが明らかとなっている。これらの骨格筋萎縮進行過程において主に3つの経路(カルパイン系・ユビキチンプロテアソーム系(UPS)・オートファジー系(Autophagy))が筋タンパク質分解に関与することが報告されており、ユビキチンプロテアソーム系が最も多く研究されてきているが、近年オートファジーの関与を示す研究報告がされている。しかしながら、がん誘発性カヘキシアの骨格筋萎縮進行過程とオートファジーの関係について報告は少なく未だ一致した見解は得られていない。

申請者は、担がんマウス下肢骨格筋においてオートファジー関連因子であるLC3の発現を確認しており(図1)、がん誘発性カヘキシアの骨格筋萎縮進行過程にオートファジーが関与することが示唆される。



担がんマウス骨格筋萎縮におけるLC3の発現

2. 研究の目的

骨格筋萎縮は、タンパク質分解経路の活性化によるタンパク質分解が亢進し、タンパク質の合成を上回ることによって引き起こされ

ることが明らかとなっている。特に様々な生理的環境下での筋萎縮とUPSに関する研究報告は数多くされているが、がん誘発性カヘキシアによる骨格筋萎縮進行過程とオートファジーの関係を示した報告は少なく未だ一致した見解は得られていない。がん誘発性カヘキシアによる骨格筋萎縮は、運動機能の低下や代謝障害を引き起こし、がん治療の効果の阻害や患者のQOLの低下を招き、がん関連死の死因の約20%を占めると報告されている。

申請者は担がんマウスの骨格筋萎縮進行過程においてオートファジーが関与する可能性を見出した。そこで、本研究では、担がんマウス骨格筋萎縮におけるオートファジー誘導メカニズムの解明により、がん誘発性カヘキシアにおける骨格筋萎縮誘導因子を同定し、抑制・改善の可能性について検討する。本研究により、カヘキシアを併発したがん患者の骨格筋萎縮を改善することによりQOLの向上に貢献できる。

3. 研究方法

担がん動物の作製

培養された細胞を5~6週齢のNOGマウス胸脇皮下に 10^5 個のがん細胞を移植した。担がん後1週間おきに経過観察を行った。担がんモデルは、直腸癌患者より採取した癌組織をNOGマウス(n=5)へ移植し、一定期間通常飼育した。癌組織移植後、生着していない動物を対照群(n=5)として用いた。実験期間中、餌・水とも自由摂取とした。実験期間終了後、マウスを深麻酔下に置き、胸部大動脈より採血の後、下肢骨格筋(腓腹筋)を迅速に摘出し、4%paraformaldehyde溶液にて浸漬固定を行なった。その後30%サッカロース溶液にてシュクローズ化の後、ドライアイスイソペンタンにて急速凍結した。その後解析まで-80℃の冷蔵庫にて保存した。

免疫組織化学法による病理形態学的解析

試料凍結後、-20℃のクリオスタットにて、10 μ mの凍結切片を作製し、シランコートしたスライドガラスに張り付け十分に乾燥させた。その後、0.1% Triton X-100にて30分間 permeabilization の後、10% Normal donkey serumにて60分間浸漬することにより非特異的結合部位を阻害した。十分な洗浄の後、オートファゴソームマーカーであるLC3とオートファジー基質として知られるp62の発現について免疫蛍光染色を抗-LC3抗体(1:500, EP1983Y, abcam)、抗-p62抗体(1:1000, GP62, PROGEN)を用い行った。

また一部の切片に対してはライソソームのマーカーであるLamp1について抗-Lamp1(1:1000, 1D4B, SantaCruz)抗体を用い、抗-LC3抗体との二重染色をおこなった。

4℃で一晩免疫反応を行った。一部の切片に

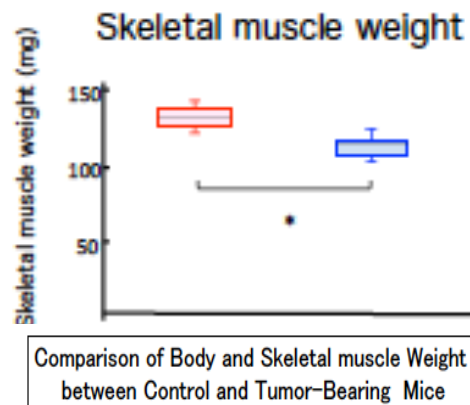
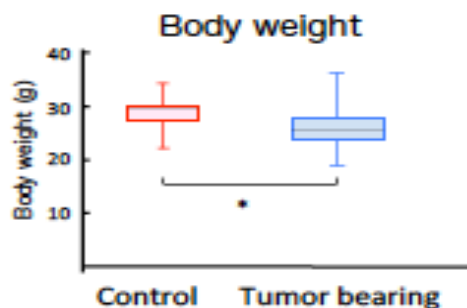
対しては、抗-LC3 抗体と抗-p62 抗体、抗-LC3 抗体、抗-Lamp1 抗体の二重染色を行った。Alexa594 または Alexa488 を標識した 2 次抗体を室温にて 3 時間反応し、封入の後共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV1000) にて観察を行い、LC3 の量的変化について検討するとともにそれぞれの免疫染色の局在関係について検討した。

4. 研究成果

悪液質は、癌や慢性心疾患、慢性腎疾患、AIDS、敗血症等で誘発される複雑な代謝性疾患である。特に癌悪液質では、化学療法や放射線治療の治療効果を阻害するだけでなく予後不良となり、患者の QOL を著しく低下させることが示されている。癌悪液質は、著しい体重の減少によって特徴づけられ、この症状は主に骨格筋の著しい萎縮に依存するものとされている。骨格筋萎縮は筋タンパクの異化作用亢進によるものであり、萎縮進行過程においてユビキチン-プロテアソーム経路及びオートファジー経路の関与が報告されている。近年、様々な骨格筋萎縮誘発条件下において、オートファジーの活性化が報告されている。しかしながら、癌悪液質誘発性骨格筋萎縮とオートファジーの関係に関する研究は少なく未だ一致した見解は得られていない。そこで本研究では、ヒトの直腸癌をマウスに移植したヒト異種担癌モデルを確立し、癌悪液質における骨格筋萎縮進行過程とオートファジーの関係について免疫組織学的手法を用い検討した。

(1) 体重及び筋重量

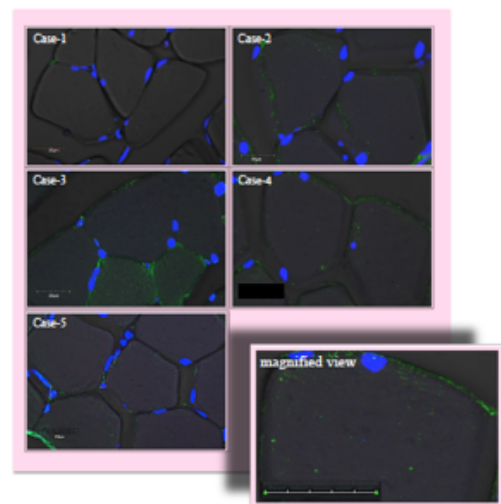
がん移植後実験期間終了時における体重及び筋重量は、体重/筋重量ともはコントロールのマウスに比し担癌マウスにおいて著明な減少を示した。体重では担癌後約 7.8% の体重の減少が認められ、筋重量では、約 14.3% の減少が認められた。



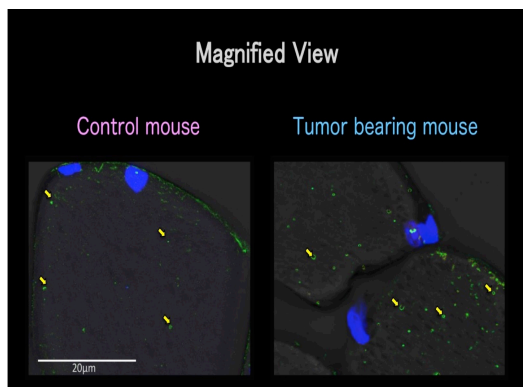
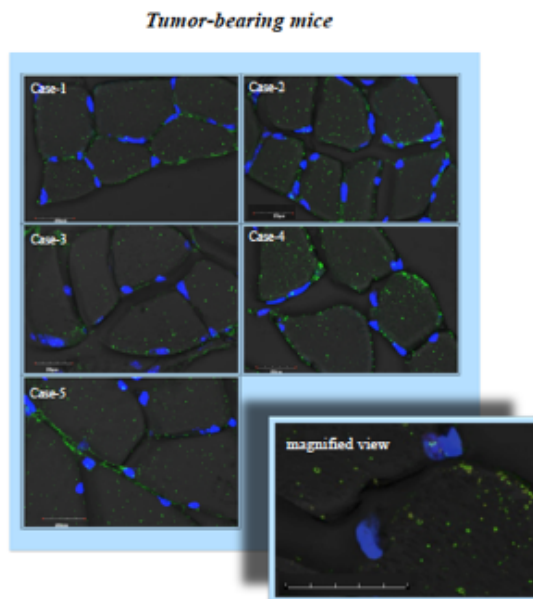
Influence of tumor-bearing on body weight (left) and skeletal muscle weight (right). The body weight and skeletal muscle weight in tumor-bearing mice (blue) were significantly decreased in comparison with graft failed mice (red). *P<0.01

(2) 免疫組織学的手法による LC3 の検出
実験期間終了後、腓腹筋を摘出し凍結切片作製の後、オートファゴソームマーカーである LC3 発現について免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。コントロール群では筋形質内に、少数の LC3 免疫陽性反応を認めることができた。一方、担癌マウス群ではコントロール群に比し、筋形質内に多くの LC3 陽性反応を認めることができ、増加する傾向が認められた。また、その反応は筋線維周辺部に局在する傾向が認められた。

Control (Tumor-not survived) mice



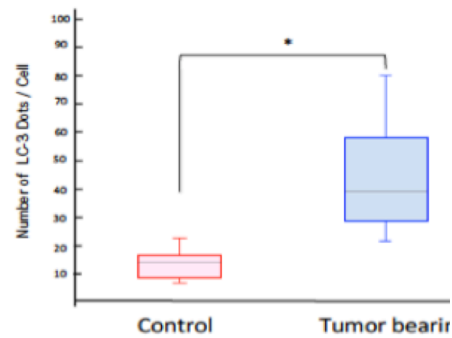
担癌マウス群の腓腹筋では、筋線維内に数多くの LC3 免疫陽性反応が認められ、その反応は微細な点状又はリング状を呈していた。



The measurement of LC3 immunopositive reactions in sarcoplasmic of tumor not survived (control) (Red bar) and tumor bearing (blue bar) mice. We were counted the number of LC3 immuno-positive reactions in sarcoplasm of 50 muscle fibers per animals. Number of LC-3 immunopositive reactions in sarcoplasm of tumor-bearing mice were significantly increased as comparison with control mice. Data presented as mean \pm SD. Statistical significance was set at * $P < 0.01$

(3) LC3 免疫陽性反応数の比較

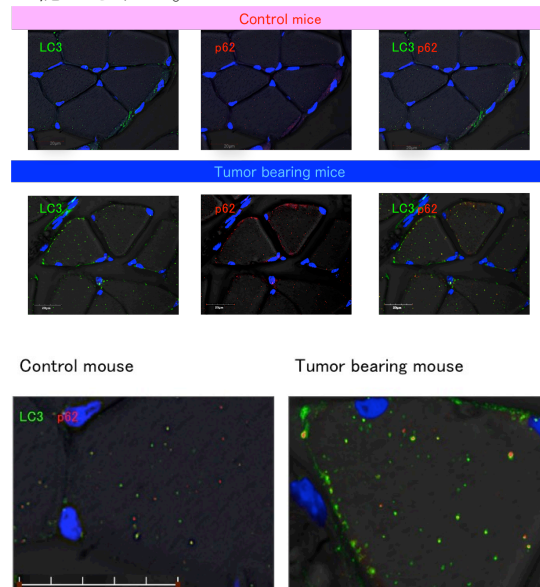
LC3 免疫陽性反応数は、対照マウス群に比し担癌マウス群の腓腹筋において有意に増加していた。この傾向は p62 免疫反応においても認められた。



The measurement of LC3 immunopositive reactions in sarcoplasmic of tumor not survived (control) (Red bar) and tumor bearing (blue bar) mice. We were counted the number of LC3 immuno-positive reactions in sarcoplasm of 50 muscle fibers per animals. Number of LC-3 immunopositive reactions in sarcoplasm of tumor-bearing mice were significantly increased as comparison with control mice. Data presented as mean \pm SD. Statistical significance was set at * $P < 0.01$

(4) LC3 とオートファジー基質である p62 の二重染色

P62 の免疫反応は LC3 と同様の傾向を示した。即ち、p62 免疫陽性反応は筋形質内に認められた。また、担癌後 p62 の免疫陽性反応は、コントロール群に比し増加する傾向が認められた。また免疫蛍光二重染色では、一部の免疫陽性反応において、LC3 と p62 の共局在が認められた。



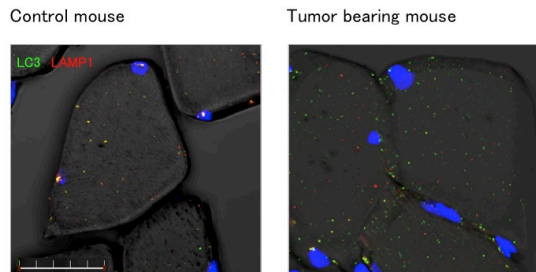
Localization pattern of LC3 and p62 immunopositive reactions

Dual immunofluorescent pattern of LC3 and p62 in skeletal muscle fibers of a tumor-bearing mice. In tumor-bearing mice (blue), p62 immunoreactions were largely co-localized with LC3 immunoreactions. However, the LC3 and

p62 immunopositive reactions in control mice (pink) far fewer than tumor-bearing mice. Green:LC3 Red:p62

(5) LC3 と LAMP1 の二重染色

LC3 と LAMP1 の免疫蛍光二重染色では、一部の免疫陽性反応において、共局在が認められた。



Dual immunofluorescent pattern of LC3 and LAMP1

本研究では、ヒト直腸癌を継代可能な免疫不全マウス系統を用い、骨格筋萎縮とオートファジーの関係について検討した。移植後3ヶ月時点で、腓腹筋を摘出し LC3 と p62 について免疫蛍光染色を行い観察した。対照と比較して担癌マウスでは体重・筋重量の有意な減少が認められた。担癌マウス筋線維内には、多くの点状又はリング状の LC3 陽性反応が認められ、その数は対照に比し有意に増加した。p62 陽性の点状構造も担癌マウス筋線維内に認められ対照より多い傾向を示し、その多くは LC3 陽性構造と共局在を示した。これらの結果は、オートファジーが癌悪液質における骨格筋萎縮進行過程に関与する可能性を強く示唆する。

まとめ

- Human to mouse xenograft model において悪液質誘発性骨格筋萎縮がされる
- 担癌マウス群の腓腹筋では、筋線維内に数多くの LC3 免疫陽性反応が認められ、その反応は微細な点状・リング状・カップ状を呈していた。
- LC3 免疫陽性反応数は、コントロールマウス群に比し担癌マウス群の腓腹筋において有意に増加していた。この傾向は p62 免疫反応においても認められた。
- LC3 と p62 の免疫蛍光二重染色では、多くの免疫陽性反応において、両者の共局在が認められ、担癌マウスにおいて増加した。
- LC3 と LAMP1 の免疫蛍光二重染色では、一部の免疫陽性反応において、共局在が認められた。

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 3 件)

1) Differing susceptibility to autophagic

degradation of two LC3-binding proteins: SQSTM1/p62 and TBC1D25/OATL1.

Hirano S, Uemura T, Annoh H, Fujita N, Waguri S, Itoh T, Fukuda M
Autophagy. 2016 Feb;12(2):312-26

2) Sqstm1-GFP knock-in mice reveal dynamic actions of Sqstm1 during autophagy and under stress conditions in living cells. Eino A, Kageyama S, Uemura T, Annoh H, Saito T, Narita I, Waguri S, Komatsu M
J Cell Sci. 2015 Dec 1;128(23):4453-61

3) A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane.

Uemura T, Yamamoto M, Kametaka A, Sou YS, Yabashi A, Yamada A, Annoh H, Kametaka S, Komatsu M, Waguri S.

[学会発表] (計 4 件)

1) Autophagy is involved in cancer cachectic skeletal muscle wasting process in tumor-bearing mice.

Hiromichi Annoh, Yuu Dobashi, Kouki Kato, Kiyooki Katahira and Satoshi Waguri
International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy 2013 (ASahct 2013); 2013 08; 仙台

2) Autophagy is involved in muscle wasting in tumor-bearing cachectic mice.

Hiromichi Annoh, Yuu Dobashi, Kouki Kato, Kiyooki Katahira and Satoshi Waguri
XXIII International Symposium on morphological Science 2013; 2013 09; 新潟

3) 担癌悪液質モデルマウスの骨格筋萎縮過程におけるオートファジーの関与.

安納弘道, 加藤弘毅, 土橋 悠, 片平清昭, 和栗 聡
日本解剖学会第 59 回東北・北海道連合支部学術集会; 2013 09; 札幌

4) 癌悪液質モデルマウスを用いた骨格筋萎縮におけるオートファジーの関与

安納弘道
第 23 回日本運動生理学会
2015 年 7 月 25 日、26 日; 東京

6. 研究組織

研究代表者

安納 弘道 (Annoh, Hiromichi)

福島県立医科大学・解剖組織学講座・助教

研究者番号: 8 0 2 5 8 3 9 2