

令和元年5月19日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16689

研究課題名(和文) ガン悪液質による骨格筋萎縮に対するNF- $\kappa$ B Decoy ONDの効果の検討研究課題名(英文) Analysis of effect of NF- $\kappa$ B decoy on skeletal muscle atrophy in tumor bearing mice

研究代表者

塚本 正 (Tsukamoto, Tadashi)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：70763738

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)：悪液質は悪性腫瘍などの基礎疾患により引き起こされ、筋肉量の減少を特徴とする複合的代謝異常症候群である。悪液質では筋肉量の低下により様々な生活動作が制限されるだけでなく、腫瘍に対する治療へも悪影響を及ぼす。本研究では悪液質に対する新たな治療として、すでに臨床で用いられているフェブキソスタットの効果を筋肉細胞の悪液質モデルと動物モデルにおいて検討した。細胞レベルでは細胞毒性のある活性酸素の低下が示され、動物実験では体重や筋肉重量の低下が抑制され、筋肉内での炎症の低下も示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍による骨格悪液質は骨格筋萎縮による機能障害を引き起こすが、その病態は依然として不明であり、確立された治療もない。悪性新生物は本邦の死亡原因の第1位であるため、悪液質による骨格筋減少により非常に多くの患者がADL制限を余儀なくされ、家族の負担も多大なものである。本研究では、悪液質の筋細胞モデルと動物モデルにおいてfebuxostatの有用性が示された。本薬剤は現在臨床で高尿酸血症に適応されており、本研究の結果をもとに臨床応用につなげ患者ADLの向上に貢献したい。

研究成果の概要(英文)：Cachexia due to the malignant tumor was a multifactorial syndrome defined by an ongoing loss of skeletal muscle mass. This condition is associated with progressive functional impairment as well as poor responses to the therapy against malignant tumors. We evaluated the effect of febuxostat, which is clinically used for hyperuricemia, for the cachexia in the model using the cells of skeletal muscles and the animals. This study showed that febuxostat effectively inhibited generation of reactive oxygen species with cytotoxicity in the cells' model of cachexia. In addition, administration of febuxostat to the animal model led a significant improvement in the body weight and muscles weight with decrease of marker of oxidative stress and inflammation.

研究分野：整形外科

キーワード：悪液質 骨格筋 悪性腫瘍 キサンチンオキシダーゼ 炎症 NF- $\kappa$ B 酸化ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)『悪液質は癌などの基礎疾患により引き起こされ、脂肪量減少の有無に関わらず、筋肉量の減少を特徴とする複合的代謝異常症候群』と、2006年ワシントンで開催された consensus conference で初めて定義(通称ワシントン定義)された [1]。その病態機序は不明な点が多く、様々な要因が複雑に関与することから研究も困難であったが、これにより研究の方向性は示された感がある。しかし治療に関しては原疾患の治療以外に有効な方法はなく、悪性新生物は本邦の死亡原因の第1位であることから、非常に多くの悪性腫瘍患者や、その家族が多大な負担を強いられている。現在、悪液質は腫瘍内科など癌治療専門医により評価・加療されるが、高カロリー補液などの栄養療法では改善できず、薬物治療で食欲を促しても筋肉減少は抑制されず、さらに筋力強化訓練や評価も不十分と思われる。このように悪性腫瘍に関連した悪液質は医療のみならず大きな社会問題であり、この分野の研究を進めることや、悪液質を克服する有効な治療を開発することは非常に意義深いものと考えられる。

(2) 整形外科医は運動器を扱うプロフェッショナルであり、現在加齢に伴う運動器疾患に対する診断治療に関して、運動器不安定症の前段階としてロコモティブシンドローム(ロコモ)の概念を発信し、本邦で加速度的に増加する高齢化、超高齢化社会における運動器疾患に対峙すべく研究を行っている。特にロコモの2大疾患のうち骨粗鬆症については薬物治療により飛躍的な効果を挙げた。一方、もう一つのロコモの代表疾患である加齢性筋肉減少症(サルコペニア)は骨粗鬆症に遅れはとったが、その病態機序や治療の開発に向けて多くの研究結果が示されている。さらに整形外科では以前よりギプス固定などの安静加療に伴う骨格筋の廃用性萎縮に対しても多くの経験がある。なかでも活性酸素種・フリーラジカル(ROS/FR)が骨格筋障害の中心的役割を担っていることが示されており、直接的にリン脂質の過酸化障害から筋細胞を障害することや、損傷された筋細胞から IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン(マイオカイン)が病態を引き起こすことが明らかにされている [2]。

(3) また悪性腫瘍疾患の病態進行において、腫瘍細胞が自身や周囲の環境へ影響を及ぼすことが重要な機序の一つであり、その際に ROS/FR は重要な因子であることも示されている [3-5]。形質転換、腫瘍の増大や浸潤、悪性度の進行といった各々の病態機序に重要な役割を果たすことが多数報告されている。さらに悪性腫瘍の例において切除標本や血清の評価から ROS/FR に関連したマーカーの増大が報告されており、全身性あるいは局所における病態に ROS/FR が関与していることは疑いようがない [6]。これらの事実から、骨格筋悪液質においても ROS/FR が原因の一つとなっている可能性が強く疑われ、治療標的の候補と考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) 今後も悪性腫瘍患者が増加することは不可避であり、分子標的薬などの新しい腫瘍治療が腫瘍罹患後の生命予後を延ばすことが予想される。同時に悪性腫瘍に関連した悪液質による骨格筋減少が患者の日常生活レベルを低下させる期間も長くなり、患者家族に強い負担も多大なものになることが予想される。このことから癌治療の進歩に伴って、ADLのレベルを維持する手段を持つべく新たな治療方法を検討する必要がある。

(2) 上述したように骨格筋減少において ROS/FR は主要な要因と考えられている。我々はこれまでに動物での下肢の駆血モデルや筋皮弁モデルを用いて骨格筋の治療研究を行い、ROS/FR による筋細胞の脂質過酸化障害や炎症性サイトカイン発現の増大を示すことに加えて、フリーラジカル除去剤であるエダラボンや炎症マーカーの遺伝子発現を一手に担う転写因子 NF $\kappa$ B に対する合成二重鎖 DNA を投与することで、骨格筋の有意な保護効果を報告してきた [7,8]。これまでの経験を活かして悪性腫瘍による骨格筋悪液質に対する抗酸化治療と抗炎症治療について検討することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 悪液質モデルマウス: 5週齢オス C3H マウスを用いた。この背部皮下にマウス骨肉腫細胞高肺転移株(LM8)を  $1.0 \times 10^7$  個を接種 ( $n=16$ ) し、正常群 ( $n=16$ ) と比較検討した。また腫瘍接種後に2回/週の間隔で飲水量と食餌摂取量を測定し、腫瘍接種後4週で体重を測定後に、前脛骨筋と腓腹筋を摘出して筋湿重量を測定し、以下の実験のために4%パラフォルムアルデヒドによる固定と液体窒素での凍結保存を行った。また転移巣を評価するために肺も摘出して4%パラフォルムアルデヒドにて固定した。これらを腫瘍接種が行われない正常コントロールと比較検討した。

(2) 薬剤の投与: 当初は二重鎖合成 DNA を用いた NF $\kappa$ B による抑制効果を検討することを計画した。まず合成二重鎖 DNA を 5mg/ml で腫瘍接種後24時間にて腹腔内へ1回投与したが、体重や筋湿重量ではコントロール(合成一重鎖 DNA 10mg/ml 投与)との差が認められず、さらに薬剤を投与しなかった群(各  $n=8$ )との差も認められなかった。この理由として合成二重鎖 DNA が投与後速やかに分解されることが考えられた。そこで FR/ROS の主要な発生源の一つであるキサンチンオキシダーゼに注目し、これを選択的に阻害する febuxostat を用いて検討

を行った。Febuxostat は飲水ボトル中に溶解して投与し、薬剤非投与群、febuxostat 5 $\mu$ g/ml 投与群 (n=10)、febuxostat 25 $\mu$ g/ml 投与群 (n=10) で比較検討した。

(3) 免疫組織化学的評価：4%パラホルムアルデヒドで固定した腓腹筋をパラフィン包埋した後、4 $\mu$ m に薄切した切片を用いて酸化ストレスマーカーである 8-OHdG を評価した。8-OHdG の評価は光学顕微鏡下に濃染された核をカウントした。

(4) キサンチンオキシダーゼ活性：凍結保存しておいた腓腹筋を凍結破砕後に RIPA buffer を用いてタンパクを抽出して測定を行った。キサンチンオキシダーゼは、プリン塩基、ヒポキサンチン、キサンチンが尿酸へと変化するとき酸化触媒するが、その際に過酸化水素が放出されるため、これを比色検出する。実験では市販の測定キット (Xanthine Oxidase Assay Kit, Sigma-ardrich, MO) を用いた。

(5) ELISA：上記の手技にてタンパクを抽出後に、TNF- $\alpha$  と IL-6 発現を市販のキット (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) を用いて測定した。

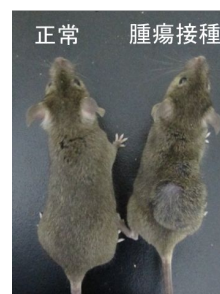
(6) 骨格筋悪液質の in vitro モデルの作成：C2C12 を 96 穴プレートに 10%FBS 下に各 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 個を播種し、24 時間後に分化用培地へ変更し、さらに 24 時間後に LM8 で conditioned medium に曝露した。Conditioned medium は LM8 を 10%FBS 下に 80% confluent まで培養し、その後 FBS を含まない培地で 72 時間後に回収して作成した。

(7) In vitro モデルでの薬剤の投与と ROS 測定：Febuxostat を 3 $\mu$ M もしくは 30 $\mu$ M で前投与した (各 n=5)。コントロールは PBS のみを投与したものを、また conditioned medium に曝露しなかった 4 群間で比較検討した。ROS 測定は 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) が細胞内に取り込まれた際に ROS により蛍光物質である DCF へ変換されるために、それを蛍光プレートリーダーで測定することで評価した。

#### 4. 研究成果

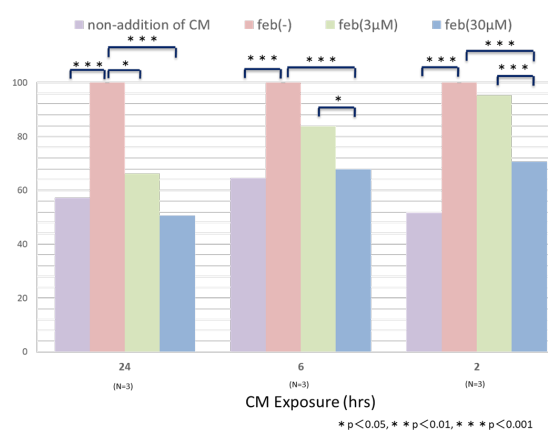
(1) LM8 接種による悪液質動物モデルの確立：LM8 接種後に体重 (正常 25g vs 腫瘍接種 21g、図 1) は有意に低下し、筋湿重量も前脛骨筋 (正常 44.5mg vs 腫瘍接種 35.7mg)、腓腹筋 (正常 118.7mg vs 腫瘍接種 91.6mg) とともに有意な低下を認めた。また 8-OHdG の免疫組織化学的評価においても LM8 接種マウスでは骨格筋の核が濃染される比率は有意に多かった (75% vs 62%)。キサンチンオキシダーゼも有意に高く (15 $\mu$ U/mg vs 10 $\mu$ U/mg)、炎症性サイトカインは TNF- $\alpha$  (12 pmol/mg vs 10 pmol/mg) は高い傾向で、IL-6 (1.2 pmol/mg vs 0.73 pmol/mg) は有意に高値であった。

図 1：肉眼的所見



(2) 骨格筋悪液質 in vitro モデルの確立：LM8 conditioned medium に刺激後 2, 6, 24 時間 (各 n=5) で DCF-DA assay にて ROS を評価し、コントロールに比して ROS は各時期において 93.3%、55.1%、83.7% と有意な増加を認め、腫瘍が骨格筋細胞へ直接的に作用することが示された。

図 2：In vitro モデルでの DCF-DA assay



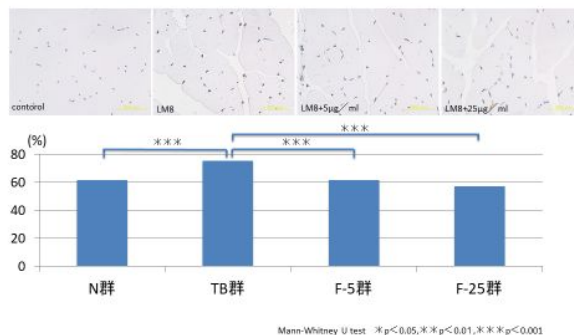
(3) Febuxostat の骨格筋細胞における保護効果：LM8 conditioned medium の刺激により増大した ROS は febuxostat 3 $\mu$ M あるいは 30 $\mu$ M を 24 時間前に前投与することで、刺激後 6 時間以降での ROS 発生が有意に抑制された。また febuxostat 30 $\mu$ M の前投与では刺激後 2 時間から ROS 発生を有意に抑制した (図 2)。

(4) 悪液質動物モデルにおける febuxostat 投与の効果：LM8 摂取による有意な体重減少と筋湿重量の低下は、febuxostat 5 $\mu$ g/ml 投与、febuxostat 25 $\mu$ g/ml 投与により、体重は 23.19g、23.69g、筋湿重量は前脛骨筋が 40.8mg、41.9mg、腓腹筋が 104.9mg、106.5mg と有意に抑制された。また飲水量と食餌量に関しては febuxostat 5 $\mu$ g/ml 投与群では悪液質モデルと差はなかったが、febuxostat 25 $\mu$ g/ml 投与群では摂取量は有意に多く、ヒト換算での最大量である febuxostat 25 $\mu$ g/ml の投与により栄養面での改善も期待される結果であった。一方、肺転位に関しては febuxostat の投与の有無に関わらず、LM8 を接種したマウスでは全例に認められ、

腫瘍細胞への抑制効果は認めないと考えられた。

(5) 悪液質動物モデルの骨格筋に対する febuxostat 投与の効果：まず xanthine oxidase 活性に関しては LM8 摂取にて有意に増大したが、febuxostat の投与により febuxostat 5 $\mu$ g/ml 投与群では 9.1U/mg febuxostat 5 $\mu$ g/ml 投与群では 8.1U/mg と有意に抑制されていた。このことから febuxostat の全身投与は骨格筋での ROS/FR に対して効果的であると考えられた。実際に骨格筋において酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の有意な低下も認められた(図3)。さらに骨格筋における炎症性サイトカインの発現に関しても febuxostat には直接的な抗炎症作用はないにも関わらず、febuxostat 5 $\mu$ g/ml 投与群、febuxostat 25 $\mu$ g/ml 投与群のいずれにおいても有意な低下を認めた。

図3：8-OHdG の免疫組織化学的評価



(6) 本研究のまとめ：骨肉腫高肺転位株を皮下に投与したモデルにおいて、骨格筋では酸化ストレス障害に暴露されていることが示された。また骨格筋内での炎症性サイトカインの高発現も示された。このことから ROS/FR 産生もしくは炎症性サイトカインの抑制が悪性腫瘍疾患における筋萎縮の治療戦略として考えられたが、二重鎖合成 DNA 技術を用いた NF $\kappa$ B の抑制では困難であった。そこで ROS/FR 抑制のために選択的キサンチンオキシダーゼ阻害剤である febuxostat を用いて抑制効果を検討した。この薬剤では抗腫瘍効果は認められなかったが、体重減少と骨格筋湿重量の低下は有意に抑制し、また飲水量と食餌量も febuxostat 25 $\mu$ g/ml 投与では改善を認めた。その機序として腫瘍により刺激された骨格筋では ROS/FR が増大するが、febuxostat は骨格筋細胞において直接的な抗酸化効果を認めることが示された。また全身投与でも骨格筋内の xanthine oxidase 活性の低下、さらに骨格筋内における酸化ストレスマーカーとも有意に抑制したことから、febuxostat 投与は骨格筋組織においても抗酸化作用から筋保護効果を示したと考えられた。また間接的に炎症を抑制することも筋萎縮の抑制機序の一つであることが考えられた。Febuxostat は臨床において高尿酸血症に適応されている薬剤であり、次に悪性腫瘍患者において高尿酸血症を示すものを対象とした臨床研究を行い、febuxostat 悪液質に対する治療へと発展させ、患者 ADL の向上に貢献したい。

#### <引用文献>

- Evans WJ, Morley JE, Argiles J, et al., Cachexia: a new definition, Clin Nutr, 2008, 27(6), 793-799.
- Powers SK, Smuder AJ, Judge AR, Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence?, Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012, 15(3), 240-245.
- Luzzatto L, Pandolfi PP., Causality and Chance in the Development of Cancer, N Engl J Med, 2015, 373(1), 84-88.
- Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D, Redox-dependent downregulation of Rho by Rac., Nat Cell Biol, 2003, 5(3), 236-241.
- Hielscher A, Gerecht S, Hypoxia and free radicals: role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships, Free Radic Biol Med, 2015, 79, 281-291.
- Nathan FM, Singh VA, Dhanoa A, Palanisamy UD, Oxidative stress and antioxidant status in primary bone and soft tissue sarcoma, BMC Cancer, 2011, 11, 382.
- Hori K, Tsujii M, Iino T, et al., Protective effect of edaravone for tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury on skeletal muscle in murine hindlimb, BMC Musculoskelet Disord, 2013, 14, 113.
- Uemura T, Tsujii M, Akeda K, et al., Transfection of nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotide protects against ischemia/reperfusion injury in a rat epigastric flap model, J Gene Med, 2012, 14(11), 623-631.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 吉田 格之進, 里中 東彦, 塚本 正, 原 隆久, 辻井 雅也, 須藤 啓広, 環指伸筋腱内ガングリオンの 1 例, 中部日本整形外科災害外科学会雑誌, 査読有, 61 巻 6 号, 2018, 1357-1358
- 吉田 格之進, 鈴木 慶亮, 里中 東彦, 塚本 正, 原 隆久, 須藤 啓広, AL-S approach における Wagner cone ステムの X 線学的評価, 日本人工関節学会誌, 査読有, 48 巻, 2018, 183-184
- 吉田 格之進, 鈴木 慶亮, 塚本 正, 須藤 啓広, Anterolateral supine approach における

〔学会発表〕(計 11 件)

Odake K, Tsujii M, Tsukamoto T, Asano T, Iino T, Sudo A, Febuxostat Improves Waste of Skeletal Muscles via Inhibition of Reactive Oxygen Species in Tumor Bearing Mice With LM8 Osteosarcoma, Orthopaedic Research Society(ORS) 2018 Annual Meeting (March 10-13 2018, New Orleans,LA)

Satonaka H, Tsujii M, Yoshida K, Tsukamoto T, Hara T, Sudo A, Clinical Results of Interposition Arthroplasty with or without Intermetacarpal Ligament Reconstruction for Thumb Carpometacarpal Osteoarthritis: a retrospective comparison study, XXIII FESSH congress (June 13-16, 2018 Copenhagen, Denmark, Tivoli congress Center)

里中東彦、辻井雅也、吉田格之進、塚本 正、原 隆久、須藤啓広、母指 CM 関節症に対する中手靭帯再建を追加した Kaarela 変法、第 130 回中部日本整形外科学会災害外科学会学術集会(平成 30 年 4 月 20-21 日 愛媛県松山市 ひめぎんホール 愛媛県民文化会館)

吉田格之進、里中東彦、塚本 正、原 隆久、辻井雅也、須藤啓広、環指伸筋腱内ガングリオンの 1 例、第 130 回中部日本整形外科学会災害外科学会学術集会(平成 30 年 4 月 20-21 日 愛媛県松山市 ひめぎんホール 愛媛県民文化会館)

里中東彦、辻井雅也、塚本 正、吉田格之進、原 隆久、須藤啓広、母指 CM 関節症に対する第 1 中手靭帯再建を追加した Kaarela 法の治療成績、第 61 回日本手外科学会学術集会(平成 30 年 4 月 26-27 日 東京都新宿区 京王プラザホテル)

里中東彦、吉田格之進、塚本 正、原 隆久、辻井雅也、須藤啓広、超音波ガイド下鎖骨上窩腕神経叢ブロックによる経皮的動脈血酸素飽和度の低下に影響する因子、第 61 回日本手外科学会学術集会(平成 30 年 4 月 26-27 日 東京都新宿区 京王プラザホテル)

小嶽和也、辻井雅也、塚本 正、浅野貴裕、須藤啓広、骨格筋悪質液に対する febuxostat の抑制効果、第 91 回日本整形外科学会学術総会(平成 30 年 5 月 24-27 日 兵庫県神戸市神戸コンベンションセンター)

里中東彦、塚本 正、吉田格之進、原 隆久、辻井雅也、須藤啓広、鎖骨上窩腕神経叢ブロック下上肢手術における経皮的動脈血酸素飽和度の低下に影響する因子の検討、第 91 回日本整形外科学会学術総会(平成 30 年 5 月 24-27 日 兵庫県神戸市 神戸コンベンションセンター)

小嶽和也、辻井雅也、塚本 正、浅野貴裕、須藤啓広、骨格筋悪質液に対する febuxostat の抑制効果、第 91 回日本整形外科学会学術総会(平成 30 年 5 月 24-27 日 兵庫県神戸市神戸コンベンションセンター)

鈴木慶亮、吉田格之進、中瀬一真、塚本 正、田島正稔、須藤啓広、ALS アプローチによる人工骨頭挿入術の 2 機種のステムアライメント評価、第 45 回日本股関節学会学術集会(平成 30 年 10 月 26-27 日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場)

吉田格之進、鈴木慶亮、塚本 正、須藤啓広、HipAlign Supine Position を用いた THA におけるカップ設置精度の検討、第 45 回日本股関節学会学術集会(平成 30 年 10 月 26-27 日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/seikeigeka/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：辻井 雅也  
ローマ字氏名：( TSUJII, Masaya )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。