

学位論文の要約

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 乙 生命医科学専攻 臨床医学系講座 運動器外科学・腫瘍集学治療学分野	氏 名	塚本 ^{つかもと} 正 ^{ただし}
-----	--	-----	-------------------------------------

主論文の題名

Febuxostat reduces muscle wasting in tumor-bearing mice with LM8 osteosarcoma cells via inhibition of reactive oxygen species generation

(LM8 による tumor bearing mice での febuxostat の骨格筋萎縮の抑制効果の検討)

Tadashi Tsukamoto, Masaya Tsujii, Kazuya Odake, Takahiro Iino,
Tomoki Nakamura, Akihiko Matsumine & Akihiro Sudo

Free Radical Research 55(7):810-820

Published: July 19, 2021

doi: 10.1080/10715762.2021.1947502

主論文の要約

【緒言】

悪液質は骨格筋萎縮を特徴とする複合的な代謝異常の症候群であり、悪性腫瘍などによって引き起こされ、進行性の機能障害をもたらす。また、がん悪液質では術後合併症や機能障害を増悪させ、化学療法や抗腫瘍療法への耐用性を著しく低下させる。悪性腫瘍では腫瘍由来および宿主由来のパラクリン因子を介して周囲の環境を変化させることや活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)が病態に関与していると、除神経、老化および廃用による骨格筋萎縮の重要なシグナル伝達にも ROS が関与していることから ROS の抑制が悪液質による筋萎縮の改善につながると仮定した。キサンチンオキシダーゼ(xanthine oxidase, XO)は尿酸を介して ROS を生成するが、XO の選択的阻害剤であるフェブキソスタットを用いて ROS を抑制することで LM8 骨肉腫細胞による骨格筋萎縮が改善しうるかを検討した。

【方法】

Conditioned medium の作成

LM8 骨肉腫細胞を 80~90%コンフルエントに達した時点で、phosphate-buffered saline(PBS)で洗浄し、培地をフェノールレッドと血清を含まない Dulbecco's Modified Eagle's Medium

(DMEM)に交換した。48時間培養後、12,000 rpm、4°Cで10分間遠心分離し、0.22 mm フィルターでろ過した培地を conditioned medium(CM)とした。

Conditioned medium で培養した C2C12 筋管細胞におけるフェブキシスタットの抗酸化作用

C2C12 細胞を 96 ウェルプレートに 1.0×10^4 /well ずつ播種し、2%FBS DMEM で分化誘導を行った後で、フェブキシスタットを 3mM または 30mM で加えて 24 時間の premedication を行ったあとで、CM で 2 時間または 24 時間培養した。

ROS の測定を 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay で行い、位相差顕微鏡で各群 100 本の筋管の直径を測定して評価を行った。Atrogin-1 の発現量の評価をウエスタンブロッティングにて行った。

動物モデルとフェブキシスタットの投与

5 週齢の雄 C3H マウスの背中に LM8 細胞 1.0×10^7 個を皮下注射して tumor bearing mice(TB mice)を作成した。フェブキシスタットは腫瘍細胞を接種した日から飲料水に溶解して投与した。F5 群(TB mice にフェブキシスタット 5 mg/ml を投与)、F25 群(TB mice にフェブキシスタット 25 mg/ml を投与)、TB 群(フェブキシスタットを投与しない TB mice)、C 群(コントロール)の 4 群間で検討した。4 週間後に屠殺し評価を行った。

ウエスタンブロッティング

液体窒素で凍結した腓腹筋を Cryopress でホモジナイズし、RIPA buffer に溶解させた。ブラッドフォード法にて各サンプルのタンパク質濃度を 2mg/ml に調整して、Atrogin-1 の発現量を評価した。

免疫組織化学的分析

腓腹筋をパラフィン包埋して薄切し、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG)抗体(日本老化制御研究所)で免疫染色を行った。各視野 8OHdG 陽性の核の数を核の総数で割ることにより、8OHdG 陽性核の比率を算出した。

XO 活性

市販キット(Sigma-Aldrich)で腓腹筋の XO 活性を測定した。

炎症性サイトカインの測定

enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)キット(BD Bioscience)を用いて TNF- α と IL-6 の定量分析を行った。

【結果】

In vitro において DCF-DA assay では CM で 2 時間培養した C2C12 筋管細胞の ROS はコントロールに比して 1.9 倍に増加し、24 時間では 1.8 倍に増加した。一方、3mM のフェブキシスタットの前投薬では 24 時間の CM 培養で、30mM の前投薬では 2 時間および 24 時間 CM 培養で ROS の増加を有意に抑制した。CM での培養により C2C12 筋管細胞での Atrogin-1 の発現は有意に増加し、筋管の直径は有意に減少した。それに対し 3mM と 30mM のフェブキシスタットの前投薬により CM による筋管の萎縮は有意に抑制され、3 mM の前投薬では Atrogin-1 の増加が抑制された。*In vivo* では LM8 細胞接種の 4 週間後で、体重は C 群(24.9 ± 1.4 g)と比較して TB 群(20.8 ± 1.7 g)で有意に低下した。TB 群の腓腹筋(88.3 ± 10.5 mg)および前脛骨筋(35.0 ± 2.2 mg)は C 群の腓腹筋(118.3 ± 10.3)および前脛骨筋(45.5 ± 2.7 mg)よりも有意に低下した。TB 群では骨格筋湿重量減少に加えて筋線維径が低下して Atrogin-1 の発現が増加しており、XO 活性(C 群 :

10.1±2.7 IU/mg、TB 群 : 14.8±3.0 IU/mg)および 8-OHdG 陽性核の比率は有意に上昇していた。TNF-α、IL-6 は TB 群(TNF-α12.1±1.3pg/ml、IL-6 1.1±0.3pg/ml)で C 群(10.0±1.7pg/ml、0.8±0.3pg/ml)よりも上昇していた。フェブキシスタットの投与により体重は F5 群(23.2±1.9g)と F25 群(23.5±2.6 g)で改善した。筋湿重量も F5 群(腓腹筋 104.9±10.9mg および前脛骨筋 41.9±4.7mg)、F25 群(腓腹筋 105.8±13.1mg および前脛骨筋 41.9±4.7mg)と TB 群と比べて有意に改善し、筋線維径の萎縮も改善した。XO 活性は有意に抑制され(F5 群 : 9.1±1.6 IU/mg、F25 群 : 8.1±1.5 IU/mg)、8-OHdG 陽性核の比率が有意に低下した。TNF-α は F5 群および F25 群で、IL-6 は F5 群で TB 群と比較して有意に減少した。また、TNF-α と IL-6 はすべての群で骨格筋の湿重量と負の相関を認めた。C 群を除いた 3 群すべてのマウスで肉眼的肺転移を認めた。平均生存期間は TB 群、F5 群、F25 群で各 46.9 日、60.5 日、56.8 日で有意差は認めなかった。

【考察】

悪性腫瘍による悪液質では炎症性サイトカインやエクソソームを含む腫瘍由来の因子が骨格筋萎縮に関与することが報告されている。また、酸化ストレスは様々な原因による悪液質において病態への関与が報告されている。本研究の *in vitro* では LM8 細胞の分泌物が ROS 上昇を介して C2C12 細胞に Atrogin-1 の増加や筋萎縮といった有害な影響を与えることが示された。悪液質の治療戦略の一つとして抗酸化物質の投与が考えられるが、本研究 *in vitro* ではフェブキシスタットの投与により CM で培養された C2C12 細胞の ROS が低下し、Atrogin-1 の増加や筋萎縮が抑えられた。*In vivo* でも同様に ROS の低下と筋萎縮の抑制を得られており、TNF-α や IL-6 上昇も抑制した。臨床で高尿酸血症の治療薬として使用されるフェブキシスタットは悪性腫瘍による悪液質での筋萎縮の治療薬になり得るが腫瘍の転移は抑えることも生存期間の改善もできず腫瘍自体の治療にはならないと考えられた。

【結語】

フェブキシスタットに抗腫瘍効果がなかったが、LM8 骨肉腫によって引き起こされた骨格筋萎縮に対して効果を示した。