

表題 悪液質誘発における宿主側因子の検討ー単一クローン腫瘍の移植部位の違いによる悪液質誘発ー

論文の区分 博士課程

著者名 千葉文博

担当指導教員氏名 力山敏樹 教授

研究指導協力教員 早田邦康 准教授

所属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
総合医学 分野
外科系総合医学

2014年1月10日申請の学位論文

目 次

はじめに	1
方法	4
腫瘍細胞	4
実験動物	5
血液、移植腫瘍、および臓器の採取と血液生化学的検査	6
サイトカイン測定	7
組織学的および免疫組織学的検討	7
Spermidine/spermine N-1 acetyl transferase (SSAT) の測定	8
アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) の測定	9
マロニル CoA の測定	10
統計学的解析	11
結果	12
マウスの体重および餌摂取量と飲水量の変化	12
腫瘍移植後 14 日目における脂肪重量と筋肉重量	13
総餌摂取量	15
クローン 20 腫瘍の移植部位の違いによる悪液質誘発の差異	16
血液学的検査	17
血清および血漿中ホルモン濃度	18
培養細胞ライセート、培養上清、移植腫瘍ライセート およびマウス血清中のサイトカイン濃度	19
サイトカイン濃度と悪液質の関係	23
移植腫瘍の肉眼的、組織学的、および免疫組織学的検討	25

SSAT-mRNA、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) 量、 およびマロニル CoA 量	28
考察	34
結論	37
謝辞	37
参考文献	38

はじめに

癌悪液質とは、骨格筋と蓄積脂肪の減少を伴う体重減少や代謝異常などを特徴とし、癌末期においては大半の患者が陥る独特の消耗状態である。癌悪液質は、癌患者の生活の質（Quality of Life=QOL）を低下させ、化学療法などの癌治療において障害となるばかりでなく、癌患者の生命予後を悪化させることが報告されている(1, 2)。すなわち、癌悪液質を治療する手段が確立されれば、癌患者の QOL を改善できるばかりではなく、生存期間の延長も期待できる。進行した消化器癌に対する治療が癌患者の生存期間の延長と QOL の改善が主な目標となっている現状を考慮すると、癌悪液質の治療も癌治療と同等の意義があると考えられる。

癌患者でしばしば認められる食欲低下は摂取エネルギー量を減少させ、体重の減少を誘発する一因となる。しかし、動物を用いた検討では、癌悪液質で認められる蓄積脂肪と骨格筋重量の減少や体重減少は、単なるエネルギー摂取の不足では説明できないことが明らかにされている。さらに、飢餓状態では脂肪組織の減少が主であるが、癌悪液質では蓄積脂肪の減少のみではなく骨格筋の減少も認められるなど、癌悪液質における代謝の変化は飢餓状態とは大きく異なっている(3, 4)（表 1）。その後、癌悪液質は、単なる摂取エネルギー量の減少ではなく、癌の存在によるエネルギー消費の増大が原因であると考えられるようになってきた。しかしながら、動物実験での悪液質の検討では、動物に強制的に栄養補給をしても癌悪液質を改善できないことなどから、悪液質を誘発する因子の存在が指摘されるようになった。これらの因子として、様々なサイトカインやホルモンが提唱され(5, 6)、これらの作用を消去することによる悪液質の治療の可能性について検討されてきた。しかし、今日に至るまで、癌悪

液質の治療法は確立されていない。

表 1. 飢餓と悪液質の違い

	飢餓	悪液質
Body Weight	↓	↓
Body Cell Mass	↓	↓↓↓
Body Fat	↓↓↓	↓↓
Resting Energy Expenditure	↓↓↓	↑↑
Protein Degradation	↓↓↓	↑↑↑
serum Insulin	↓↓↓	↑↑↑
serum Cortisol	→	↑↑

文献 (4) より一部改変

一部の研究グループは癌が存在することによって産生される独特な因子が悪液質の主な原因であると提唱している(7, 8)。しかし、癌悪液質と類似の消耗状態は、感染症、肺気腫症、心不全の患者などの非担癌患者においても観察される。また、担癌状態の初期に悪液質が発症していなくても、癌の進行や転移に伴い末期にはほとんどの癌患者が悪液質を発症することや、発生した癌の種類に関わらず癌悪液質の病態が誘発されることが指摘されている(1, 9)。これらのことは、癌が産生する特殊な悪液質誘発因子によってのみ悪液質が誘発されるのではなく、宿主細胞もしくは宿主と腫瘍間の反応が悪液質の病態に大きく関与していることを示唆するものである。実際に、悪液質を誘発する因子である様々なサイトカインやホルモンは、宿主の正常細胞から産生される

(10-13)。研究指導協力教員である早田は、マウス大腸癌コロニ 26 腫瘍を用いた悪液質動物モデルで、悪液質誘発にはインターロイキン (IL) 6 が重要な役割を演じており、その産生には宿主の免疫細胞が関与していることを報告してきた (14-17)。

通常、腫瘍細胞は複数の細胞集団からなっている。腫瘍細胞を動物に移植すると、宿主の反応によって選択されたある種の細胞集団からのみ構成される腫瘍細胞が増殖する。例えば、悪液質誘発腫瘍としてしばしば用いられるマウス大腸癌コロニ 26 腫瘍を、動物の異なった部位に移植すると、増殖する腫瘍の組織像は移植部位によって異なることが指摘されている(18)。このような移植される部位による腫瘍の組織像の違いは、免疫機能に欠損のあるヌードマウスへの腫瘍移植モデルでも観察される(19, 20)。そこで、この研究では、マウス大腸癌コロニ 26 腫瘍から限界希釈法により 1 個の細胞から樹立されたクローン腫瘍を用いる。このことによって腫瘍移植部位の違いによって生じる腫瘍細胞の差異を排除することができ、癌悪液質における宿主の因子をより明確にできると考えられる。クローン 5 腫瘍はコロニ 26 腫瘍から樹立された単一クローン腫瘍であるが、マウスの皮下に移植しても悪液質を誘発しない(21)。この研究は、クローン 5 腫瘍をマウスの様々な臓器や組織に移植して、悪液質誘発の状態を検討し、悪液質における宿主側の因子の重要性を明らかにするとともに、癌悪液質の治療のターゲットとなり得る因子を同定することを目的とした。

方法

腫瘍細胞

マウス大腸癌コロネ 26 腫瘍は発癌化学物質 (N-Nitroso-N-Methylurethan) を投与した BALB/c マウスから得られた大腸腺癌である。そのコロネ 26 腫瘍から限界希釈法によって 1 個の癌細胞から樹立されたコロネ 5 腫瘍とコロネ 20 腫瘍を実験に用いた(21)。コロネ 26 腫瘍はマウスに移植すると悪液質を誘発することで知られているが、コロネ 5 腫瘍をマウスの皮下に移植しても悪液質は誘発されない(15, 21)。一方、コロネ 20 腫瘍をマウスの皮下に移植すると、悪液質を強力に誘発する。

腫瘍細胞は、非動化した 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA) および 0.01% Penicillin/Streptomycin を含む RPMI1640 培養液で培養した。細胞密度が 5×10^5 cell/ml になるように調節した細胞浮遊液を T75 フラスコ (75 cm², Iwaki Glass, Tokyo, Japan) に入れて、sub-confluence になるまで培養し (37°C、5% CO₂)、移植可能な細胞数になるまで 3-4 回継代培養を行った。Hanks' balanced salt solution (Gibco) で 5×10^6 cell/ml の細胞浮遊液を作成し、0.2ml (1×10^6 cell の腫瘍細胞を含む) を、マウスに移植した。

細胞培養液中のサイトカイン濃度を測定するため、 1×10^6 個の細胞を含む細胞培養液を 500×g で 5 分間遠心し、培養上清を -80°C で保存した。細胞内サイトカイン濃度を測定する目的で、培養した細胞を PBS に再懸濁し、細胞数を調節した後に 500×g (室温、5 分) で遠心して上清を取り除き、200μl の Procarta lysis buffer (Panomics, Inc., Fremont, CA, USA, from Veritas, Tokyo, Japan) を加え、氷上で 5 分間インキュベートした。19,100×g (4°C、10 分) で遠心した後、上清

はサイトカイン濃度測定まで-80℃で保存した。

実験動物

動物実験計画は自治医大倫理委員会の承認を得た上で、動物実験取扱いの基本原則を遵守して実験を行った。7週齢のCD2F1 (BALB/c×DBA/2 F1) マウス (オス) を日本チャールズリバー社 (Atsugi, Kanagawa, Japan) から購入した。CD2F1 マウスは免疫機能や内分泌機能に異常はなく、BALB/c や DBA/2 マウスから樹立された癌の移植が可能なマウスである。4匹ずつを1ゲージに入れ、HEPA フィルターユニット (AQUA-CLEAN 空調システム; Japan CLEA Inc., Tokyo, Japan) を通した空気で 23℃の室温に保たれ、12時間毎に明暗を調節した飼育器で飼育した (さいたま医療センター循環器病臨床医学研究所新小動物舎: 環境制御飼育装置エバック; Japan CLEA Inc.)。餌 (Nippon Bio-Supply, Tokyo, Japan) と水は自由に摂取できるようにした。マウスは搬入後1週間ほど環境に慣れさせ、8週齢になった時点で以下の6つのグループに無作為に分けた。1) クローン5の右鼠径部皮下移植マウス群 (C5 Cut)、2) クローン5の左腓腹筋内移植マウス群 (C5 Mus)、3) クローン5の腹腔内移植マウス群 (C5 Per)、4) クローン5の胸腔内移植マウス群 (C5 Tho)、5) 腫瘍を移植しないマウス群 (NTB)、6) クローン20の右鼠径部皮下移植マウス群 (C20 Cut)。体重、および食餌摂取量と飲水量は毎日16時頃に測定した。

血液、移植腫瘍、および臓器の採取と血液生化学的検査

腫瘍移植 14 日後に、PBS で希釈したペントバルビタール (60 μ g/g BW) をマウスの腹腔内に投与して、十分な麻酔を得られた後に右房より全血を採取した。採血後、移植腫瘍、右腓腹筋、および精巢上体脂肪を摘出して、直ちに重量を測定した。移植腫瘍内のサイトカイン濃度の測定目的で、プロテアーゼインヒビターを含む 300 μ l の Procarta lysis buffer (Panomics) を 10mg の腫瘍に加えてホモジナイズし、19,100 \times g (4 $^{\circ}$ C、10 分) で遠心後、上清を回収し-80 $^{\circ}$ C で保存した。また組織学および免疫組織学的検討のため、腫瘍の一部は摘出後直ちに-80 $^{\circ}$ C で保存した。

血球計算と白血球分画は、EDTA 処理した全血を用いて、臨床検査機関 (Japan Pet Life Co., Ltd., Tokyo, Japan) の自動測定器で測定した。血漿はヘパリン処理によって採取し、血清は MiniCollect (Sekisui Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて採取した。検体を 5,000 \times g (20 $^{\circ}$ C、10 分) で遠心し、血漿もしくは血清を回収した。得られた血漿や血清中の各種ホルモン濃度は、臨床検査機関 (SRL, Inc., Tokyo, Japan) の自動測定器で測定した。血清の一部は、サイトカイン濃度測定まで-80 $^{\circ}$ C で保存した。

血清アミロイド蛋白 A (SAA) 濃度は、過去の報告を参考にして(22, 23)、Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法で測定した。PBS で希釈したモノクローナル抗体を 96well のマイクロプレートに 37 $^{\circ}$ C で一晩コーティングし、1%BSA を含む PBS を加えて、37 $^{\circ}$ C で 2 時間ブロッキングした。0.05%Tween-20 を含む BSA-PBS (1:100) でマウス血清を希釈し、マイクロプレートに加えて、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。プレートを洗浄後、0.05%Tween-20 を含む 1%BSA-PBS で希釈した HRP 標識二次抗体を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。マイ

クロプレートを洗浄後、ortho-phenyldiamine を加えて、490nm で吸光度測定した。

サイトカイン測定

培養細胞ライセート、細胞培養液、移植腫瘍ライセート、および血清中のサイトカイン濃度の測定は、Procarta Cytokine Assay kit (Panomics) を用いて行った。マニュアルに従って、抗体付きビーズと biotin 標識した検出抗体および Streptavidin-phycoerythrin で検体をインキュベートし、Luminex 100 instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で測定した。測定したサイトカインは、interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , leukemia inhibitory factor (LIF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), monocyte chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α および vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) である。検量線を用いてサイトカイン濃度を決定した。移植腫瘍内のサイトカイン濃度は、Lowry 法 (*DC*TM プロテインアッセイ ; Bio-Rad) で測定した総蛋白量で補正した。

組織学的および免疫組織学的検討

10%ホルマリンで固定した腫瘍組織をエタノールで脱水し、キシレンに置き換えた後、パラフィン固定した。3 μ m 厚の連続切片標本を作成し、キシレンでパラフィン除去し、段階的な脱水をエタノールで行った。

連続切片のうちの一つは H&E 染色を行い、病理医に組織学的評価を行

ってもらった。H&E 染色の手順は、Mayer's hematoxylin 染色（3分）、蒸留水洗浄、eosin 染色（2分）、段階的なエタノール脱水、キシレン置換を行い封入した。

免疫染色に用いる切片を 10 mM クエン酸ナトリウム溶液内で 30 分間加熱（95℃）し抗原を賦活化させた。内因性ペルオキシターゼ活性を除去するため、1%過酸化水素を含むメタノールに切片を 15 分間置いた。洗浄後、10%ラビット血清と 1%BSA を含む PBS で 2 時間ブロッキング（室温）した。一次抗体反応は、rat monoclonal anti-neutrophil antibody（1:100; NIMP-R14; Abcam, Cambridge, MA, USA）、および rat monoclonal anti-F4/80 antibody（1:100; BM8; Abcam）と 4℃で一晩インキュベートして行った。洗浄後、rabbit anti-rat biotinylated secondary antibodies（1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）で二次抗体反応を行い、ABC horseradish peroxidase reagent（Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories）と室温で 30 分間反応させ、発色は Peroxidase Substrate kit（ImmPACT DAB; Vector Laboratories）を用いた（室温、7 分間）。最後に、Mayer's hematoxylin で対比染色を行った。免疫染色の定量的評価は、Image J software を用いたカラーサンプリング法(24)を参考にして行い、1 検体につき 40 倍で 6 視野を解析した。

Spermidine/spermine N-1 acetyl transferase（SSAT）の測定

マウス肝臓内の spermidine/spermine N-1 acetyl transferase（SSAT）はリアルタイム PCR で測定した。Illustra RNAspin Mini RNA Isolation kit（GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont, UK）を用いて、ホモジナイズしたマウス肝臓より total RNA を抽出した。Bioanalyzer 2100（Agilent Technologies, Santa Clara,

CA, USA) を用いて、RNA の品質確認を行った (RNA Integrity Number: RIN > 7)。High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて、total RNA より一本鎖 cDNA を合成した。

SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio, Inc., Otsu, Japan) と cDNA template および各々のプライマーを加えて全量 50 μ l にした後、ABI PRISM 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems) で PCR 反応を行った。反応は、95 $^{\circ}$ C で 10 秒の初期変性の後、95 $^{\circ}$ C で 5 秒と 60 $^{\circ}$ C で 34 秒を 40 サイクル施行し、Dissociation Stage は 95 $^{\circ}$ C で 15 秒の後、60 $^{\circ}$ C で 1 分、95 $^{\circ}$ C で 15 秒とした。すべての反応は duplicate して行った。解析は Sequence Detection System (SDS2.1) software を用いた。また glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内因性コントロールとした。各プライマーは下記のように設定した。

SSAT primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) :

(forward) 5'-ATCTAAGCCAGGTTGCAATGA-3'

(reverse) 5'-GCACTCCTCACTCCTCTGTTG-3'

GAPDH primers (Invitrogen) :

(forward) 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

(reverse) 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) の測定

アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) 量はウェスタンブロット法で測定した。500 μ l の lysis buffer (RIPA buffer; Cell Signaling Technology, Beverly, MA,

USA: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 1% nonyl phenoxypolyethoxyethanol-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μg/ml leupeptin) および 1mM の phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) とともに 30mg のマウス肝臓をホモジナイズし、氷上で 10 秒間の sonication を 3 回繰り返した。14,000×g (室温、10 分) で遠心して不溶性物質を除去した後、Bradford 法 (Bio-Rad Protein Assay kit; Bio-Rad) にて総蛋白量を測定した。同量の蛋白を含有するサンプルを SDS-PAGE で泳動して、polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (GE Healthcare Bio-Sciences) に転写した。PVDF は 0.1% Tween-20 を含んだ 5% スキムミルク + Tris-buffered saline (TBS-T) に浸し、室温で 3 時間ブロッキングして、TBS-T で 2 回洗浄した。ACC の一次抗体反応は、5% BSA + TBS-T 内に anti-acetyl CoA carboxylase antibody (1 : 200 ; Cell Signaling Technology) を加えて、4°C で一晩インキュベートして行った。β-actin の一次抗体反応は、5% スキムミルク + TBS-T 内に anti-mouse β-actin antibody (1 : 3000 ; Cell Signaling Technology) を加えて、4°C で一晩インキュベートして行った。3 回の洗浄後、5% スキムミルク + TBS-T に 1 : 3,000 の濃度に調節した HRP 標識二次抗体とともに、室温で 1 時間インキュベートした。3 回洗浄後に enhanced chemiluminescence (ECL Prime; GE Healthcare) で目的蛋白のバンドを検出し、デンシトメトリーを用いて Image J software で定量化した。

マロニル CoA の測定

マロニル CoA の測定は、マロニル CoA : アセチル CoA サイクリング法

で行った(25, 26)。マウス肝臓の重量を測定し、その4倍量の0.3 M H₂SO₄を加え、氷上で10分間ホモジナイズした。10,000×g (4°C、10分)で遠心して得た上清に1 M Tris 5% v/vを加えて、NaOHでpH6.5に調節した。

サンプル内のアセチル CoA を除去するため、サンプルと反応液(100 mM oxaloacetic acid、蒸留水、およびサイクリングバッファ (100 mM MgSO₄·7H₂O と 10 mM 2-mercaptoethanol を含む 500 mM Tris-HCl (pH 7.2)))を混合し、2μl の citrate synthase を加えて合計 1000μl に調整してインキュベートした (30°C、10分)。さらに 2μl の citrate synthase を加えインキュベートした (30°C、20分)。その後、サイクリング反応を惹起させるため、50 mM malonate、10 mM ATP、および 1.0 U malonate decarboxylase を加えてインキュベートした (30°C、20分)。続いて、1.0 U acetate kinase を加え、インキュベートした後 (30°C、20分)、2.5 M neutralized hydroxylamine を加えて、さらにインキュベートした (30°C、20分)。次いで、25 mM trichloroacetic acid と 1 M HCl 中に溶解した 10 mM ferric chloride を加えて発色させ、spectrophotometer (Ultraspect 3100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用いて 540nm の吸光度で測定した。酵素を加えていないサンプルの吸光度も測定し、Acetohydroxamate formed 量の正味の吸光度を算出した。検量線は純マロニル CoA (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて作成した。

統計学的解析

すべての統計学的解析は SPSS version 11.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) を用いて行った。2群間の差は Mann-Whitney の U 検定で検定

し、相関は Pearson の相関分析で検定した。悪液質の誘発に重要な因子を抽出する目的で、体重、精巣上体脂肪重量、および腓腹筋重量を目的変数、サイトカイン濃度、ケモカイン濃度、およびホルモン濃度を説明変数として重回帰分析（ステップワイズ法（変数増減法））を行った。P 値<0.05 をもって統計学的有意差ありとした。データは平均値 \pm SD（標準偏差）で示した。

結果

マウスの体重および餌摂取量と飲水量の変化

腫瘍移植から 14 日目までの各群のマウスの体重変化と一日当たりの餌摂取量および飲水量を図 1 に示す。非担癌マウス（NTB）の体重は増加した。悪液質誘発腫瘍であるクローン 20 を皮下移植したマウス（C20 Cut）は、腫瘍移植後 9 日目頃より体重が減少し始め、14 日目には移植前体重の 76.1%まで減少した。また、餌摂取量および飲水量も著明に減少した。クローン 5 皮下移植マウス（C5 Cut）の体重は腫瘍を移植しても減少せず、餌摂取量および飲水量もわずかに低下する程度で、悪液質は誘発されなかった。しかし、クローン 5 筋肉内移植マウス群（C5 Mus）、クローン 5 腹腔内移植マウス群（C5 Per）およびクローン 5 胸腔内移植マウス群（C5 Tho）では、群間で程度の違いはあるものの、体重と餌摂取量および飲水量はいずれの群でも減少した。クローン 5 移植群では C5 Mus 群の体重減少が最も著明で、移植前の 87.8%に減少し、次いで C5 Tho 群が移植前の 88%、C5 Per が移植前の 96.7%に減少していた。餌摂取量および飲水量は、NTB 群と比較して、C5 Cut 群はほとんど低下を認めなかったが、C20 Cut

群、C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群では 9 日目頃より減少し始め、C5 Tho 群で最も著明に減少した (図 1)。

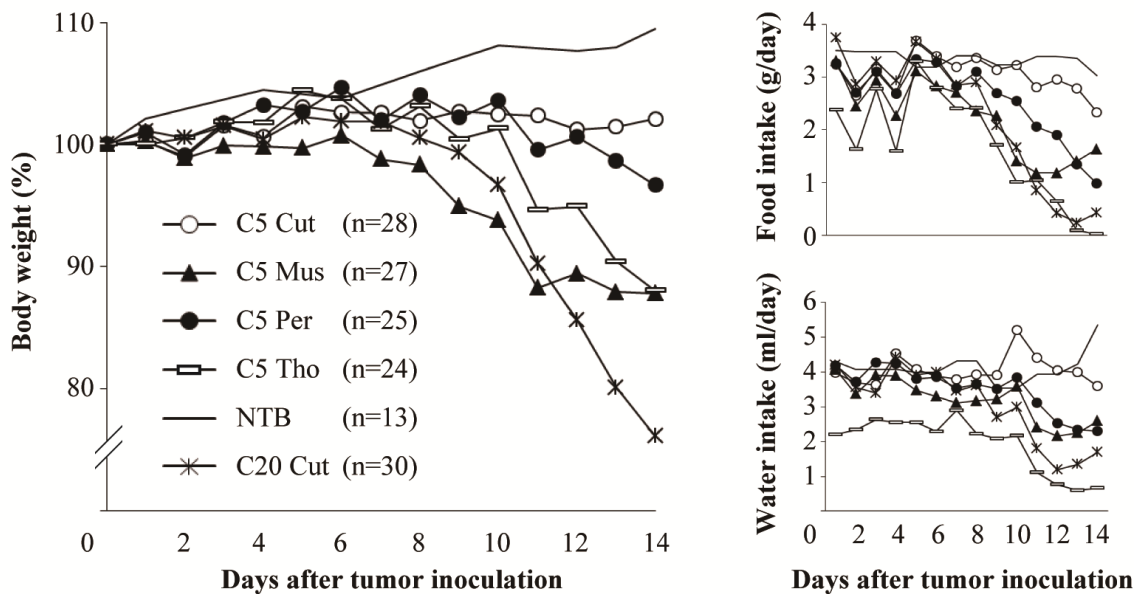


図 1. 腫瘍移植後のマウス体重と餌摂取量および飲水量の変化

マウスの体重と餌摂取量および飲水量は各群の匹数 (n) の平均値である。腫瘍移植前日の体重を 100%とした。

C5 Cut, クローン 5 皮下移植マウス ; C5 Mus, クローン 5 筋肉内移植マウス ; C5 Per, クローン 5 腹腔内移植マウス ; C5 Tho, クローン 5 胸腔内移植マウス ; NTB, 非担癌マウス ; C20 Cut, クローン 20 皮下移植マウス

腫瘍移植後 14 日目における脂肪重量と筋肉重量

腫瘍移植後 14 日目におけるマウスの蓄積脂肪 (精巣上体脂肪) 重量および筋肉 (腓腹筋) 重量を図 2 に示す。C20 Cut 群の脂肪重量と筋肉重量は、NTB 群の 12% および 58.3% まで著明に減少したが、C5 Cut 群の脂肪重量 (100%) と

筋肉重量 (95.1%) は減少しなかった。一方、C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群における脂肪重量と筋肉重量は、NTB 群の 28.7% と 55.4%、64.1% と 71.9%、65.4% と 75.3% までそれぞれ著明に減少していた。クローン 5 移植群での検討では、脂肪重量および筋肉重量ともに、C5 Mus 群、C5 Tho 群、C5 Per 群の順で有意に減少しており、体重減少の順と一致していた。脂肪重量および筋肉重量が最も減少していたのは C20 Cut 群であったが、C5 Mus 群の脂肪重量も C20 Cut 群と同程度まで減少していた (図 2)。

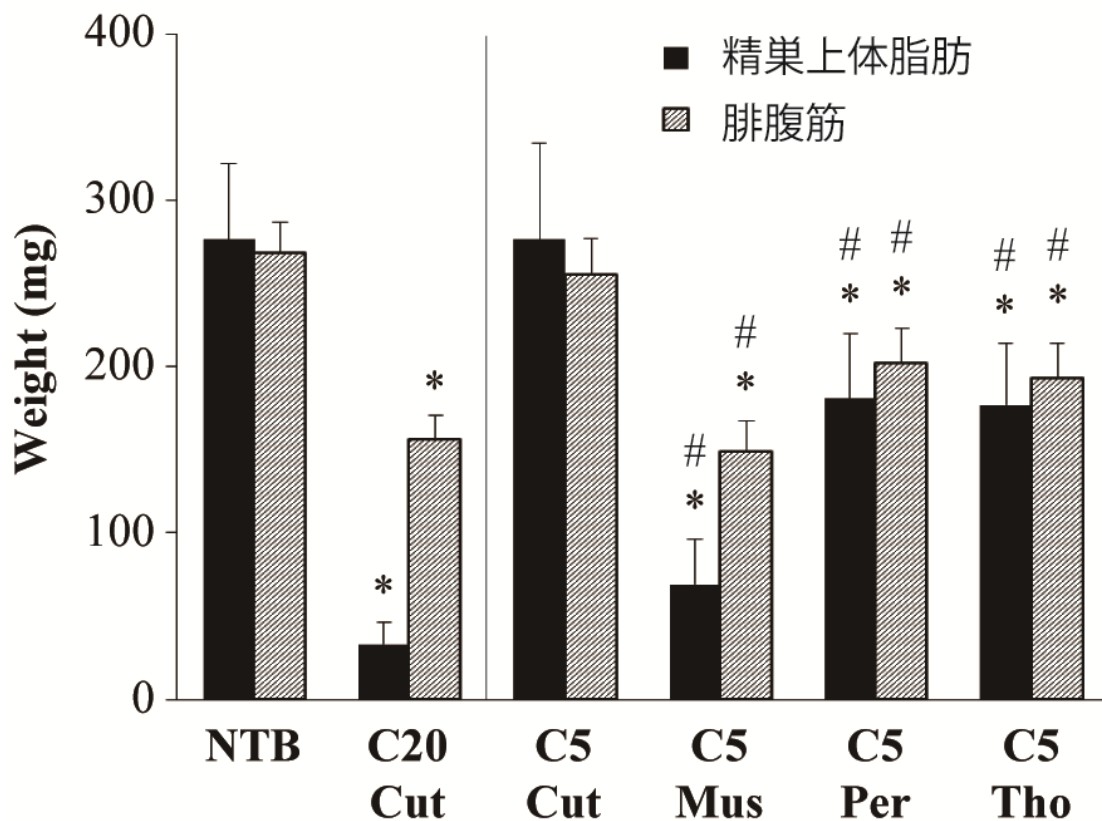


図 2. 精巣上体脂肪重量と腓腹筋重量 (n=10)

それぞれの群の平均値と標準偏差を示す。

*P<0.05 vs NTB, #P<0.05 vs C5 Cut

総餌摂取量

14 日間の観察期間における総餌摂取量を図 3 に示す。C20 Cut の総餌摂取量は、NTB よりも有意に減少していた。クローン 5 移植群では、C5 Cut 群の総餌摂取量は減少していなかったが、C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群では減少していた。最も総餌摂取量が減少していたのは C5 Tho 群で、次いで C5 Mus 群、C5 Per 群の順であり、体重減少や脂肪重量および筋肉重量の減少の程度とは必ずしも一致しなかった (図 3)。

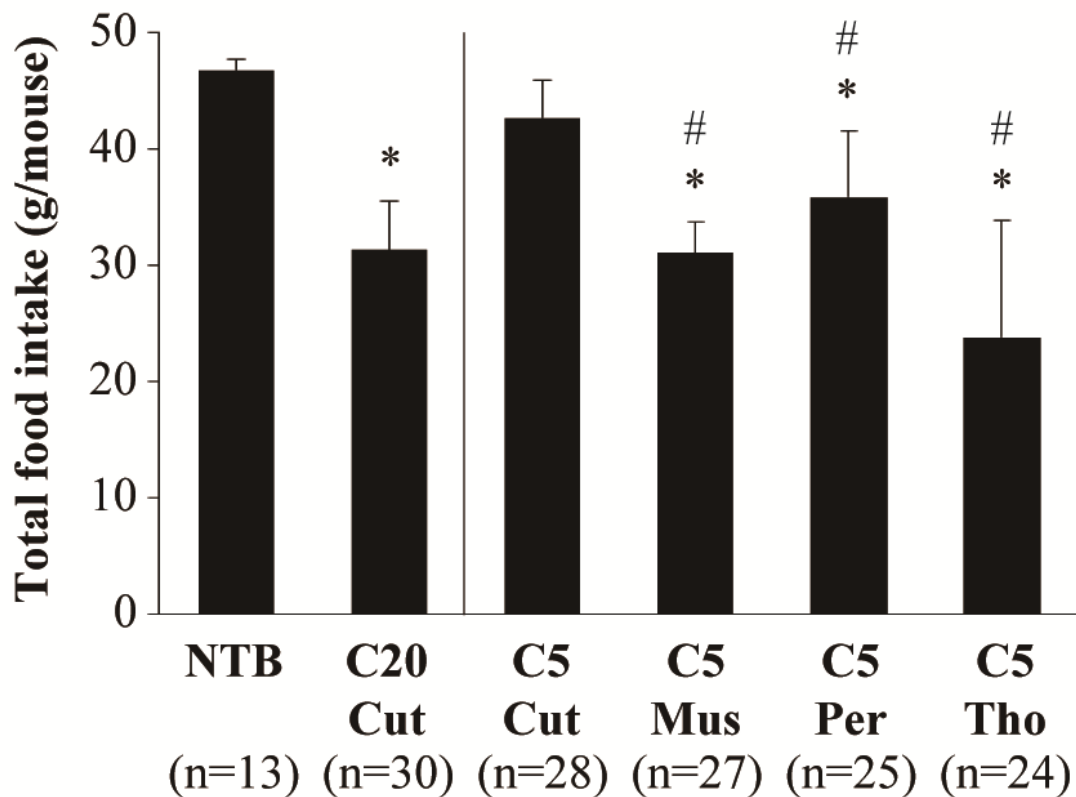


図 3. 腫瘍移植後 14 日間の総餌摂取量
それぞれ群の平均値と標準偏差を示す。n は匹数を示す。
*P<0.05 vs NTB, #P<0.05 vs C5 Cut

クローン 20 腫瘍の移植部位の違いによる悪液質誘発の差異

皮下に移植すると高度の悪液質を誘発するクローン 20 腫瘍を用いて、腫瘍を移植した部位の違いによって悪液質の誘発に差が生じるか否かを少数のマウスで検討した。クローン 20 腫瘍を筋肉内、腹腔内、胸腔内に移植してみたところ、クローン 20 皮下移植マウスで観察された悪液質よりさらに重度な悪液質状態に全てのマウスが陥り、早期に死亡する例もみられた（図 4）。クローン 20 腫瘍の腹腔内移植では体重減少がみられないが、大量の血性腹水を伴っており、外見上は著明な悪液質状態を呈していた。

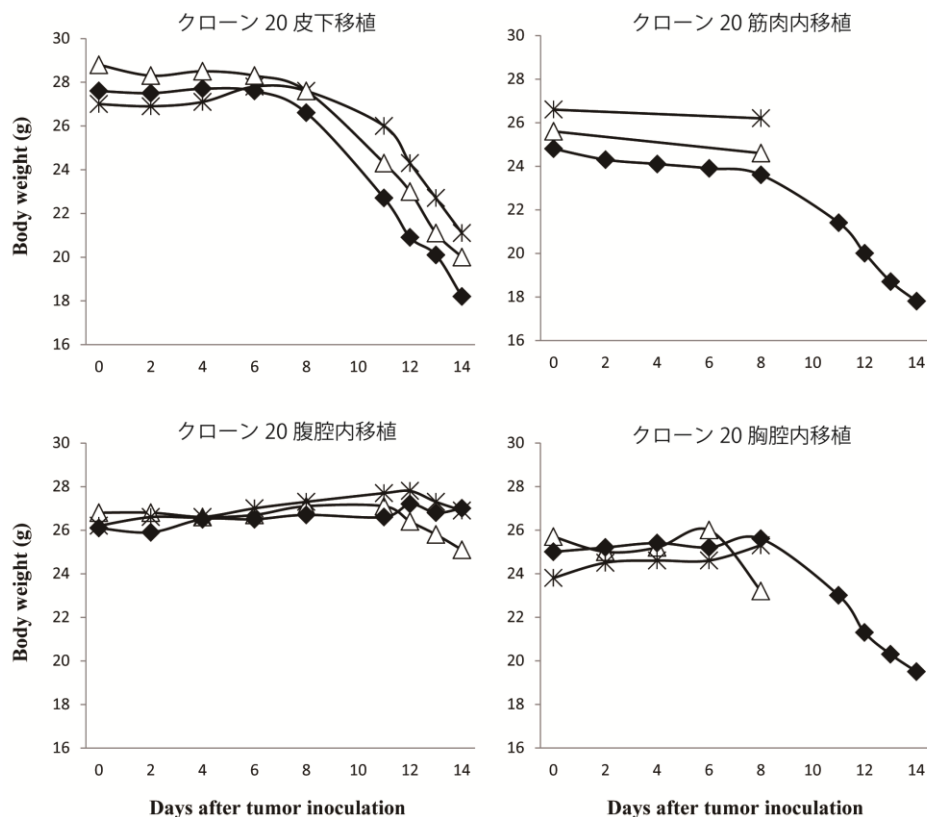


図 4. クローン 20 腫瘍を様々な部位に移植した際のマウスの体重変化
各群 3 匹ずつで検討した。腫瘍移植後 14 日までの観察期間の個々のマウスの
体重変化を示す。14 日以前に消失したグラフは、マウスが死亡したために計
測を中止したものである。

血液学的検査

NTB 群と比較し、末梢血液中の白血球数、好中球数、単球数、リンパ球数、および血小板数は、悪液質発症の有無やその程度にかかわらず、腫瘍を移植したマウスで上昇がみられた。悪液質が高度に認められた C20 Cut 群と悪液質を呈さなかった C5 Cut 群との間には、末梢血検査結果に有意な差はみられなかった。クローン 5 移植群では、白血球数の上昇は悪液質の程度と相関がみられた。すなわち、C5 Cut 群と比較して、悪液質が高度であった C5 Mus 群では著明に増加し、次いで C5 Tho 群、C5 Per 群の順で上昇していた。C5 Mus 群の好中球数の増加は、C5 Cut 群と比較して高度ではなかったが、C5 Per 群、C5 Tho 群で上昇していた。単球は、C5 Mus 群では C5 Cut 群より低下していたが、その他の移植群は C5 Cut 群と差を認めなかった。リンパ球は、C5 Cut 群と比較すると C5 Mus 群において上昇が顕著で、次いで C5 Tho 群、C5 Per 群の順で上昇していた。急性期反応タンパクの SAA は、悪液質が高度であった C20 Cut 群や C5 Mus 群で高度に上昇していたが、悪液質を呈さなかった C5 Cut 群でも上昇しており、反対に悪液質状態に陥った C5 Per 群および C5 Tho 群では上昇が顕著ではなかった (表 2)。

表 2. 末梢血検査

	WBC (/mm ³)	Neutrophils (/mm ³)	Monocytes (/mm ³)	Lymphocytes (/mm ³)	RBC (x10 ⁴ /mm ³)	Hb (g/dl)	Platelets (x10 ⁴ /mm ³)	SAA (mg/l)
NTB	1,571±180	307±55	79±28	1,183±170	946±56	13.5±0.6	81±17	0.4±0.1
C20 Cut	3,514±1229 ^a	1,033±554 ^a	182±93 ^a	2,299±617 ^a	931±34	13.0±0.4 ^a	163±36 ^a	463±142 ^{a,b}
C5 Cut	3,542±315 ^a	861±114 ^a	305±15 ^a	2,497±323 ^a	915±35	13.2±0.5	131±25 ^a	256±178 ^a
C5 Mus	4,928±430 ^{a,b}	1,015±158 ^a	262±67 ^{a,b}	3,644±420 ^{a,b}	905±39	12.6±0.5 ^b	182±10 ^{a,b}	576±104 ^{a,b}
C5 Per	4,628±844 ^{a,b}	1,171±191 ^{a,b}	191±75 ^a	3,258±795 ^{a,b}	899±18 ^a	13.1±0.2 ^a	104±18	64±59 ^{a,b}
C5 Tho	4,757±1429 ^{a,b}	1,290±492 ^{a,b}	206±79 ^a	3,261±722 ^{a,b}	1,061±108 ^{a,b}	15.2±1.4 ^{a,b}	108±7 ^a	28±37 ^{a,b}

平均値±標準偏差を示す。

^a P<0.05 vs NTB, ^b P<0.05 vs C5 Cut

SAA, 血清アミロイド蛋白 A

血清および血漿中ホルモン濃度

悪液質が最も高度であった C20 Cut 群では、血清コルチコステロン以外のホルモン濃度は NTB 群と同程度か低値であった。血清コルチコステロンは、腫瘍を移植したすべての群で上昇がみられたが、C5 Mus 群では C5 Cut 群より低値となっており、必ずしも悪液質の程度との関連は明確ではなかった。また、その他のホルモンにおいても、クローン 5 移植群で最も悪液質が高度であった C5 Mus 群が C5 Cut 群より低値を示すことが多かった (表 3)。クローン 5 移植群の検討では、NTB と比較して高値であったのは、コルチコステロン、アドレナリン、およびノルアドレナリンであったが、アドレナリンとノルアドレナリンに関しては、悪液質を来さなかった C5 Cut 群が最も高値であった。

表 3. 血清および血漿ホルモン濃度

	Serum (ng/ml)		Plasma (pg/ml)				
	Insulin	Corticosterone	ACTH	Glucagon	Adrenaline	Noradrenaline	Dopamine
NTB	1.4	272.7	114	66	792	1,072	135
C20 Cut	1.3	589.7	88.3	66	699	506	57
C5 Cut	2.7	376.6	269	44	6,149	4,318	179
C5 Mus	2.0	344.8	267	50	2,272	1,411	80
C5 Per	0.7	436.2	205	47	1,933	2,699	262
C5 Tho	1.4	786.4	43.9	65	2,048	4,053	502

6匹のマウスから採取した血清もしくは血漿を混合した検体中のホルモン濃度を測定した。

培養細胞ライセート、培養上清、移植腫瘍ライセートおよびマウス血清中のサイトカイン濃度

クローン5腫瘍とクローン20腫瘍の細胞数を同一にして、培養細胞ライセートと培養上清中のサイトカイン濃度を測定した。クローン20細胞ライセートのサイトカインやケモカインの濃度は、クローン5細胞ライセートより高値を示す傾向があったが、MCP-1濃度はクローン5で高値であった(図5A上段)。一方、培養上清中のサイトカイン濃度は、クローン20とクローン5の培養上清で差を認めなかった(図5A下段)。

A

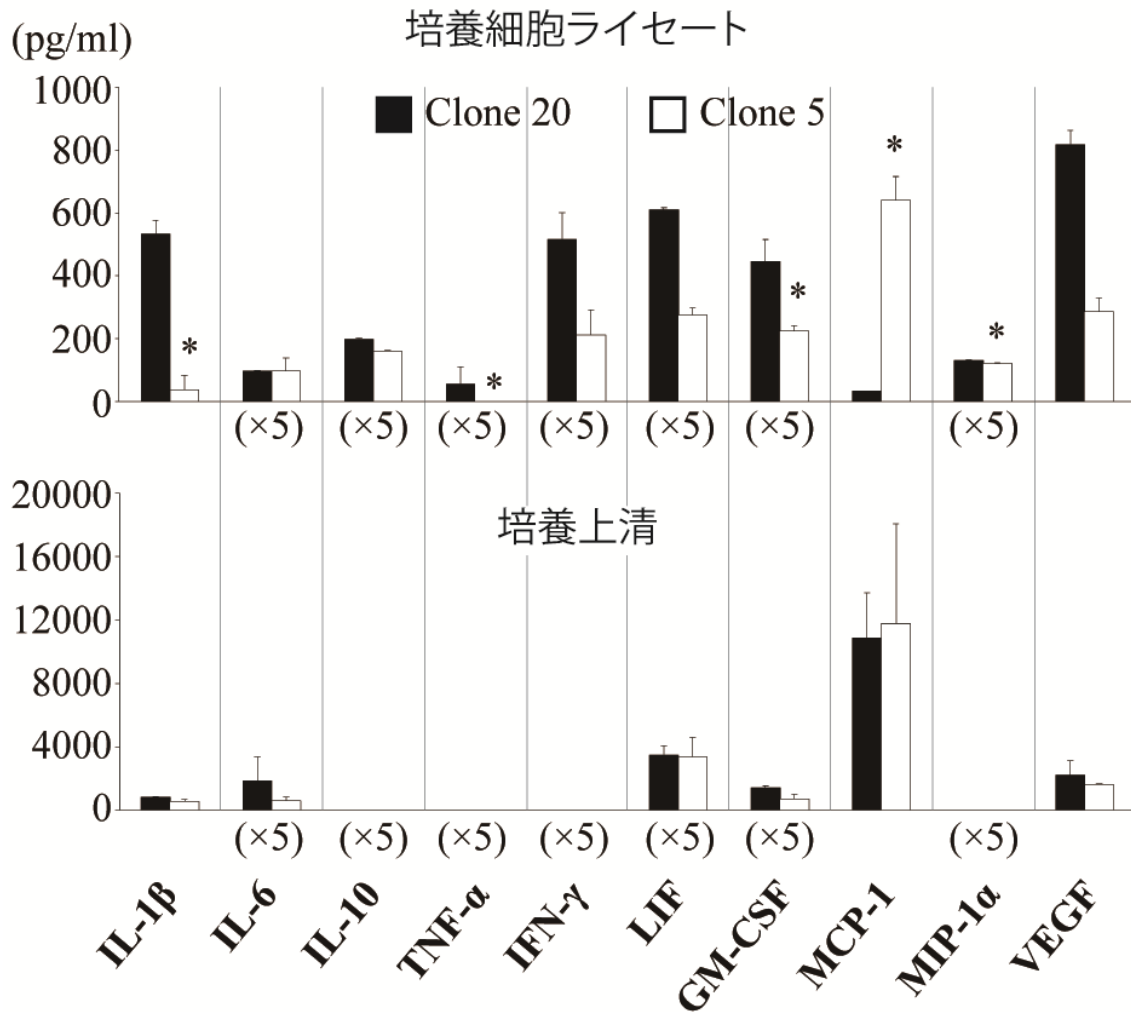


図 5A. サイトカイン濃度 (培養細胞ライセート、培養上清)

図中の棒グラフは平均値と標準偏差を示す。培養細胞 1×10^6 cell の細胞ライセート (n=3) とその培養上清 (n=2) を測定した。

(×5) は測定値を 5 倍にした濃度を示している。

*P<0.05 vs Clone 20

IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon; LIF, leukemia inhibitory factor; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; MCP, monocyte chemotactic protein; MIP, macrophage inflammatory protein; VEGF, vascular endothelial growth factor

移植腫瘍ライセートとマウス血清中のサイトカイン濃度の上昇が目立ったのは IL-6 であった。培養細胞ライセートや培養上清中の濃度と比較すると、C20 Cut 群の移植腫瘍ライセートおよびマウス血清中の上昇が他のサイトカインと比較して著しかった (図 5B)。また C20 Cut 群のマウス血清中のサイトカイン濃度は、C5 Cut 群と比較すると、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、GM-CSF および MIP-1 α の上昇が目立っており、培養細胞ライセートや培養上清中の濃度の傾向とは必ずしも一致しなかった (図 5B 下段)。クローン 5 移植群で検討すると、移植腫瘍ライセートの IL-1 β 、IL-6、TNF- α および IFN- γ は、C5 Mus 群、C5 Per 群および C5 Tho 群で高い傾向があった。一方、マウス血清中の IL-1 β 、IL-6、IFN- γ および GM-CSF は、悪液質の程度が強かった C20 Cut 群と C5 Mus 群で上昇がみられたが、C5 Per 群や C5 Tho 群では C5 Cut 群と差を認めなかった (図 5B)。

B

移植腫瘍

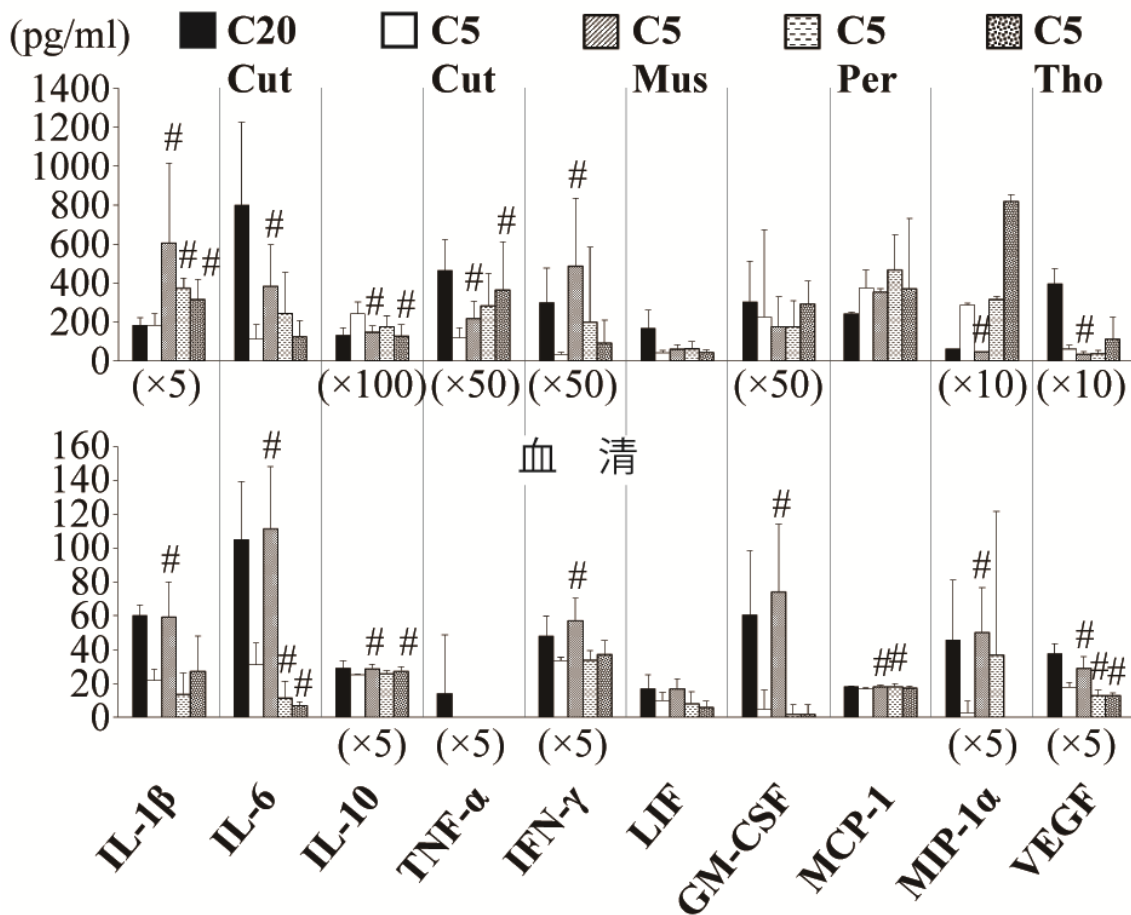


図 5B. サイトカイン濃度 (移植腫瘍内、およびマウス血清中) (n=6)

図中の棒グラフは各群のサイトカイン濃度の平均値と標準偏差を示す。

(×5)、(×10)、(×50)、および (×100) はそれぞれ測定値を 5 倍、10 倍、50 倍、および 100 倍にした濃度を示している。

P<0.05 vs C5 Cut

IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon; LIF, leukemia inhibitory factor; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; MCP, monocyte chemotactic protein; MIP, macrophage inflammatory protein; VEGF, vascular endothelial growth factor

サイトカイン濃度と悪液質の関係

Pearson の相関分析にて、クローン 5 腫瘍を移植した 4 群 (C5 Cut、C5 Mus、C5 Per、C5 Tho) に NTB 群を含めた 5 群で、血清サイトカイン (各群 n=7) の平均値と体重、精巣上体脂肪重量および腓腹筋重量の平均値との関係性を評価した。その中で、血清 IL-10 濃度が体重、精巣上体脂肪重量および腓腹筋重量と有意な負の相関を示した (図 6)。しかし、血清 IL-10 以外のサイトカイン濃度と体重および脂肪や筋肉重量との相関は認められなかった。血清 IL-10 の測定値は非常に低い値であったが、感度 1pg/ml 以上で測定可能なキットを使用し検量線をはずれていなかったため有効測定値として扱った (株式会社ベリタス (Veritas, Tokyo, Japan) に確認した)。

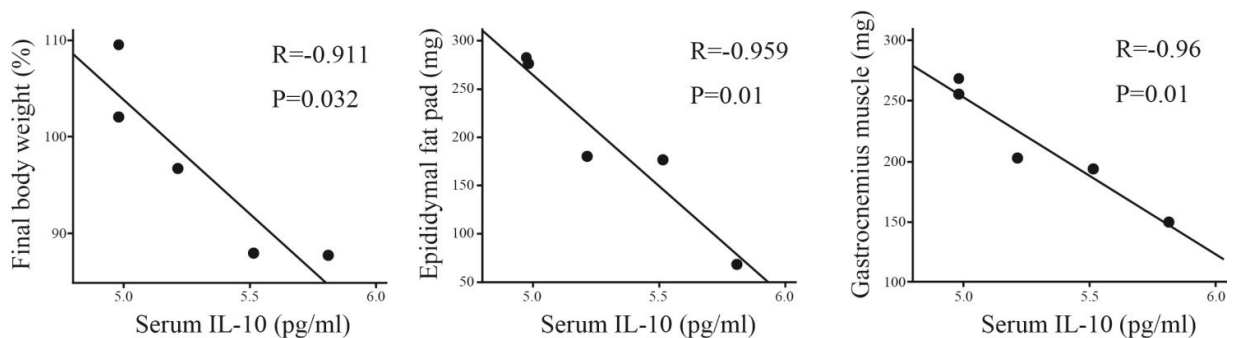


図 6. 血清 IL-10 と体重、精巣上体脂肪重量および腓腹筋重量との相関図
クローン 5 腫瘍を移植した 4 群 (C5 Cut、C5 Mus、C5 Per、C5 Tho) と NTB 群のマウスの血清 IL-10 濃度の平均値と体重、精巣上体脂肪重量および腓腹筋重量の平均値との相関を示す。各群 7 匹ずつの平均値を用いた。

血清および血漿中ホルモンを解析に加えないで、ステップワイズ重回帰分析を行ったところ、有意な説明変数として抽出されたのは、体重を目的変数

にした場合には IL-10 (R=-0.911, P=0.032) が、精巣上体脂肪重量を目的変数にした場合には IL-10 (R=-0.849, P=0.004)、MIP-1 α (R=-0.403, P=0.006)、および IFN- γ (R=0.159, P=0.027) が、腓腹筋重量を目的変数にした場合には IL-10 (R=-0.701, P=0.004) と MCP-1 (R=-0.379, P=0.012) が抽出された (表 4)。解析に血中ホルモンを加えた場合にもほぼ同様の結果であったが、腓腹筋重量では、ドーパミン (R=-0.044, P=0.011) が追加抽出された (表 5)。

表 4. ステップワイズ重回帰分析 (サイトカイン)

		Regression coefficient	t value	P value	95% confidence intervals
Body weight	IL-10	-0.911	-3.822	0.032	-43.230 to -3.945
Epididymal fat pad	IL-10	-0.849	-150.557	0.004	-220.024 to -185.781
	MIP-1 α	-0.403	-109.213	0.006	-8.074 to -6.391
	IFN- γ	0.159	23.962	0.027	2.949 to 9.607
Gastrocnemius muscle	IL-10	-0.701	-16.666	0.004	-119.574 to -70.503
	MCP-1	-0.379	-9.003	0.012	-30.754 to -10.864

表 5. ステップワイズ重回帰分析 (ホルモンを加えた解析)

		Regression coefficient	t value	P value	95% confidence intervals
Body weight	IL-10	-0.911	-3.822	0.032	-43.230 to -3.945
Epididymal fat pad	IL-10	-0.849	-150.557	0.004	-220.024 to -185.781
	MIP-1 α	-0.403	-109.213	0.006	-8.074 to -6.391
	IFN- γ	0.159	23.962	0.027	2.949 to 9.607
Gastrocnemius muscle	IL-10	-0.692	-656.738	0.001	-95.463 to -91.839
	MCP-1	-0.387	-369.684	0.002	-21.976 to -20.516
	Dopamine	-0.044	-57.375	0.011	-0.016 to -0.010

移植腫瘍の肉眼的、組織学的、および免疫組織学的検討

皮下や筋肉内に移植したクローン 5 腫瘍は 1cm 大の腫瘤を形成し、他臓器への浸潤はみられなかった。腹腔内や胸腔内に移植したクローン 5 腫瘍は播種状に広がり、いくつかの小結節を形成した。C5 Per 群と C5 Tho 群においては、移植腫瘍が重要臓器（肺、心臓、主要血管、肝臓、腎臓、腸管など）へ浸潤し早期に死亡するマウスがいたが、臓器への明らかな浸潤がみられた場合には、検討の対象から除外した。クローン 5 移植群（C5 Cut、C5 Mus、C5 Per、C5 Tho）の移植腫瘍の組織学的評価では、各群間における腫瘍細胞の形態学的な違いは認められなかった（図 7）。

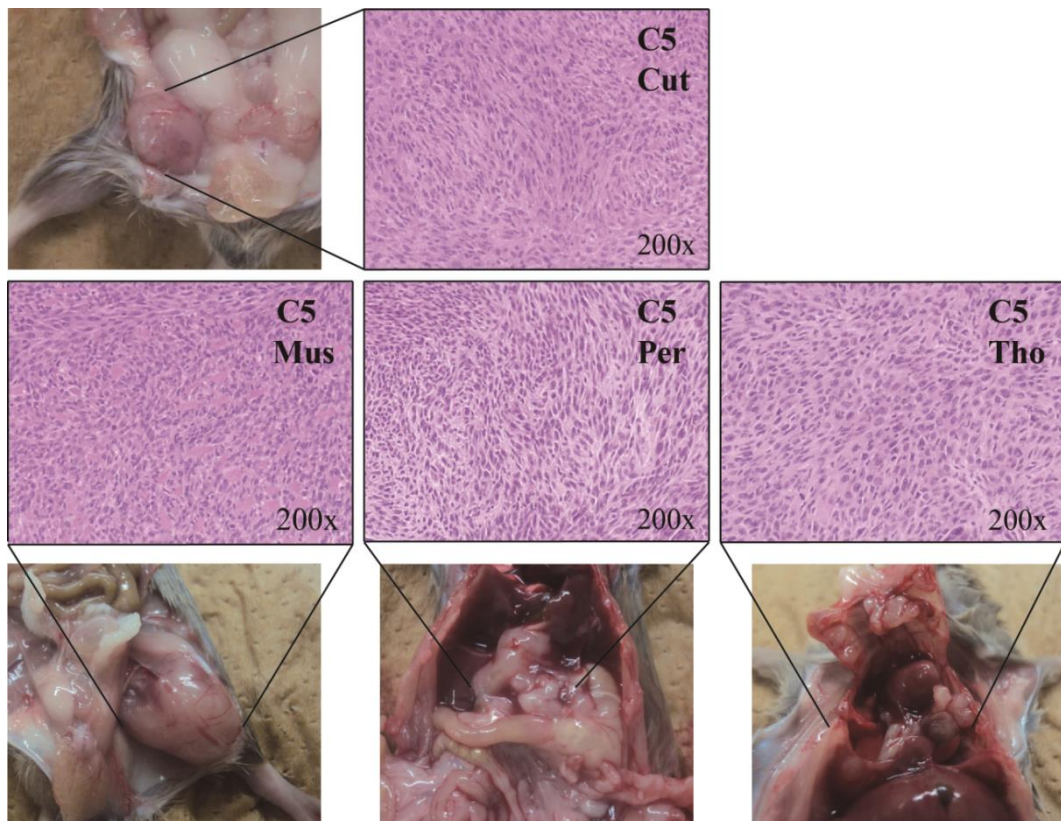


図 7. 移植腫瘍の HE 染色

各群に移植した腫瘍の肉眼的形態と 200 倍で観察した組織像を示す。組織像はすべての視野を観察した。

免疫染色では、C5 Cut 群の移植腫瘍内には好中球の浸潤はほとんどみられなかったが、C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群の移植腫瘍内には多くの好中球浸潤が観察された（図 8）。カラーサンプリング法(24)を参考にして、1 検体につき 40 倍で 6 視野を解析した結果、C5 Tho 群で最も浸潤が強く、次いで C5 Per 群、C5 Mus 群の順であった（図 9）。一方、マクロファージの腫瘍内浸潤の程度は、クローン 5 移植群間で違いを認めなかった。

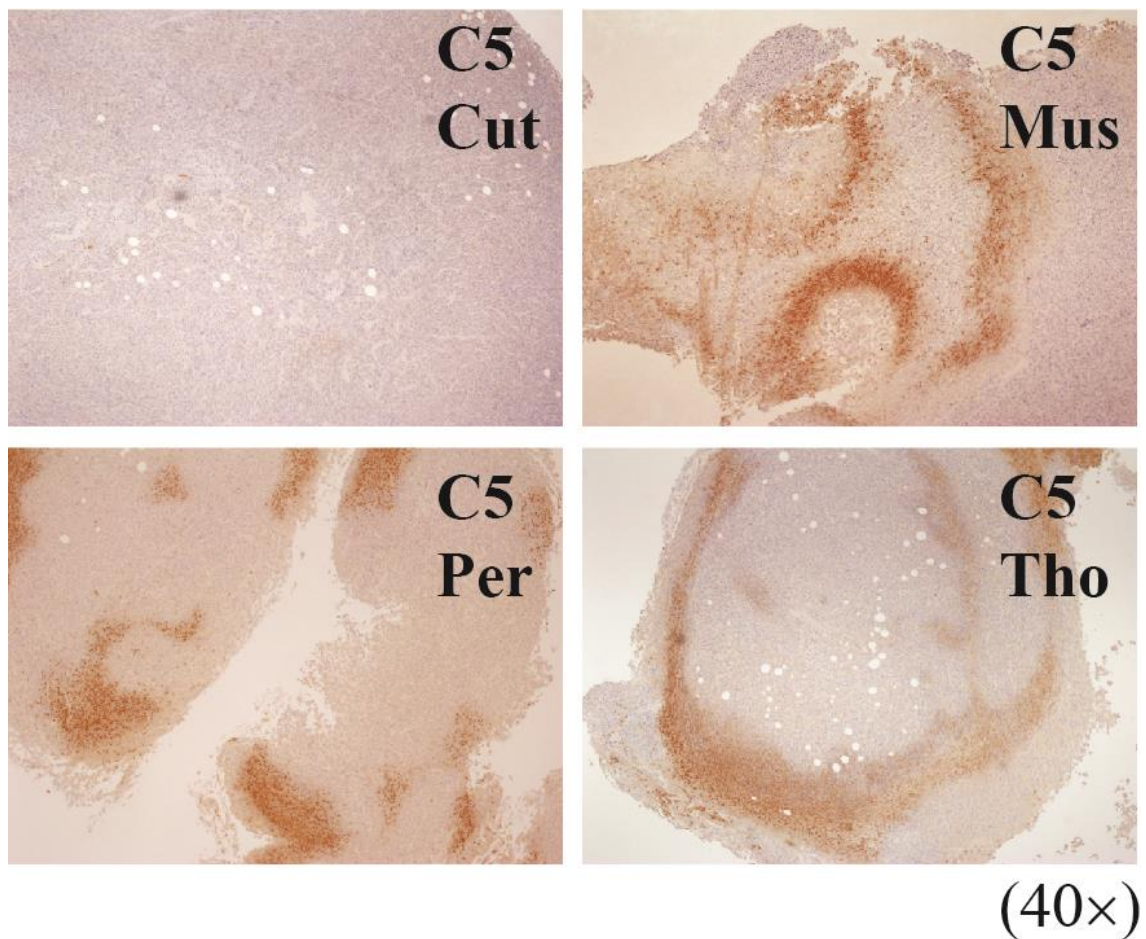


図 8. 免疫組織化学

40 倍（40×）で観察した免疫染色像を示す。染色された細胞は好中球である。

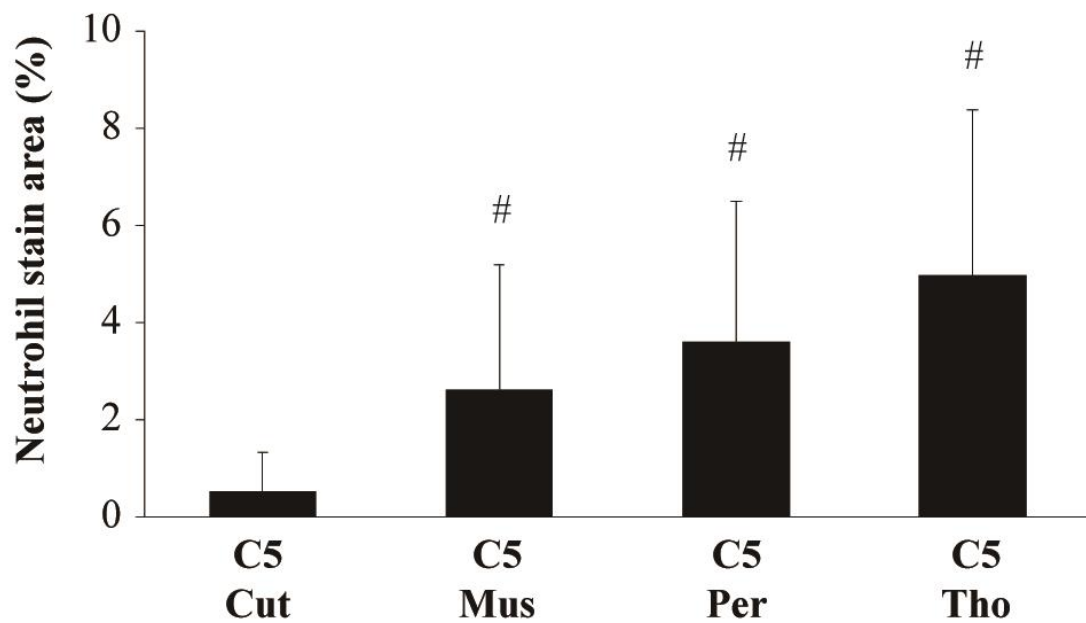
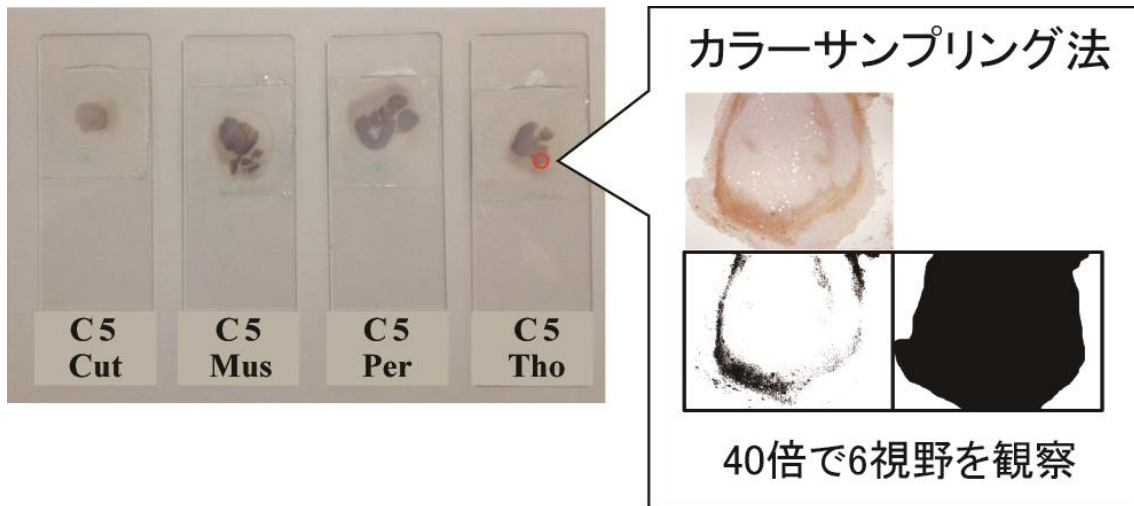


図9. 移植腫瘍への好中球浸潤を定量化したグラフ

1 検体につき 40 倍の免染像を 6 視野観察した。グラフは各群の平均値と標準偏差を示す。

#P<0.05 vs C5 Cut

SSAT-mRNA、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) 量、およびマロニル CoA 量

GAPDH で補正した肝臓内の SSAT の mRNA 発現量は、悪液質を発症したマウスにおいて有意に上昇していたが、C5 Cut 群では上昇はみられなかった。C20 Cut 群では NTB 群の 3 倍の発現量が認められ、C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群では NTB 群の約 2 倍の発現量であった。また、C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群では、C5 Cut 群と比較しても有意に上昇していた (図 10)。

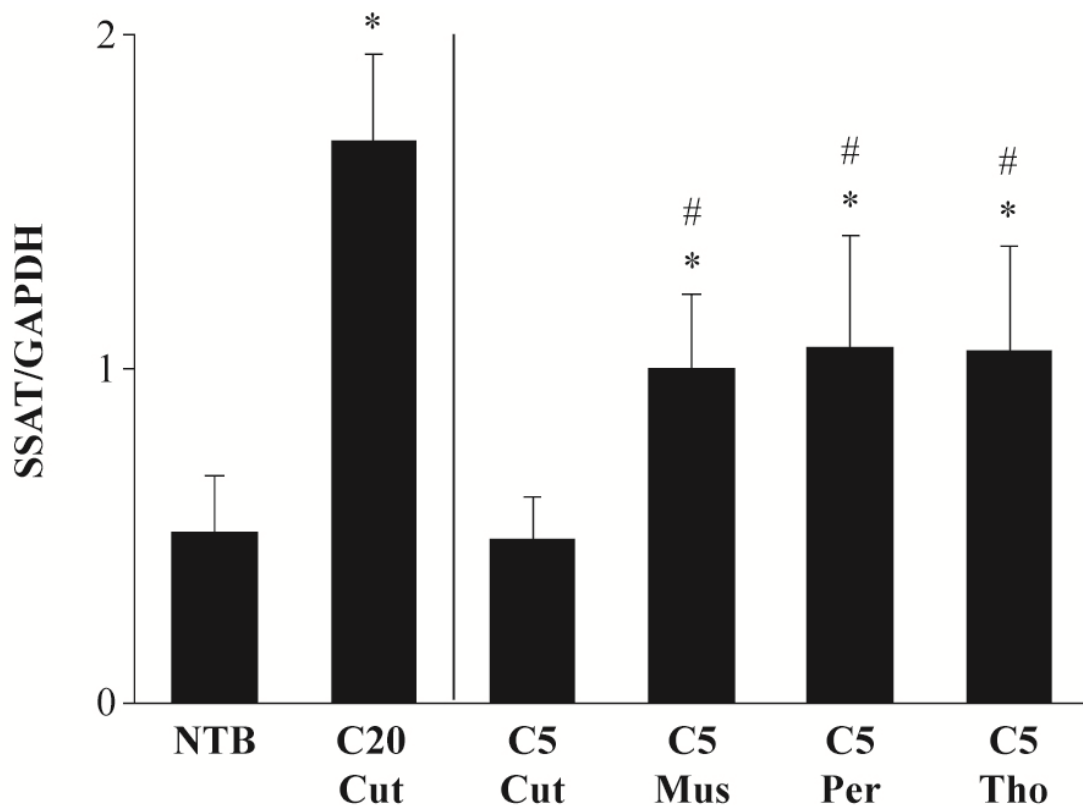


図 10. 肝臓内 SSAT の mRNA 発現 (n=6)

GAPDH で補正した SSAT-mRNA を示す。グラフは各群の平均値と標準偏差を示す。

*P<0.05 vs NTB, #P<0.05 vs C5 Cut

肝臓内の ACC 量は β -actin で補正した。程度の差はあれ、腫瘍を移植したマウスで ACC 量は減少していた。しかし悪液質に陥ったマウスでは、より高度に減少している傾向があった。悪液質を来した C20 Cut 群、C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群の ACC 量は、NTB 群のそれぞれ 33%、31%、43%、および 26%であった。悪液質に陥ったクローン 5 移植群 (C5 Mus、C5 Per、C5 Tho) の ACC 量は、C5 Cut 群より有意に低下していた (図 11)。

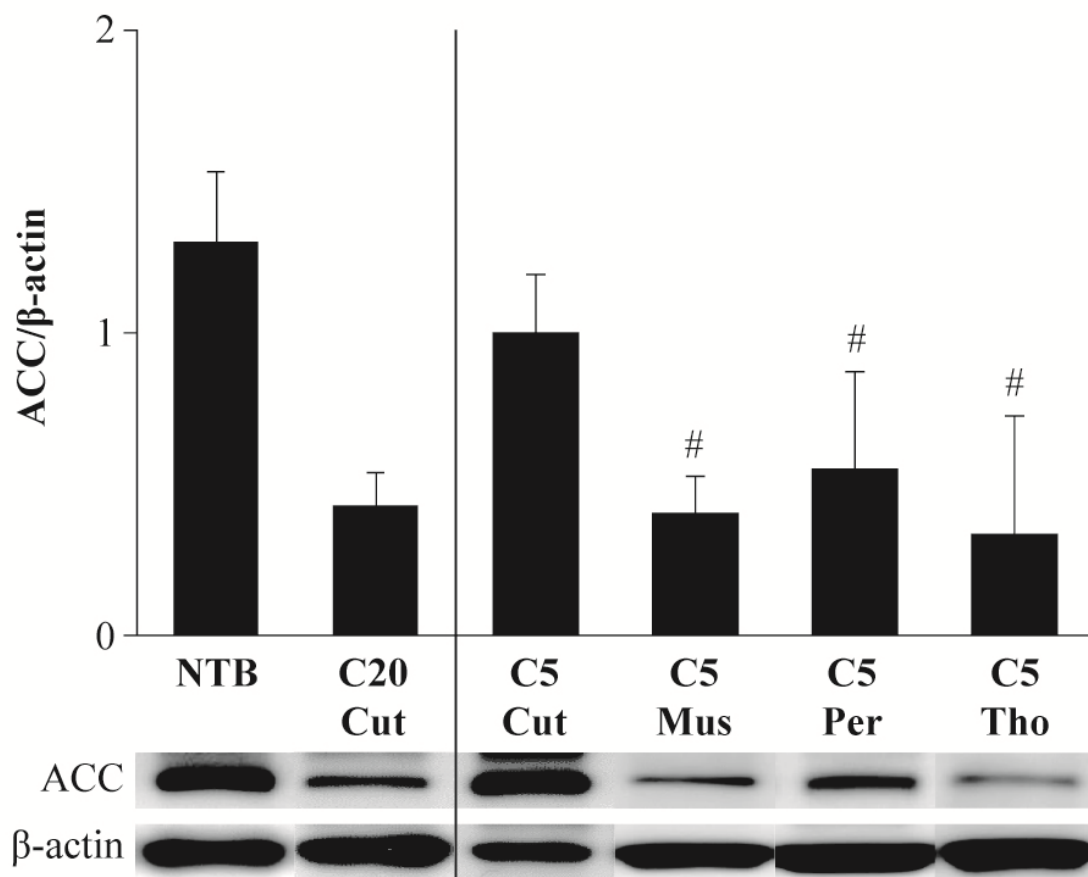


図 11. 肝臓内 ACC 量 (n=7)

グラフは各群の平均値と標準偏差を示す。ACC 量は β -actin で補正した。

#P<0.05 vs C5 Cut

肝臓内マロニル CoA 量は腫瘍を移植したマウスで低下する傾向にあったが、NTB 群と C5 Cut 群の間では差を認めなかった。しかし、悪液質状態に陥ったマウスでは著明に低下していた。C5 Mus 群、C5 Per 群、および C5 Tho 群におけるマロニル CoA 量は NTB 群の 30.5%、49.2%、および 43.5%であった。悪液質に陥ったクローン 5 移植群 (C5 Mus、C5 Per、C5 Tho) はいずれも C5 Cut 群より有意に低下していた (図 12)。

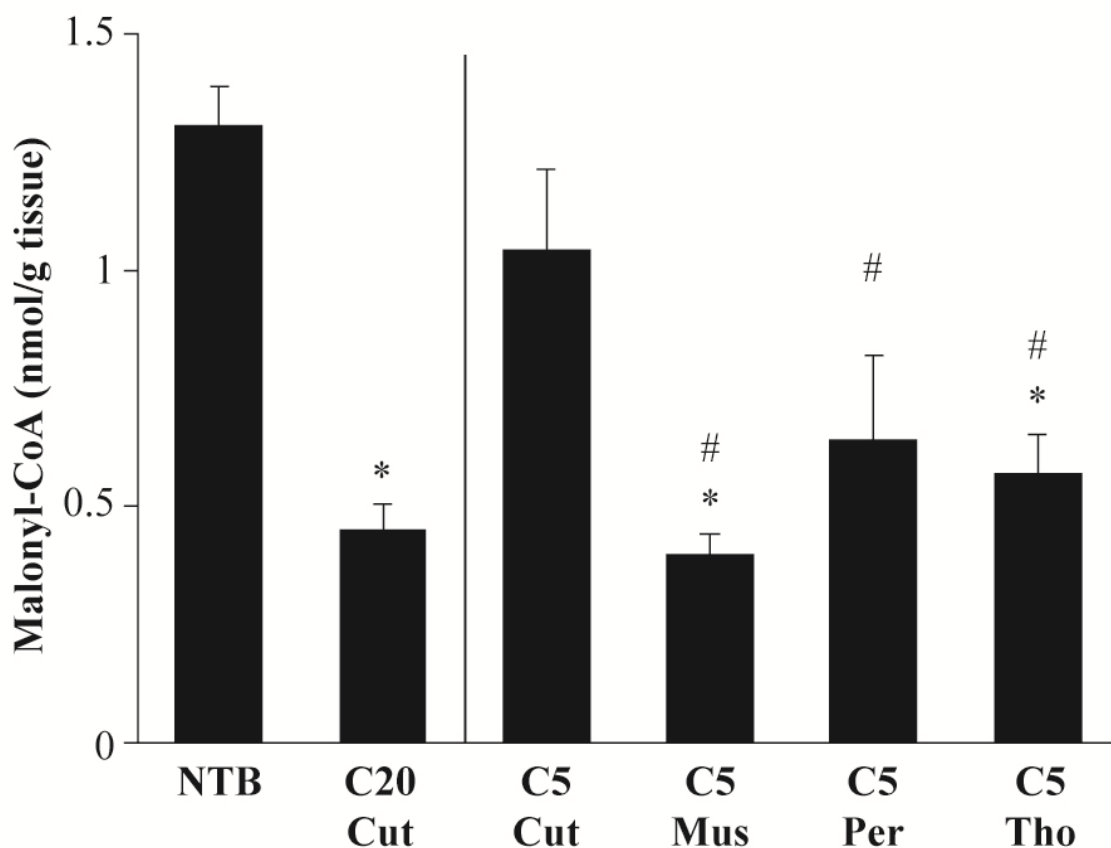


図 12. 肝臓内マロニル CoA 量 (n=6)

グラフは各群の平均値と標準偏差を示す。

*P<0.05 vs NTB, #P<0.05 vs C5 Cut

肝臓内では、悪液質誘発因子であるサイトカインやホルモンによって活性化された SSAT はその補酵素であるアセチル CoA を消費する。アセチル CoA の減少と ACC の低下によってマロニル CoA の合成が低下し、マロニル CoA が減少する。その結果として脂肪酸合成が抑制されるだけでなく、 β 酸化に必要なカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT-1) への抑制が解除されて脂肪酸の β 酸化が亢進する (図 13)。

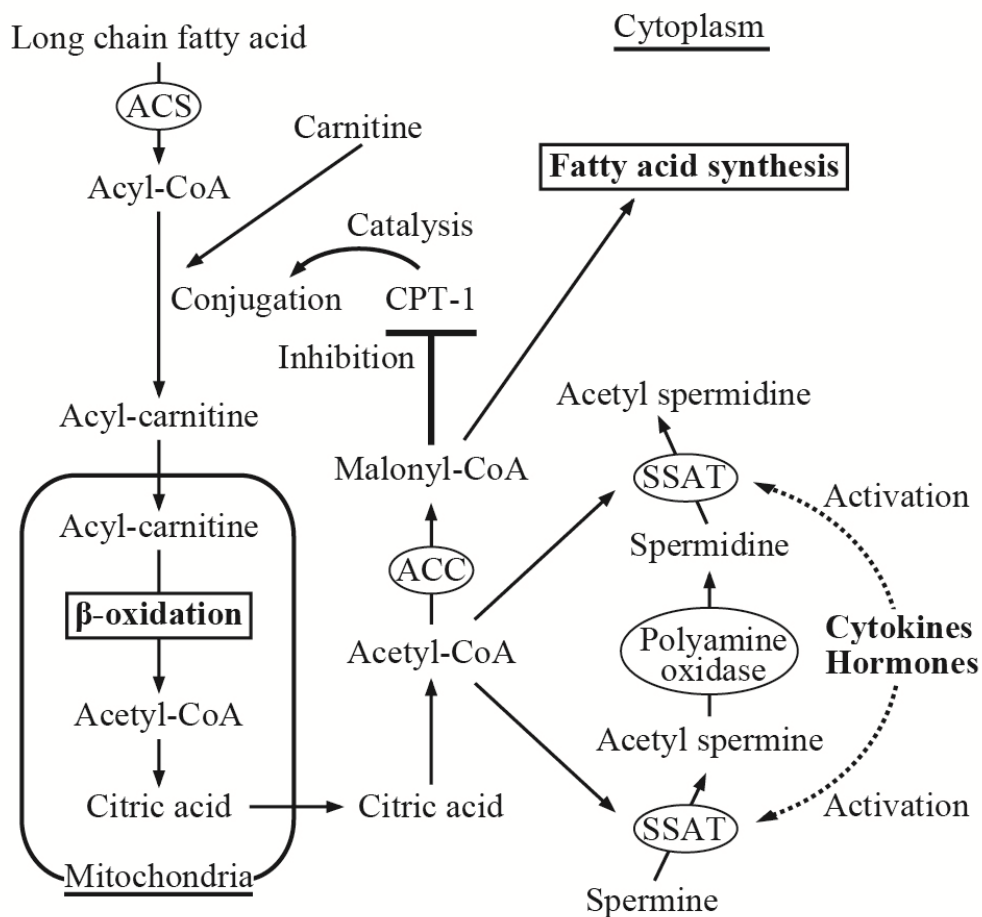


図 13. 肝臓内の脂肪酸代謝経路

ACS, acyl-CoA synthetase; SSAT, spermidine/spermine N-1 acetyl transferase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase 1; acetyl-CoA, acetyl coenzyme A; malonyl-CoA, malonyl coenzyme A

蓄積脂肪の減少は悪液質の重要な指標であるので、蓄積脂肪の減少と肝臓内の SSAT-mRNA 発現量やマロニル CoA 量との関係を検討した。1 匹のマウスから得られた精巣上体脂肪重量、SSAT-mRNA 発現量およびマロニル CoA 量のデータを用いて（各群 6 匹ずつ）、精巣上体脂肪重量と SSAT-mRNA 発現量との相関、および精巣上体脂肪重量とマロニル CoA 量との相関を分析した。クローン 5 移植群（C5 Cut、C5 Mus、C5 Per、C5 Tho）では、SSAT と脂肪重量との間に相関は認められなかった（ $R=-0.315$, $P=0.133$, $n=24$ ）。同様に NTB 群を加えて解析したところ、やはり相関は明確ではなかった（ $R=-0.357$, $P=0.052$, $n=30$ ）（図 11A）。しかし、C20 Cut 群を解析に加えた場合は、SSAT と脂肪重量との間に負の相関が認められた（ $R=-0.588$, $P<0.001$, $n=36$ ）（図 11B）。一方、マロニル CoA については、クローン 5 移植群で行った解析では、脂肪重量と強い正の相関がみられた（ $R=0.789$, $P<0.001$, $n=24$ ）（図 11C）。同様の相関は NTB 群を加えても認められた（ $R=0.415$, $P=0.022$, $n=30$ ）。さらに、解析に C20 Cut 群を加えた場合でも強い正の相関が認められた（ $R=0.509$, $P=0.002$, $n=36$ ）（図 11D）。

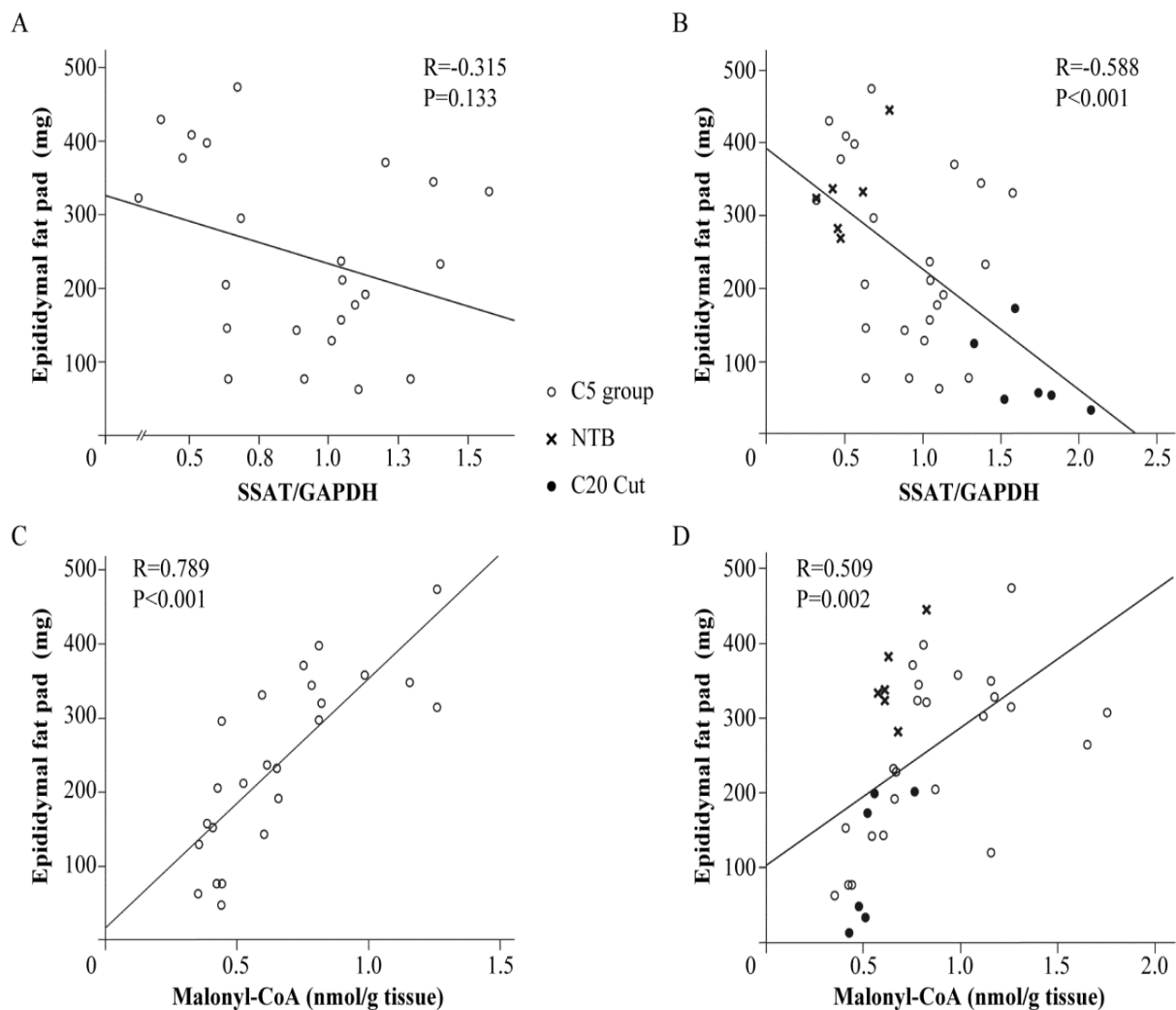


図 11. 精巢上体脂肪重量と SSAT-mRNA 発現量、およびマロニル CoA 量との相関
 1 匹のマウスから得られた対比可能なデータで解析した。(A) クローン 5 腫瘍移植
 マウスの脂肪重量と SSAT の相関 (n=24)、(B) クローン 5 腫瘍移植マウスに NTB
 群と C20 Cut 群を含めたマウスの脂肪重量と SSAT の相関 (n=36)、(C) クローン 5
 腫瘍移植マウスの脂肪重量とマロニル CoA の相関 (n=24)、(D) クローン 5 腫瘍移
 植マウスに NTB 群と C20 Cut 群を含めたマウスの脂肪重量とマロニル CoA の相関
 (n=36) を示す。各群 6 匹ずつのマウスを用いた。

C5 group, クローン 5 腫瘍移植マウス (C5Cut, C5Mus, C5Per, C5Tho) ; NTB, 非担癌
 マウス ; C20 Cut, クローン 20 皮下移植マウス

考察

悪液質の発症には様々な因子が関与していることが報告されている(4-8, 27-34)。そして、抗体などによって悪液質誘発物質の生物活性を抑制することにより悪液質の改善が得られることが動物実験で示されてきた(35-40)。しかし、これらの実験では、多くの場合には何らかの免疫学的もしくは内分泌機能の異常を有する動物を用いているか(36, 40)、サイトカインなどのある種の悪液質誘発物質を産生する特殊な腫瘍を移植するなど特殊な状況下での検討であった(36-39)。その中で、コロン 26 腫瘍は BALB/c マウスより化学発癌で得られた腫瘍であり、免疫機能や内分泌機能に異常のない同系統のマウスに移植できるために、悪液質病態の解明に多く用いられてきた(36-38, 41)。さいたま医療センター外科のグループでは、これまでコロン 26 腫瘍を限界希釈法で 1 個の細胞から樹立したクローン 20 腫瘍を用いて検討し、IL-6 が悪液質に重要な役割を担っていることや、悪液質の誘発には IL-6 以外の物質の関与も強く示唆されることなど報告した(14, 15)。さらに、腫瘍-宿主間の反応も悪液質の病態に影響を及ぼすことなどを示してきたが(16, 17)、今回の検討では腫瘍-宿主間の反応が悪液質の病態に大きく関わっていることを示す結果となった。

癌悪液質はある特殊な癌でのみ発症するわけではなく、あらゆる癌で観察されることや、癌患者では早期には悪液質を呈さない患者でも、転移などの癌の進行に伴って悪液質が誘発され、末期には大半の癌患者が悪液質状態に陥ることなどを考慮すると(1, 9)、腫瘍-宿主間によって産生された物質が悪液質の誘発に関与していることを強く示唆している。今回の検討では、皮下に移植しても悪液質を誘発しないクローン 5 腫瘍を筋肉内、腹腔内、および胸腔内に移植した場合に典型的な悪液質の状態に陥ることを示すことができ、腫瘍-宿

主間の反応が悪液質の病態に重要な役割を担っていることがわかった。このことは、移植腫瘍ライセートとマウス血清中のサイトカインやケモカイン濃度が、腫瘍の移植部位の違いによって異なっていることから裏付けられている。

これまで動物を用いた検討で、IL-1 β 、IL-6、および TNF- α は悪液質誘発との関係が指摘されてきた(14, 15, 30, 37, 42)。しかし、今回の検討では、血清中のこれらのサイトカイン濃度とマウスの体重減少および蓄積脂肪重量や筋肉重量の減少との間には明確な関係が認められなかった。一方、癌患者では、血清 IL-10 と癌悪液質の誘発に密接な関係のあることがしばしば報告されているが(43-45)、今回の動物モデルでも悪液質と血清 IL-10 には密接な関係があった。また、悪液質を来したクローン 5 移植群 (C5 Mus、C5 Per、C5 Tho) での検討では、悪液質の誘発と白血球数の相関を認めた。免疫組織学的検討においても、C5 Cut 群の移植腫瘍内には好中球の浸潤はわずかであったが、悪液質に陥ったクローン 5 移植群 (C5 Mus、C5 Per、C5 Tho) の移植腫瘍内には多くの好中球の浸潤を認めた。最近の臨床報告では、血中の好中球数や腫瘍への好中球浸潤が、悪液質の発症と関連していることが指摘されている(46-51)。これらのことから、この悪液質動物モデルは、ヒトの悪液質の病態を検討する上で適切な動物モデルであると考えられる。

悪液質の病態において蓄積脂肪の減少は重要な指標となる。その蓄積脂肪の減少の機序には β 酸化の亢進が指摘されている。 β 酸化と密接な関係のあるマロニル CoA 量は、アセチル CoA や、ACC 活性、マロニル CoA デカルボキシラーゼ活性、および SSAT などによって影響を受ける(25, 52) (図 13)。マロニル CoA は脂肪酸合成の基質となるが(53)、 β 酸化のステップであるミトコンドリア内への脂肪酸誘導をコントロールするカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT-1) を抑制する(54)。従って、マロニル CoA の減少は、肝臓内にお

ける脂肪酸合成を減少させ、 β 酸化を亢進させることとなる(55)。一方、蓄積脂肪では、悪液質誘発因子であるサイトカインやホルモンが脂肪酸の取り込みや合成を阻害し(56-58)、蓄積脂肪の分解を促進する(59, 60)。脂肪細胞から放出された脂肪酸は、肝臓内での β 酸化に利用されることとなる。ところが、マウスのSSATを過剰発現させると、蓄積脂肪の著明な減少を生じる悪液質類似の状態を誘発することが示されている(52)。このことを考慮すると、肝臓における β 酸化の亢進が蓄積脂肪の放出にも大きな役割を担っていることが推測される。数種類のサイトカインやホルモンなどやストレスはSSATを活性化させることが知られている(61-66)。C20 Cut群では移植腫瘍ライセートやマウス血清中のIL-1 β 、IL-6、およびTNF- α の上昇が比較的高かったが、C20 Cut群をSSATと蓄積脂肪重量との相関の検討に加えた場合には、両者の相関が認められるようになった。皮下に移植しても強力な悪液質を誘発するクローン20腫瘍は、SSATを活性化させる作用の強いことが示唆され、悪液質の病態にSSATの活性化が重要な役割を担っていることを示す結果であった。しかしながら、クローン5移植群の検討では、SSATのmRNAのレベルと蓄積脂肪重量との間には相関が認められなかった。一方、マロニルCoA量と蓄積脂肪の減少との間には密接な相関が認められた。この両者の関係はC20 Cut群を加えても同様に認められ、悪液質の誘発においてマロニルCoA量は、蓄積脂肪重量の減少と密接に関係するものであることがわかった。このことより、悪液質における蓄積脂肪の減少の機序においては、SSATの活性化を介する以外にもマロニルCoA量を減少させるその他の因子も関与していることを示唆するものであり、今後は今回の検討結果を加味して悪液質の機序の解明と治療法の開発を行っていく必要があると思われた。

結論

この研究によって、癌悪液質の誘発には腫瘍の存在に反応した臓器や組織における宿主側の因子が重要な役割を担うことが示された。今回の検討では、悪液質の指標や治療のターゲットとなる単一もしくは少数の因子を見出せず、悪液質の病態の複雑さが改めて明らかになった。悪液質の重要な徴候である蓄積脂肪の減少に関しては、SSATの活性化が注目されているが、この検討では肝臓内マロニル CoA との関係がより密接であり、今後新たな悪液質の指標や治療のターゲットとして検討対象にするべきであると考えられた。

謝辞

研究を行うにあたってご指導いただいた自治医科大学附属さいたま医療センター一般消化器外科の力山敏樹教授、前教授の小西文雄先生、および懇切かつ丁寧なご指導を賜りました早田邦康准教授に心より御礼申し上げます。また実験をサポートいただいた自治医科大学臨床検査医学の賀来智美様、および自治医科大学附属さいたま医療センター一般消化器外科の研究補助員である石坂伊津子様、BSL 研究施設の皆様、実験室と測定装置の拝借および実験指導をいただいたベリタス（東京）の技術員の方々に御礼申し上げます。

参考文献

1. Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglass HO Jr, Engstrom PF, Ezdinli EZ, Horton J, Johnson GJ, Moertel CG, Oken MM, Perlia C, Rosenbaum C, Silverstein MN, Skeel RT, Sponzo RW and Tormey DC: Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med* 69: 491-497, 1980.
2. Tisdale MJ: Biology of cachexia. *J Natl Cancer Inst* 89: 1763-1773, 1997.
3. Brennan MF: Uncomplicated starvation versus cancer cachexia. *Cancer Res* 37: 2359-2364, 1977.
4. Kotler DP: Cachexia. *Ann Intern Med* 133: 622-634, 2000.
5. Tisdale MJ: Mechanisms of Cancer Cachexia. *Physiol Rev* 89: 381-410, 2009.
6. Fearon KC, Glass DJ and Guttridge DC: Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab* 16: 153-166, 2012.
7. Tisdale MJ: Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? *Future Oncol* 6: 503-513, 2010.
8. Rebeca R, Bracht L, Noleto GR, Martinez GR, Cadena SM, Carnieri EG, Rocha ME and de Oliveira MB: Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochem Funct* 26: 731-738, 2008.
9. Tisdale MJ: Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2: 862-871, 2002.
10. Denkers EY, Del Rio L and Bennouna S: Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem Immunol Allergy* 83: 95-114, 2003.
11. Bliss SK, Marshall AJ, Zhang Y and Denkers EY: Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J Immunol* 162: 7369-7375, 1999.
12. Lloyd AR and Oppenheim JJ: Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 13: 169-172, 1992.
13. Stow JL, Low PC, Offenhäuser C and Sangermani D: Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology* 214: 601-612, 2009.
14. Soda K, Kawakami M, Kashii A and Miyata M: Characterization of mice bearing subclones of colon 26 adenocarcinoma disqualifies interleukin-6 as the sole inducer of cachexia. *Jpn J Cancer Res* 85: 1124-1130, 1994.

15. Soda K, Kawakami M, Kashii A and Miyata M: Manifestations of cancer cachexia induced by colon 26 adenocarcinoma are not fully ascribable to interleukin-6. *Int J Cancer* 62: 332-336, 1995.
16. Soda K, Kawakami M, Takagi S, Kashii A and Miyata M: Splenectomy before tumor inoculation prolongs the survival time of cachectic mice. *Cancer Immunol Immunother* 41: 203-209, 1995.
17. Kanzaki M, Soda K, Gin PT, Kai T, Konishi F and Kawakami M: Erythropoietin attenuates cachectic events and decreases production of interleukin-6, a cachexia-inducing cytokine. *Cytokine* 32: 234-239, 2005.
18. Matsumoto T, Fujimoto-Ouchi K, Tamura S, Tanaka Y and Ishitsuka H: Tumour inoculation site-dependent induction of cachexia in mice bearing colon 26 carcinoma. *Br J Cancer* 79: 764-769, 1999.
19. Giavazzi R, Campbell DE, Jessup JM, Cleary K and Fidler IJ: Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. *Cancer Res* 46: 1928-1933, 1986.
20. Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Jessup JM and Fidler IJ: Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 48: 6863-6871, 1988.
21. Fujimoto-Ouchi K, Tamura S, Mori K, Tanaka Y and Ishitsuka H: Establishment and characterization of cachexia-inducing and -non-inducing clones of murine colon 26 carcinoma. *Int J Cancer* 61: 522-528, 1995.
22. Tsuchiya H, Sato J, Tsuda H, Fujiwara Y, Yamada T, Fujimura A and Koshimizu TA: Serum amyloid A upsurge precedes standard biomarkers of hepatotoxicity in ritodrine-injected mice. *Toxicology* 305: 79-88, 2013.
23. Yamada T, Fukuda T, Wada A and Itoh Y: Monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for murine serum amyloid A. *J Immunoassay* 20: 223-235, 1999.
24. Kaczmarek E, Górna A and Majewski P: Techniques of image analysis for quantitative immunohistochemistry. *Rocz Akad Med Bialymst* 49 Suppl 1: 155-158, 2004.
25. Celik A, Kano Y, Tsujinaka S, Okada S, Takao K, Takagi M, Chohnan S, Soda K, Kawakami M and Konishi F: Decrease in malonyl-CoA and its background metabolic alterations in murine model of cancer cachexia. *Oncol Rep* 21: 1105-1111, 2009.
26. Takamura Y, Kitayama Y, Arakawa A, Yamanaka S, Tosaki M and Ogawa Y: Malonyl-CoA: acetyl-CoA cycling. A new micromethod for determination of

- acyl-CoAs with malonate decarboxylase. *Biochim Biophys Acta* 834: 1-7, 1985.
27. Nicolini A, Ferrari P, Masoni MC, Fini M, Pagani S, Giampietro O and Carpi A: Malnutrition, anorexia and cachexia in cancer patients: A mini-review on pathogenesis and treatment. *Biomed Pharmacother* 67: 807-817, 2013.
 28. Sato T, Laviano A, Meguid MM, Chen C, Rossi-Fanelli F and Hatakeyama K: Involvement of plasma leptin, insulin and free tryptophan in cytokine-induced anorexia. *Clin Nutr* 22: 139-146, 2003.
 29. Gelin J, Moldawer LL, Lönnroth C, Sherry B, Chizzonite R and Lundholm K: Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. *Cancer Res* 51: 415-421, 1991.
 30. Johnen H, Lin S, Kuffner T, Brown DA, Tsai VW, Bauskin AR, Wu L, Pankhurst G, Jiang L, Junankar S, Hunter M, Fairlie WD, Lee NJ, Enriquez RF, Baldock PA, Corey E, Apple FS, Murakami MM, Lin EJ, Wang C, During MJ, Sainsbury A, Herzog H and Breit SN: Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med* 13: 1333-1340, 2007.
 31. Machado AP, Costa Rosa LF and Seelaender MC: Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. *Cell Tissue Res* 318: 503-514, 2004.
 32. Moldawer LL, Rogy MA and Lowry SF: The role of cytokines in cancer cachexia. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 16: 43S-49S, 1992.
 33. Kim HJ, Kim HJ, Yun J, Kim KH, Kim SH, Lee SC, Bae SB, Kim CK, Lee NS, Lee KT, Park SK, Won JH, Park HS and Hong DS: Pathophysiological role of hormones and cytokines in cancer cachexia. *J Korean Med Sci* 27: 128-134, 2012.
 34. Agustsson T, Rydén M, Hoffstedt J, van Harmelen V, Dicker A, Laurencikiene J, Isaksson B, Permert J and Arner P: Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res* 67: 5531-5537, 2007.
 35. Yae S, Takahashi F, Yae T, Yamaguchi T, Tsukada R, Koike K, Minakata K, Murakami A, Nurwidya F, Kato M, Tamada M, Yoshikawa M, Kobayashi H, Seyama K and Takahashi K: Hochuekkito (TJ-41), a Kampo Formula, Ameliorates Cachexia Induced by Colon 26 Adenocarcinoma in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 976926, 2012.
 36. Yasumoto K, Mukaida N, Harada A, Kuno K, Akiyama M, Nakashima E, Fujioka N, Mai M, Kasahara T, Fujimoto-Ouchi K, Mori K, Tanaka Y and Matsushima K: Molecular analysis of the cytokine network involved in cachexia in colon 26 adenocarcinoma-bearing mice. *Cancer Res* 55: 921-927, 1995.

37. Strassmann G, Fong M, Kenney JS and Jacob CO: Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* 89: 1681-1684, 1992.
38. Fujita J, Tsujinaka T, Yano M, Ebisui C, Saito H, Katsume A, Akamatsu K, Ohsugi Y, Shiozaki H and Monden M: Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents muscle atrophy in colon-26 adenocarcinoma-bearing mice with modulation of lysosomal and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways. *Int J Cancer* 68: 637-643, 1996.
39. Llovera M, Carbó N, García-Martínez C, Costelli P, Tessitore L, Baccino FM, Agell N, Bagby GJ, López-Soriano FJ and Argilés JM: Anti-TNF treatment reverts increased muscle ubiquitin gene expression in tumour-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 653-655, 1996.
40. Tsujinaka T, Fujita J, Ebisui C, Yano M, Kominami E, Suzuki K, Tanaka K, Katsume A, Ohsugi Y, Shiozaki H and Monden M: Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest* 97: 244-249, 1996.
41. Murphy KT, Chee A, Trieu J, Naim T and Lynch GS: Importance of functional and metabolic impairments in the characterization of the C-26 murine model of cancer cachexia. *Dis Model Mech* 5: 533-545, 2012.
42. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO and Jablons D: Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res* 52: 4113-4116, 1992.
43. Ebrahimi B, Tucker SL, Li DH, Abbruzzese JL and Kurzrock R: Cytokines in pancreatic carcinoma - Correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer* 101: 2727-2736, 2004.
44. Shibata M, Nezu T, Takekawa M, Takizawa H, Ando K, Miyake H, Amano S and Kurosu Y: Serum levels of interleukin-10 and interleukin-12 in patients with colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci* 795: 410-412, 1996.
45. Lira FS, Rosa JC, Zanchi NE, Yamashita AS, Lopes RD, Lopes AC, Batista ML Jr and Seelaender M: Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. *Cell Biochem Funct* 27: 71-75, 2009.
46. McMillan DC: Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12: 223-226, 2009.
47. McMillan DC: The systemic inflammation-based Glasgow Prognostic Score: a decade of experience in patients with cancer. *Cancer Treat Rev* 39: 534-540, 2013.
48. Zahorec R: Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy* 102: 5-14,

- 2001.
49. Donskov F: Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Semin Cancer Biol*, 2013.
 50. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S and Brandau S: Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother* 61: 1155-1167, 2012.
 51. Mantovani A, Allavena P, Sica A and Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436-444, 2008.
 52. Jell J, Merali S, Hensen ML, Mazurchuk R, Spornyak JA, Diegelman P, Kisiel ND, Barrero C, Deeb KK, Alhonen L, Patel MS and Porter CW: Genetically altered expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase affects fat metabolism in mice via acetyl-CoA. *J Biol Chem* 282: 8404-8413, 2007.
 53. Harwood HJ: Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. *Expert Opin Ther Targets* 9: 267-281, 2005.
 54. McGarry JD and Brown NF: The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244: 1-14, 1997.
 55. Foster DW: The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1033: 1-16, 2004.
 56. Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, Gavin LA and Grunfeld C: Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 8313-8317, 1986.
 57. Ogawa H, Nielsen S and Kawakami M: Cachectin/tumor necrosis factor and interleukin-1 show different modes of combined effect on lipoprotein lipase activity and intracellular lipolysis in 3T3-L1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1003: 131-135, 1989.
 58. Doerrler W, Feingold KR and Grunfeld C: Cytokines induce catabolic effects in cultured adipocytes by multiple mechanisms. *Cytokine* 6: 478-484, 1994.
 59. Rydén M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A and Arner P: Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 168-175, 2004.
 60. Bézaire V, Mairal A, Anesia R, Lefort C and Langin D: Chronic TNFalpha and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis. *FEBS Lett* 583: 3045-3049, 2009.
 61. Casero RA and Pegg AE: Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J* 7: 653-661, 1993.

62. Desiderio MA, Pogliaghi G and Dansi P: Regulation of spermidine/spermine N1-acetyltransferase expression by cytokines and polyamines in human hepatocarcinoma cells (HepG2). *J Cell Physiol* 174: 125-134, 1998.
63. Green ML, Chung TE, Reed KL, Modric T, Badinga L, Yang J, Simmen FA and Simmen RC: Paracrine inducers of uterine endometrial spermidine/spermine N1-acetyltransferase gene expression during early pregnancy in the pig. *Biol Reprod* 59: 1251-1258, 1998.
64. Rodriguez-Sallaberry C, Simmen FA and Simmen RC: Polyamine- and insulin-like growth factor-I-mediated proliferation of porcine uterine endometrial cells: a potential role for spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase during peri-implantation. *Biol Reprod* 65: 587-594, 2001.
65. Huang YL and Taylor MW: Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase by interferon type I in cells of hematopoietic origin. *J Interferon Cytokine Res* 18: 337-344, 1998.
66. Babbar N, Hacker A, Huang Y and Casero RA: Tumor necrosis factor alpha induces spermidine/spermine N-1-acetyltransferase through nuclear factor kappa B in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 281: 24182-24192, 2006.