患者腫瘍組織移植マウスで見られる骨格筋萎縮ではLC3陽性顆粒が増加する

安納 弘道¹, 土橋 悠², 田村 直輝¹, 植村 武文¹, 和栗 聡¹

LC3-positive puncta increase in skeletal muscle of patient-derived xenograft mice

Hiromichi Annoh¹, Yuu Dobashi², Naoki Tamura¹, Takefumi Uemura¹ and Satoshi Waguri¹

¹福島県立医科大学医学部解剖組織学講座, 〒960-1295 福島県福島市光が丘1番地 (*Department of Anatomy and Histology, Fukushima Medical University, 1 Hikarigaoka, Fukushima City, Fukushima 960-1295, Japan*)

²福島県立医科大学ふくしま国際医療科学センター医療-産業トランスレーショナルリサーチセンター, 〒960-1295 福島県福島市光が丘1番地 (*Fukushima Medical University, Fukushima Global Medical Science Center, Translational Research Center, 1 Hikarigaoka, Fukushima City, Fukushima 960-1295, Japan*)

Received: August 17, 2017 / Accepted: December 14, 2017

Abstract Loss of muscle tissues in cancer cachexia has been partly attributed to the activation of autophagy; however, because the experimental animal models involved only canonical cell lines, this conclusion cannot be confirmed until it is evaluated for different pathological conditions. Hence, in the present study, we histologically examined the punctate signal for LC3, an autophagosome marker, in patient-derived xenograft (PDX) mice. When 10 PDX mice grafted with colorectal cancer tissues were examined, their body weight, muscle (gastrocnemius) weight, and area of muscle fiber were all significantly lesser than those of control mice. In addition, immunofluorescence microscopy revealed that the number of LC3-positive puncta per muscle fiber or fiber area was significantly higher in the PDX mice than in control mice. These results indicate that the autophagy-lysosomal degradation system is involved in cancer cachexia-induced muscle wasting, and that PDX mice are a useful model for pathological analyses of cachexic muscle loss.

Jpn J Phys Fitness Sports Med, 67(1): 99-105 (2018)

Keywords : cachexia, skeletal muscle, patient-derived xenograft, autophagy, LC3

緒 言

悪液質は、癌、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り、骨格筋の著しい萎縮に特徴づけられる¹⁻³⁾。この筋萎縮は、主に筋タンパク質の異化作用亢進が原因と考えられており、これまでにカルパイン分解系⁴⁾、ユビキチン-プロテアソーム分解系⁵⁾、及びオートファジー分解系⁶⁻⁸⁾の関与が報告されている。オートファジーはリソソームを利用した細胞質成分の分解システムである。まず細胞質の一部が隔離膜という2重膜構造で囲まれてオートファゴソームを形成し、その後リソソームと融合することでオートリソソームとなり、隔離内容の分解が進む。これまで30種類を超えるAtg (Autophagy-related) 遺伝子が同定され、機能解析が進んでいる^{9,10)}。Atg8ファミリーの一つであるLC3 (microtubule-associated protein 1, light chain 3) は、オートファジーの進行とともに細胞質型のLC3-Iからフォスファチジルエタノールアミンと共有結合した

LC3-IIへ変換されること、そしてLC3-IIは隔離膜、オートファゴソーム、オートリソソームに局在することから、生化学的及び形態学的解析の有用なマーカータンパク質として活用されている^{11,12)}。

これまで、癌悪液質を模倣する培養細胞実験系、癌細胞株を移植したモデルマウス、及び癌患者の骨格筋におけるオートファジー関連分子の発現解析により、癌悪液質誘導性の筋萎縮にはオートファジー-リソソーム分解が関与すると指摘されてきた^{6,8,13)}。さらに最近、オートファジーフラックスアッセイをマウス個体に応用した研究により、癌悪液質の筋萎縮においてオートファジーが亢進することが積極的に示唆された⁷⁾。しかし、この報告ではオートファジー基質であるp62の蓄積やリソソーム機能の抑制が、特に進行した悪液質で認められており、オートファジー亢進のみでは説明できない点も指摘している。また、これまでの癌悪液質の動物実験モデルでは、LLC (Lewis lung carcinoma) 細胞、C26 (Colon-26 adenocarcinoma) 細胞、AH-130 (Yoshida ascites hepa-

toma), B16F10 (melanoma) 細胞など^{7,13-19)}, この実験系に適した細胞株が移植されており, 結論の普遍性に弱さが残る. すなわち, 将来的にオートファジー解析を臨床に応用するには, 腫瘍組織の違いによる個体差を踏まえた評価を進める必要がある. 本研究では, その動物実験系としてヒト癌由来組織を移植した (PDX: patient-derived xenograft) マウスモデルに着目した. このモデルは主に抗癌剤の開発過程で使用されるが, 筋萎縮病態に注目した研究は少なく²⁰⁾, オートファジーを解析した報告はない. また, これまでの報告にはLC3-IIがオートファジー構造に集積することを示す免疫組織蛍光法の結果が示されていない. そこで本研究では, 悪液質誘導性筋萎縮におけるオートファジーの関与を調べるために, 移植腫瘍組織に多様性のあるPDXマウスの筋におけるLC3陽性顆粒を組織学的に評価した.

材料と方法

抗体の検証 本研究ではウサギ抗LC3抗体 (abcam, EP1983Y, USA) を用いた. この抗体の有効性について, 野生型, およびAtg3²¹⁾ あるいはAtg7²²⁾ を欠損したマウス胎仔由来線維芽細胞を用いたウエスタンブロット法, およびマウス筋芽細胞由来C2C12細胞を用いた免疫蛍光法を行った. 両細胞共に10%ウシ胎仔血清を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; ナカライテスク) を培養液として用い, 37°C, 5% CO₂ 環境下で培養した.

ウエスタンブロット法では, オートファジーを誘導するために細胞をアミノ酸欠乏DMEM (Wako 048-33575) あるいは100 nM bafilomycin A1 (Merck Millipore 19-148) を添加した同培養液で2時間培養した. その後, 細胞を1%プロテアーゼインヒビター (Roche), 1%フォスファターゼ阻害剤 (SIGMA Aldrich), および1% Triton X-100を含む150 mM NaCl添加リン酸緩衝液 (PBS) を用いて溶解した. 1レーンあたりタンパク質10 µgのサンプルを還元状態で電気泳動し, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (MILLIPORE) に転写した. 10%スキムミルク, および0.1% Tween-20を含むPBSで30分間, 室温でブロッキング後, ウサギ抗LC3抗体 (1:1000) を室温で1時間反応させ, さらにHRP標識抗ウサギIgG抗体 (1:2000) を室温で30分間反応させた. 化学発光試薬 (ECL Prime, GEヘルスケア・ジャパン) を用いて約3分間室温で発光反応を行い, LAS-4000 (GEヘルスケア・ジャパン) で検出した. 内部コントロールとして抗glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (サンタクルーズ, 希釈倍率1:2000) を用いた.

免疫蛍光法では, C2C12細胞をハンクス液にて60分間培養することで飢餓誘導を行った. 細胞を4%パラホル

ムアルデヒドを含むリン酸緩衝液 (PB, pH 7.4) で15分間, 室温で固定した. 0.1% Triton X-100/PBSで30分間, 室温で透過処理を行った後, 2%正常ヤギ血清と0.1% Tween-20/PBSで室温, 15分間, ブロッキングした. ウサギ抗LC3抗体 (1:500) で室温, 1時間で反応後, Alexa 488標識抗ウサギIgG抗体 (1:800) を室温, 30分で反応させ, 共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, Olympus) を用いて観察した.

PDXマウスの作製 移植の成功率を高めるために, 重度の複合型免疫不全動物として知られているNOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/ShiJic) マウス²³⁾ を実験動物中央研究所より購入した. 異なる大腸癌患者より採取した癌組織 (2 x 2 mm腫瘍片を4個程度) をそれぞれ6-12週齢のNOGマウスの腋窩及び腹腔に移植し, 約3ヶ月間の飼育を行った. 水および飼料は自由摂取とし, 12時間の明暗周期の照明下に飼育した. イソフルラン吸入麻酔下に体重を測定し, その後にペントバルビタールナトリウム (100 mg/kg) を腹腔内投与して安楽死後に解剖した. 目視, および小さな腫瘍病変に関しては病理組織診断により生着の有無を判断した. PDXマウスの作製は本研究に関わらず継続して行っているため, 時系列に沿って癌組織が生着したマウス10匹, 及び生着しなかったマウス (対照群) 10匹を筋組織採取の対象とした. 上記麻酔下に屠殺後, 体重測定を行い, さらに左腓腹筋の起始から停止までの全体を切り出し, 重量測定を行った. 本研究は, 福島県立医科大学倫理委員会 (承認番号: 1518) 及び福島県立医科大学動物実験委員会 (承認番号: 25028) の承認のもとに実施した.

免疫組織蛍光法 腓腹筋は4%パラホルムアルデヒドを含む0.1 M PB (pH 7.4) にて4°C, 2日間浸漬固定を行った. 30%サッカロース/PBSで氷晶防止をした後, 筋腹中央で上下に分け, 筋横断切片が作製できる方向でティッシュ・テックOCTコンパウンド (サクラファインテックジャパン, 日本) に包埋し, ドライアイスを含むイソペンタン液にて急速凍結した. その後, -18°Cのクリオスタット内にて10 µm厚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貼り付け, 乾燥させた. 0.1% Triton X-100/PBSによる膜透過処理後, 1%イムノセーバー (日新EM) 液に漬け, 専用電子レンジ (Microwave Processor MI-77, 東屋医科機器, 日本) を用い10分間, 70°Cにて抗原賦活処理を行った. 5%正常ロバ血清/PBSにて室温, 30分間反応させて非特異的反応部位をブロックし, 洗浄後, ウサギ抗LC3抗体 (希釈倍率1:2,000) を用いて4°C, 14時間の免疫反応を行った. 洗浄後, 2次抗体としてAlexa 488標識ロバ抗ウサギ抗体 (Jackson ImmunoResearch; USA; 希釈倍率1:800)

を用い、室温にて 2 時間反応した。包埋剤 (Aqua-Poly/Mount, Polysciences, Inc. GBR) にて封入後、60 倍対物レンズ (PlanApo N 60×, NA 1.42 oil) を装着した共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, オリンパス, 日本) にて観察した。

定量と統計処理 それぞれのマウス腓腹筋から凍結切片を作製して上記の免疫染色を行った。約 10 個の筋線維を含む領域 (200 × 200 μm) 約 10 箇所を無作為に抽出し、合計 100 本の筋線維について LC3 陽性顆粒数を数えると共に、画像解析ソフト (Photoshop, Adobe, USA) を用いて筋線維横断面積を測定した。筋線維当たり、及び単位面積当たりの陽性顆粒数を算出し、その平均を個体の代表値として、PDX 群と対照群における平均値と標準偏差を算出した。統計学的有意差検定には、Student's *t*-test を用いた。有意水準は、危険率 1% または 5% 未満とした。

結 果

使用した抗 LC3 抗体の検証 本研究で用いた抗 LC3 抗体の有効性について、ウエスタンブロット法および培養細胞を用いた免疫蛍光法で評価した。Fig. 1A に示すように、MEF をアミノ酸欠乏培地で培養したところ、対照培地に比して LC3-I のバンド濃度は弱く、LC3-II のバンド濃度は強かった。また、オートファゴソーム以降の過程を阻害する bafilomycin A1 を投与したものでは、LC3-II の濃度はさらに強かった (Fig. 1A)。また、LC3-II への変換ができない Atg3 あるいは Atg7 欠損 MEF では LC3-II は認められなかった (Fig. 1B)。したがって、この抗体は LC3-II を認識できることが示された。さらにマウス筋芽細胞由来の C2C12 細胞でオートファジーを誘導し免疫蛍光法で解析したところ、対照と比べて隔離膜やオートファゴソームを示す LC3 陽性構造 (Fig. 1C, 挿入図) が多数認められた。LC3-I は細胞

Fig. 1 Evaluation of anti-LC3 antibody

(A) Wild-type (WT) MEFs were incubated with amino acid-free DMEM (AA -) in the presence (Stv + Baf) or absence (Stv) of bafilomycin A1 (Baf) for 2 h. They were lysed and processed for western blot analysis using anti-LC3 or anti-GAPDH antibody. (B) MEFs for WT, Atg3^{-/-} and Atg7^{-/-} were cultured in a control medium, lysed and processed for western blot analysis using anti-LC3 or anti-GAPDH antibody. Bands representing LC3-I (I) and LC3-II (II) are indicated. (C) C2C12 cells were incubated with the control (cont) or Hanks' medium (AA -) for 1 h. They were fixed and processed for immunofluorescence microscopy using anti-LC3 antibody. LC3-positive structures are enlarged and shown in insets. Arrowheads indicate ring or c-shaped structures. Bars: 10 μm and 1 μm (in insets).

質に分布し, オートファジーが誘導されるとLC3-IIに変換されて主に隔離膜やオートファゴソームに局在すること^{12,24)}から, これら所見はLC3-IIへの変換, すなわちオートファジーが発動されたことを示すものと考えられた. 以上の結果は, この抗体がマウス組織におけるオートファジー解析に適すること, および過去に報告^{11,25)}されたように, LC3陽性構造の増加がオートファジーの指標になることを示す.

PDXマウスにおける悪液質と筋萎縮の評価 次に, 本研究で用いたPDXマウスの悪液質の程度を評価した. PDXマウスの体重 (26.3 ± 2.2 g) は対照マウス (28.7 ± 1.5 g) に比べて有意に軽く ($p < 0.01$), 約8.4%の低値を示した (Fig. 2A). また, 腓腹筋の湿筋重量に関しては, PDXマウス (110.8 ± 9.1 mg) は対照マウス (128.1 ± 6.0

mg) より有意に軽く ($p < 0.01$), 約13.5%の低値を示した (Fig. 2B). さらに, 筋線維の横断面積を調べたところ, PDXマウス ($973.3 \pm 118.28 \mu\text{m}^2$) は対照マウス ($1402.12 \pm 292.43 \mu\text{m}^2$) より有意に少なく ($p < 0.05$), 約30.6%の低値を示した. 一方, 体重当たりの筋重量に関しては有意な差は認められなかった (Fig. 2D). 以上の結果により, 本研究で用いたPDXマウスは, 悪液質による筋萎縮を引き起こしていることを確認した.

免疫組織蛍光法によるLC3顆粒の解析 さらにLC3の免疫組織蛍光染色を行った. Fig. 3Aに示すようにPDX及び対照マウスの筋線維内には大小のLC3陽性顆粒が認められた. また, 一部の構造はリングあるいはカップ状を呈しており, アミノ酸飢餓で誘導される隔離膜やオートファゴソーム構造 (Fig. 1C) に類似していた^{12,24)}. 定

Fig. 2 Loss of body weight and muscle in PDX mice

Body weight (A), weight of gastrocnemius muscle (B), cross-sectional area of muscle fiber (C), and relative muscle weight (D) in PDX and control (Cont) mice were measured and expressed as a box-and-whisker plot. The box indicates inter quartile range, with a horizontal line for median and an arrowhead for mean. The whiskers indicate the minimum and maximum data. Statistical analysis was carried out by Student's *t*-test ($n = 10$). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ns: not significant.

Fig. 3 Increase in LC3-positive puncta in the skeletal muscle of PDX mice

(A) Immunohistofluorescence microscopy was carried out using anti-LC3 antibody in control (Cont) and PDX mice. Boxed regions are enlarged and shown in the insets. Note that ring structures for LC3 are detected in both muscles (insets). Bars, 10 μ m and 1 μ m (inset). (B) Numbers of LC3-positive puncta per muscle fiber (B) and per area (C) were calculated and are expressed as a box-and-whisker plot. The box indicates inter quartile range, with a horizontal line for median and an arrowhead for mean. The whiskers indicate the minimum and maximum data. Statistical analysis was carried out by Student's *t* test ($n = 10$). **: $P < 0.01$.

量的解析を行うために、筋線維の横断面積当たりのLC3陽性顆粒数を測定した²⁵⁾。その結果、PDXマウスにおけるLC3陽性顆粒数 (25.12 ± 4.66) は、対照マウス群 (10.79 ± 3.26) に比べ有意に高い値を示した (Fig. 2B; $p < 0.01$)。また、単位面積当たりのLC3陽性反応数についても、PDXマウス (0.026 ± 0.007) は対照マウス (0.008 ± 0.003) より有意に高かった (Fig. 2C; $p < 0.01$)。

考 察

PDXマウスを利用した骨格筋萎縮モデルについて 本研究で作製したPDXマウスは、有意な体重減少と骨格筋萎縮を示した (Fig. 2)。これまで、癌悪液質により誘導される筋萎縮の動物モデルとしては、LLC細胞やC26細胞など、細胞株の移植モデルが良く使われてきたが^{7,13-19)}、

PDXマウスの骨格筋を評価した報告は少ない。例えばGoらは最近、膵臓癌組織の同所移植によるPDXを用いた解析を行い、有意な筋重量の低下を報告した²⁰⁾。本研究では大腸癌組織の異種移植を採用しており、方法の違いはあるものの、癌悪液質誘導性の筋萎縮研究にPDXマウスが有効であることを示唆するものである。今後は、成長速度や組織型の異なる癌種間での比較解析、および各種悪液質マーカーを用いた病態分類も合わせて行う必要がある。

PDXマウス骨格筋におけるLC3陽性顆粒の増加について 本研究ではLC3陽性顆粒の増加を検出することにより、悪液質による骨格筋萎縮にオートファジー・リソソーム分解系が関わることを示した。PDXマウスを用

いたこと, またLC3陽性顆粒を評価した点が初の試みであるものの, 本結果は癌悪液質におけるオートファジーフラックスの増減を示すものではない. LC3-IIはオートファゴソーム二重膜の内膜と外膜の両方に局在し, 内膜に存在する分子はオートファゴソームとリソソームが融合した後に分解される. 従って, リソソームの分解活性が損なわれた状態でもLC3-IIあるいはLC3陽性顆粒は増加する^{24,26)}. 実際にFig. 1で示したように, bafilomycin A1投与でMEFのリソソーム機能を阻害した場合でもLC3-IIの増加が認められる. 過去にPennaらは各種細胞株を移植したマウス, およびラットの骨格筋を解析した⁷⁾. その結果, LC3-IIやBeclin 1のタンパク量は増加し, そして個体におけるオートファジーフラックスが増加することから, 癌悪液質による筋萎縮ではオートファジーが亢進することを示唆した. しかし, 同時にオートファジー基質として分解されるべきp62が蓄積すること, 進行した悪液質ではリソソーム機能が低下することも示してしていることから, 悪液質の重症度による詳細解析の必要性に言及している. 本研究では, PDXマウスの筋組織でLC3陽性顆粒が有意に増加しており, その一部はリング構造を呈していた. このことは, 癌悪液質に至る過程でオートファジーが亢進したことを示唆する. しかし, 我々の実験系では, Pennaらが示したようにPDXマウス筋組織におけるp62陽性顆粒の増加傾向も見られたため(未発表データ), リソソーム機能の低下も考慮する必要がある. したがってオートファジー亢進を結論付けるにはさらなる解析が必要である. 本研究では, 特に形態学的解析を用いてLC3陽性リング構造を検出したことで, オートファゴソーム数の増加を証明したことに意義がある. また, 本研究では細胞株の移植ではなく, 個体差のある患者由来の癌組織を用いて実験を行い, やはりLC3顆粒の増加が認められた. このことは, 間接的ではあるがLC3がオートファジー・リソソーム分解系の変化を検出するマーカーとして, ヒト臨床研究においても使用できる可能性を示唆する.

利益相反

本研究に関して申告すべき利益相反はない.

謝 辞

本研究を技術的側面から支援して頂いた菅野勝行氏, 渡辺祥吾氏, 羽田鮎美氏に感謝します. また, 動物実験に関して多大な助言を頂いた片平清昭博士に感謝します. 本研究の一部はJSPS科研費25560375及び15H04670の助成を受けて行われました.

引用文献

- 1) Argiles JM, Busquets S, Stemmler B, Lopez-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular

- basis. *Nat Rev Cancer* 14: 754-762, 2014. doi: 10.1038/nrc3829.
- 2) Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab* 16: 153-166, 2012. doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.011.
- 3) Penna F, Baccino FM, Costelli P. Coming back: autophagy in cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17: 241-246, 2014. doi: 10.1097/MCO.0000000000000048.
- 4) Smith IJ, Aversa Z, Hasselgren PO, Pacelli F, Rosa F, Doglietto GB, Bossola M. Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. *Muscle Nerve* 43: 410-414, 2011. doi: 10.1002/mus.21893.
- 5) Krawiec BJ, Frost RA, Vary TC, Jefferson LS, Lang CH. Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E969-980, 2005. doi: 10.1152/ajpendo.00126.2005.
- 6) Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 6: 458-471, 2007. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.001.
- 7) Penna F, Costamagna D, Pin F, Camperi A, Fanzani A, Chiarpotto EM, Cavallini G, Bonelli G, Baccino FM, Costelli P. Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *Am J Pathol* 182: 1367-1378, 2013. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.12.023.
- 8) Aversa Z, Pin F, Lucia S, Penna F, Verzaro R, Fazi M, Colasante G, Tirone A, Rossi Fanelli F, Ramaccini C, Costelli P, Muscaritoli M. Autophagy is induced in the skeletal muscle of cachectic cancer patients. *Sci Rep* 6: 30340, 2016. doi: 10.1038/srep30340.
- 9) Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728-741, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- 10) Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132: 27-42, 2008. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- 11) Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghisso JA, Ahn HJ, Ait-Mohamed O, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akira S, Al-Younes HM, Al-Zeer MA, Albert ML, Albin RL, Alegre-Abarrategui J, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445-544, 2012.
- 12) Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19: 5720-5728, 2000. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720.
- 13) Lokireddy S, Wijesoma IW, Bonala S, Wei M, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R, Sharma M. Myostatin is a novel tumoral factor that induces cancer cachexia. *Biochem J* 446: 23-36, 2012. doi: 10.1042/BJ20112024.

- 14) Paul PK, Gupta SK, Bhatnagar S, Panguluri SK, Darnay BG, Choi Y, Kumar A. Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J Cell Biol* 191: 1395–1411, 2010. doi: 10.1083/jcb.201006098.
- 15) Asp ML, Tian M, Wendel AA, Belury MA. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int J Cancer* 126: 756–763, 2010. doi: 10.1002/ijc.24784.
- 16) Cospier PF, Leinwand LA. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. *Cancer Res* 71: 1710–1720, 2011. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3145.
- 17) Talbert EE, Metzger GA, He WA, Guttridge DC. Modeling human cancer cachexia in colon 26 tumor-bearing adult mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 5: 321–328, 2014. doi: 10.1007/s13539-014-0141-2.
- 18) Gallot YS, Durieux AC, Castells J, Desgeorges MM, Vernus B, Plantureux L, Remond D, Jahnke VE, Lefai E, Dardevet D, Nemoz G, Schaeffer L, Bonnieu A, Freyssenet DG. Myostatin gene inactivation prevents skeletal muscle wasting in cancer. *Cancer Res* 74: 7344–7356, 2014. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0057.
- 19) Bonetto A, Kays JK, Parker VA, Matthews RR, Barreto R, Puppa MJ, Kang KS, Carson JA, Guise TA, Mohammad KS, Robling AG, Couch ME, Koniaris LG, Zimmers TA. Differential Bone Loss in Mouse Models of Colon Cancer Cachexia. *Front Physiol* 7: 679, 2016. doi: 10.3389/fphys.2016.00679.
- 20) Go KL, Delitto D, Judge SM, Gerber MH, George TJ Jr, Behrns KE, Hughes SJ, Judge AR, Trevino JG. Orthotopic Patient-Derived Pancreatic Cancer Xenografts Engraft Into the Pancreatic Parenchyma, Metastasize, and Induce Muscle Wasting to Recapitulate the Human Disease. *Pancreas* 46: 813–819, 2017. doi: 10.1097/MPA.0000000000000843.
- 21) Sou YS, Waguri S, Iwata J, Ueno T, Fujimura T, Hara T, Sawada N, Yamada A, Mizushima N, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M. The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* 19: 4762–4775, 2008. doi: 10.1091/mbc.E08-03-0309.
- 22) Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169: 425–434, 2005. doi: 10.1083/jcb.200412022.
- 23) Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. NOD/SCID/gamma (c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175–3182, 2002. doi: 10.1182/blood-2001-12-0207.
- 24) Kimura S, Fujita N, Noda T, Yoshimori T. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods Enzymol* 452: 1–12, 2009. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03601-X.
- 25) Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15: 1101–1111, 2004. doi: 10.1091/mbc.E03-09-0704.
- 26) Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3: 542–545, 2007.