がん悪液質におけるインスリン抵抗性の関与

大澤 匡弘,* 村上 友康, 桑 和彦

Possible Involvement of Insulin Resistance in the Progression of Cancer Cachexia in Mice

Masahiro Ohsawa,* Tomoyasu Murakami, and Kazuhiko Kume

Department of Neuroparmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya City University; 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan.

(Received September 18, 2015)

Malnutrition is a common problem among cancer patients, affecting up to 85% of patients with certain cancers. In severe cases, malnutrition can progress to cachexia, a specific form of malnutrition characterized by loss of lean body mass and muscle wasting. Although this muscle wasting might be a product of enhanced protein degradation, the precise mechanisms of cancer cachexia are not fully elucidated. Based on basic and clinical research, glucose intolerance and insulin resistance have been postulated to be associated with cancer cachexia. Since insulin in the skeletal muscle inhibits protein degradation and promotes protein synthesis, insulin resistance could be a possible cause of cancer cachexia. Therefore, we investigated the involvement of insulin resistance in the development of cancer cachexia in tumor-bearing mice. The signaling protein in the insulin cascade was attenuated in the skeletal muscle and hypothalamus from tumor-bearing mice. We identified *Chrysanthemum morifolium* RAMAT., known as Kikuka, as a peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand. Treatment with Kikuka attenuates the skeletal muscle changes in tumor-bearing mice. These results suggest that this natural PPAR γ activator might be an attractive candidate for the treatment of cancer cachexia. In the symposium, we presented the PPAR γ activator-induced improvement of cancer cachexia.

Key words——cancer cachexia; insulin resistance; sarcopenia; Kikuka (*Chrysanthemum morifolium* RAMAT.); peroxisome proliferator-activated receptor γ

悪液質とは

悪液質は、栄養不良により衰弱した状態を指す言葉として用いられてきたが、長年、明確な定義がなく、あいまいな概念であった。2006年、米国ワシントンで開催されたコンセンサス会議において、「悪液質は基礎疾患に関連して生ずる複合的代謝異常の症候群で、脂肪量の減少の有無にかかわらず筋肉量の減少を特徴とする。臨床症状として成人では体重減少、小児では成長障害がみられる」と定義された。2011年初めには、がん悪液質について、「従来の栄養サポートにより改善することが困難であり、さらに進行性の機能障害を引き起こす（脂肪組織の減少の有無にかかわらず）著しい筋組織の減少を特徴とする複合的な疾患群を指す。病態生理学的

には、経口摂取の減少と代謝異常によるタンパクとエネルギー平衡の破綻を特徴とする」と定義された。これは、European Palliative Care Research Collaborative (EPCRC) や European Association for Palliative Care (EAPC), European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) といった欧州における緩和・栄養関連の主要学会並びに北米のエキスパートによって支持されており、現在のところがん悪液質の標準的な定義とされているものの、今後の研究によっては変更を余儀なくされることもあるのではないと思われる。

悪液質は、がんのほかに腎不全や心不全、慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD)、感染症などの慢性的な消耗性疾患の悪化に伴って出現する。末期がん患者では、大多数に悪液質がみられ、生活の質の低下や生存期間の短縮、積極的がん治療の中止、がん治療に対する反応性の低下など、数多くの悪影響を与える。例えば、悪液質はがんの死因の約30%を占めていると言われて

名古屋市立大学大学院薬学研究科神経薬理学分野
(〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

*e-mail: ohsawa@phar.nagoya-cu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第135年会シンポジウム S34 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Stages of Cancer Cachexia

Cachexia is defined into three stages depending on the patients' status. Pre-cachexia showed anorexia and metabolic changes without the substantial involuntary body weight loss. Refractory cachexia is clinically refractory as a result of very advanced cancer or the presence of rapidly progressive cancer unresponsive to anticancer therapy. Cachexia is the condition between pre-cachexia and refractory cachexia. Modified from Ref. 7).

いる。¹⁻³⁾ 生命の維持に不可欠な骨格筋が可及的に温存され、脂肪組織が優先的に減少する飢餓による低栄養状態とは対照的で、悪液質では早期から骨格筋量が減少する。⁴⁾

がん悪液質を生じ難いがん種もあり、その進行速度も様々であるが、がん悪液質はがんの進行とともに次第に死をもたらす不可逆性の栄養不良へと進展する。がん悪液質がもたらす栄養不良は食欲不振が大きく影響するものの、根本的には全身の慢性炎症反応による代謝異常であるため、骨格筋組織の分解亢進やインスリン抵抗性、脂質分解の亢進等の異化亢進がみられる。この代謝障害が高度になると、栄養不良は不可逆的となる。がん悪液質が軽度な状態は“pre-cachexia”と呼ばれ、この段階で栄養状態の悪化を可及的に遅らせることが重要である。^{2,5)} また、“late cachexia”, “severe cachexia”などの呼称が用いられてきた高度代謝障害により栄養状態の改善の余地がない最終末期の状態は、EPCRCのガイドラインでは“refractory cachexia”とされた (Fig. 1)。このガイドラインの中で cachexia の前後にある pre-cachexia と refractory cachexia のステージ概念は、がん患者の栄養管理を行う上で大きな意味があるだけでなく、薬物治療が介入すべきポイントを見定める上でも重要である。⁶⁾

悪液質の進行を阻止する効果的な治療法はまだまだ見い出されていない。悪液質の発症メカニズムはなかなか解明が進まず、代謝栄養学的見地から食欲不振による栄養摂取量の低下とエネルギー消費の増大

が要因と考えられるにすぎなかった。しかし、がん悪液質患者に高カロリー輸液などの十分な栄養投与を行ってもがん悪液質を改善できないことから、近年、腫瘍の発育・進展に伴って、腫瘍やその存在に対する反応として患者組織から分泌・遊離される種々の因子が、栄養障害の発現に係わっていると考えられるようになった。⁷⁾ つまり、がん悪液質は免疫や代謝、神経内分泌系の異常が複雑に絡み合って誘発される病態と言える。そのため、がん悪液質に係わる炎症性サイトカイン類や腫瘍由来因子に加え、脂肪、筋肉などの機能を維持する分子レベルでの検討が勢力的に行われている。このようながん悪液質の病態に関する分子レベルの理解は、新しい治療標的の発見と治療法の開発に結びつくと期待できる。

がん悪液質とインスリン抵抗性の関係

がん悪液質患者では、1919年という古くから耐糖能異常が認められることが知られていた。⁸⁾ また、動物実験においても、インスリンによる血糖降下作用が担がん動物において有意に減弱していることが示されている。⁹⁾ このインスリンの反応減弱には、インスリン抵抗性が係わっていると考えられ、肝臓や骨格筋においてインスリン抵抗性が生じていることも明らかにされている。また、インスリン抵抗性に関与すると考えられている全身の脂質分解もがん悪液質では亢進しており、脂質代謝の亢進によりインスリン抵抗性が生じてがん悪液質が発現すると考えられている。実際に、脂肪細胞内に貯蔵された脂質を分解する酵素である脂肪トリグリセリドリ

パーゼ (adipose triglyceride lipase; ATGL) が、がん悪液質の発現には重要であると、遺伝子操作により ATGL を欠損させた動物を用いた研究より明らかにされている。¹⁰⁾

インスリン抵抗性を改善する peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 活性化薬のロシグリタゾンは、がん悪液質モデルマウスの体重量と脂肪組織量の減少を軽減する。⁹⁾ また、ロシグリタゾンの投与により、がん悪液質モデルマウスでみられるインスリン抵抗性が改善し、アディポネクチン量も上昇することが示されている。さらに、がん悪液質モデルマウスの骨格筋におけるタンパク分解に関与する Atrogin-1 や muscle RING-finger protein-1 (MuRF-1) 遺伝子発現の上昇もロシグリタゾンにより抑制されることから、タンパク分解の亢進も改善すると考えられる。加えて、骨格筋のタンパク合成に係わる細胞内情報伝達系であるインスリンシグナル分子の活性も、がん悪液質モデルマウスでは低下していることから、タンパク合成系の機能低下もがん悪液質の発現に係わっていると言える。インスリンの投与によっても、筋肉量の増加や脂肪組織の増加、安静時のエネルギー消費量の低下などが認められる。¹¹⁾ これらのことから、がん悪液質に対してインスリン受容体の感受性改善薬やインスリンの投与が治療効果を持つものと期待されている。インスリンはがん細胞の増殖に係わる因子であるが、がん悪液質の状態にインスリンを使用してもがんの進行は認められないと報告されている。¹⁰⁾

悪液質の動物モデル

がん悪液質の動物モデルとして、がん細胞をマウスやラットに移植する方法が一般的に用いられる。特に、Lewis lung carcinoma (LLC)¹²⁻¹⁷⁾ や colorectal tumors,¹⁸⁻²⁰⁾ syngenic sarcomas^{13,21-25)} は、よく用いられる細胞株である。これらの細胞株を皮下に移植すると、ヒトの悪性新生物のような転移はみられないものの、宿主とがん細胞の相互作用を引き起こし、炎症性サイトカイン類やプロスタグランジン類の産生をさせ、ヒトにみられる悪液質と同様の症状が出現するため、これら細胞株を皮下に移植した動物モデルは、ヒトのがん悪液質を模倣するモデルとして使用されている。

これらの細胞株のほかに、メラノーマ細胞も悪液質を引き起こす。^{10,26)} 筆者らも、メラノーマ細胞を

側腹部皮下に移植して、移植後 18 日目の骨格筋重量や腫瘍を除いた体重量が、対照群マウスと比べ有意に低下していることを確認した。一方、メラノーマ細胞の移植により腫瘍の形成が認められる移植 10 日後では、骨格筋重量や腫瘍を除いた体重量に対照群マウスと比較して変化はみられなかった。臨床におけるがん悪液質の定義に当てはめると、メラノーマ移植 10 日後が pre-cachexia 状態であり、18 日後が cachexia 状態であると考えられた。

悪液質モデルにおけるインスリンシグナリングの変化

PPAR γ 活性化薬ががん細胞移植による悪液質モデルの症状を改善したことから、悪液質モデルではインスリン抵抗性が生じていることが考えられる。そこで、骨格筋組織である腓腹筋におけるインスリンシグナルや、それに影響を与える分子の発現について解析を行った。メラノーマ細胞移植 18 日目の腓腹筋では、インスリンシグナル分子である Akt のリン酸化が有意に低下しており、サイトカインシグナル分子であり、インスリンの細胞内情報伝達系を抑制する signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) のリン酸化は有意に上昇していた。一方、メラノーマ細胞移植 10 日目の腓腹筋では Akt のリン酸化に変化は認められなかったものの、サイトカインシグナルの下流にある STAT3 のリン酸化は上昇していた。また、骨格筋のタンパク質量を反映するミオシン重鎖の発現は、メラノーマ細胞移植 10 日目では明らかな変化は認められなかったものの、移植 18 日目においては、著しい低下が認められた。さらに、筋肉増殖の負の制御因子として機能している Myostatin の発現も、ミオシン重鎖と同様にメラノーマ移植後 10 日目では変化が認められず、18 日目では有意に増加していた。これらのことから、メラノーマ移植マウスでは、骨格筋におけるインスリンシグナルの減弱が起こっており、骨格筋の萎縮が生じていることが明らかになった。また、白色脂肪組織におけるタンパク質発現についても解析を行い、メラノーマ移植後 10 日目において、STAT3 のリン酸化と Akt のリン酸化の上昇が認められた。Akt は脂肪細胞において脂質合成を促進し、脂肪細胞のサイズを大きくし、STAT3 は脂肪細胞の性質を変化させ、インスリン抵抗性を促進する因子を放出させることが知られている。こ

Fig. 2. Schematic Representation of the Effect of Kikuka (*Chrysanthemum morifolium* RAMAT.) on the Melanoma-induced Cancer Cachexia in Mice

Details are provided in the text. In brief, insulin resistance in cancer cachexia mouse skeletal muscle is caused by the increase of inflammatory cytokines, tumor-necrosis factor- α , free fatty acids which is released from adipocytes. Kikuka improves the insulin receptor function through the activation of PPAR γ in the skeletal muscle and adipose tissue.

の白色脂肪細胞の性質変化は、2型糖尿病と同様の变化であり、がん悪液質モデルマウスの脂肪組織においても、インスリン抵抗性が白色脂肪細胞の機能変化を起点として、pre-cachexia 状態から認められることが明らかになった。なお、メラノーマ移植後18日目においては、脂肪組織が消失しており、タンパク質発現についての検討を行うことはできなかった。褐色脂肪組織においては、メラノーマ移植後5日目において体温産生並びにミトコンドリアにおけるエネルギー産生に關与する uncoupling protein 1 (UCP1) の mRNA 発現や、UCP1 の発現を誘導する peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 α (PGC-1 α) の mRNA の発現が上昇していた。このことから、メラノーマを移植されたマウスでは、悪液質の症状が出現するよりはるかに前に全身の異化反応が活発化し、全身のエネルギー消費が亢進していることが明らかになった。

悪液質を改善する生薬成分の探索

がん性悪液質の進行は、PPAR γ アゴニストにより緩徐になることが示されたことから、PPAR γ アゴニスト活性のある生薬であるキクカ (*Chrysanthemum morifolium* RAMAT.)²⁷⁾ のがん悪液質に対

する効果を検討した。キクカは、解熱、解毒、鎮痛、消炎作用を有しており、感冒や発熱、悪寒、頭痛の際に頻繁に用いられる。漢方薬としては、釣藤散の中に含まれており、有効成分として luteolin が知られている。

まず、キクカを含む飼料をメラノーマ移植マウスに与えたところ、体重量の減少が改善した。また、腓腹筋の重量低下もキクカにより改善した。一方、腫瘍重量に対し、キクカは有意な影響を与えなかったことから、腫瘍の肥大には影響を与えず、悪液質の症状を改善することが示唆された。また、メラノーマ移植マウスでみられた腓腹筋におけるリン酸化 Akt 量の低下やリン酸化 STAT3 量の上昇を改善した。さらに、メラノーマ移植マウスの白色脂肪組織で認められたリン酸化 STAT3 の上昇並びにリン酸化 Akt の上昇も、キクカにより抑制された。これらのことから、キクカはメラノーマ移植により生じた骨格筋や脂肪組織におけるインスリンシグナルの変化を正常化することが明らかになり、メラノーマ移植による悪液質の症状も緩徐にすることが示された。

まとめ

がん悪液質の発症メカニズムについては不明な点が多い。今回、インスリン抵抗性が悪液質の発症に係わることを明らかにし、想定されるメカニズムをFig. 2に示した。がん細胞の増殖に伴い、なんらかの因子 (Fig. 2では、因子X) が放出され、白色脂肪組織の機能変化と白色脂肪組織への炎症細胞浸潤を引き起こす。その結果、脂肪細胞の機能が変化しインスリン抵抗性を引き起こす因子のインターロイキン-6や腫瘍壊死因子 α 、遊離脂肪酸などを放出し、骨格筋のSTAT3シグナルを活性化する。STAT3シグナルは、インスリンシグナルを抑制し、リン酸化Aktを阻害する。インスリンシグナルは、タンパク質合成系を促進し、分解系の機能を抑制することから、悪液質状態では骨格筋のタンパク質分解系の亢進が示唆される。このタンパク質分解系の亢進により、筋肉の委縮が生じ、結果として悪液質となったと考えられる (Fig. 2)。

一方、PPAR γ 活性化因子であるロシグリタゾンやキクカは、脂肪細胞の機能変化を抑制すること、並びに骨格筋のインスリン感受性を改善することで、悪液質の進行を緩徐にすることが示唆された。今後、キクカの有効成分を同定することで、治療が不可能であった悪液質の症状を緩和することが可能になるものと期待される。

謝辞 本研究を行うに当たり、生薬のメタノール抽出液を提供頂いた牧野利明先生 (名古屋市立大学大学院薬学研究科) 並びにルシフェラーゼアッセイに必要なベクターを作製頂いた杉山晶則先生 (岩手医科大学薬学部) に感謝いたします。また、本研究の一部は、独立行政法人科学技術振興機構研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム (シーズ顕在化タイプ) 「骨格筋量を維持・増加させる生薬「キクカ」の有効成分の探索」並びにがん研究開発費 23-A-2 (特) 「基礎と臨床の橋渡しのための研究」の支援により行った。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Acharyya S., Butchbach M. E., Sahenk Z., Wang H., Saji M., Carathers M., Ringel M.

- D., Skipworth R. J., Fearon K. C., Hollingsworth M. A., Muscarella P., Burghes A. H., Rafael-Fortney J. A., Guttridge D. C., *Cancer Cell*, **8**, 421–432 (2005).
- 2) Fearon K. C., *Eur. J. Cancer*, **44**, 1124–1132 (2008).
- 3) Tisdale M. J., *Physiol. Rev.*, **89**, 381–410 (2009).
- 4) Brennan M. F., *Cancer Res.*, **37**, 2359–2364 (1977).
- 5) Muscaritoli M., Anker S. D., Argilés J., Aversa Z., Bauer J. M., Biolo G., Boirie Y., Bosaeus I., Cederholm T., Costelli P., Fearon K. C., Laviano A., Maggio M., Rossi Fanelli F., Schneider S. M., Schols A., Sieber C. C., *Clin. Nutr.*, **29**, 154–159 (2010).
- 6) Fearon K., Strasser F., Anker S. D., Bosaeus I., Bruera E., Fainsinger R. L., Jatoi A., Loprinzi C., MacDonald N., Mantovani G., Davis M., Muscaritoli M., Ottery F., Radbruch L., Ravasco P., Walsh D., Wilcock A., Kaasa S., Baracos V. E., *Lancet Oncol.*, **12**, 489–495 (2011).
- 7) Fearon K., Strasser F., Anker S. D., Bosaeus I., Bruera E., Fainsinger R. L., Jatoi A., Loprinzi C., MacDonald N., Mantovani G., Davis M., Muscaritoli M., Ottery F., Radbruch L., Ravasco P., Walsh D., Wilcock A., Kaasa S., Baracos V. E., *Lancet Oncol.*, **12**, 489–495 (2011).
- 8) Rohdenburg G. L., Bernhard A., Krehbiel O., *J. Am. Med. Assoc.*, **72**, 1528–1530 (1919).
- 9) Asp M. L., Tian M., Wendel A. A., Belury M. A., *Int. J. Cancer*, **126**, 756–763 (2010).
- 10) Das S. K., Eder S., Schauer S., Diwoky C., Temmel H., Guertl B., Gorkiewicz G., Tamilarasan K. P., Kumari P., Trauner M., Zimmermann R., Vesely P., Haemmerle G., Zechner R., Hoefler G., *Science*, **333**, 233–238 (2011).
- 11) Lundholm K., Körner U., Gunnebo L., Sixt-Ammilon P., Fouladiun M., Daneryd P., Bosaeus I., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 2699–2706 (2007).
- 12) Marks D. L., Butler A. A., Turner R., Brookhart G., Cone R. D., *Endocrinology*, **144**, 1513–1523 (2003).
- 13) Marks D. L., Ling N., Cone R. D., *Cancer Res.*, **61**, 1432–1438 (2001).

- 14) Markison S., Foster A. C., Chen C., Brookhart G. B., Hesse A., Hoare S. R., Fleck B. A., Brown B. T., Marks D. L., *Endocrinology*, **146**, 2766–2773 (2005).
- 15) Nicholson J. R., Kohler G., Schaerer F., Senn C., Weyermann P., Hofbauer K. G., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 771–777 (2006).
- 16) Jiang W., Tucci F. C., Tran J. A., Fleck B. A., Wen J., Markison S., Marinkovic D., Chen C. W., Arellano M., Hoare S. R., Johns M., Foster A. C., Saunders J., Chen C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 5610–5613 (2007).
- 17) Tran J. A., Jiang W., Tucci F. C., Fleck B. A., Wen J., Sai Y., Madan A., Chen T. K., Markison S., Foster A. C., Hoare S. R., Marks D., Harman J., Chen C. W., Arellano M., Marinkovic D., Bozigian H., Saunders J., Chen C., *J. Med. Chem.*, **50**, 6356–6366 (2007).
- 18) Joppa M. A., Gogas K. R., Foster A. C., Markison S., *Peptides*, **28**, 636–642 (2007).
- 19) Vos T. J., Caracoti A., Che J. L., Dai M., Farrer C. A., Forsyth N. E., Drabic S. V., Horlick R. A., Lamppu D., Yowe D. L., Balani S., Li P., Zeng H., Joseph I. B., Rodriguez L. E., Maguire M. P., Patane M. A., Claiborne C. F., *J. Med. Chem.*, **47**, 1602–1604 (2004).
- 20) Weyermann P., Dallmann R., Magyar J., Anklin C., Hufschmid M., Dubach-Powell J., Courdier-Fruh I., Henneböhle M., Nordhoff S., Mondadori C., *PLoS One*, **4**, e4774 (2009).
- 21) DeBoer M. D., Zhu X. X., Levasseur P., Meguid M. M., Suzuki S., Inui A., Taylor J. E., Halem H. A., Dong J. Z., Datta R., Culler M. D., Marks D. L., *Endocrinology*, **148**, 3004–3012 (2007).
- 22) Ramos E. J., Middleton F. A., Laviano A., Sato T., Romanova I., Das U. N., Chen C., Qi Y., Meguid M. M., *J. Am. Coll. Surg.*, **199**, 716–723 (2004).
- 23) Wang Z., Wang W., Qiu W., Fan Y., Zhao J., Wang Y., Zheng Q., *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **39**, 992–998 (2007).
- 24) Ramos E. J., Romanova I. V., Suzuki S., Chen C., Ugrumov M. V., Sato T., Goncalves C. G., Meguid M. M., *Brain Res.*, **1046**, 157–164 (2005).
- 25) Goncalves C. G., Ramos E. J., Romanova I. V., Suzuki S., Chen C., Meguid M. M., *Surgery*, **139**, 202–208 (2006).
- 26) Graves E., Ramsay E., McCarthy D. O., *Res. Nurs. Health*, **29**, 87–97 (2006).
- 27) Yokoi H., Mizukami H., Nagatsu A., Ohno T., Tanabe H., Inoue M., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 735–740 (2009).