
原 著

糖負荷が腫瘍成長と骨格筋萎縮におよぼす影響の検討

奈良県立医科大学分子病理学講座

森 拓 也, 額 賀 翔 太, 宮 川 良 博
後 藤 桂, 川 原 勲, 國 安 弘 基

Effect of Glucose Loading on Cancer Growth and Skeletal Muscle Atrophy

TAKUYA MORI, SHOTA NUKAGA, YOSHIHIRO MIYAGAWA, KEI GOTO, ISAO KAWAHARA,
HIROKI KUNYASU

Department of Molecular Pathology, Nara Medical University School of Medicine.

Received September 11, 2019

Abstract : Skeletal muscle volume is reported to be associated with prognosis of cancer patients. Maintenance of skeletal muscle is an essential issue in cancer treatment. Glucose metabolism plays a pivotal role in maintaining skeletal muscle; however, cancer cells also require glucose as a main energy source. We here examined the effect of glucose loading on tumor growth and muscle maintenance using a mouse subcutaneous tumor model. CT26 murine colon cancer cells were inoculated into the subcutaneous tissues in syngeneic BALB/c mice, which were treated with water, 10% glucose or 50% glucose by free drinking for 2 weeks. Blood sugar was not different among the groups. Tumor sizes were larger in the glucose-treated groups than those in the control group. Protein content in the muscle was not different among the groups, whereas the levels of SDS-soluble myosin light chain 1 protein were higher in the glucose-treated groups than those in the control group. These findings suggest that glucose loading enhances muscle differentiation as significant as tumor growth.

Key words : sugar load, skeletal muscle atrophy, cancer growth

はじめに

骨格筋は身体の40～50%を占め、その運動機能は、日常生活動作（ADL）の基盤となり、生活の質（QOL）に直結する。がん患者において、骨格筋量は、がん特

性の炎症性サイトカイン、低栄養、悪液質（カヘキシア）などの影響により低下し、骨格筋萎縮を引き起こす¹⁻²⁾。それらの症状は進行期のがん患者の約80%に見られ、30%は死に関連するともされる³⁾。また、担がんマウスにおける筋萎縮を改善させる実験において

は、担がんマウスの生存曲線と骨格筋量は強い正の相関を示すことが報告されている⁴⁾。これらの知見から、がん患者における骨格筋量の維持・向上はQOL維持の上で非常に重要だと考えられる。近年では悪液質や低栄養を伴うがん患者における治療の選択は、抗がん剤、栄養不良の改善、活動性向上のための運動が推奨されている¹⁾。その中でも栄養の観点から細胞のエネルギー代謝に着目すると、腫瘍と骨格筋はいずれも糖質を主なエネルギー源とすることが報告されている⁵⁻⁹⁾。糖質の制限が腫瘍に抗腫瘍効果を与える可能性が報告されているが、骨格筋に着目し、筋萎縮に対する効果まで検討した報告は乏しい。また糖質の制限は骨格筋のエネルギー供給を阻害し、萎縮を加速する可能性も考えられる。このため、本研究では、腫瘍の成長と骨格筋萎縮の関係を見出すことを目的として、糖質負荷を担がんマウスモデルに施行し、腫瘍と骨格筋への影響を検討した。

材料と方法

実験動物：4週齢BALB/c雄性マウス（日本SLC、静岡）16匹、2週間通常飼育の後、6週齢より実験を開始した。

CT26細胞皮下投与マウスモデル：実験動物と同系のBALB/cマウス由来大腸癌細胞株CT26を使用した。CT26細胞は、10% fetal bovine serum (FBS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)および2% penicillin-streptomycin (Sigma)含有Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM; 和光純薬、大阪)で37℃、5% CO₂下で培養した。培養後、冷却したphosphate buffered saline (PBS)で $1 \times 10^7 / 0.2$ mLの濃度に懸濁し、マウスの背部の皮下に投与した。投与時は運動制限のためイソフルランにより吸入麻酔を行った。

糖負荷：糖負荷に関しては、自由飲水にて糖水を投与した¹⁰⁾。50%ブドウ糖液（大塚製薬、徳島）をフィルター水で希釈し、Glucose (Glc)濃度が0%、10%、50%になるよう作成した。

群分け：対照群とCT26群に分け、さらに糖濃度別に群分けを行った。内訳は、対照群3匹、10% Glc群2匹、50% Glc群2匹、CT26群3匹、CT26 + 10% Glc群3匹、CT26 + 50% Glc群3匹とした。

実験時における飼育環境：温度、時間は全ての群で一定とし、餌に関しては常時食事が可能な状態とした。各群ともに飲水のみ糖濃度別に変更した。実験開始2週間後、体重測定と血糖測定の後、イソフルラン吸入後、頸椎脱臼にて安楽殺とした。腫瘍を摘出し、腫瘍径を計測した。左右下肢の大腿四頭筋も摘出したが、摘出方法は上前腸骨棘に付着している起始側の腱と膝蓋腱にて切開し採取した。また採取の際、筋膜や腱は目視にて除去した。大腿四頭筋は片側ずつ湿重量を測定した。採取した腫瘍と大腿四頭筋は、-80℃で凍結保存した。

タンパク抽出：-80℃で凍結保存を行った大腿四頭筋をハンマーで粉砕し、PBSで洗浄、さらにQSONICA（微量超音波ホモジナイザー ワケンピーテック、京都）による超音波細胞粉砕（3秒粉砕/10秒冷却）を行い、ペレット状にした。ペレット状サンプルを各大腿四頭筋に対して40 mgずつ作製した。タンパク質抽出にはRadioimmunoprecipitation buffer (RIPA buffer; 和光純薬; 50mM Tris-HCl [pH8.0], 150mM sodium chloride, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1.0% NP-40, 2 mM PMSF, 1% protease cocktail)を使用した。Myosin light chain 1 (MYL1)は、NP-40のみではheavy chainから分離・可溶化できないが、0.1% SDS存在下では可溶化される¹¹⁾。プロバイダーのプロトコルに従い、サンプル40 mgをRIPA buffer 1 mLによりvortexで十分に懸濁し、4℃にて15分間震盪を行った。その後、4℃で15分間の遠心（回転数10,000 x g）を行い、その上清をwhole cell lysateタンパク質として利用した。

ELISA法：骨格筋におけるミオシンの量を計測するためMYL1 ELISAキット（Cusabio Bioscience, Wuhan China）をプロバイダーのプロトコルに従い利用した。Standardから検量線を作成し、MYL1濃度を算出した。

統計処理：体重、飲水量、血糖値、腫瘍径、MYL1濃度におけるデータを多群間における比較は一元配置分散分析を用い、Steel-Dwass検定を用いた。また2群間による比較はWilcoxon検定を用いた。血糖値と腫瘍計に関してはSpearmanの順位相関係数を用いた。全ての統計処理に関わる有意水準は0.05とした。

結 果

マウスの体重, 糖摂取量, 血糖値: 体重, 飲水量, 血糖値に各群間に有意差は認められなかったが (Table 1). 糖水飲水量は対照群で有意差は認められなかったが, 多い傾向にあった. 10%と50%の糖水を比較すると, 対照群では50%糖水の飲水量が多かった ($P < 0.05$). CT26群では50%糖水が多い傾向が見られた. 血糖値はすべての群で正常範囲内であった. CT26群では糖水の糖濃度が高いほど血糖が低かった ($P < 0.05$). 体重はCT26群の3群で対照群3群よりも増大している傾向が見られた.

腫瘍径: 腫瘍径に有意差は認められないものの,

腫瘍径は10%・50%糖水負荷の各群で高い傾向が見られた. 糖負荷群と非負荷群の2群に分けて比較すると糖負荷群で腫瘍径は有意に増大して認められた (Table 2).

さらに, 腫瘍径と血糖をCT26群のマウスで比較した. その結果, Fig. 1のように血糖値と腫瘍径は逆相関を示した ($r = -0.5345, P < 0.05$).

骨格筋湿重量の変化: 骨格筋湿重量に関しては, 各群間に有意差は認められなかった (Table 3). しかし, 対照群の3群とCT26群の3群で比較を行うと, CT26群で有意に減少していた ($P < 0.05$). 一方, 対照群では糖負荷により筋重量が増加する傾向が認められた.

Table 1. Glucose water intake and blood sugar levels of the control group and the CT26 mouse group.

Glc (%)	Control			CT26 tumor			P*
	0	10	50	0	10	50	
Glucose drink (mL/day/mouse)	—	8.6	20.5	—	12.3	15.1	n.s.
Blood sugar** (mg/dL)	141 ± 7	128 ± 0	116 ± 4	164 ± 35	142 ± 5	129 ± 22	n.s.
Body weight** (g)	23.1 ± 0	22.9 ± 1	23.7 ± 2	24.2 ± 0	24.4 ± 1	24.1 ± 1	n.s.

*Statistical difference is calculated by Steel-Dwass test for two groups and by ordinary ANOVA for three groups. The significance level was set at < 0.05 .

**Average ± S.D.

Table 2. Effects of glucose drink on tumor growth of CT26 mice.

Glucose	n	Tumor diameter (mm)	P*
0	3	7 ± 4	
10%	3	20 ± 8	
50%	3	18 ± 7	NS
(-)	3	7 ± 4	
(+)	6	19 ± 7	< 0.05

Diameter of CT26 tumor is measured 2 weeks after inoculation. Error bar, S.D.

*Statistical difference is calculated by Steel-Dwass test (< 0.05).

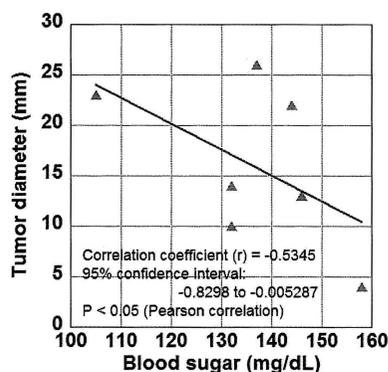


Fig.1. Inverse correlation between tumor growth and blood sugar in CT26 mice.

Diameter of CT26 tumor is compared with blood sugar in each mouse. Statistical difference is calculated by Pearson's correlation test.

Table 3. Effects of glucose drink on muscle weight of BALB/c mice.

CT26 tumor	Glucose	n	Muscle weight (mg)
(-)	0	3	221 ± 38
	10%	2	258 ± 32
	50%	2	243 ± 30
	Average	7	241 ± 41*
(+))	0	3	185 ± 18
	10%	3	181 ± 20
	50%	3	194 ± 15
	Average	9	186 ± 16*

Weights of the quadriceps femoris muscles are measured 2 weeks after inoculation. Error bar, S.D. Statistical difference is calculated by Steel-Dwass test.

*The significance level was set at < 0.05.

骨格筋ミオシン軽鎖1濃度の変化: SDS可溶性MYL1濃度は、機能的骨格筋のマーカーとみなされるため¹¹⁾、骨格筋湿重量変化に加えて検討を行った (Table 4.)。対照群とCT26群で、各糖負荷濃度ごとに比較すると、Glc 0%と10%においてCT26群のMYL1濃度は低下していた ($P < 0.05$)。しかし、Glc 50%では両群に有意差は消失していた。一方、対照群の3群と腫瘍群の3群をそれぞれ比較すると、両群ともに糖負荷濃度に相関してMYL1濃度が増加していた ($P < 0.05$)。

考 察

今回、われわれが行った検討では、CT26皮下投与マウスモデルにおける飲水による糖負荷は、腫瘍の成長に影響を与え、骨格筋ミオシン軽鎖1の増加を誘導する可能性が示唆された。

腫瘍細胞は選択的に糖質を利用した解糖系の代謝にてエネルギー供給を行う (Warburg effect) と報告されている⁷⁻⁹⁾。糖負荷は解糖系を促進し腫瘍増大を促進することが考えられたが、今回の検討でも糖負荷群では非負荷群に比較し有意な腫瘍径の増大が認められた。飲水による糖負荷濃度と血糖との間に相関が認められなかった一方、腫瘍径と血糖値が逆相関を示しており、血中グルコースの腫瘍への取り込みが血糖値に影響を与えていることが考えられた。また、飲水によ

Table 4. Effects of glucose concentration on SDS-soluble MYL1 of Control groups and CT26 groups.

CT26 tumor	Glucose	n	SDS-soluble myosin light chain 1 (pg/g)	$P^{1)}$
(-)	0	3	71 ± 1 ²⁾	< 0.05
	10%	2	87 ± 2 ³⁾	
	50%	2	98 ± 2	
(+))	0	3	41 ± 1 ²⁾	< 0.05
	10%	3	72 ± 1 ³⁾	
	50%	3	103 ± 2	

MYL1 is measured by ELISA using whole cell lysate solubilized with RIPA buffer containing 0.1% SDS. Error bar, S.D.

1) Statistical difference is calculated by Steel-Dwass test or ordinary ANOVA test.

2) Statistical difference is calculated by Steel-Dwass test (< 0.05).

3) Statistical difference is calculated by Steel-Dwass test (< 0.05).

る糖負荷濃度と腫瘍径との間に相関が認められなかったが、糖負荷による腫瘍における糖利用に上限が存在する可能性も考えられ、より動物数を増やした今後の詳細な検討が必要と思われる。

担がん動物における骨格筋への影響については、骨格筋湿重量が担がん動物で減少していたことから、がん性サルコペニアが確認される結果となった¹²⁾。がんにより、サルコペニアが生じる機序については、腫瘍による炎症性サイトカインによる筋オートファジーの促進、低栄養や血流障害などによる筋萎縮効果が考えられた^{1-3,13)}。

SDS可溶性MYL1は骨格筋成熟とよく相関することをわれわれは以前に確認しており、対照的にNP-40可溶性MYL1は成熟度と相関しなかった。本研究において、SDS可溶性MYL1の濃度が担がん動物で低下していることは、骨格筋の量とともにその質の低下も生じていることが示唆された。一方、対照群の動物のみならず担がん動物においても、糖負荷量に相関してMYL1濃度が増大した結果は、骨格筋の維持に糖が果たす役割を示している。通常骨格筋は血中の70~80%のglucoseを筋恒常性の維持や運動のために取り込み、ATP産生に利用するとされ、MYL1はATPの利用に関連する¹³⁾。また、マウス筋芽細胞を用いて、Glucose濃度の上昇が骨格筋細胞の増殖と分化を促進するとの報告も多い⁵⁾。糖質負荷による骨格筋への糖取込が促進され、MYL1濃度が糖濃度に相

関して増加したと考えられた。

これらの結果より、糖負荷により、腫瘍、および、骨格筋での糖取り込みが、ともに亢進し、腫瘍増大・骨格筋維持を促進したと考えられる。このことは生体内の glucose を腫瘍と骨格筋の両者が主要なエネルギー源として、競合的に利用していると考えられ、腫瘍での糖代謝抑制と骨格筋の維持・糖代謝促進が排他的な関係にある可能性が示唆された。骨格筋量を維持することは腫瘍抑制にも繋がる可能性が示唆された。

結 語

本実験の結果より、糖質の摂取は骨格筋の形質保持や増加に有用ではあるが、腫瘍の増大を引き起こすため、有益な骨格筋萎縮予防の手段とはならない可能性が示唆された。また腫瘍抑制に焦点を当てながら骨格筋維持を行う場合、糖質以外の栄養素に着目する必要性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Fearon K, et al: Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10: 90-99, 2013.
- 2) Acharyya S, et al: Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: A regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell* 8: 421-432, 2005.
- 3) Fearon K.C: Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem. *Eur. J. Cancer* 44: 1124-1132, 2008.
- 4) Zhou X, et al: Reversal of Cancer Cachexia and Muscle Wasting by ActRIIB Antagonism Leads to Prolonged Survival. *Cell* 142: 531-543, 2010.
- 5) Grabiec K, et al: The influence of high glucose and high insulin on mechanisms controlling cell cycle progression and arrest in mouse C2C12 myoblasts: the comparison with IGF-I effect. *J Endocrinol. Invest.* 37: 233-245, 2014.
- 6) Li W, et al: Response of C2C12 myoblasts to hypoxia: the relative roles of glucose and oxygen in adaptive cellular metabolism. *Biomed Res. Int.* 2013: 326346, 2013.
- 7) Warburg O, et al: The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol.* 8: 519-30, 1927.
- 8) Gatenby R. A, and Gillies R. J: Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4: 891-9, 2004.
- 9) Hirayama A, et al: Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 69: 4918-25, 2009.
- 10) Elkalaf M, et al: Low glucose but not galactose enhances oxidative mitochondrial metabolism in C2C12 myoblasts and myotubes. *PLoS One.* 8: e70772, 2013.
- 11) Yazaki Y, et al: Fractionation of the light chains from rat and rabbit cardiac myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 328: 464-9, 1973.
- 12) Shachar S, S: Prognostic value of sarcopenia in adults with solid tumours: A meta-analysis and systematic review. *Eur J Cancer*: 57: 58-67, 2016.
- 13) Luo Y, et al: Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. *Cancer Res.* 74: 330-40, 2014.