

1. 運動制御性臓器連関から解明する発がん予防メカニズム

青井 渉

京都府立大学 大学院生命環境科学研究科 応用生命科学専攻 栄養科学研究室

Key words : 運動, 大腸がん, 骨格筋, マイオカイン, 代謝

緒言

我が国における死因1位はがんであり、特に大腸がんによる死亡率は年々高まっている現状である。各国の疫学研究から、大腸がんの罹患リスクを低下させるための生活習慣として身体活動が効果的であると判定されている [1]。しかし、身体活動・運動による大腸発がん予防機序の詳細については解明されていない。

骨格筋は生理活性物質マイオカインを分泌する内分泌臓器であることが知られ、身体活動・運動による疾病予防作用を説明するものとして、分野を超えた多くの生命科学分野で注目されている。我々は、マイオカイン研究に早くから取り組み、Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) が、運動によって分泌制御を受けるマイオカインであることを報告した [2, 3]。SPARCは抗腫瘍作用を有し、大腸発がんを防ぐ可能性が考えられるが、筋由来のマイオカイン SPARC が病変抑制に寄与するかどうかは不明である。

また近年、宿主機能における腸内細菌叢の役割が明るみになり、大腸発がんリスクに影響することがわかってきた。運動習慣によって腸内細菌叢が改善することが知られるが、これら菌叢の変化がどのような機序で起こるのか、またこのことが大腸発がん予防に寄与するののかについては不明である。一方、腸内細菌およびその代謝物が宿主へ及ぼす影響を評価する手法として便移植法が発展してきた。

本研究は骨格筋特異的 *Sparc* 遺伝子欠損マウスを用いたマイオカイン SPARC の機能、便移植法を用いた腸内容物 (腸内細菌・代謝物) の機能を検証することを目的とし、運動習慣による大腸発がん予防のメカニズムについて筋と腸の臓器連関の観点から解明を目指した。

方法

1. 骨格筋特異的 *Sparc* 欠損型マウスにおける運動効果の検証

1-1. *Sparc* 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (*Sparc*^{Flox/Flox}, *Myf5-Cre*) および野生型マウスを用いて、大腸発がんモデルにより評価した。アゾキシメタンを腹腔内投与した後、各マウスを運動群と安静群にそれぞれ分け、運動群には低強度走運動 (30分、3回/週) を6週間行わせた。大腸上皮の Aberrant crypt の形成について観察し、群間で比較した。

1-2. *Sparc* 欠損型マウスおよび野生型マウスを高脂肪食 (脂質 45%エネルギー) 下で4週間飼育した。体組成ならびに血液と骨格筋における代謝関連因子を測定した。

2. 便移植による腸内容物の機能検証

2-1. *Sparc* 欠損型マウスと野生型マウス (ドナー) から便を採取し、含有される腐敗産物、腸内細菌叢をマウス間で比較した。また、無菌マウス (レシピエント) にアゾキシメタンを腹腔内投与した後、ドナーから採取した便サンプルを経口投与した。6週間飼育後、大腸上皮の Aberrant crypt の形成を評価した。

2-2. 4週間走運動に馴化させたマウスと安静マウス (ドナー) から便を採取し、無菌マウス (レシピエント) に経口投与した。1週間飼育後、レシピエントから採取した骨格筋における SPARC の mRNA 発現量を測定した。

結果および考察

1. 骨格筋特異的 *Sparc* 欠損型マウスにおける運動効果の検証

低強度走運動に馴化させた野生型マウスでは、大腸上皮における Aberrant crypt 形成の有意な抑制がみられた (図 1a)。一方、*Sparc* 欠損型マウスにおいては群間で Aberrant crypt に差はなく、運動による抑制効果はみられなかった。SPARC の発がん抑制作用として Caspase 活性化を介したアポトーシスの誘導効果が知られている。野生型マウスでは、運動により Caspase の活性化がみられ、アポトーシスが促進されたが、*Sparc* 欠損型マウスでは運動による Caspase 活性化はみられなかった (図 1b)。したがって、骨格筋由来の SPARC がアポトーシスを誘導することにより、大腸の腫瘍形成抑制に寄与したことが示唆された。以上より、骨格筋活動により分泌されるマイオカイン SPARC が、大腸発がんの予防に寄与すると考えられる。

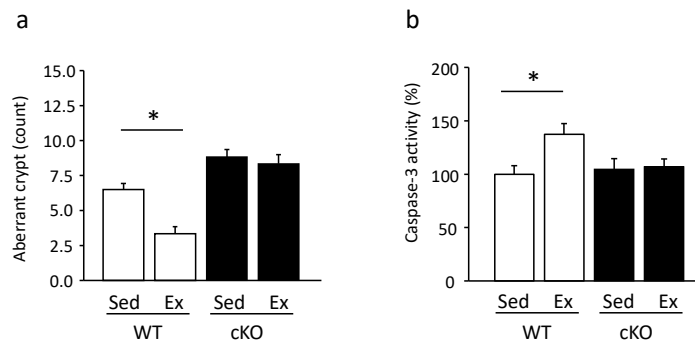


図 1. 骨格筋 *Sparc* 欠損型マウスにおける大腸病変の検討

大腸上皮における Aberrant crypt の形成 (a)、Caspase 活性 (b) を示した。

2 元配置分散分析、事後検定 Tukey を用いて比較した。データは平均値±標準誤差で示した。

Sed : 安静群、Ex : 運動群、WT : 野生型、cKO : 欠損型、* $P < 0.05$ 。

また、骨格筋における SPARC の機能的特徴として、糖取り込み能を高めることが示されている [3]。そのため、*Sparc* 欠損型マウスに高脂肪食を摂取させて、肥満および代謝障害を誘発し、体組成、代謝指標を野生型マウスと比較した。体重、骨格筋量にマウス種間で差はないものの、精巣周囲脂肪重量、血糖値が *Sparc* 欠損型マウスにおいて高値であった (図 2a~e)。さらに、腓腹筋の AMP-activated kinase (AMPK) リン酸化レベルは欠損型マウスで低く (図 2f)、SPARC が骨格筋の糖取り込みシグナルを高め、血液中の糖、インスリン濃度を調整すると考えられる。高血糖、高インスリンは、がん細胞の増殖シグナルを活性化することから、SPARC は筋の糖代謝を高めることでも間接的に大腸発がん予防作用に寄与する可能性が考えられる。

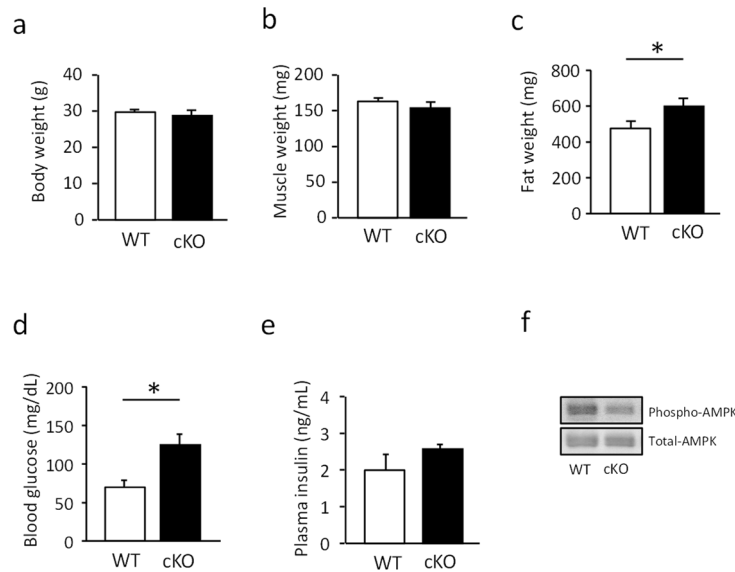


図 2. 骨格筋 *Sparc* 欠損型マウスにおける代謝応答
高脂肪食を 4 週間摂取させたマウスの体重 (a)、腓腹筋重量 (b)、精巣周囲脂肪重量 (c)、
血糖値 (d)、血漿インスリン濃度 (e)、骨格筋 AMPK レベル (f) を示した。
t 検定を用いた統計処理により比較した。データは平均値±標準誤差で示した。
WT : 野生型、cKO : 欠損型、* $P < 0.05$ 。

2. 便移植による腸内容物の機能検証

レシピエントにおける Aberrant crypt 形成は、ドナー遺伝子型の違いによる影響はみられなかった (図 3a)。また、Caspase 活性についても両レシピエント間で差はみられず、アポトーシス活性に影響しなかった (図 3b)。そのため、マイオカイン SPARC の大腸発がん予防作用は、腸内細菌等の腸内容物を介して起こるとは考えにくい。一方、ドナーマウスの便中腸内細菌叢を比較したところ、欠損型マウスにおいて *Bacteroides* 属の割合が低く、*Clostridium* 属の割合が高かった (図 4a、b)。便中 Indol 濃度については群間で差はみられず (図 4c)、腐敗産物の産生には影響を及ぼさなかったものの、骨格筋 SPARC が腸内環境に及ぼす影響については今後さらなる検討が必要である。

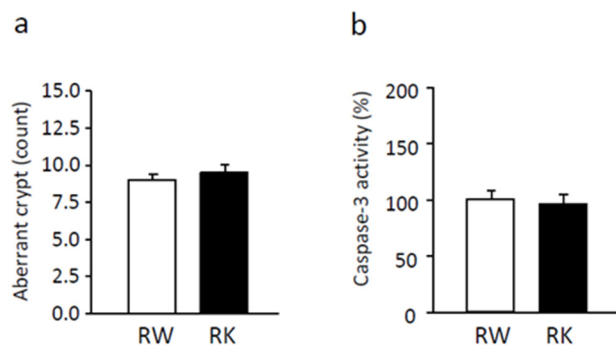


図 3. 骨格筋 *Sparc* 欠損型マウス由来の腸内容物が大腸病変に及ぼす影響
レシピエントの大腸上皮における Aberrant crypt の形成 (a)、Caspase 活性 (b) を示した。
t 検定を用いた統計処理により比較した。データは平均値±標準誤差で示した。
RW : 野生型ドナーマウス由来のレシピエントマウス、RK : 欠損型ドナーマウス由来のレシピエントマウス。

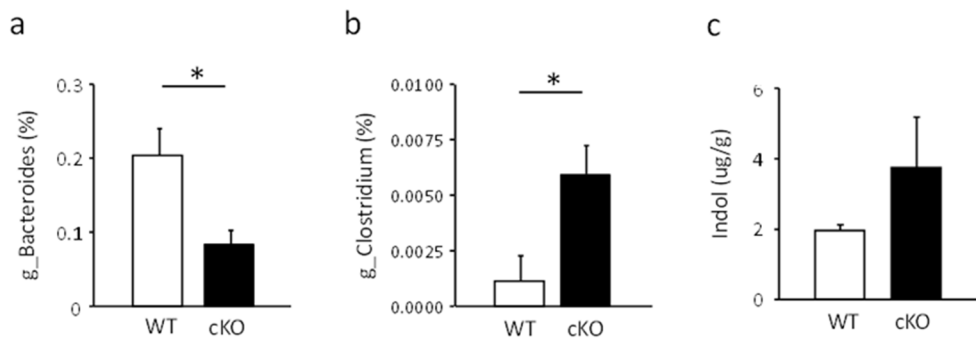


図4. 骨格筋 *Sparc* 欠損型マウスにおける腸内細菌、腐敗産物の検討
便中における *Bacteroides* 属 (a)、*Clostridium* 属 (b)、Indol 濃度 (c) を示した。
t 検定を用いた統計処理により比較した。データは平均値±標準誤差で示した。
WT : 野生型、cKO : 欠損型、* $P < 0.05$ 。

骨格筋 SPARC が腸内環境によって干渉を受けるかどうか検討するため、運動を馴化させたドナーマウス由来の便を無菌マウスに移植した。運動馴化ドナー由来のレシピエントは、安静ドナー由来のレシピエントと比較して、骨格筋の SPARC 発現が高値傾向であった (図5)。そのため、運動馴化した個体の腸内細菌は、骨格筋の SPARC 分泌に影響を及ぼす可能性を有することを示唆している。すなわち、腸内環境の変化が骨格筋分泌能へ干渉し、さらにマイオカインを介した大腸がん予防に寄与する筋と腸の臓器連関が存在する可能性が考えられ、今後さらなる検討が必要である。

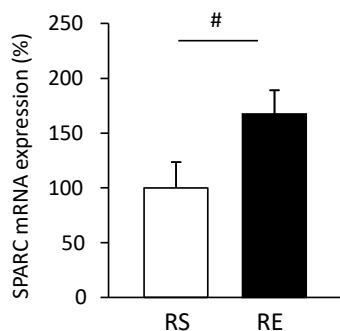


図5. 運動馴化マウス由来の腸内容物が骨格筋 SPARC 発現に及ぼす影響
運動馴化させたドナーマウス由来の便を移植したレシピエントマウスにおける骨格筋の SPARC 発現量。t 検定を用いた統計処理により比較した。データは平均値±標準誤差で示した。
RS : 安静ドナーマウス由来のレシピエントマウス、RE : 運動ドナーマウス由来のレシピエントマウス。# $P < 0.1$ 。

共同研究者

本研究は、京都府立医科大学生体免疫栄養学講座の内藤裕二教授、摂南大学動物機能科学研究室の井上亮教授、京都府立大学栄養科学研究室員の協力のもと実施された。

文 献

- 1) World Cancer Research Fund/American Institution for Cancer Research. Diet, Nutrition, Physical Activity, and Colorectal Cancer. 2017, 1-111.
- 2) Aoi W, Naito Y, Takagi T, Tanimura T, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Hang LP, Mizushima K, Hirai Y, Koyama R, Wada S, Higashi A, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. *Gut*. 2013 Jun 13;62(6):882-9. Epub 2012 Jul 31. PMID: 22851666 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300776
- 3) Aoi W, Hirano N, Lassiter DG, Björnholm M, Chibalin AV, Sakuma K, Tanimura Y, Mizushima K, Takagi T, Naito Y, Zierath JR, Krook A. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) improves glucose tolerance *via* AMP-activated protein kinase activation. *FASEB J*. 2019 Sep;33(9):10551-62. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31225998 DOI: 10.1096/fj.201900453R