

がんカヘキシーによる筋萎縮に対するイソフラボンの効果

平坂勝也^{*1}・齋藤志伸¹・山口沙起¹・宮崎里帆¹・春名真里江²・

竹下哲史¹・谷山茂人¹・二川 健³・橘 勝康¹

¹長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科食品栄養学研究室

²武庫川女子大学生活環境学部食品素材学研究室

³徳島大学医学部医科栄養学科生体栄養学分野

Effects of Isoflavones Derived from Soy Beans on Tumor-Bearing Muscle

Katsuya HIRASAKA^{*1}, Shinobu SAITO¹, Saki YAMAGUCHI¹, Riho MIYAZAKI¹,
Marie HARUNA², Satoshi TAKESHITA¹, Shigeto TANIYAMA¹,
Takeshi NIKAWA³ and Katsuyasu TACHIBANA¹

¹Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies,
Nagasaki University, Nagasaki 852-8521

²Department of Human Environmental Sciences, School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Woman's University, Nishinomiya 663-8558

³Department of Nutritional Physiology, Institute of Medical Nutrition,
Tokushima University Medical School, Tokushima 770-8503

ABSTRACT

Proinflammatory cytokines produced by tumor contribute to a progression of muscle wasting. We have previously reported that isoflavones, such as genistein and daidzein, prevent the tumor necrosis factor- α -induced muscle atrophy in C2C12 myotubes. In this study, we examined the effect of dietary flavonoids on the wasting of muscle caused by cachexia. LLC (1 x 10⁶) cells were injected subcutaneously into the right thighs of C57BL/6 mice. Mice continued to receive normal and isoflavone diet containing 0.4% soyaflavone HG until the termination of the experiment. The wet weight and cross sectional area in hindlimb muscles were examined at 3 weeks after tumor-bearing. There were no significant differences between normal and isoflavone diet in the intake of food and body weight. The wet weight in skeletal muscle of tumor-bearing mice significantly decreased, compared with that of vehicle injected mice. The isoflavone diet prevented the reduction of muscle wet weight and myofiber size. Therefore, dietary isoflavones suppress muscle wasting in tumor-bearing mice. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 226-230, 2015.

Key words : muscle wasting, ubiquitin ligase, isoflavone diet

^{*}〒852-8521 長崎市文教町1-14

がんカヘキシーは筋肉や脂肪組織量の減少を特徴とした体重減少を生ずる栄養不良状態であり、栄養補充のみでは改善されない複雑な病態である。がんカヘキシーの原因としては、主に、がん細胞から分泌される液性因子などが挙げられる。しかしながら未だ不明な点が多い。近年の研究において、がん細胞を移植したマウスの骨格筋では腫瘍の成長に従い筋重量が減少することが報告されている¹⁾。がん細胞による筋萎縮では筋たん白質合成の低下と筋たん白質分解の亢進が認められ、特に、筋たん白質分解には骨格筋特異的なユビキチンリガーゼであるAtrogin-1/MAFbxとmuscle RING finger 1 (MuRF1) が関与する。実際に、結腸がん (C26) 細胞やルイス肺がん (LLC) 細胞の移植はマウス骨格筋内でAtrogin-1やMuRF1の発現を上昇させることから^{2,3)}、がんカヘキシーによる筋萎縮ではユビキチンプロテアソーム依存性のたん白質分解経路が重要な役割をしていることが示唆されている。

がんカヘキシー患者の血中では炎症性サイトカインが上昇することが知られており、慢性的な炎症状態ががんカヘキシーによる筋萎縮の原因の一つであると考えられている⁴⁾。TNF (tumor necrosis factor) - α などの炎症性サイトカインはNF κ BやFoxo4などの転写因子を介して、Atrogin-1やMuRF1の発現を誘導する。以前の我々の結果において、大豆由来イソフラボンは脱アセチル化酵素であるSIRT1の発現やAMPキナーゼを介してSIRT1活性化に間接的に作用し、TNF- α によって誘導されるMuRF1の転写活性や筋管萎縮を抑制することを報告した⁵⁾。さらに、大豆イソフラボン摂取群では坐骨神経切除による筋萎縮に対して抵抗性を示した⁶⁾。したがって、大豆イソフラボンを含む食事は筋萎縮予防の手掛かりとなりうる。しかしながら、がんカヘキシーによる筋萎縮に対する大豆イソフラボンの予防効果については研究されていない。

本研究では、大豆イソフラボンのがんカヘキシーによる筋萎縮予防効果をマウス筋萎縮モデルを用いて検討した。

方 法

動物実験

7週齢、C57/BL6系雄マウスは $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、午前6時から午後6時までを明期として飼育した。実験動物の取り扱いには長崎大学実験動物取り扱い指針に則して行った。マウスは普通食を1週間自由摂取させた後、筋萎縮モデルを模倣した。その間、普通食群と粗精製大豆イソフラボン (ソヤフラボンHG、不二製油) を重量

比0.4%で配合した飼料を給餌させた群に分け、それぞれの試験食を3週間自由摂取させた。

がんカヘキシーモデル

マウス由来LLC細胞は 37°C 、5% CO_2 の条件下で、増殖培地 [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン, 100 U/mL ペニシリン, 10% 牛胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] で培養した。培養細胞はトリプシンにて剥離し、Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) に懸濁させた。1 $\times 10^6$ 個のLLC細胞は1週間の予備飼育を行ったマウス右脚の大腿筋近傍の皮下に移植した。一方、コントロール群はHBSSをマウス右脚の大腿筋近傍の皮下に投与された。投与後、マウスは4群 (普通食コントロール群: NC; 普通食がん細胞移植群: NT; 大豆イソフラボン食コントロール群: SC; 大豆イソフラボン食がん細胞移植群: ST) に分け、3週間の飼育を行った後、直ちに後肢の前脛骨筋、腓腹筋を採取した。湿重量を測定し、体重当りの筋湿重量を算出した。このとき、NCの平均筋湿重量を100%とした。

蛍光染色法

マウスから前脛骨筋を取り出し、すぐにイソペンタンと液体窒素を用いて急冷した。クリオスタットの庫内を -20°C に下げ、薄切 (3 μm) し、スライドグラスに付着させた。室温で風乾し、PBSで洗浄後、冷アセトンで固定した。固定後、PBSで洗浄した。このスライドグラスを湿箱に並べ、5%精製ミルクカゼイン (雪印乳業) を含むPBSにて、室温で1時間反応させた。次に1次抗体としてRabbit polyclonal anti-Laminin抗体 (abcam), Mouse monoclonal anti-Myosin (FAST) 抗体 (SIGMA-ALDRICH) と 4°C で一晩反応させた。2次抗体として抗rabbit IgG Alexa 568 (Molecular Probes), 抗mouse IgG Alexa 488 (Molecular Probes) と室温で1時間反応させた。核染色はHoechstと室温で10分間反応させた。その後、蛍光退色防止剤 (Dako) で封入し、カバーグラスをかけて顕微鏡下で観察した。

筋線維面積の計測

結果は全て、BIOREVO BZ-9000 (Keyence, Osaka, JAPAN) 蛍光顕微鏡で撮影したものをBZ-II analyzing supplicationソフトウェアを用いて処理した。

前脛骨筋の断面は倍率 $\times 20$ で撮影し、少なくとも250個の筋横断面積を測定した。

結果と考察

我々は以前の研究において、大豆イソフラボン摂取群では坐骨神経切除による筋萎縮に対して抵抗性を示すことを報告している⁶⁾。そこで、大豆イソフラボンががんカヘキシーによる筋萎縮においても効果的かどうか検討した。飼育期間のマウスの1日当たりの摂食量はそれぞれNC, 2.5 ± 0.5 g ; NT, 2.7 ± 0.3 g ; SC, 2.8 ± 0.1 g ; ST, 2.7 ± 0.1 gであった。一方、飼育期間終了時の体重はNC, 22.3 ± 0.9 g ; NT, 23.6 ± 1.8 g ; SC, 23.0 ± 0.5 g ; ST, 23.2 ± 1.1 gであった。以前の研究と同様、大豆イソフラボン摂取群と普通食摂取群の体重増加および摂食量における変化は認められなかった。

3週間のがん細胞移植により、腫瘍重量は普通食群、大豆イソフラボン摂取群において、それぞれ 1.40 ± 0.53 g, 1.57 ± 0.29 gであった。普通食群において、がん細胞を移植することにより、腓腹筋湿重量がおおよそ85%まで減少した。一方、大豆イソフラボン摂取群では、普通食群と比較して、筋重量の減少はおおよそ98%までに留まり、がん細胞移植による筋萎縮に対して抵抗性を示した (Fig. 1)。がんカヘキシーによる筋萎縮はTNF- α などのがん細胞由来液性因子を介して引き起こされることが知られている。同様に、TNF- α は速筋優位に萎縮が起こる老化による筋萎縮の原因の一つとされている。より詳細な形態学的観察を行うために速筋優位の筋肉である前脛骨筋を用いて、速筋型ミオシンの免疫染色を行った。普通食群において、がん細胞を移植することにより、筋線維の萎縮が認められた。それらの面積はそれぞれNC, $2123.5 \pm 959.2 \mu\text{m}^2$; NT, $1268.5 \pm 550.5 \mu\text{m}^2$ であり、おおよそ60%筋線維面積が減少した (Fig. 2)。一方、大豆イソフラボン摂取群における筋線維面積は、SC, $1899.1 \pm 801.4 \mu\text{m}^2$; ST, $1537.8 \pm 707.8 \mu\text{m}^2$ であり、コントロール群と比較してがん細胞移植群では81%の減少であった (Fig. 2)。筋湿重量の変化同様、筋線維面積においても大豆イソフラボン摂取群ではがんカヘキシーによる筋萎縮に対して抵抗性を示すことが示唆された。

TNF- α によって誘導されるAtrogin-1の発現はMAPキナーゼファミリー (p38, ERK1/2, JNK) の活性化によって引き起こされる⁷⁾。実際に、膵臓の β 細胞において、大豆イソフラボンの成分であるゲニステインの抗炎症効果はERKシグナル経路の抑制を介して引き起こされることが報告されている⁸⁾。我々もまた、大豆イソフラボンを摂取したマウスの骨格筋では、がん細胞の移植によって誘導されるERKのリン酸化を抑制することを見出しつつある。したがって、大豆イソフ

ラボン摂取による筋萎縮予防効果は骨格筋中のERKシグナル抑制を介して引き起こされた可能性が示唆される。しかしながら、大豆イソフラボンは他の経路にも作用する可能性があるため、さらに詳細な検討が必要である。

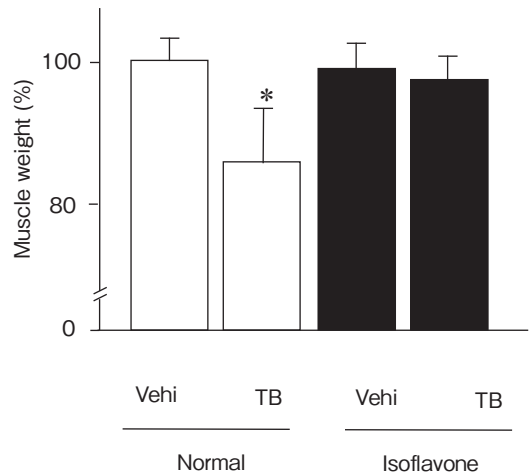
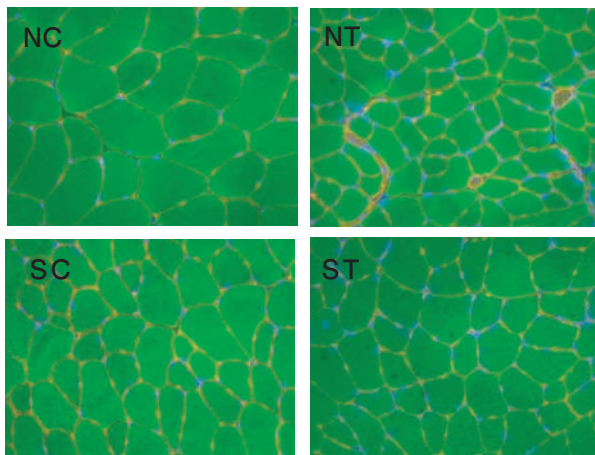


Fig. 1. Effect of dietary soy isoflavone on tumor-induced decrease in muscle wet weight. Isoflavone diet or normal diet was given to mice for 3 weeks after tumor-bearing (TB) or Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) injection (Vehi). Wet weight of gastrocnemius muscle was measured. Data are mean $\pm$ SD (n=6). * $p < 0.05$, compared with HBSS injected muscle of mice fed the normal diet.

A



B

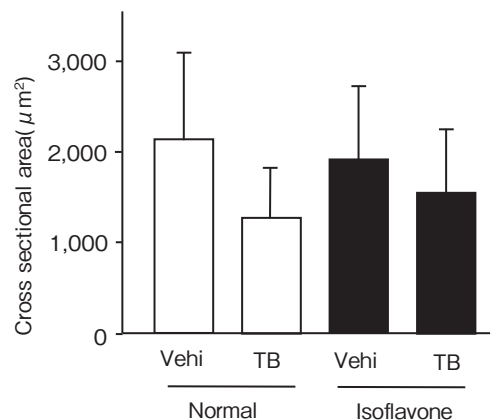


Fig. 2. Effect of dietary soy isoflavone on tumor-induced decrease in muscle cross-sectional area. Isoflavone diet or normal diet was given to mice for 3 weeks after tumor-bearing (TB) or Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) injection (Vehi). (A) Sections (3-μm thickness) of tibialis anterior (TA) muscle from NC, NT, SC and ST groups were immunostained with anti-myosin heavy chain fast-type (green) and anti-laminin (red) antibodies and Hoechst 33342 (blue). The overlay shows in Fig. 2A. (B) The distributions of cross-sectional areas indicate the average area of the myofibers in the section. NC, HBSS injected mice fed normal diet; NT, tumor-bearing mice fed normal diet; SC, HBSS injected mice fed isoflavone diet; ST, tumor-bearing mice fed isoflavone diet.

要 約

がんカヘキシーによる筋萎縮はがん細胞由来液性因子を介して引き起こされることが知られている。これまでの我々の研究において、TNF- α などの炎症性の液性因子が筋管細胞に作用し、たん白質分解の律速酵素であるユビキチンリガーゼの発現を増大せることを報告している。また、大豆イソフラボン摂取群では坐骨神経切除による筋萎縮に対して抵抗性を示した。したがって、液性因子を介した筋萎縮に対しても大豆イソフラボンが効果的である可能性が示唆される。本研究では、これまで我々が得た結果を基に、大豆由来イソフラボンのがんカヘキシーによる筋萎縮予防効果を検討した。

がんカヘキシーモデルは、 1×10^6 個のルイス肺がん細胞を移植し、筋萎縮を模倣した。移植後、マウスに普通食もしくは、粗精製大豆イソフラボン（ソヤフラボンHG、不二製油）重量比0.4%で配合した飼料（イソフラボン食群）を与えた。3週間後に解剖し、筋重量、筋線維横断面積の測定を行った。

普通食群とイソフラボン食群では共に、がん細胞移植を行っても摂取量や体重に差はみられなかった。普通食群ではがんカヘキシーマウスにおいて、萎縮筋で観察される筋重量の減少や筋線維面積の縮小が認められた。これに対して、イソフラボン食群ではがんカヘキシーによる筋重量や筋線維面積の減少に対して完全ではないが抵抗性を示した。以上の結果より、食事性的大豆イソフラボン摂取はがんカヘキシーによる筋萎縮予防につながりうることが考えられた。

文 献

- 1) Toledo M, Penna F, Busquets S, López-Soriano FJ and Argilés JM (2014): Distinct behaviour of sorafenib in experimental cachexia-inducing tumours: the role of STAT3. *PLoS One*, **9**, e113931.
- 2) Asp ML, Tian M, Wendel AA and Belury MA (2010): Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int J Cancer*, **26**, 756-763.
- 3) Wang H, Lai YJ, Chan YL, Li TL and Wu CJ (2011): Epigallocatechin-3-gallate effectively attenuates skeletal muscle atrophy caused by cancer cachexia. *Cancer Lett*, **305**, 40-49.
- 4) Gordon JN, Green SR and Goggin PM (2005): Cancer cachexia. *QJM*, **98**, 779-788.
- 5) Hirasaka K, Maeda T, Ikeda C, Haruna M, Kohno S, Abe T, Ochi A, Mukai R, Oarada M, Teshima-Kondo S, Ohno A, Okumura Y, Terao J and Nikawa T (2013): Isoflavones derived from soy beans prevent MuRF1-mediated muscle atrophy in C2C12 myotubes through SIRT1 activation. *J Nutr Sci Vitaminol*, **59**, 317-324.
- 6) 平坂勝也, 前田 翼, 春名真里江, 安倍知紀, 越智ありさ, 真板(大野)綾子, 近藤(手嶋)茂忠, 谷山茂人, 橘 勝康, 二川 健 (2014): サルコペニアに対する大豆由来イソフラボンの予防効果. 大豆たん白質研究, **17**, 150-155.
- 7) Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL and Reid MB (2005): TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*, **19**, 362-370.
- 8) Kim EK, Kwon KB, Song MY, Seo SW, Park SJ, Ka SO, Na L, Kim KA, Ryu DG, So HS, Park R, Park JW and Park BH. (2007): Genistein protects pancreatic beta cells against cytokine-mediated toxicity. *Mol Cell Endocrinol*, **278**, 18-28.