

博士論文

低糖質高脂肪食ががん性腹膜炎の進行に及ぼす影響

ワトキンス 彩子

論文題目；低糖質高脂肪食ががん性腹膜炎の進行に及ぼす影響

所属；外科学専攻

指導教員名；深柄 和彦 教授

申請者名；ワトキンス 彩子

目次

1. 要旨.....	- 7 -
2. 序文.....	- 8 -
3. ラード強化低糖質高脂肪食ががん性腹膜炎マウスの生存に及ぼす影響	- 13 -
3-1：背景と目的.....	- 13 -
3-2：対象と方法.....	- 14 -
3-2-1：膵臓がん培養細胞.....	- 14 -
3-2-2：マウス Panc02 がん性腹膜炎モデルの作成.....	- 16 -
3-2-3：低糖質高脂肪食の自由摂食と生存.....	- 19 -
3-2-4：摂取エネルギーを調整した低糖質高脂肪食と生存.....	- 20 -
3-2-5：統計学的検討法.....	- 21 -
3-3：結果.....	- 22 -
3-3-1：低糖質高脂肪食の自由摂食と生存.....	- 22 -
3-3-2：摂取エネルギーを調整した低糖質高脂肪食と生存.....	- 25 -
3-4：考察及び小括.....	- 27 -
4. ラード強化低糖質高脂肪食ががん性腹膜炎マウスの宿主免疫に及ぼす影響	- 28 -
.....	- 28 -
4-1：背景と目的.....	- 28 -
4-2：対象と方法.....	- 29 -
4-2-1：腹腔内腫瘍・精巣周囲脂肪量・右大腿部筋肉量の評価.....	- 29 -
4-2-2：腹腔洗浄液中の炎症性サイトカインレベル評価.....	- 30 -

4-2-3 : 腹腔洗淨液中・脾臓・腫瘍中の免疫細胞の評価.....	- 32 -
4-2-4 : 統計学的検討法.....	- 34 -
4-3 : 結果.....	- 35 -
4-3-1 : 腹腔内腫瘍・脂肪量・筋肉量.....	- 35 -
4-3-2 腹腔洗淨液中サイトカインレベルの評価.....	- 36 -
4-3-3 腹腔洗淨液中の免疫細胞評価.....	- 39 -
4-3-4 脾臓の免疫細胞の評価.....	- 41 -
4-3-5 腫瘍中の免疫細胞の評価.....	- 43 -
4-3-6 がん関連マクロファージサブセットの評価.....	- 45 -
4-4 : 考察及び小括.....	- 47 -
5. 低糖質高脂肪食の脂肪の種類が Panc02 がん性腹膜炎マウスの生存に及ぼす影響	- 52 -
5-1 : 背景と目的.....	- 52 -
5-2 : 対象と方法.....	- 53 -
5-2-1 : 対象.....	- 53 -
5-2-2: 各種低糖質高脂肪食の自由摂食と Panc02 がん性腹膜炎モデルマウスの生存.....	- 54 -
5-2-3 : 統計学的検討法.....	- 56 -
5-3 : 結果.....	- 57 -
5-4: 考察及び小括.....	- 60 -

6 : 低糖質高脂肪食の脂肪の種類が ID8 がん性腹膜炎マウスの生存に及ぼす	
影響	- 61 -
6-1 : 背景と目的.....	- 61 -
6-2 : 対象と方法.....	- 62 -
6-2-1 : マウス ID8 がん性腹膜炎モデルの作成.....	- 62 -
6-2-2 : 各種低糖質高脂肪食の自由摂食と ID8 がん性腹膜炎モデルマウスの	
生存.....	- 62 -
6-2-3 : 統計学的検討法.....	- 63 -
6-3 結果.....	- 64 -
6-4 : 考察及び小括.....	- 66 -
7. 低糖質高脂肪食の脂肪の種類ががん性腹膜炎マウスの生体反応に及ぼす	
影響	- 67 -
7-1 : 背景と目的.....	- 67 -
7-2 : 対象と方法.....	- 68 -
7-2-1 : 対象.....	- 68 -
7-2-2 : 血液・腹腔洗浄液・腹腔内腫瘍の回収と腫瘍重量の評価....	- 69 -
7-2-3 : 腹腔内・血漿サイトカインレベルの評価.....	- 69 -
7-2-4 : 腹腔洗浄液中・腫瘍の免疫細胞の測定.....	- 70 -
7-2-5 : 血漿アディポネクチンレベルの評価.....	- 70 -
7-2-6 : 血漿のケトン体レベルの評価.....	- 70 -
7-2-7 : がん細胞増殖に関わるシグナル経路・転写因子の測定.....	- 71 -

7-2-8 : 統計学的検討法.....	- 73 -
7-3 : 結果.....	- 75 -
7-3-1 : 腹腔内腫瘍重量の評価.....	- 75 -
7-3-2 : 腹腔洗浄液中・血漿中サイトカインレベルの評価.....	- 76 -
7-3-3 : 腹腔洗浄液中・腫瘍中の免疫細胞の測定.....	- 79 -
7-3-4 : 血漿アディポネクチンレベルの評価.....	- 85 -
7-3-5 : 血漿ケトン体レベルの評価.....	- 86 -
7-3-6 : がん増殖に関わるシグナル経路・転写因子の評価.....	- 87 -
7-4 : 考察及び小括.....	- 90 -
8. 総括.....	- 99 -
9. 謝辞.....	- 103 -
10. 引用文献.....	- 104 -

1. 要旨

進行がん患者は栄養状態が低下しやすく、エネルギー摂取量の維持が課題である。がん病態の代謝の変化に対応して、糖質を抑え脂肪摂取を増やす食事療法が推奨されているが、がん自体の予後・生体反応に及ぼす影響は不明である。

本研究はがん性腹膜炎のマウスにラード、大豆油、魚油といった脂肪の種類を変えた低糖質高脂肪食が、予後・生体反応にどのような影響を及ぼすか調べた。

その結果、ラードや大豆油強化の低糖質高脂肪食を与えたマウスでは、炎症反応が増悪し免疫抑制性の細胞数が増加して生存が悪化した。一方、魚油を強化した低糖質高脂肪食を摂取したマウスは、炎症抑制と抗腫瘍免疫の維持を示し、腫瘍重量が抑制され、体重は維持された。生存期間は悪化を示さなかった。

2. 序文

進行がん患者の多くは食欲不振と悪液質による異化亢進により、体重が減少し深刻な栄養不良となる。[1] 栄養不良は感染防御能を低下させるために、治療効果や QOL を著しく低下させる。[2] がん患者の周術期管理において、栄養不良の改善・予防が重視される所以である。担がん患者への栄養療法の有効性は以前より報告されており、本邦でも平成 28 年度よりがん患者の栄養指導に保険点数が付加され、管理栄養士による介入が積極的に行われるようになった。がんの栄養療法は、必要エネルギーやたんぱく質摂取量の充足と、食欲不振時の分食や栄養補助食品など摂取方法の調整が主となる。また、周術期のがん患者には免疫増強経腸栄養剤（Immune-enhancing enteral diet ; IED）が使用され、術後の合併症率や在院日数の低下が報告されている。[3, 4] 一方、終末期では QOL の維持に重点が置かれ、積極的な栄養療法は行われない。[5]

がん患者に必要なエネルギーを十分に投与するための手法として、油脂を食事に追加することが推奨されるほか、脂肪の割合を増やした栄養補助食品などが多く使用されている。脂肪は 9 kcal/g とエネルギー効率が良く、先行研究では担がん患者に標準的な投与量の約 2 倍までの脂肪投与(0.7~1.9 g/kg/日)の安全性と体重減少の抑制・維持効果が示されている。[6] 実際、欧米のがん患者の栄養療法では具体的な指導内容として、エネルギー密度の高い脂肪やたんぱく

質を多く含む、肉類や乳製品の摂取量増加が一般的である。脂肪の摂取量増加は食欲不振のがん患者が、少しでも多く経口でエネルギーを摂取するために一般的に行われる指導内容と言える。[7]

担がん患者では様々な代謝変化が起きる。特に糖代謝において、腫瘍細胞は好氣的な環境でも解糖系を亢進させて増殖のためのエネルギーを得ていることが示されている (Warburg effect)。[8] また、がん患者ではインスリン抵抗性の増加、耐糖能異常により、しばしば高血糖症となる。高血糖症は細胞増殖、遊走、抗アポトーシス作用を増幅させ、ある種のがんを増悪させることが報告されている。[9] その一方で、担がん患者の脂肪の代謝は維持または亢進している。[10] 多くのがん細胞で酵素やミトコンドリアの欠陥により、脂肪酸の β 酸化によって生成されるケトン体を使用できないことも示されてきた。[8] そのため、がん患者におけるエネルギー源としての脂肪の特殊性(優位性)を背景に、脂肪はがんの進行に悪影響を及ぼさない、良質なエネルギー源と考えられてきた。

これらを背景に近年、低糖質高脂肪食 (Low-carbohydrate high-fat diet ; LCHFD) ががんの栄養療法に有効であると臨床栄養のガイドラインで示されるようになった。2016年に発表されたヨーロッパ臨床栄養代謝学会(ESPEN)のがん患者の栄養管理ガイドラインでは、「体重減少やインスリン抵抗性のある患

者には、糖質を抑え脂質の割合を増やす栄養療法が有効」と強い推奨度をもって示し、その理由に脂質のエネルギー効率と、高血糖による副作用や、水分貯留の抑制を挙げている。[11] 近年のマウスを用いた実験で、糖質の割合をエネルギー比で 5-10%と極端に抑え、脂質の割合を増やすケトン食により、ある種の腫瘍の増大が抑えられたという報告もある。[12]

しかし、炎症反応への影響という点では、脂肪摂取ががん患者に不利に働くかもしれない。脂質の摂取増加により体内で脂肪細胞が増加すると脂肪細胞からアディポカインおよび生理活性物質が生成され、慢性炎症の原因となる。

[13] がんは慢性炎症を特徴とする疾患であり、これまでの研究により、炎症はがんの進行に深く関わることを示されている。肥満マウスや高脂肪食を与えたマウスにがんを皮下接種すると、がんが増悪する報告がある。[14-16] これらのマウスモデルの基礎実験の多くは体脂肪細胞の増加が、がん増悪の原因となると結論付けている。

先に述べた ESPEN のガイドラインでも、進行がん患者を対象に脂肪の摂取割合を増加することを推奨しているものの、予後やがんの増悪については不明と示されている。LCHFD が、がん患者の手術時の炎症性サイトカインレベルに与える影響や、胃、膵臓、大腸や卵巣がんの末期に起こるがん性腹膜炎(腹膜播種)の進行に及ぼす影響を評価した基礎研究も少ない。[14, 17, 18] LCHFD

が、担がん動物の予後や代謝以外の生体反応に、どのような影響を及ぼすかを明らかにする必要がある。

そのため、我々はがん性腹膜炎(Carcinomatous peritonitis ; CP)のマウスモデルを作成して2つの実験を行った。1つ目の実験では LCHFD が進行がんの生存と、腹腔洗浄液中・脾臓・腫瘍中のサイトカインや免疫細胞の変化を通して宿主の予後・生体反応に及ぼす影響について調べた。この実験で使用した LCHFD は、飽和脂肪酸 (Saturated fatty acid ; SFA) と一価不飽和脂肪酸 (Monounsaturated fatty acid ; MUFA) を主体とするラードを強化したものである。それは、この LCHFD が標準的な西洋食(Western diet)の脂肪酸構成をよく反映し、動物実験でも一般的に使用されているからである。

2つ目の実験では、1つ目の実験結果を踏まえて、ラード以外の脂肪で同様の検討を行った。脂肪はその種類によって炎症反応や免疫に及ぼす影響が大きく異なるからである。脂肪は細胞膜を含む生体膜の構成成分であり、生体膜から切り離された遊離脂肪酸のうち多価不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid ; PUFA)は生理活性物質となってパラクリン(傍分泌)、また、細胞内でセカンドメッセンジャー-物質を産生する。[19] PUFA の中でも n-6 系多価不飽和脂肪酸 (n-6 PUFA) から産生される生理活性物質は炎症促進性に働き、一方で n-3 系多価不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA) は抗炎症性に働く。[20] 食事由来による脂質ラフ

トの変化は、細胞間または細胞内のシグナル伝達や生理活性物質産生を変化させ、がんの進行や免疫反応に関連している可能性がある。そこで我々は n-6 系多価不飽和脂肪酸(n-6 PUFA)を多量に含む大豆油、あるいは n-3 系多価不飽和脂肪酸(n-3 PUFA)を多量に含む魚油を強化した餌を用いて同様の実験を行うと共に、細胞増殖や炎症に関わるシグナル伝達経路および、シグナルたんぱく質についても評価した。

今回の研究における動物実験プロトコールは東京大学の倫理委員会で承認されたものであり、東京大学大学院医学系研究科・研究ガイドライン（実験系）（<http://www.m.u-tokyo.ac.jp/education/guideline.html>）に則り行われた。

3. ラード強化低糖質高脂肪食ががん性腹膜炎マウスの生存に及ぼす影響

3-1 : 背景と目的

LCHFD のがんに対する栄養療法としての代謝上の有効性が注目されているが、一方で動物実験では高脂肪食の摂取は炎症を増悪させ、がん進行を促進するという報告もある。[21-23] 低糖質高脂肪食を推奨する ESPEN のガイドラインでも、栄養投与において脂肪の割合を増やすことへの推奨度は強いがエビデンスレベルは低く、LCHFD ががん進行や生存にどのような影響を及ぼすか不明である。

我々は膵臓がん由来の Panc02 腹腔内に投与して作成した CP マウスを用いて、動物モデルで一般的に用いられるラード強化の LCHFD が、生存に与える影響について調べた。

3-2 : 対象と方法

3-2-1 : 膵臓がん培養細胞

Panc02 マウス膵臓がん細胞は、東京大学医学部附属病院消化器内科より提供された。培養液は、低グルコースダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, cat. D6046-500ML, Sigma-Aldrich Japan)に、10%のウシ胎児血清(FBS, cat. F7524-500ML, Sigma-Aldrich Japan)と、5%ペニシリン(10000units/ml)ストレプトマイシン(10mg/ml)混合溶液 (cat. P4333, Sigma-Aldrich Japan) を用いた。

Panc02 細胞培養は、まず細胞の入った凍結バイアルを恒温槽 (37 °C) で融解させ、同様に温めておいた培養液 5 ml に移した。遠心後 (4 °C、5 分間、2-)、クリーンベンチ内で上清を吸引し、培養液 1 ml を加えて細胞を再懸濁した。次に、9 ml の培地を入れた滅菌シャーレに移し、インキュベーター内 (5%CO₂, 37 °C)で培養した。以降 48-72 時間ごとに後述する細胞継代作業を行った。

継代は、まずシャーレを顕微鏡で観察し、Panc02 細胞がシャーレ内の約 80% に広がっているものを継代シャーレとした。クリーンベンチ内で培地を吸引し、2 ml のリン酸緩衝液(PBS)を加えて細胞表面を 2 回洗浄した。次に、0.25% トリプシン-EDTA(cat. 25200056, Gibco™) 1 ml を添加し、インキュベーター内で 5 分間静置した。がん細胞がシャーレ底面から浮いていることを目視で確認

後、培養液 9 ml を加えた。新しいシャーレに 5 倍希釈または 10 倍希釈となるよう新しい培養液と細胞の入った培養液を加え、インキュベーターに移して培養した。48 時間から 72 時間ごとに継代を繰り返した。

3-5 回継代後、接種のための溶液調整を行った。0.25%トリプシン-EDTA 添加までは継代と同様の作業を途中まで行った。5 分静置後、がん細胞がシャーレから浮いていることを確認してから、培養液 2 ml を添加して懸濁した。全てのシャーレ内の細胞を 1 本のコニカルチューブに集めた後、セルカウンターを用いて生細胞数を測定した。遠心後 (4 °C、5 分間、200 g)、上清を吸引し、次に PBS5 ml をチューブに加えて再度遠心した。(4 °C、5 分間、200 g) これを 2 回繰り返して細胞を洗浄した。最後に PBS で 2×10^6 /ml になるよう調製し、接種液とした。

3-2-2 : マウス Panc02 がん性腹膜炎モデルの作成

7 週齢の C57/BL6J マウス (雄性) (Charles River Laboratories Japan, INC. Japan) を購入した。搬入後、マウスを個別ケージに入れ、馴化用の餌 (MF、オリエンタル酵母工業株式会社 バイオ事業部) を与えて飼育し、1 週間環境順応させた後に実験を開始した。

8 週齢のマウスを、通常食(ノーマルダイエット)群 (ND 群)、LCHFD 群 (LCHFD 群) の 2 群に無作為に割り当て、それぞれの飼料を開始した。各食餌の栄養組成は表 1 に、食事中に含まれる主な脂肪酸の一覧を表 2 に示した。食餌開始後 7 日目に、Panc02 マウス膵臓がん細胞 1×10^6 個をマウスの腹腔内に 27G 針を用いて接種した。

	ND (AIN-93M)	LCHFD (HFD-60)
カゼイン (g/kg)	140	256
シスチン (g/kg)	3	4
コーンスターチ (g/kg)	250.7	160
マルトデキストリン (g/kg)	0	60
スクロース (g/kg)	100	50.5
セルロース (g/kg)	5	6.6
大豆油 (g/kg)	40	20
ラード (g/kg)	0	330
混合ミネラル(g/kg)	35	35
混合ビタミン (g/kg)	10	10
エネルギー(kcal/kg)	3570	5062
たんぱく質 (%)	14.9	18.2
脂質 (%)	9.4	62.2
炭水化物 (%)	75.7	19.6
飽和脂肪酸(g/kg)	6.4	108.8
一価不飽和脂肪酸 (g/kg)	9.2	139.9
多価不飽和脂肪酸 (g/kg)	23.2	47.9

表 1 : 栄養組成

脂肪酸	飽和脂肪酸(SFA)		ラード・牛脂・バター
	不飽和脂肪酸 (PUFA)	一価不飽和脂肪酸(MUFA)	オリーブオイル アボカド 菜種油
		n-6系不飽和脂肪酸 (n-6 PUFA)	大豆油 ごま油 ひまわり油
		n-3系不飽和脂肪酸 (n-3 PUFA)	魚油 えごま油 亜麻仁油

表 2 食事に含まれる主な脂肪酸

3-2-3 : 低糖質高脂肪食の自由摂食と生存

38 匹の CP マウス(n=19/群)を用いて、各餌を自由摂食させ生存実験を行った。各マウスの体重測定と餌摂取量を週 2 回計測した。実験開始後 28 日目より、毎日生存確認を行った。(図 1)

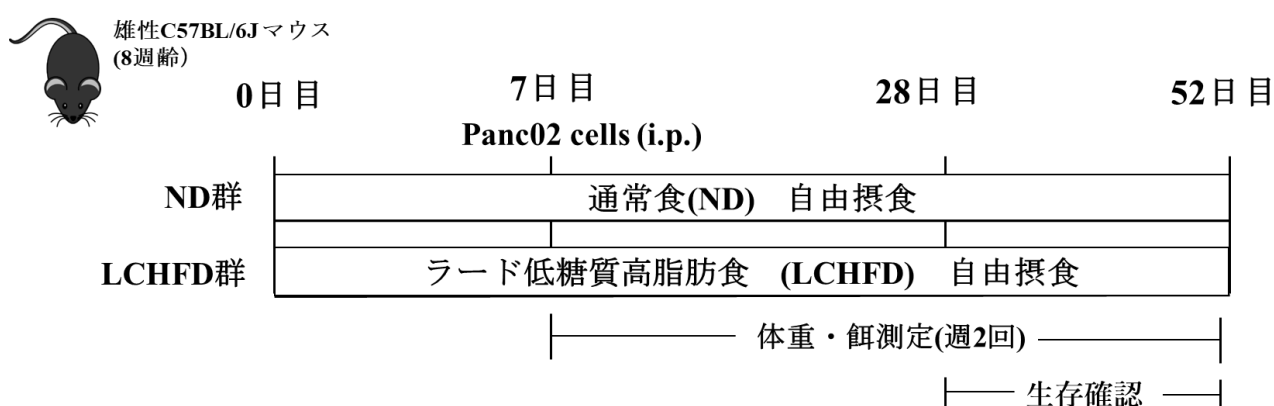


図 1 : ラード強化 LCHFD 生存実験プロトコール

マウスをランダムに LCHFD 群と ND 群に分け、それぞれの餌を開始した。餌開始 1 週間後に、マウス Panc02 膵臓がん細胞を腹腔内に接種した。各餌を自由摂食させて生存実験を行った。

3-2-4：摂取エネルギーを調整した低糖質高脂肪食と生存

3-2-3 の生存実験と同様のプロトコールで、同エネルギーに調整した各餌を毎日与えて生存実験を行った。(図 2) 28 匹の CP マウス(n=14/群)を用いて、餌の投与量は ND 群の自由摂食量および他の先行研究を参考に、4g/日の ND 餌と同エネルギーになるように LCHFD 投与量を定めた(2.8g/日)。毎日定量(14.4kcal/日)の餌をケージ内に投与した。

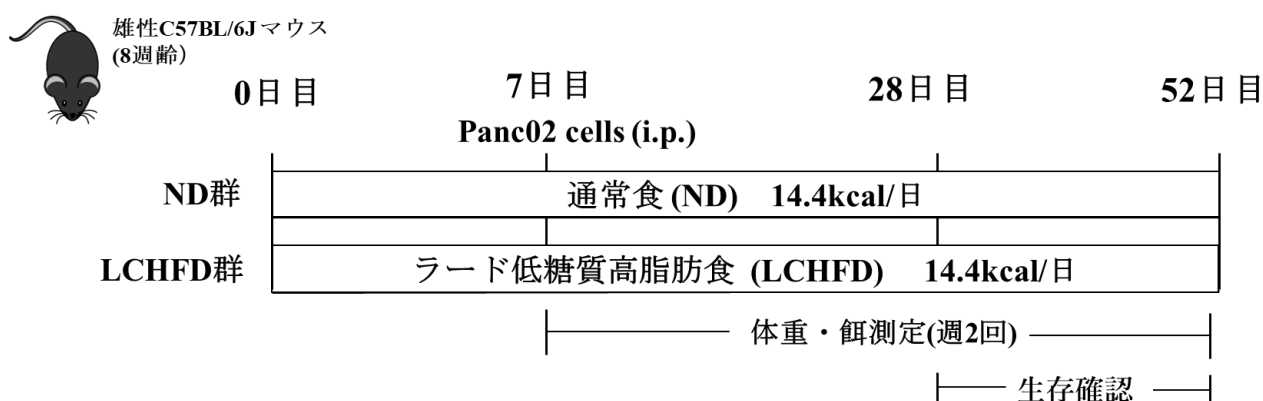


図 2：ラード強化 LCHFD 生存実験プロトコール

マウスをランダムに LCHFD 群と ND 群に分け、それぞれの餌を開始した。餌開始 1 週間後に、マウス Panc02 膵臓がん細胞を腹腔内に接種した。両群の投与エネルギーを統一(14.4kcal/日)して同様の生存実験を行った。

3-2-5 : 統計学的検討法

本実験での値は全て平均±標準誤差で表し、統計ソフトは Windows 版 JMP Pro 13 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。有意差は log-rank 検定で評価した。p 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。

3-3 : 結果

3-3-1 : 低糖質高脂肪食の自由摂食と生存

各餌を与えたマウスの体重は経時的に増加した。16日目から27日目までは、LCHFD群がND群に比べ有意に高体重を示した。(図3) しかし、28日目以降は特にLCHFD群において体重が急激に減少し、40日目に生存しているマウスの平均体重はND群の方がLCHFD群より高値となった。

生存実験中、平均食餌摂取量はND群で3.83g/マウス/日(13.9kcal/マウス/日)、LCHFD群で3.44g/マウス/日(17.4kcal/マウス/日)だった。

餌摂取量については全期間で2群間に差はみられなかった。(図4)

生存は、実験開始後から数えてLCHFD群で 41.5 ± 1.0 日、ND群は 46.5 ± 0.9 日となり、LCHFD群でND群と比べて生存が悪化した ($p=0.0035$)。(図5)

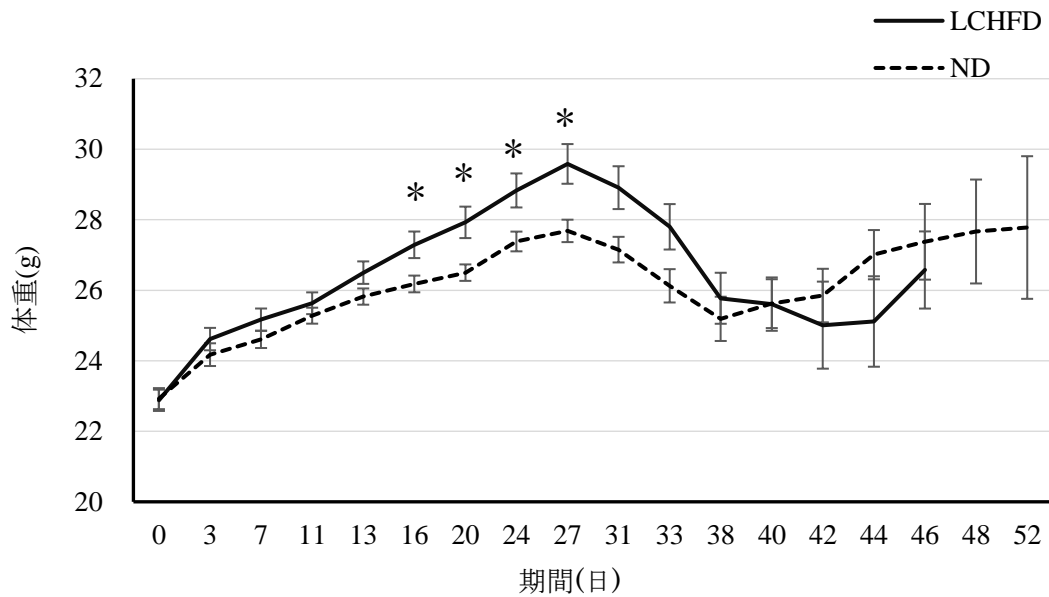


図 3 : LCHFD の自由摂食がマウスの体重変化に与える影響

体重は 16 日から 27 日までの期間において、LCHFD 群で有意に増加した。データは平均±標準誤差、* $p < 0.05$ vs. ND (t-test)。

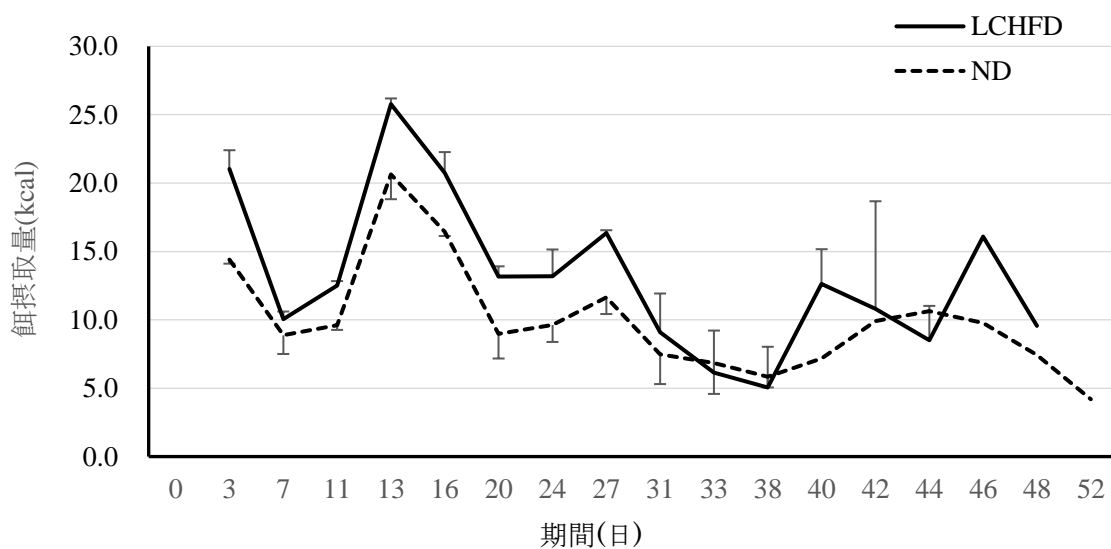


図 4 : 実験期間における食餌摂取量

全期間の食餌摂取量は両群間で差は見られなかった。データは平均±標準誤差。

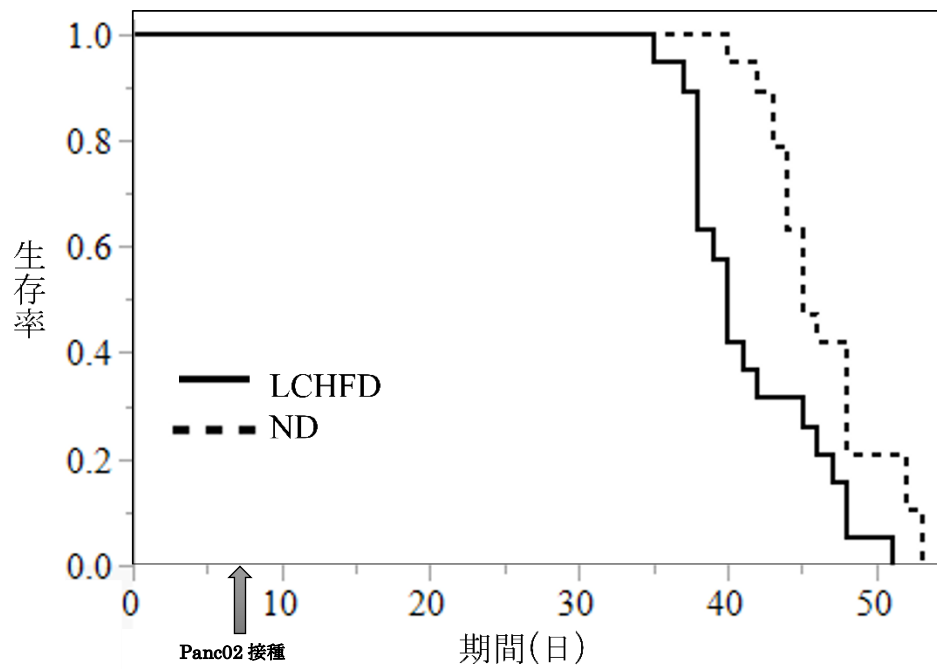


図 5 : LCHF の自由摂食が Panc02CP マウスの生存に与える影響
 LCHF および ND の自由摂食開始後 7 日目に Panc02 がん細胞を接種し、CP モデルを作成した。生存は LCHF 群で短縮した。(生存期間; ND:46.5±0.9 日, LCHF:41.5±1.0 日, p=0.0035, log-rank test)。データは平均±標準誤差。

3-3-2：摂取エネルギーを調整した低糖質高脂肪食と生存

摂取エネルギー量を調整した本モデルでは、両群の体重は全期間において有意差は見られなかった。(図 6) 実験開始後 30 日目以降は、LCHFD 群において体重が減少し、自由摂食時と同様に悪液質の様相を呈した。

生存は自由摂食の生存実験の結果と同様に、LCHFD 群で有意に悪化した。(図 7) 生存期間は実験開始後から数えて、ND 群が 45.6 ± 1.4 日、LCHFD 群が 40.9 ± 1.0 日であった。

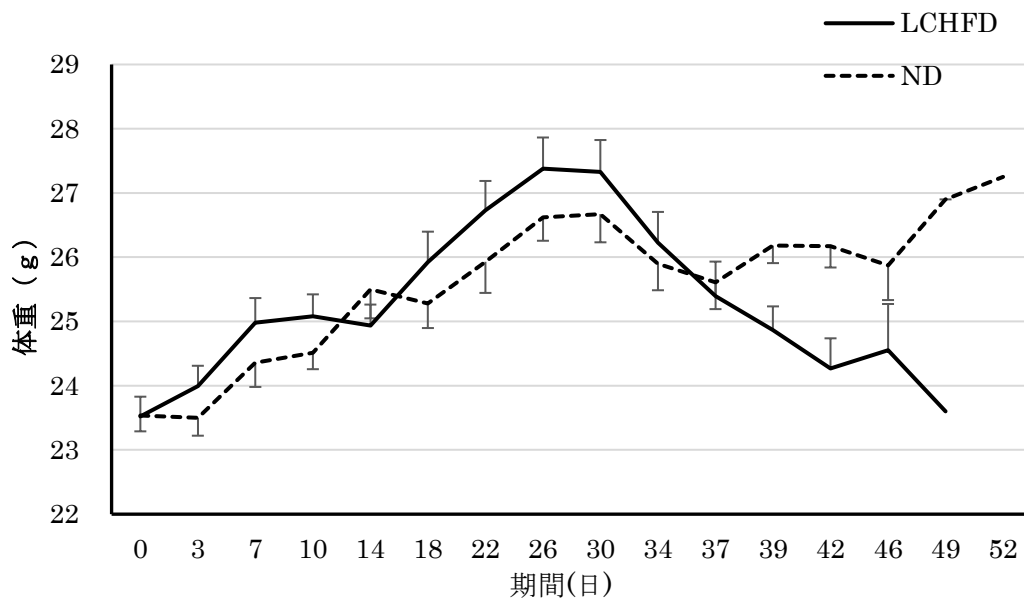


図 6 : LCHF と ND を同エネルギーで摂食したマウスの体重変化
全期間において、両群間に体重の有意差はみられなかった。

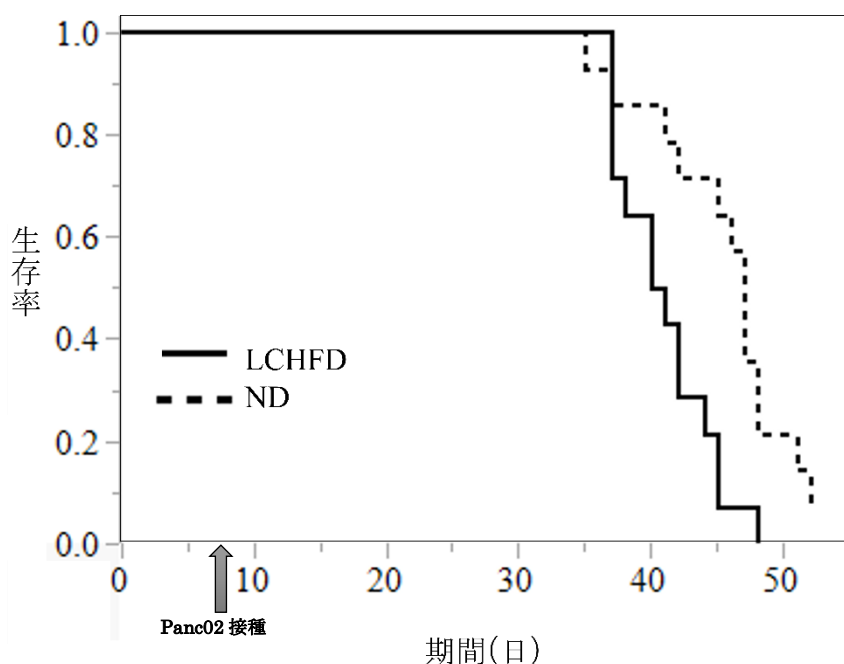


図 7: エネルギー投与量を同等に調整した LCHF が Panc02CP マウスの生存に与える影響

同エネルギーに調整した LCHF 摂食も、自由摂食と同様に CP モデルの生存を悪化させた。データは平均±標準誤差。(生存期間; ND: 45.6±1.4 日, LCHF: 40.9±1.0 日, $p=0.004$, log-rank test)。

3-4 : 考察及び小括

Panc02 膵臓がんを腹腔内接種した CP マウスモデルにおいて、ラード強化の LCHFD の摂取は ND を摂取したマウスと比較して、生存を悪化させた。

自由摂食で行った生存実験では、実験開始後 27 日目まで LCHFD 群で体重がより増加した。過剰なエネルギー摂取による体脂肪細胞の増加は、生理活性物質増加や慢性炎症を通して腫瘍の増大やがんの進行に関連することは多くの研究で報告されている。[24-26] 我々の実験でも LCHFD 群で腹膜播種と生存が増悪したが、エネルギー過剰が原因である可能性も考えられた。そこで同様のプロトコールで、同エネルギーに調整した ND と LCHFD を CP マウスに毎日投与して生存実験を行った。実験期間を通して両群の体重に差は無かったが、それでも生存は LCHFD 群で悪化した。

これらの結果より、エネルギー過剰投与よりも、エネルギー組成の割合が本モデルの生存に影響を及ぼすと考えられた。このため、我々は次章以降、自由摂食モデルにおける免疫反応や炎症に関わるマーカーを調べることにした。

4. ラード強化低糖質高脂肪食ががん性腹膜炎マウスの宿主免疫に及ぼす影響

4-1 : 背景と目的

第3章の実験より、ラード強化 LCHFD によるマウスがん性腹膜炎モデルの生存悪化には、エネルギー組成の違いが重要であることが判明した。LCHFD 群では更に、観察後期に著明な体重減少が見られた。LCHFD の摂取が、慢性炎症や宿主の生体反応に影響を及ぼし、がん増悪に関与している可能性がある。

そこで我々は、第3章と同様の Panc02 がん細胞を腹腔内に投与して作成した CP マウスモデルを用いて、ラード強化の LCHFD 自由摂食が、腹腔内の炎症に関わるサイトカインと、腹腔洗浄液中・脾臓・腫瘍中の免疫細胞に与える影響について調べた。

4-2 : 対象と方法

4-2-1 : 腹腔内腫瘍・精巣周囲脂肪量・右大腿部筋肉量の評価

第 3 章の自由摂食の生存実験と同様のプロトコールで、20 匹(n=10/群)の Panc02CP マウスに LCHFD または ND を与えた。食餌開始後 35 日目(がん接種後 28 日目)のマウスに、ケタミン 100 mg/kg とキシラジン 10 mg/kg の混合溶液を皮下に注入し全身麻酔を行ったのちに、心腔採血にて脱血し犠死せしめた。開腹し腹腔内の目に見える腫瘍を全て回収し、その数と大きさ、重量を評価した。次に、精巣周囲脂肪と右大腿部の筋肉を採取し、その重量を測定した。

4-2-2：腹腔洗浄液中の炎症性サイトカインレベル評価

Panc02CP マウスの、腹腔洗浄液中のサイトカインレベルの誘導・産生の経時的な変化をみるため、実験開始後 7 日目 (Panc02 接種日、n=6/群)、21 日目 (n=5/群)、35 日目(n=7/群)の評価を行った。(図 8)

マウス腹腔内に 5%FBS 添加 PBS(PBS+FBS)を 2 ml 注入し、指で腹部を 1 分間マッサージ後、開腹して腹腔洗浄液を回収した。腹腔洗浄液を 40 μ m メッシュにて濾過後、遠心分離 (4 $^{\circ}$ C、10 分間、3000 rpm)し、上清を採取して-80 $^{\circ}$ C で保存した。後日サイトカインレベルを測定する直前に室温解凍して使用した。サイトカインはインターロイキン-6 (IL-6)、単球走化性因子-1 (MCP-1)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)、インターロイキン-10 (IL-10) を測定した。測定には CBA-detection kit (BD cytometric bead array mouse inflammation kit, cat.552364 Becton-Dickinson Bioscience, California, USA) を用い、フローサイトメトリー (BD accuri C6, Becton-Dickinson Bioscience, California, USA) で評価した。

更にはがんと関係なく、LCHFD 摂食による体重増加自体で炎症が増悪し、サイトカインが上昇したのか否かを調べる為、がん細胞の腹腔内接種なしに LCHFD および ND を 35 日間摂食させたモデル(n=8/群)においても、35 日目に同様のサイトカインレベルの評価を行った。

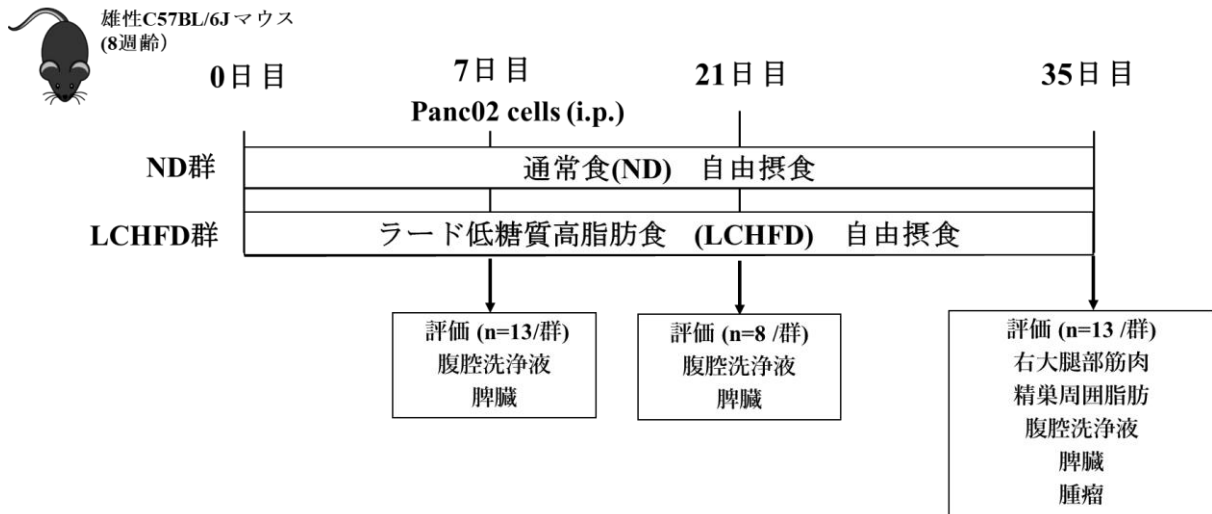


図 8 : 実験プロトコール

マウスをランダムに LCHFD 群と ND 群に分け、それぞれの餌を自由摂食させた。餌開始 1 週間後に、マウス Panc02 膵臓がん細胞を接種した。7 日、21 日、35 日目に犠死せしめ、腹腔洗浄液と脾臓、視認できる腫瘍を全て採取し、サイトカインレベルと免疫細胞数を測定した。

4-2-3：腹腔洗浄液中・脾臓・腫瘍中の免疫細胞の評価

CP マウスを食餌開始後 7 日目(がん接種前、n=13/群)、21 日目(n=8/群)、35 日目(n=13/群)にそれぞれ 4-2-1 と同様の方法で犠死せしめた。

各マウス腹腔内に PBS+FBS を 2 ml 注入し、指で腹部を 1 分間マッサージ後、開腹して腹腔洗浄液を回収し、40 μ m メッシュを通した。脾臓は摘出後、40 μ m メッシュ上で細切り、PBS+FBS を加えながら全量 5 ml になるまで愛護的に潰した。腫瘍は 35 日目のマウスのみで腹膜播種の腫瘍が視認できた。視認できる腫瘍を全て取り除き、全てペースト状になるまで細切後、500 mg を 40 μ m メッシュ上に置き脾臓と同様に潰した。

腹腔洗浄液、脾臓、腫瘍全て遠心分離 (4 $^{\circ}$ C、5 分間、300 g) して上清を取り除き、ペレットをほぐした後、赤血球を溶解するためライシングバッファー (Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-MaxTM, cat. R7757 SIGMA) で 10 分間反応させた。その後 PBS+FBS を 10 ml 加え遠心分離 (4 $^{\circ}$ C、5 分間、300 g) して細胞洗浄し、上清を取り除いた。この洗浄作業を 3 回繰り返した。

細胞数を測定後、エッペンドルフチューブに 1×10^6 個の細胞を分配した。非特異的な反応を防ぐため、anti-mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc BlockTM; cat. 553141, BD Bioscience, CA) を 1 エッペンドルフチューブあたり 0.5 μ l 加えて 15 分反応させた。300 μ l の PBS+FBS で洗浄作業後、各抗体を反応させた。Phycoerythrin with

cyanin-7-anti-CD3(clone 145-2C11; cat. 552774, BD Bioscience, CA)で T 細胞を判別した後、 allophycocyanin-anti-CD4 (clone RM4-5; cat. 553051, BD Bioscience, CA), fluorescein isothiocyanate-anti-CD8 α (clone CT-CD8 α ; Invitrogen)、 phycoerythrin-anti-CD25(clone PC61; cat. 553866, BD Bioscience, CA), fluorescein isothiocyanate-anti-NK1.1 (clone PK136 ; cat. 14594182, Invitrogen)を用いて CD4 陽性 T 細胞(CD4⁺T 細胞)、 CD8 陽性 T 細胞(CD8⁺T 細胞)および NK 細胞のサブセットを標識した。マクロファージにおいては、allophycocyanin-anti-F4/80(clone BM8; cat. 123116, eBioscience, CA), phycoerythrin-anti-CD11b (clone M1/70; cat. 557397, BD Bioscience, CA)を用いて認識し、 M1 型マクロファージ(M1)マーカーに fluorescein isothiocyanate-anti-CD86(clone GL1; cat. 105005, eBioscience, CA)を用いた。すべての抗体はデータシートを基に PBS+FBS で希釈し、4 °Cにて 30 分間反応させた。その後 PBS+FBS で洗浄作業を 3 回行い、1% paraformaldehyde で固定した。

制御性 T 細胞 (Treg) と M2 型マクロファージ (M2) の測定には 1% paraformaldehyde で固定を行わず、 Fixation/Permeabilization buffer kit(cat. 00-5523-00, eBioscience, CA)を用いて 12 時間から 18 時間 4°C で反応後、3 回洗浄した。Fc ブロックを以前と同様に反応させた後に洗浄作業を行い、 alexsa fluor488-anti-Foxp3(clone MF23; cat. 560403, BD Bioscience, CA)、 phycoerythrin-cyanine7 -anti-CD206(clone MR6F3; cat. 25-2061-82, eBioscience, CA)を希釈して PBS+FBS にて

30 分間 4°C で反応させた。洗浄作業を 3 回行った後、フローサイトメトリーで解析した。

4-2-4 : 統計学的検討法

本実験での値は全て平均±標準誤差で表し、統計ソフトは Windows 版 JMP Pro 13 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。有意差は t-test あるいは Mann-Whitney U test にて評価した。p 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。

4-3 : 結果

4-3-1 : 腹腔内腫瘍・脂肪量・筋肉量

35 日目の腹膜播種が形成されたマウスの腹腔から、視認できる腫瘍を採取して個体ごとに腫瘍の数と重量を評価した。LCHFD 群は腫瘍総重量、腫瘍合計数が増加した。(表 2)

精巣周囲脂肪重量は両群間で有意差はみられなかった。大腿部筋肉重量は LCHFD 群で ND 群より低値であった。



	ND	LCHFD	
腫瘍総重量 (g/body)	1.61±0.19	2.44±0.28*	ND 
腫瘍合計数(/body)	48.18±7.07	75.70±11.25*	
腫瘍数 0.5<1mm	20.54±4.81	29.70±4.69	
腫瘍数 1<2mm	14.72±2.48	22.10±3.47*	
腫瘍数 2<5mm	9.09±0.93	16.90±3.11*	
腫瘍数 5mm<	3.81±0.96	7.0±1.11*	
精巣周囲脂肪 (g/body)	0.57±0.09	0.77±0.19	LCHFD 
右大腿部筋肉 (g/body)	0.79±0.04	0.65±0.03*	

表 2 : LCHFD の自由摂食がマウスの腫瘍・脂肪・筋肉に与える影響

実験開始後 35 日目のマウス腹腔内において、腫瘍は総重量・数共に LCHFD 群で ND 群よりも多かった。精巣周囲脂肪量は両群間の差がみられなかった。右大腿部筋肉量は、LCHFD 群で低下した。データは平均±標準誤差、*p<0.05 vs. ND (t-test)。

4-3-2 腹腔洗浄液中サイトカインレベルの評価

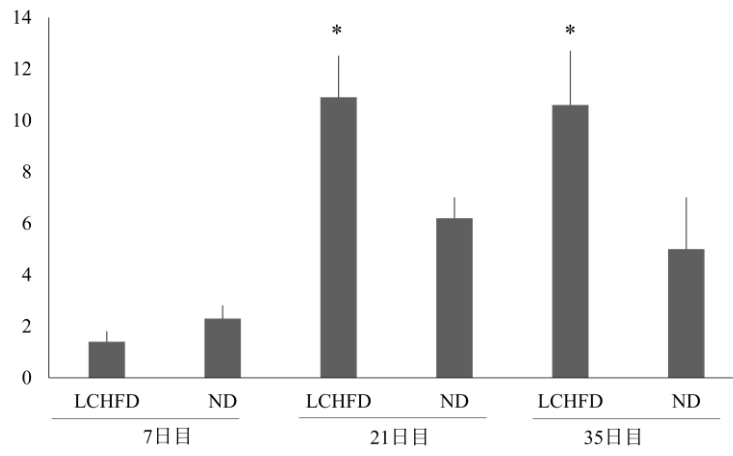
腹腔内の洗浄液を用いて、CP マウスの炎症に関わるサイトカインレベルの測定を行った。食餌開始1週間後(7日目)、がんを接種する前の段階では、全ての項目において両群間に差はみられなかった。(図9)

21日目においては、目に見える腫瘍結節は確認できなかったものの、炎症促進性サイトカインであるTNF α 、MCP-1、IL-6レベルは共にLCHFD群で高値を示した。また、抗炎症性サイトカインのMCP-1、IL-6も、同様にLCHFD群でND群よりも高値であった。

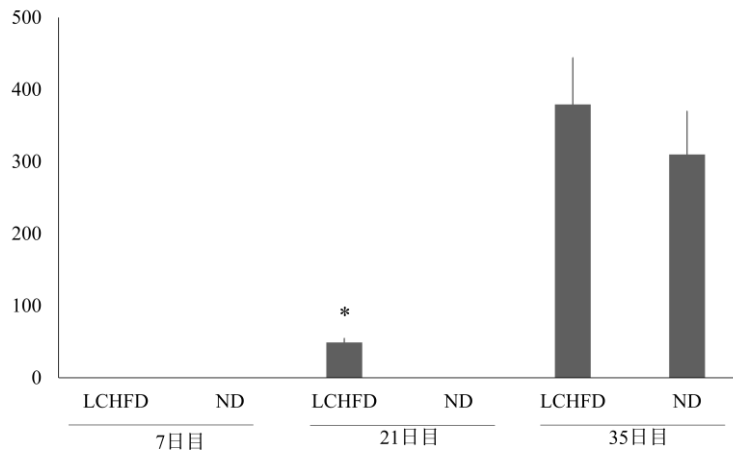
全てのマウスで腹膜播種が形成された35日目には、炎症促進性サイトカインのTNF α がLCHFD群でND群と比較して高値であった。また、抗炎症性サイトカインIL-10もLCHFD群でND群よりも高値であった。IL-6は35日目においてLCHFD群で高い傾向がみられたが、統計学的有意差には至らなかった。(p=0.08, t-test)

なお、がん細胞の接種なしで高脂肪食を投与したマウスで35日目において同様のサイトカインを測定したが、MCP-1、IL-6、IL-10はいずれも検出限界値未満であった。TNF α はLCHFD群 2.8 ± 0.5 pg/ml、ND群 3.6 ± 1.0 pg/mlであり、両群間に有意差はみられなかった。

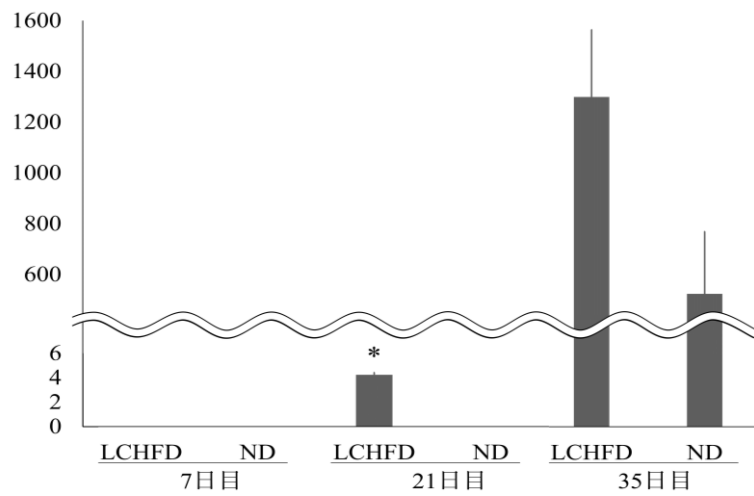
(a) TNF α



(b) MCP-1



(c) IL-6



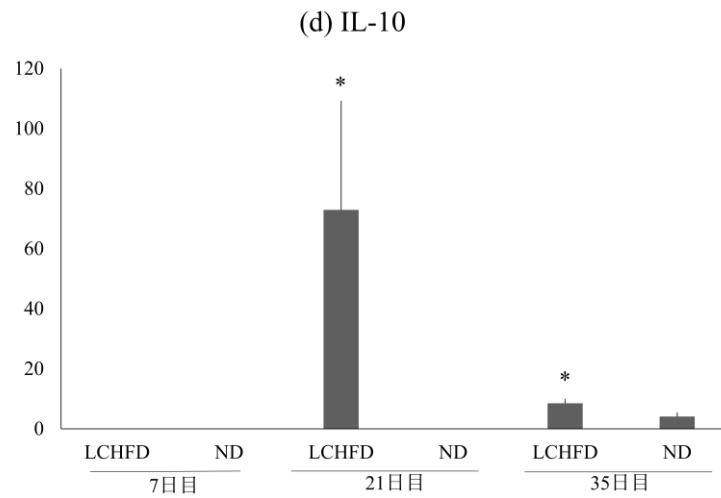


図 9 : LCHF の自由摂食が腹腔洗浄液中の炎症に与える影響

ラード強化 LCHF または ND を摂食した CP マウスモデルにおいて、腹腔洗浄液中の炎症促進性サイトカインである(a)TNF α (b)MCP-1 (c)IL-6 および抗炎症性サイトカイン(d)IL-10 のレベル(pg/ml)を 7 日目、21 日目、35 日目に観察した。各群 n=10。データは平均 \pm 標準誤差、*p<0.05 vs. ND (t-test)。

4-3-3 腹腔洗淨液中の免疫細胞評価

各食餌を与えて7日目の腹腔洗淨液中では、NK細胞は両群で検出されなかった。(図10)他に評価した免疫細胞数も両群間で差が無かった。

21日目の時点では、腹腔洗淨液中でNK細胞が検出され、更に活性化NK細胞数はND群と比較してLCHFD群で高値となった。その他の細胞数は両群間に有意差は無かった。

35日目の腹腔洗淨液中では、Treg数がLCHFD群でND群より高値となった。その他の細胞数は両群間に有意差は無かった。

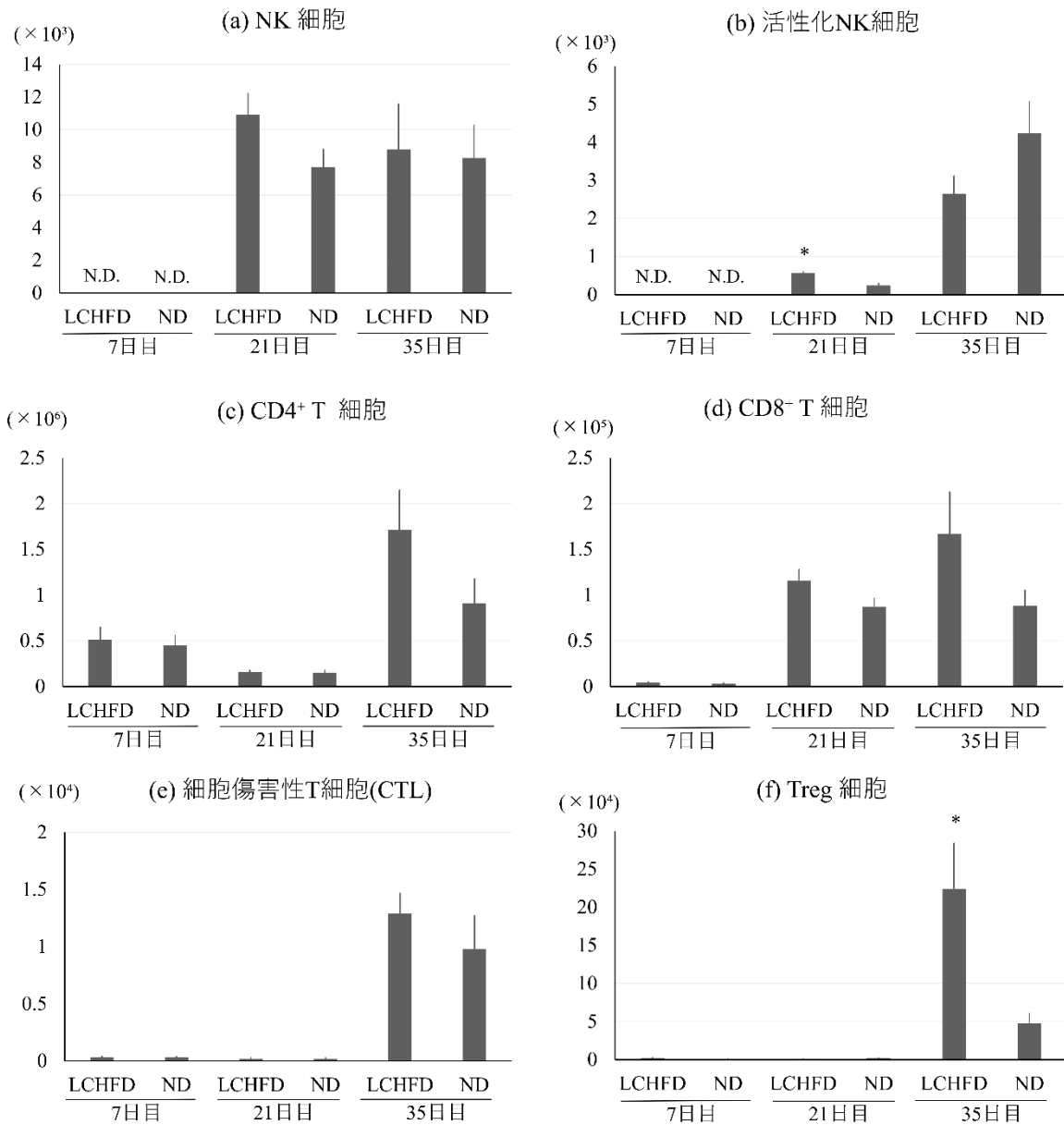


図 10 : LCHF の自由摂食が腹腔洗浄液中のリンパ球に与える影響

7日目、21日目、35日目のラード強化LCHFまたはNDを摂食したCPマウスモデルの腹腔洗浄液を採取し、リンパ球数をフローサイトメトリーにて評価した。N.D.=未検出 (not detected)、各群 n=8-10、データは平均±標準誤差、*p<0.05 vs. ND (Mann-Whitney U test)。

4-3-4 脾臓の免疫細胞の評価

各食餌を与えて7日目の脾臓リンパ球のうち、活性化NK細胞数がLCHFD群でND群と比較して低値であった。(図11) 他の細胞では群間で差は見られなかった。

21日目の時点では、いずれの免疫細胞においても両群間の差はみられなかった。

35日目の時点では、LCHFD群において、活性化NK細胞数とCTL数が、ND群と比較して低値であった。

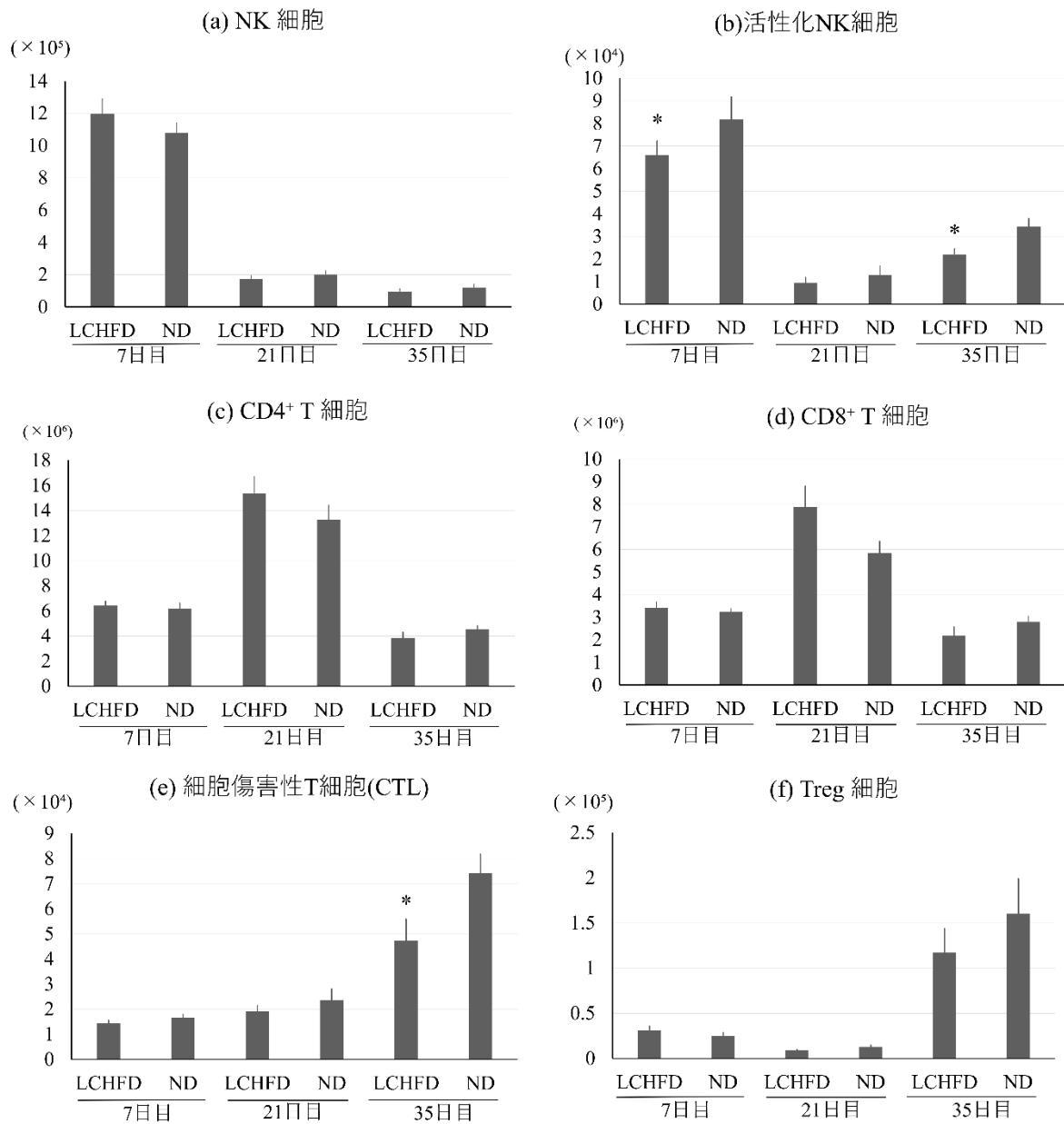


図 11 : LCHF の自由摂食が脾臓のリンパ球に与える影響

7日目、21日目、35日目のラード強化 LCHF または ND を摂食した CP マウスモデルの脾臓からリンパ球を分離し、その数をフローサイトメトリーにて評価した。各群 n=10-12、データは平均±標準誤差、*p<0.05 vs. ND (Mann-Whitney U test)。

4-3-5 腫瘍中の免疫細胞の評価

腫瘍中の免疫細胞については、肉眼で腫瘍が確認できた 35 日目のみ評価した。CD4⁺および CD8⁺T 細胞、CTL、総マクロファージ数はいずれも両群間に有意差がみられなかったが、Treg 数は LCHF 群で ND 群と比較して約 2 倍と高値を示した。(図 12)

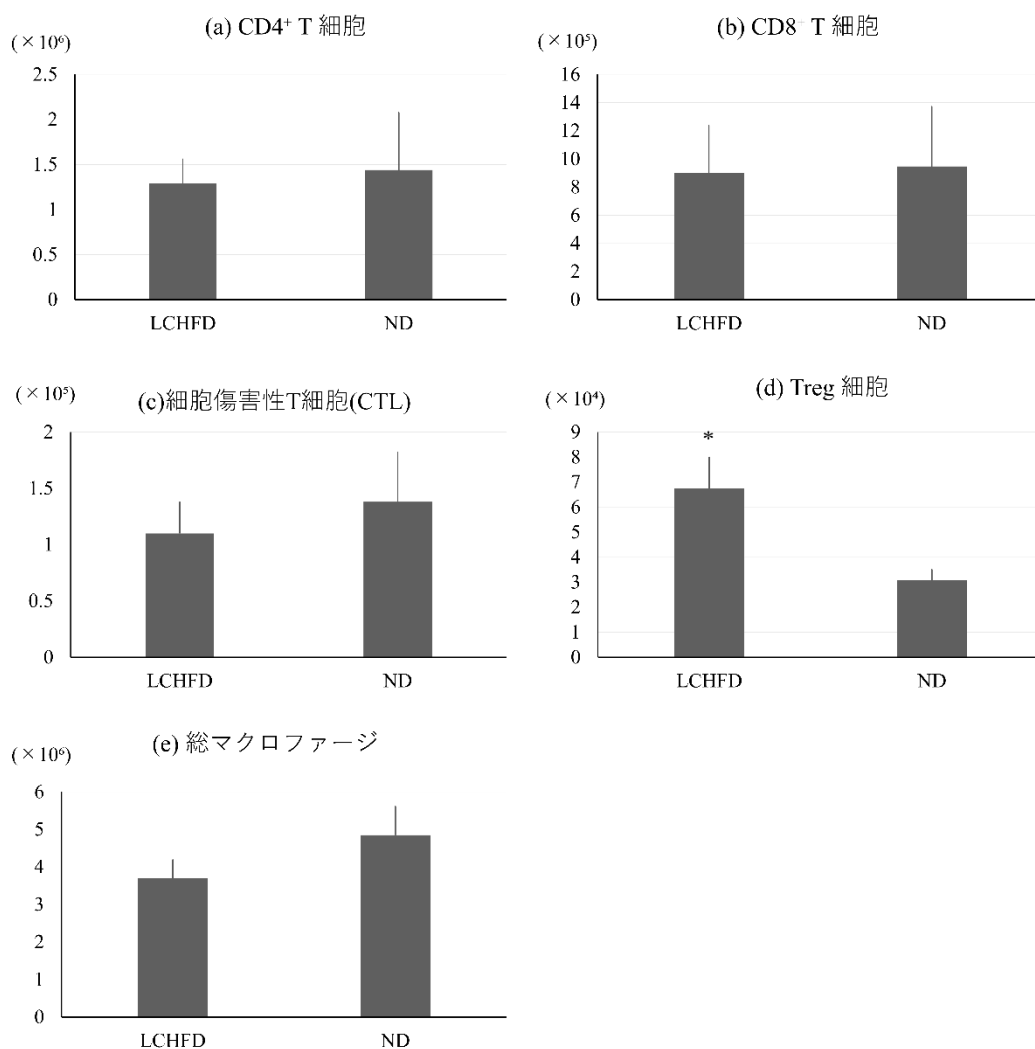


図 12 : LCHF の自由摂食が腫瘍のリンパ球とマクロファージに与える影響
35 日目のラード強化 LCHF または ND を摂食した CP マウスモデルの腫瘍か

らリンパ球およびマクロファージを分離し、その数をフローサイトメトリーにて評価した。各群 n=10-13、データは平均±標準誤差、*p<0.05 vs. ND (Mann-Whitney U test)。

4-3-6 がん関連マクロファージサブセットの評価

がん関連マクロファージ (TAM)は M1 と M2 に大別され、M1 は抗腫瘍性に、M2 は腫瘍促進性に働く。[27] 腹膜播種の形成された 35 日目における、TAM を腹腔洗浄液中、脾臓、腫瘍で評価した。

腹腔洗浄液中・脾臓・腫瘍中の各サブセットの数は、腹腔洗浄液の M2 型マクロファージが、LCHFD 群で ND 群と比較して高値を示した。腫瘍中の M1 型の数は LCHFD 群で ND 群と比較して低値を示した。(図 13) 腫瘍中の M1 型は LCHFD 群で 腹腔洗浄液中・脾臓の M1/M2 比は、LCHFD 群で ND 群と比較して低値であった。(表 3)

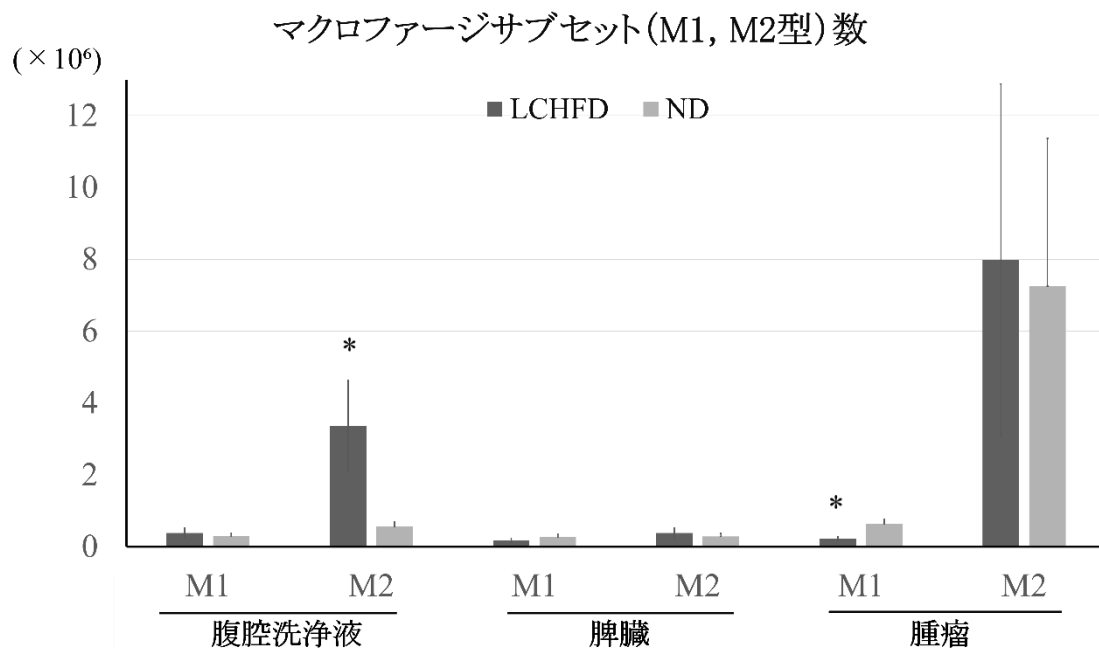


図 13 : LCHF の自由摂食がマクロファージサブセットの数に与える影響

35 日目のラード強化 LCHF または ND を摂食した CP マウスモデルの腹腔洗浄液、脾臓および腫瘍からマクロファージを分離し、その数をフローサイトメトリーにて評価した。各群 n=9-10、データは平均 \pm 標準誤差、*p<0.05 vs. ND (Mann-Whitney U test)。

M1/M2 比	LCHF	ND
腹腔洗浄液中	0.27 \pm 0.13*	0.68 \pm 0.13
脾臓	0.60 \pm 0.11*	0.99 \pm 0.11
腫瘍	0.19 \pm 0.08	0.31 \pm 0.07

表 3 : LCHF の自由摂食がマクロファージサブセット(M1/M2)に与える影響

35 日目のラード強化 LCHF または ND を摂食した CP マウスモデルの腹腔洗浄液、脾臓および腫瘍からマクロファージを分離し、その数をフローサイトメトリーにて評価した。各群 n=9-10、データは平均 \pm 標準誤差、*p<0.05 vs. ND (t-test)。

4-4 : 考察及び小括

ラード強化の LCHFD を摂食したマウス CP モデルの生存悪化の機序を調べる為、炎症に関わるサイトカインや免疫細胞数を評価した。計測したタイミングは、がん細胞を接種する当日の 7 日目、LCHFD 群で体重増加がみられるも、腹腔内に視認できる播種は無い状態の 21 日目、両群で腹膜播種が形成された 35 日目で行った。

7 日間 LCHFD を摂食したマウスでは、脾臓の NK 細胞数が ND を摂食したマウスと比較して減少した。それ以外の評価項目で両群間に差はなかった。21 日目には、LCHFD 群で ND 群と比較して、腹腔洗浄液中の炎症性サイトカインレベルおよび抗炎症性サイトカインレベルの上昇がみられた。35 日目には、LCHFD 群で ND 群より腹腔内のがん腫瘍の増加と、体重減少が有意にみられた。同じく 35 日目の脾臓中の活性化 NK 細胞と CTL などの抗腫瘍性リンパ球数が ND 群と比較して減少した。更に興味深いことに、LCHFD 群は免疫抑制に関わる制御性 T 細胞の増加（腹腔洗浄液中、腫瘍中）と、M1/M2 比の低下（腹腔洗浄液中、脾臓中）を示した。

サイトカインは細胞間の情報伝達物質であり、がんを制御するための免疫を増強する重要な物質である。しかし、がん細胞によって様々な炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの過剰産生が引き起こされると、免疫細胞の

機能が阻害または抑制されて、がん細胞の増殖に最適な環境を作り出されてしまう。[28] 近年のリピドミクス研究において SFA 強化の高脂肪食による体脂肪細胞の増加は、Toll 様受容体 4 (TLR4) を通じて炎症の重要な調節因子である核内因子 κ B(NF κ B)を上方制御しており、TNF α 、MCP-1、IL-6 などの産生増加により全身の慢性炎症が起きることが判明した。[20, 29, 30]

がん病態において、これらのサイトカイン増加はがん増悪に重要な影響を及ぼす。TNF α はがん発生初期には抗腫瘍性に働くサイトカインであるが、進行がんの病態ではインスリン抵抗性、がん細胞の血管浸潤、腹膜播種増悪との関連がみられ、がん細胞の増殖に関与すると考えられている。[31] MCP-1 はがん細胞の遊走に関わり転移を促進する。[32] また、マクロファージの M2 極性を誘導する因子である。[33] IL-6 はがん細胞の増殖、新生血管、転移全てに関わる代表的な炎症促進性サイトカインである。[34-36] これら炎症促進性のサイトカインの上昇が LCHFD 群で見られると共に、抗炎症性に働く IL-10 の上昇も観察された。がん細胞の周辺で IL-10 の上昇は以前より報告されており、Treg や M2 などの免疫抑制に働く細胞から分泌されるとの報告がある。[37] Panc02CP マウスモデルでは LCHFD 摂取群が炎症性および抗炎症性サイトカインが共に高値を示したことから、慢性炎症と宿主の免疫反応の抑制が同時に起こっていることが示唆された。

しかし、35日目におけるサイトカイン環境の群間の違いが、がんの進行によって生じているものか、あるいはがんの進行の原因となっているのかは不明である。そこで我々は、腹腔内のがん進展が顕著に表れていない21日目においても腹腔洗浄液中のサイトカインレベルを評価した。その結果 LCHFD 群ではサイトカインレベルが ND 群よりも上昇したことを確認した。更に、Panc02 がん細胞を接種しないマウスを用いて同じプロトコールで行った実験では、マウスは肥満状態となったがサイトカインはいずれも検出限界値以下であった。つまり、LCHFD 摂取と脂肪細胞の増加だけでは腹腔内の炎症は起きないが、がん細胞が腹腔内にある状態で LCHFD を摂食することで、がん細胞周辺の高サイトカイン環境が作り出され、がんの悪化を進展させたと考えられる。

炎症性サイトカインと免疫抑制サイトカインは共に、宿主免疫を阻害する。[38, 39] 35日目の LCHFD 群の脾臓で、抗腫瘍性の NK 細胞や CTL 数が低下した。これらの細胞はグランザイム B やパーフォリンなどのプロテアーゼを分泌し、がん細胞のアポトーシスを誘導する。[40] 脾臓は腸間膜リンパ節および大網と交通しており、腹腔から取り込まれた抗原に反応して、リンパ球を放出する。[41] 先行研究では、結腸がんのマウスに脾臓摘出術を行うと腸間膜の NK 細胞の数が減少する。[42] さらに脾臓リンパ球の機能を増強すると、結腸がんのマウスの腹膜播種が抑制される。[43] 腹膜播種が形成された 35日目の CP

マウス脾臓中の抗腫瘍細胞の減少は、LCHFD 群においてがんに対する抵抗力が弱まっていることを示唆している。

興味深いことに LCHFD 群の腹腔洗浄液中および腫瘍中で、免疫抑制に働く Treg が増加した。Treg は本来宿主の過剰な免疫反応を抑える代表的な免疫細胞である。[44]がん細胞は、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF- β) を分泌し、CD4⁺T 細胞を Treg へ分化させる。[45] 腫瘍周辺の Treg の増加と、Treg の分泌する IL-10 は、抗腫瘍に働く CTL や NK 細胞の機能を抑制し、結果的にがん細胞への攻撃を防ぐ。[46] 更にマクロファージにおいても、LCHFD 群の腹腔および脾臓では免疫抑制性に働く M2 優位の環境であった。多くのがん組織周辺の TAM は、がん細胞からの刺激により M2 に極性化して存在しており、IL-10、TGF- β などの分泌により宿主免疫や薬剤応答を抑制すると考えられている。[47] TAM は血管新生、がん細胞や Treg の浸潤、組織の再構築を促進することによって、がん細胞の増殖・転移に都合の良い環境を整える。近年の研究で、Treg の生存やマクロファージの M2 への極性化 (M1/M2 比の低下) に必要なエネルギーは、脂肪酸の酸化(Palmitate の細胞内取り込み増加)によって供給されることが示されているが、脂肪摂取量を増加させるだけで、これらの細胞が増加するという報告は無い。[48-51] しかし、がん細胞によって生じる炎症反応の中で、LCHFD ががん腫瘍中、腹腔洗浄液中の Treg 分化促進、M2 極性化を進めたと推

察される。いずれにしても、ラード強化の LCHFD 摂食によるがん増悪の機序は、慢性炎症と共に Treg や M2 による宿主免疫の抑制が大きく関与していると考えられる。これらの免疫細胞の変化が総合的にがん細胞に有利な環境となり、腹膜播種の進行と生存悪化につながった可能性がある。

今回我々が使用した、エネルギー比で 60%がラード由来の脂肪、20%炭水化物の餌は、動物の肥満モデル作成で一般的に使用されているものである。近年がんの治療と併用して、ケトン食や n-3 PUFA のエイコサペンタエン酸摂取の有効性が注目されている。KD は今回の LCHFD より高い脂肪含有量(エネルギー比 80~90%)であり、今回の結果が KD のがんに対する抑制効果を否定するものではない。[52, 53] また、PUFA はラードに大量に含まれる SFA・MUFA と比較して生理活性や炎症への影響が大きく異なるため、今回の結果を脂肪の種類が違う LCHFD に当てはめることはできない。[54] LCHFD でも脂肪の種類や割合により、Panc02 がんの進行に対する反応が変わる可能性があるため、脂肪の種類を変えた、さらなる研究が必要である。

5.低糖質高脂肪食の脂肪の種類が Panc02 がん性腹膜炎マウスの生存に及ぼす影響

5-1：背景と目的

ESPEN のがん患者に対する栄養療法のガイドラインでは、脂肪の摂取割合を増やすことを推奨する一方で、脂肪組成の違いが予後に及ぼす影響について、今後研究が必要であるとしている。[11] 先行研究では、摂取する脂肪の種類や、他の栄養素との割合が、がんの進行または抑制に関わると報告されている。[55]

脂肪酸の中では、n-3 PUFA の投与にがん細胞の増殖抑制効果があることが示されている。[56] また消化器がんの周術期においても、n-3 PUFA の術前投与が術後の合併症予防に有効であるという報告がある。

先行研究では、特に代謝酵素を同じとする必須脂肪酸の n-6 PUFA と n-3 PUFA の比が、炎症の制御に重要であるとされている。[57, 58] 我々は n-6:n-3=2.1:1 に調整した餌、n-6 PUFA を強化した餌 (n-6:n-3=7.0:1)、SFA・MUFA を強化した餌 (n-6:n-3=8.8:1) を作成し、CP マウスに自由摂食させて生存実験を行った。

5-2 : 対象と方法

5-2-1 : 対象

がんセルライン、マウス CP モデル作成は第 3 章と同様に行った。

餌は、米国リサーチダイエット社の高脂肪飼料を、EPS 益新株式会社を通じて購入した。第 3 章と同様にラードを強化した LCHFD であり、エネルギー比で 60%の脂肪を含む餌 (HF-L, cat. D12492, n-6/n-3=8.8) を基準として、他の栄養素は変えずに脂肪を大豆油強化 (HF-S, cat. D16092004, n-6/n-3=7.0)、あるいは魚油と大豆油を混合した餌(HF-F, cat. D16092003, n-6/n-3=2.1)を作成した。コントロール群はエネルギー比 10%の脂肪を含む餌を使用した。(ND, cat. D12450B) 詳細な栄養組成を表 4 に示す。また食事中に含まれるこれらの脂肪酸について表 5 に示した。

マウスを 4 群(ND 群、HF-F 群、HF-S 群、HF-L 群, n=10/群)に無作為に割り当て、実験開始時から各飼料を自由摂食させた。

5-2-2 : 各種低糖質高脂肪食の自由摂食と Panc02 がん性腹膜炎モデルマウスの生存

Panc02 マウス膵臓がん細胞は、継代を 3-5 回行った後に、食餌開始後 7 日目のマウス腹腔内に接種した。生存実験を第 3 章 2-3 の方法に準じて行った。

(n=40)

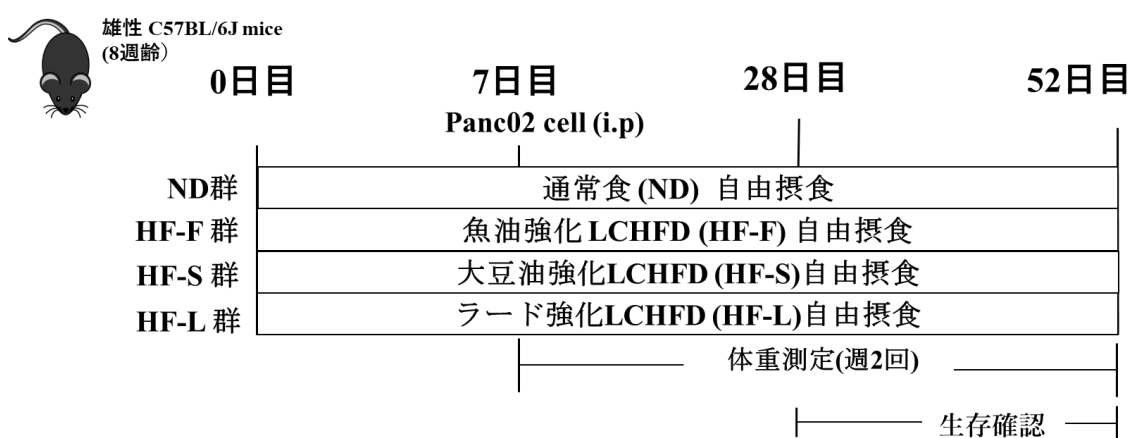


図 14 : 実験プロトコール

8 週齢雄性の C57BL/6J マウスを通常食群 (ND 群,脂肪 10%kcal)、魚油強化 LCHFD (HF-F) 群、大豆油強化 LCHFD (HF-S) 群、ラード強化 LCHFD (HF-L) 群 (いずれも脂肪 60%kcal)に分けた(n=10/群)。1 週間の給餌後、腹腔内にマウス Panc02 膵臓がん細胞を接種して生存実験を行った。

	ND	HF-F	HF-S	HF-L
カゼイン (g/kg)	200	200	200	200
L-シスチン (g/kg)	3	3	3	3
コーンスターチ (g/kg)	315			
マルトデキストリン (g/kg)	35	125	125	125
スクロース (g/kg)	350	68.8	68.8	68.8
セルロース (g/kg)	50	50	50	50
大豆油 (g/kg)	25	120	195	25
ラード (g/kg)	20	75	75	245
魚油 (g/kg)	0	75	0	0
ミネラルミックス (g/kg)	10	10	10	10
リン酸二カルシウム (g/kg)	13	13	13	13
炭酸カルシウム (g/kg)	5.5	5.5	5.5	5.5
クエン酸カリウム (g/kg)	16.5	16.5	16.5	16.5
ビタミンミックス (g/kg)	10	10	10	10
重酒炭酸コリン (g/kg)	2	2	2	2
たんぱく質 (%kcal)	20	20	20	20
炭水化物 (%kcal)	70	20	20	20
脂肪 (%kcal)	10	60	60	60
n-6系多価不飽和脂肪酸 (%)	1.4	29.1	42.3	15.2
n-3系多価不飽和脂肪酸 (%)	0.2	13.9	6.0	1.7
n-6/n-3比	7	2.1	7.0	8.8

表 4：栄養組成

5-2-3 : 統計学的検討法

本実験での値は全て平均±標準誤差で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 13 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。有意差は log-rank 検定で評価した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。

5-3 : 結果

各種 LCHFD を摂食したマウスは経時的に体重が増加し、開始後 7 日目から 32 日目まで、ND 群と比較して体重は高値を示した。(図 15) 期間を通しての平均エネルギー摂取量は、ND 群(10.4 ± 1.3 kcal/日)、HF-F 群 (14.4 ± 1.8 kcal/日)、HF-S 群 (13.2 ± 1.1 kcal/日)、 HF-L (15.7 ± 2.0 kcal/日)だった。実験開始後 28 日目以降は、HF-S 群と HF-L 群で体重減少が見られた一方で、HF-F 群では 36 日目においても他群と比較して有意に高値であった。

マウスの平均生存期間(日)は実験開始後から短い順に、HF-S 群 (41.0 ± 0.7 日), HF-L 群 (42.4 ± 0.5 日), HF-F 群 (44.5 ± 1.3 日), ND 群 (45.5 ± 1.3 日)であった。(図 16) HF-S 群と HF-L 群は HF-F 群あるいは ND 群と比較して、有意に生存時間が短縮した。(ND vs. HF-S $p=0.0026$, ND vs. HF-L $p=0.0097$, HF-F vs. HF-S $p=0.0079$, HF-F vs. HF-L $p=0.0027$)

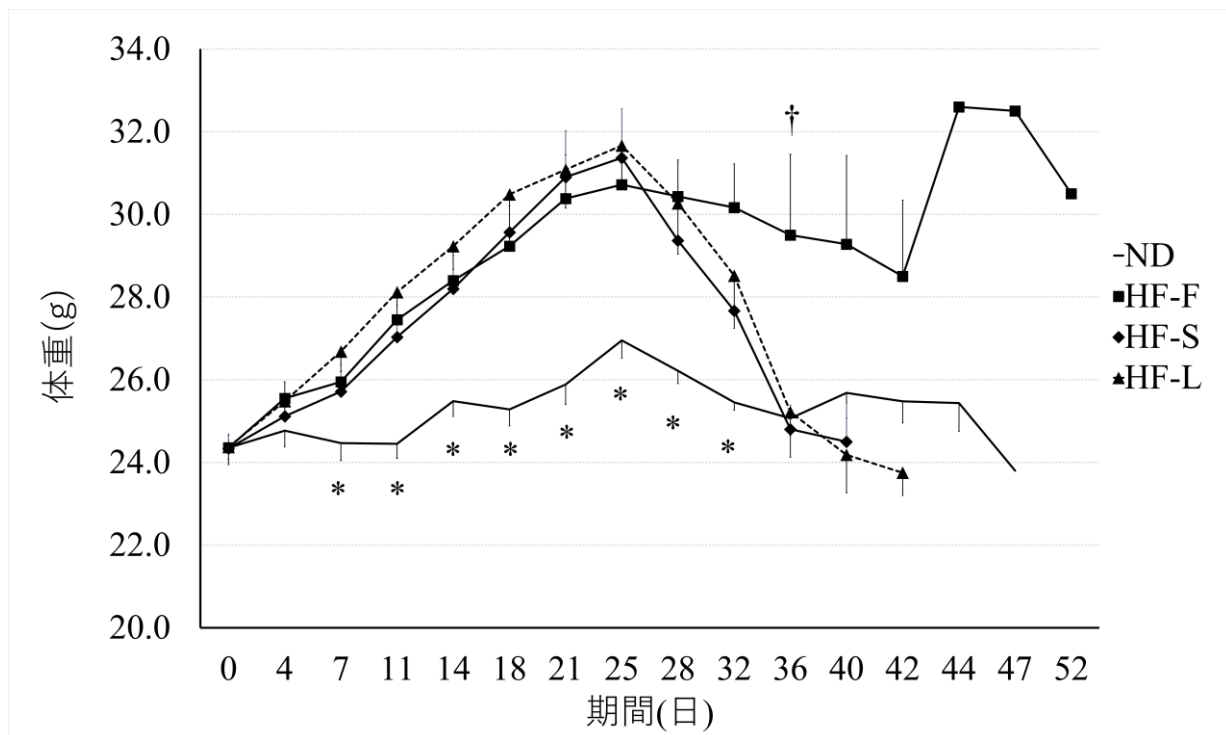


図 15：脂肪種別の LCHFD の自由摂食がマウスの体重変化に与える影響

体重は 7 日から 32 日目までの期間において、各種 LCHFD 群で ND 群より増加した。HF-F 群のみ 36 日目も体重が他群より高値であった。データは平均 ± 標準誤差、* $p < 0.05$ vs. HF-F, HF-S, HF-L, † $p < 0.05$ vs. ND, HF-S, HF-L (t-test)。

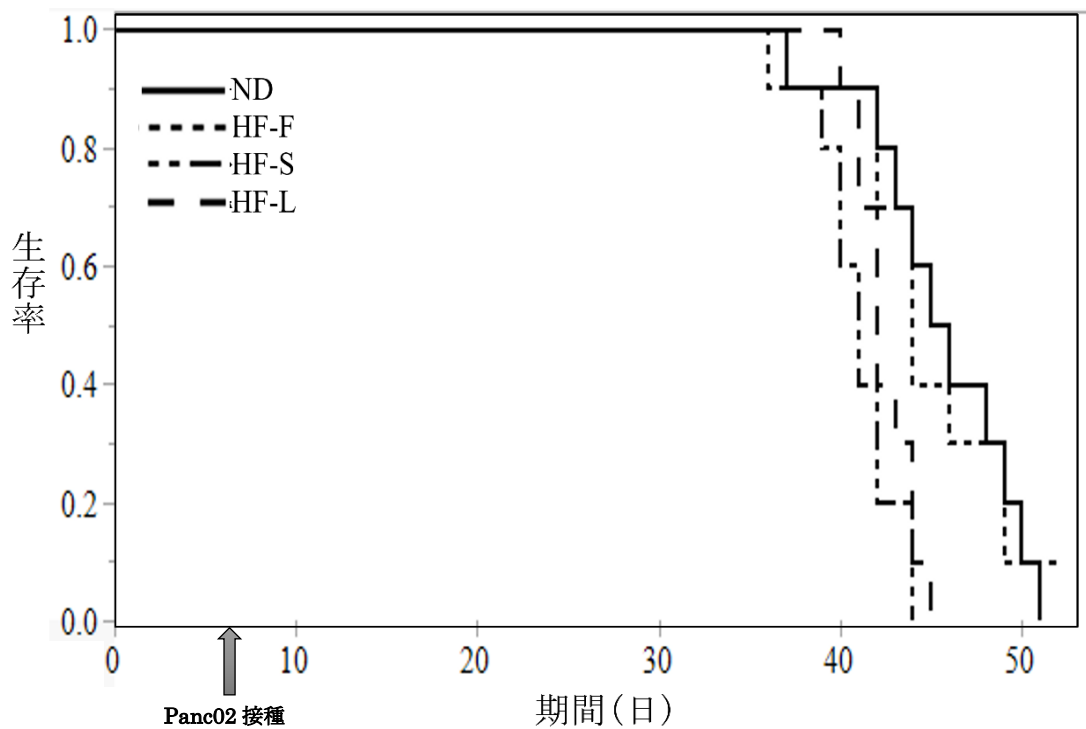


図 16：各種 LCHF の自由摂食が CP マウスの生存に与える影響

HF-S および HF-L 群は、ND および HF-F 群と比較して生存が悪化した。各食餌開始後 7 日目に Panc02 がん細胞を接種したマウスの平均生存期間（日）は実験開始後から短い順に、HF-S 群 (41.0 ± 0.7 日), HF-L 群 (42.4 ± 0.5 日), HF-F 群 (44.5 ± 1.3 日), ND 群 (45.5 ± 1.3 日)。(ND vs. HF-S $p=0.0026$, ND vs. HF-L $p=0.0097$, HF-F vs. HF-S $p=0.0079$, HF-F vs. HF-L $p=0.0027$, log-rank test)。

5-4: 考察及び小括

本検討により、同量の脂肪を含む LCHFD でも、強化する脂肪の種類によって、Panc02 がん性腹膜炎モデルマウスの生存に及ぼす影響が大きく異なることが明らかになった。

Panc02 を腹腔内接種したマウスモデルにラード強化の LCHFD(HF-L)あるいは、大豆油を強化した LCHFD (HF-S) を投与すると、ND や n-3 PUFA を強化した LCHFD (HF-F) を投与したマウスと比較して生存時間が短縮した。

6：低糖質高脂肪食の脂肪の種類が ID8 がん性腹膜炎マウスの生存に及ぼす

影響

6-1：背景と目的

5章の実験結果から、LCHFDで摂取する脂肪の種類がマウス Panc02 がん性腹膜炎モデルの生存に影響することが示唆された。これが Panc02 膵臓がんモデル以外でも同様に起こるかを検討するため、マウス卵巣がん細胞 ID8 を用いてがん性腹膜炎モデルを作成し、同様の生存実験を行った。

6-2: 対象と方法

6-2-1 : マウス ID8 がん性腹膜炎モデルの作成

Panc02 がん細胞以外のセルラインでも、各種 LCHFD 摂食が生存に同様の効果を及ぼすかを確認するため、マウス卵巣がん細胞を用いて生存実験を行った。ID8 マウス卵巣がん細胞は、東京大学医学部附属病院女性診療科・産科より提供され、コラーゲン I コートディッシュ(IWAKI)を用いて培養した。マウスの飼育環境、手技、プロトコール、使用した薬品や実験器具は第 5 章 1-2-1 と同様に行った。

卵巣がんのがん性腹膜炎モデルマウス作成のため、雌性の 7 週齢 C57/BL6J マウス (n=56) を購入した。1 週間の馴化期間を与えた後にランダムに 4 群に分け、各餌を開始した。(n=14/群)

6-2-2 : 各種低糖質高脂肪食の自由摂食と ID8 がん性腹膜炎モデルマウスの生存

餌開始後 7 日目に、各マウスの腹腔内に 3×10^6 個の卵巣がん細胞を 100 μ l の PBS に溶解し投与した。(図 17) 生存実験を第 3 章 2-3 の方法に準じて行った。

6-2-3 : 統計学的検討法

本実験での値は全て平均±標準誤差で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 13 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。有意差は log-rank 検定で評価した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。

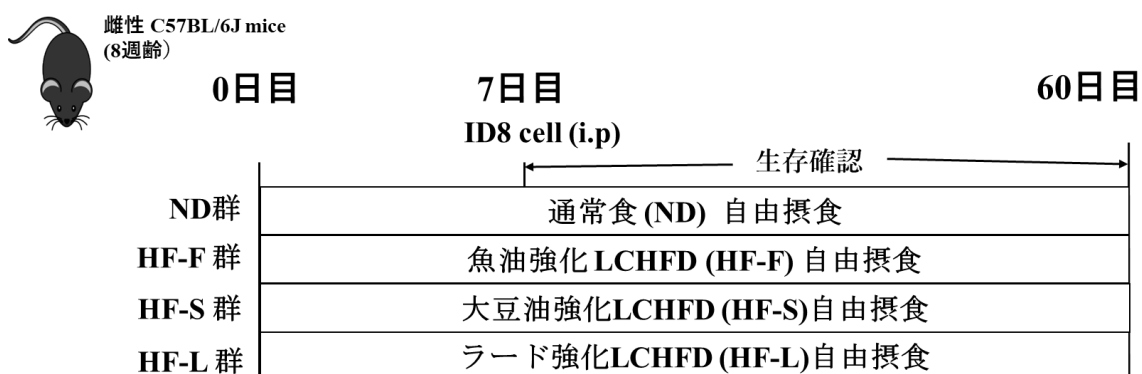


図 17 : 実験プロトコール

8 週齢雌性の C57BL/6J マウス(n=14/群)を通常食群 (ND 群,脂肪 10%kcal)、魚油強化 LCHFD (HF-F) 群、大豆油強化 LCHFD (HF-S) 群、ラード強化 LCHFD (HF-L) 群 (いずれも脂肪 60%kcal)に分けた。1 週間の給餌後、腹腔内にマウス ID8 卵巣がん細胞を接種して生存実験を行った。

6-3 結果

ID8 卵巣がん細胞を腹腔内接種した雌マウスの平均生存期間（日）は、実験開始後から短い順に、HF-S 群 (53.8 ± 0.9), HF-L 群 (54.9 ± 0.9), HF-F 群 (58.6 ± 0.7), ND 群 (59.4 ± 1.1)であった。(図 18) Panc02CP マウスの生存実験と同様に、HF-S 群と HF-L 群は HF-F 群あるいは ND 群と比較して、生存時間が短縮した。(ND vs. HF-S $p=0.0003$, ND vs. HF-L $p=0.0045$, HF-F vs. HF-S $p=0.0004$, HF-F vs. HF-L $p=0.0113$)

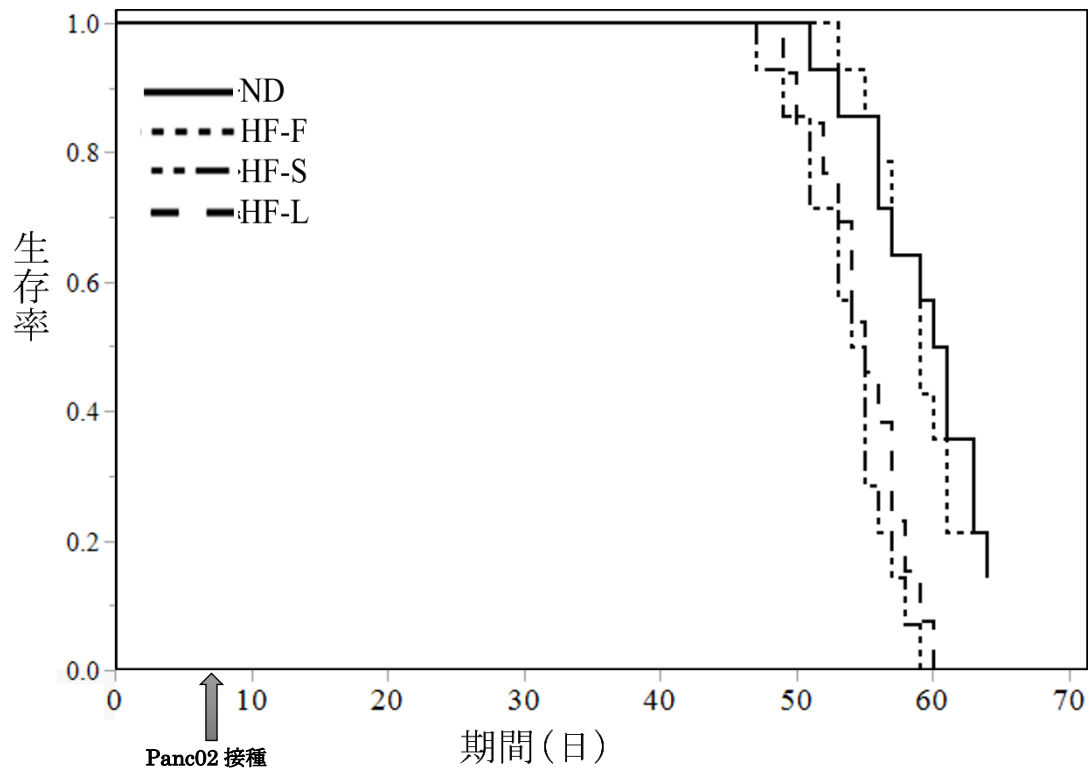


図 18 : 各種 LCHFD の自由摂食が ID8 CP マウスの生存に与える影響

各食餌開始後 7 日目に、ID8 卵巣がん細胞を接種し CP モデルを作成した。HF-S および HF-L 群は、ND および HF-F 群と比較して ID8 マウス CP モデルの生存を悪化させた。マウスの平均生存期間 (日) は実験開始後から短い順に、HF-S 群 (53.8 ± 0.9), HF-L 群 (54.9 ± 0.9), HF-F 群 (58.6 ± 0.7), ND 群 (59.4 ± 1.1)。 (ND vs. HF-S $p=0.0003$, ND vs. HF-L $p=0.0045$, HF-F vs. HF-S $p=0.0004$, HF-F vs. HF-L $p=0.0113$, log-rank test)

6-4: 考察及び小括

マウス卵巣がんの ID8 細胞を用いて作成したマウス CP モデルにおいても、生存実験で Panc02 モデルと同様に HF-L 群および HF-S 群で ND、HF-F 群と比較して生存が悪化した。LCHFD の影響が Panc02 膵臓がん特有のものではないと推察された。

次に我々は第 4 章の実験と同様に、宿主の炎症や免疫細胞、更に腹膜播種の増悪に、脂肪の種類を変えた LCHFD が与える影響について検討を行うこととした。

7. 低糖質高脂肪食の脂肪の種類ががん性腹膜炎マウスの生体反応に及ぼす影響

7-1 : 背景と目的

第5章、第6章の実験で、摂取する脂肪の種類の違いががん性腹膜炎マウスの生存に影響を及ぼすことが示された。脂肪は細胞膜の重要な構成成分であり、摂取する脂肪の違いによって様々な炎症反応、免疫反応が修飾されることが明らかになっている。[59, 60] 実際に n-3 PUFA の摂取が、抗炎症作用を通じてがん細胞の増殖を阻害し、n-6 PUFA の摂取は炎症促進性サイトカインの分泌を増加させて、がん増悪に関わることが先行研究で報告されている。[61, 62]

我々は脂肪の種類を変えた LCHFD が、Panc02 マウス CP モデルの炎症性・抗炎症性サイトカイン、その産生を制御するシグナルたんぱく質、ホルモン、がん免疫に関わる免疫細胞の数と機能に及ぼす影響を評価した。

7-2 : 対象と方法

7-2-1 : 対象

がんセルライン、マウス CP モデル作成は第 5 章と同様に行った。(図 19)

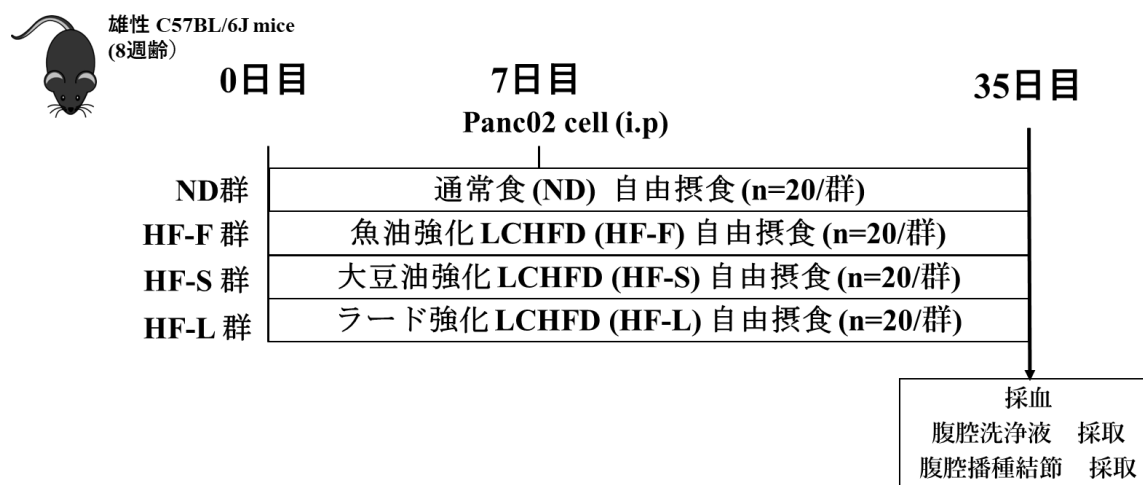


図 19 : 実験プロトコール

8 週齢雄性(Panc02 接種)の C57BL/6J マウスを通常食群 (ND 群,脂肪 10% kcal)、魚油強化 LCHFD (HF-F) 群、大豆油強化 LCHFD (HF-S) 群、ラード強化 LCHFD (HF-L) 群 (いずれも脂肪 60%kcal)に分けた。1 週間の給餌後、腹腔内にマウス Panc02 膵臓がん細胞を接種した。マウスを 35 日目に犠死せしめ、血液・腹腔洗浄液と視認できる播種腫瘤を全て回収した。

7-2-2 : 血液・腹腔洗浄液・腹腔内腫瘍の回収と腫瘍重量の評価

実験開始後 35 日目に、各種餌を与えた Panc02CP マウス (n=80) を第 4 章 2-1 の方法に準じて犠死せしめた。血液の採取は麻酔後心腔穿刺にて行い、ヘパリン全血検体を遠心分離 (4 °C、10 分間、3000 rpm) し、その上清を-80 °Cにて凍結保存した。

マウス腹腔内に 5%FBS 添加 PBS 溶液を 2 ml 注入し、指で腹部を 1 分間マッサージ後、開腹して腹腔洗浄液を回収した。腹腔洗浄液を 40 µm メッシュにて濾過後、遠心分離 (4 °C、10 分間、3000 rpm) し、上清を採取して-80 °Cで保存した。

開腹した後、腹腔内の視認できる全ての腫瘍を採取し、総重量を測定した。その後採取した全ての腫瘍をシャーレ内で細かく細切し、0.5g を腫瘍浸潤免疫細胞の評価に用いた。残りの腫瘍は-80 °Cで保存した。

7-2-3 : 腹腔内・血漿サイトカインレベルの評価

腹腔洗浄液中および血漿中のサイトカインレベルを第 4 章 2-2 の方法に準じて測定した。血漿および腹腔洗浄液は、測定直前に室温解凍した。測定項目は第 4 章で評価した IL-6、MCP-1、TNF α 、IL-10 に加えて、インターロイキン-12p70 (IL-12p70) とインターフェロン γ (IFN- γ) を追加した。

7-2-4 : 腹腔洗浄液中・腫瘍の免疫細胞の測定

第4章 2-3の方法に準じて、免疫細胞を測定した。また追加項目として、免疫寛容のマーカーである抗 Programmed death receptor-1 (PD-1)抗体(phycoerythrin-anti-PD-1 (clone J43; cat. 12998582, Invitrogen, CA)を用いて、CD8⁺T細胞上のPD-1免疫チェックポイント受容体を測定した。

7-2-5 : 血漿アディポネクチンレベルの評価

各群 n=20 からランダムに選んだ10個の検体について、アディポネクチンレベルを、マウス/ラットアディポネクチンキット(大塚製薬)を使用して測定した。

7-2-6 : 血漿のケトン体レベルの評価

各群 n=20 からランダムに選んだ10個の検体について、ケトン体の一種である、 β -ヒドロキシ酪酸 (β -Hydroxybutyric acid, BHB) の濃度を、キット(cat. K632, β -Hydroxybutyrate Colorimetric Assay Kit, BioVision)を用いてELISA法にて測定した。

7-2-7：がん細胞増殖に関わるシグナル経路・転写因子の測定

がんの増殖に関わるシグナルおよび転写因子についてウェスタンブロッティング法にて調べた。第7章 2-2 で凍結した腫瘍 60mg(n=8-10/群)を RIPA バッファー (Pierce™ RIPA Buffer, cat. 89900, Thermo Scientific™) とプロテアーゼインヒビター (cOmplete™ Protease inhibitor cocktail tablets, cat.11697498001, Roche) を混合した溶液に溶かし、氷上でホモジナイザーにて攪拌後、30 分静置した。遠心分離後 (13000 g, 20 min, 4 °C) 上清を回収し、腫瘍ライセート液とした。タンパク質の定量は、Quick Start プロテインアッセイキット用希釈済みタンパク質濃度スタンダード(cat. 5000206, Bio-Rad)を用いて ELISA 法で測定した。

サンプルバッファーの調整は、Laemmli Sample Buffer 4x(cat.161-0747, Bio-Rad)、2-メルカプトエタノール(cat.1071172, Bio-Rad)と混合後、95 °Cで 5 分加熱して作成した。ゲル(Mini-PROTEAN® TGX™ Gels, cat.456-1083, Bio-Rad)を用いて、ウェルに各サンプルをたんぱく質 50 μg になるように入れ、SDS-PAGE を行った(Tris/Glycine/ SDS Buffer, cat. 1610732, Bio-Rad)。SDS-PAGE 後、PVDF メンブレン (Immun-Blot® PVDF Membrane, cat.1620174, Bio-Rad) に転写した (Tris/Glycine/ Buffer, cat.1610734, Bio-Rad)。その後カゼイン入ブロッキング剤 (1×Tris Buffer Saline 1% Casein Blocker, cat.16107821, Bio-Rad)で 2 時間反応後、各一次抗体をオーバーナイト (4 °C) で反応させた。翌日に Tris Buffer Saline

(cat. 1706435, Bio-Rad)を用いて洗浄作業（10分×3回）を行った後、二次抗体（Goat anti Mouse IgG (H/L):HRP, cat. STAR207P Bio-Rad）を45分反応させた。洗浄作業（10分×3回）を行った後、ECL発光液をかけて（Clarity™ Western ECL Substrate, cat.170-5060, Bio-Rad）、ChemiDoc XRS Plus（Bio-Rad）にて測定した。

使用した一次抗体として、抗NF- κ B p65 (cat. ab16502, abcam)、抗シクロオキシゲナゼ-2(COX-2) (cat. 12375-1-AP, Proteintech)、抗低酸素誘導因子 1 α (HIF-1 α , cat. H1alpha67, abcam)、血管内皮増殖因子受容体 2(VEGFR2, cat. ab39256, abcam)、抗Akt (Akt1/2/3, cat. sc-81434, Santa cruz)、抗リン酸化Akt (phospho-Akt1/2/3, cat.sc-81433, Santa cruz)、抗細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) (ERK1/2, cat. 16443-1-AP, proteintech)、抗リン酸化ERK(Phospho-p44/42 Erk1/2, cat. 9101, Cell signaling)、抗Jun-N末端キナーゼ(JNK) (cat. sc-7345, Santa cruz)、抗リン酸化JNK (p-JNK, cat. sc-6254, Santa cruz)を用いた。ハウスキーピングたんぱく質のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)の測定は Mouse anti GAPDH (cat.VMA00046, Bio-Rad)を用いた。

7-2-8 : 統計学的検討法

本実験での値は全て平均±標準誤差で表し、統計ソフトは Windows 用の JMP Pro 13 (SAS Institute Japan Ltd, Japan)を使用した。P 値は 0.05 未満にて有意差があるとした。4 群間の比較は ANOVA 検定および Kruskal-Wallis の検定を用いて行った。Post hoc test はペアごとの t-test(ANOVA) および Wilcoxon の順位和検定 (Kruskal-Wallis)を用いて行った。

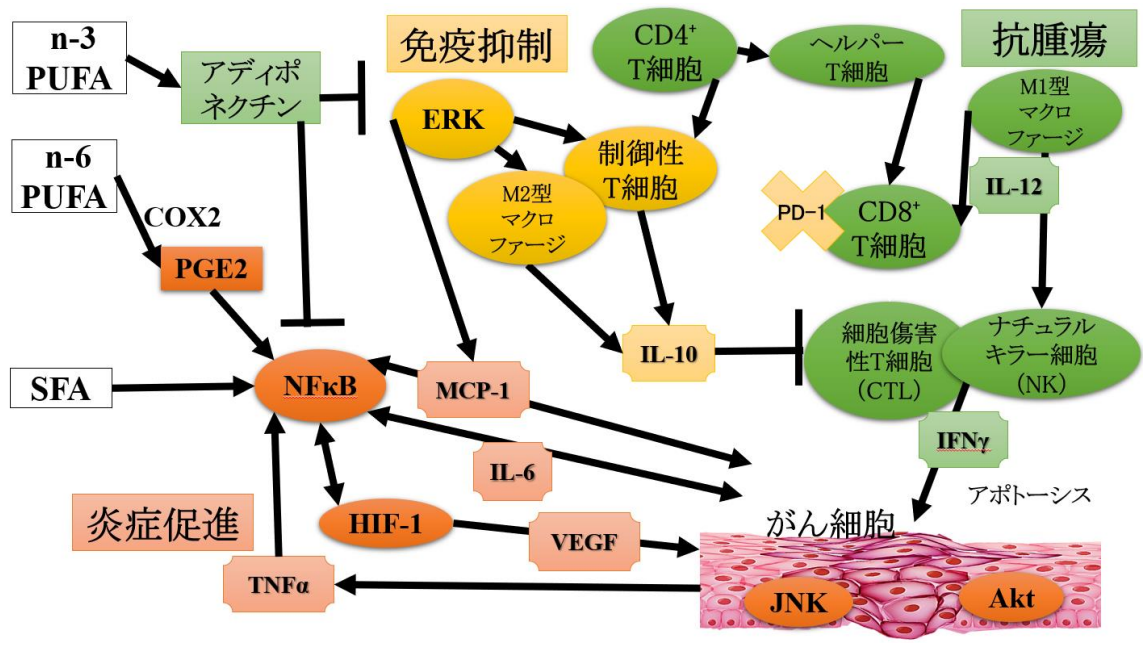


図 20 : 評価項目

7-3 : 結果

7-3-1 : 腹腔内腫瘍重量の評価

35 日目の腹膜播種が形成されたマウスの腹腔から、視認できる腫瘍を採取して個体ごとに重量を評価した。(図 21) 腫瘍総重量は、HF-F 群が他の 3 群(ND、HF-S、HF-L)よりも有意に低値を示した。HF-L 群は ND 群と比べても有意に高値であった。

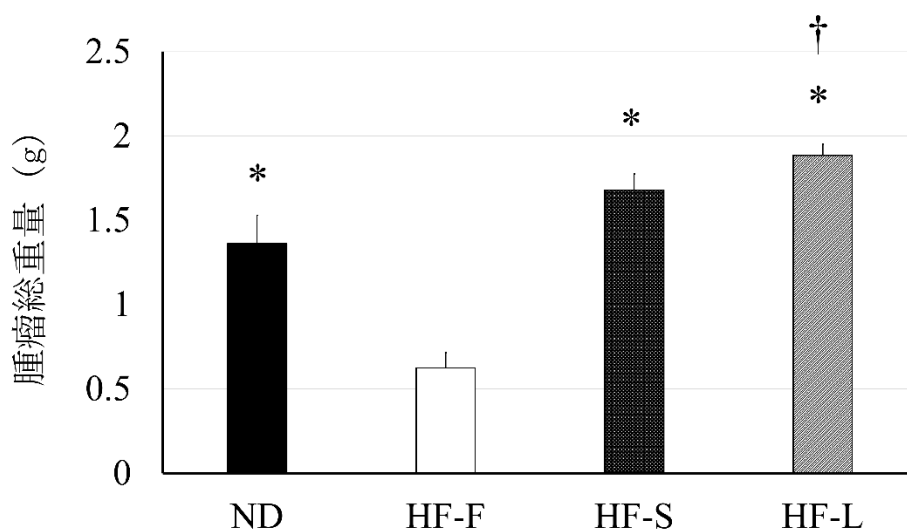


図 21 : 各種 LCHFD の自由摂食が CP マウスの腫瘍重量に与える影響

ND と脂肪の種類を変えた LCHFD(魚油・大豆油・ラード)を摂食したマウスの、35 日目における腹腔内腫瘍の重量は、ND 群と比較して HF-L 群で増加した。HF-F 群は他群と比較して有意に腫瘍の成長が抑制された。データは平均±標準誤差、*P<0.05 vs. HF-F、†P<0.05 vs. ND (ANOVA)。

7-3-2 : 腹腔洗浄液中・血漿中サイトカインレベルの評価

腹膜播種の形成された CP マウスの腹腔洗浄液中では、抗腫瘍性に働く IL-12p70 と IFN- γ レベルが、HF-S 群で他の 3 群と比較して低値を示した。(図 22 (a)(b)) 腫瘍促進性に働く IL-6 レベルは、腹腔洗浄液中では、HF-F 群において HF-S、HF-L 群と比較して低値を示した。(図 22 (c)) 炎症を増強する MCP-1 レベルは、腹腔洗浄液中では HF-F 群で、ND 群と HF-S 群と比較して低値であった。(図 22 (d))

一方で血漿中のサイトカインレベルは、IL-12p70 と IFN- γ レベルが、HF-F 群で他の 3 群と比較して高値を示した。(図 23 (a)(b)) IL-6 のレベルは ND および HF-F 群と比較して HF-S、HF-L 群で高い傾向が見られたが、統計的有意差には至らなかった($p=0.09$)。(図 23 (c)) MCP-1 レベルは HF-F 群で、HF-L 群と比較して低値を示した。(図 23 (d))

なお、炎症性サイトカインである TNF α および抗炎症性サイトカインである IL-10 は、腹腔洗浄液中・血漿共に 4 群間で有意差は認められなかった。(図 22 (e)(f)、図 23 (e)(f))

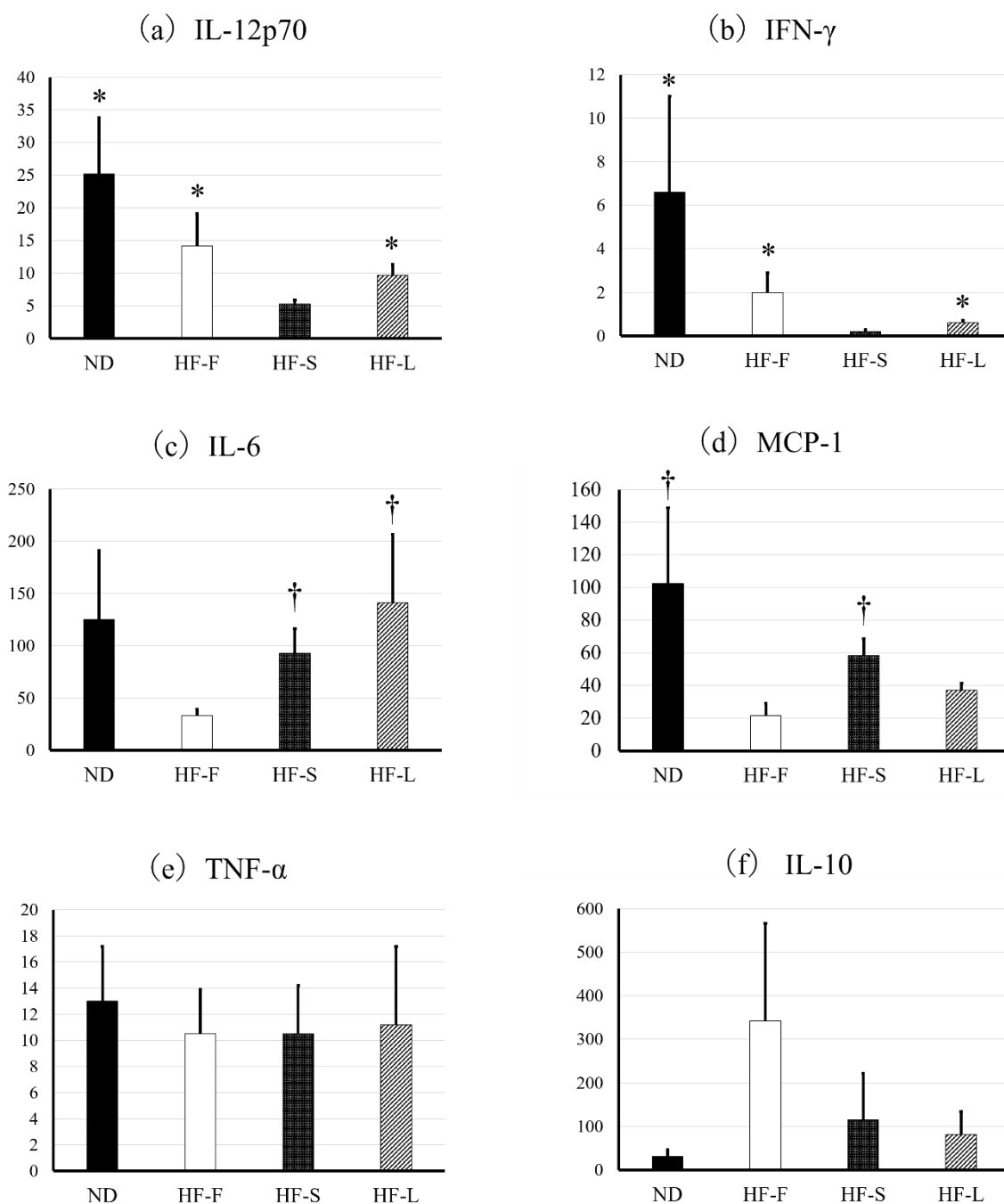


図 22：各種 LCHFD の自由摂食が CP マウスの腹腔洗浄液中のサイトカインレベルに与える影響

腹腔洗浄液中のサイトカインレベル (a)IL-12p70 (b)IFN-γ (c)IL-6 (d)MCP-1 (e)TNFα (f)IL-10 (pg/ml) を、ND と脂肪の種類を変えた LCHFD (魚油・大豆油・ラード) を摂食したマウスで評価した。データは平均±標準誤差、*p<0.05 vs. HF-S, †p<0.05 vs. HF-F (Kruskal-Wallis rank sum test)。

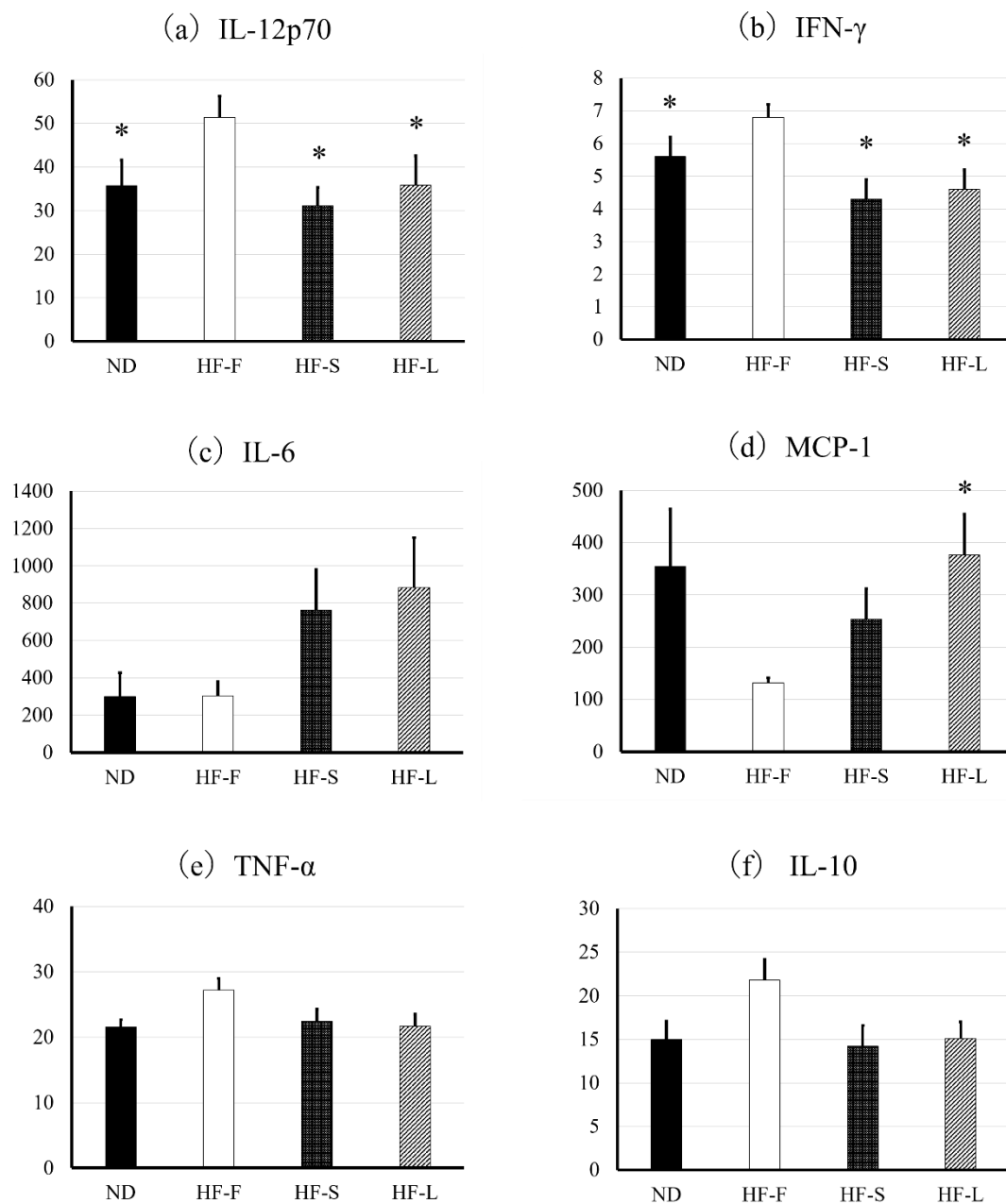


図 23 : 各種 LCHF の自由摂食が CP マウスの血漿中のサイトカインレベルに与える影響

血漿中サイトカインレベル(a)IL-12p70 (b)IFN- γ (c)IL-6 (d)MCP-1 (e) TNF α (f) IL-10 (pg/ml)を、ND と脂肪の種類を変えた LCHF(魚油・大豆油・ラード) を摂食したマウスで評価した。データは平均 \pm 標準誤差、* $p < 0.05$ vs. HF-F (Kruskal-Wallis rank sum test)。

7-3-3：腹腔洗浄液中・腫瘍中の免疫細胞の測定

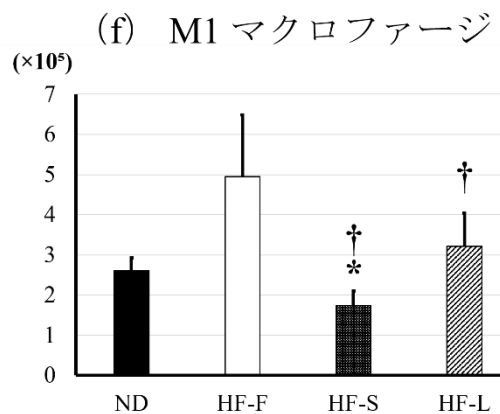
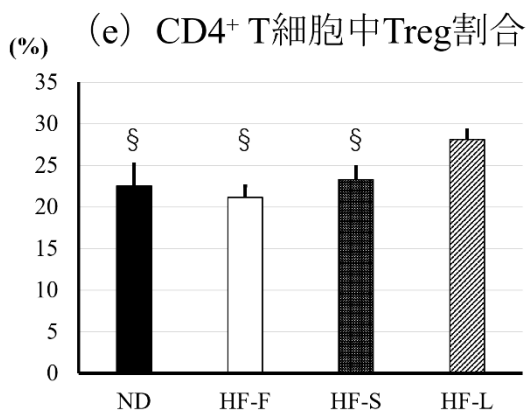
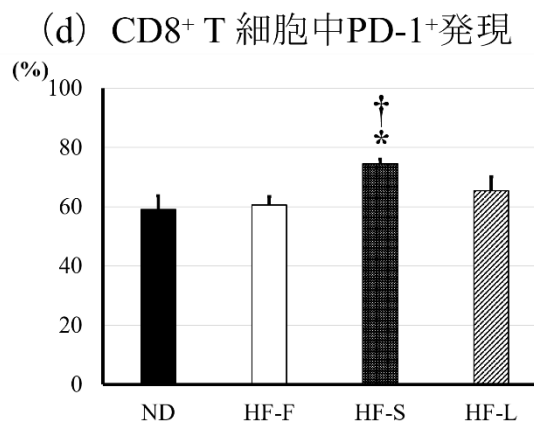
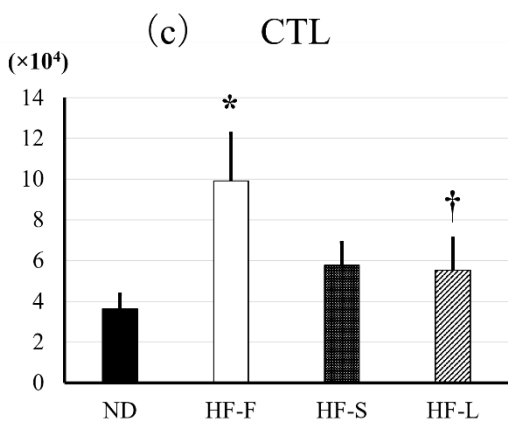
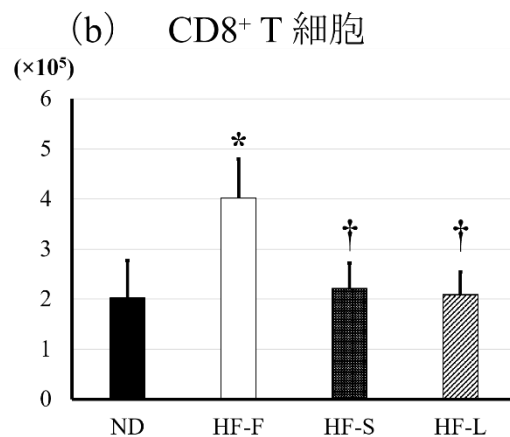
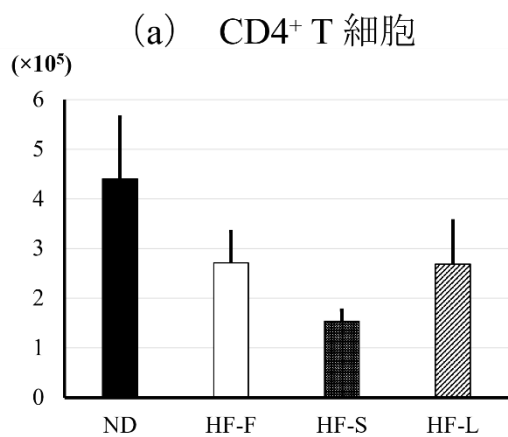
各種 LCHFD 摂食が免疫細胞に与える影響を見るため、まず抗腫瘍性に働く免疫細胞として CD8⁺T 細胞および CTL、NK 細胞数を腹腔洗浄液中、腹腔のがん腫瘍中で評価した。CD8⁺T 細胞数は、腹腔洗浄液中および腫瘍中で、HF-F 群で他群より高値を示した。(図 24 (b), 図 25 (b)) 腹腔洗浄液中の CTL 数も、HF-F 群で ND 群および HF-L 群と比較して高値であった。(図 24 (c), 図 25 (c))

次に、免疫抑制のマーカーである CD8⁺T 細胞上 PD-1 受容体の発現割合と、CD4⁺T 細胞中の Treg 割合を評価した。PD-1 受容体の発現割合は、腹腔洗浄液中では HF-S 群で ND および HF-F 群と比較して高値を示した一方で、腫瘍中では HF-F 群で ND 群および HF-S 群より低値を示した。(図 24 (d), 図 25 (d)) 一方で Treg 割合は HF-L 群が、腹腔洗浄液中で他群と比較して高値となったが、腫瘍中では差はみられなかった。(図 24 (e), 図 25 (f))

NK 細胞は、腹腔洗浄液中はどの群でも数が非常に少なく、群間差も無かったが、腫瘍中では HF-S 群で ND 群および HF-F 群より低値であった。(図 25 (e))

マクロファージは、M1 型の数が腹腔洗浄液中では HF-F 群で他の LCHFD 群 (HF-S 群、HF-L 群) と比較して高値であった。(図 24 (f), 図 25 (g)) 一方で M2 型のマクロファージ数は、腫瘍中は HF-F 群で他の LCHFD 群より低値であった。(図 24 (g), 図 25 (h)) マウス個体ごとの M1/M2 比は、腹腔洗浄液中と腫

瘤中の両方において HF-S, HF-L 群で 0.6 前後であり、ND 群や HF-F 群と比較して低値であった。(図 24 (h), 図 25 (i))



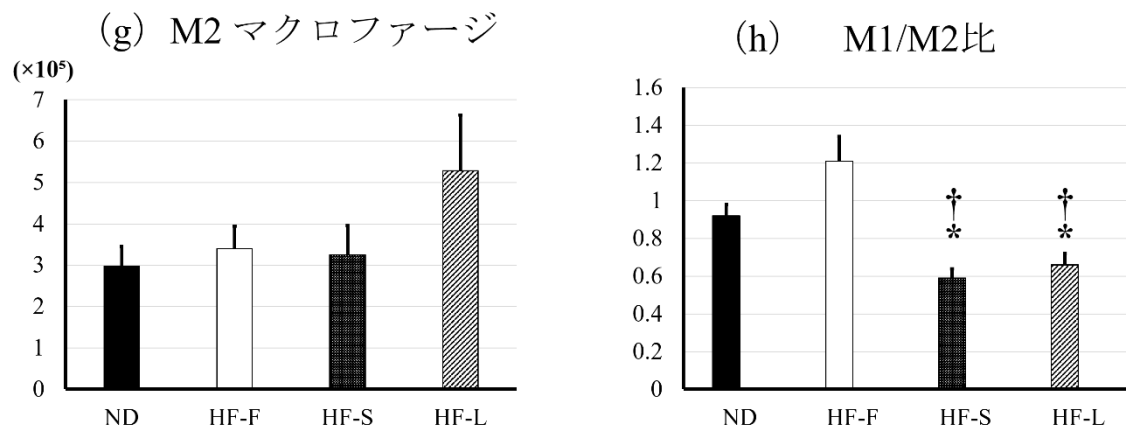
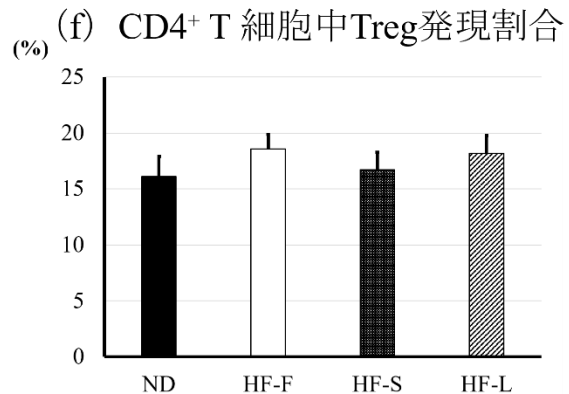
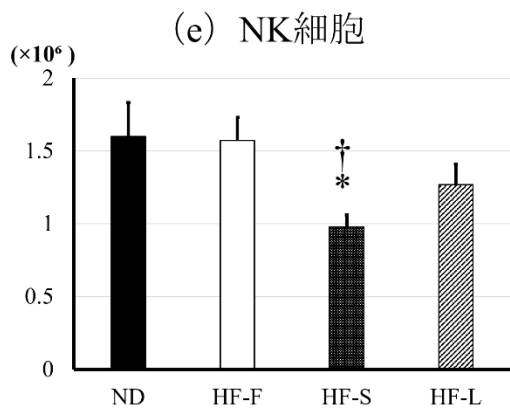
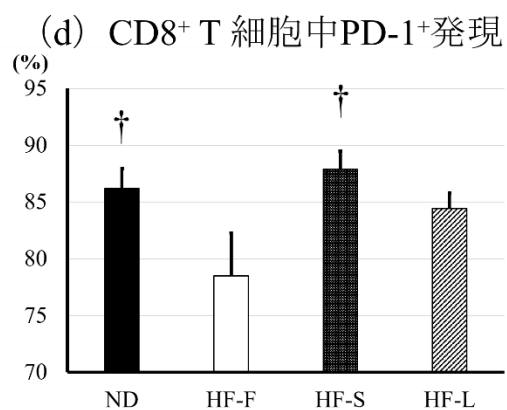
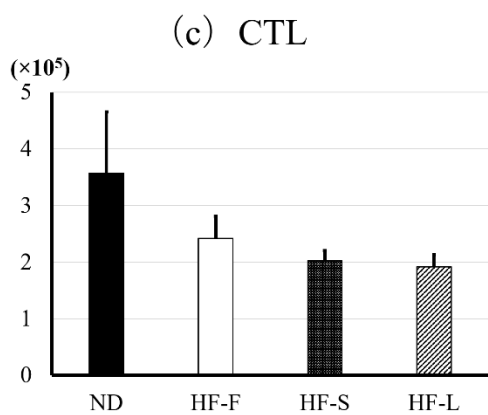
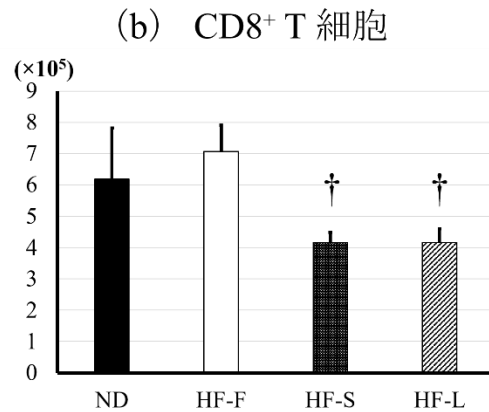
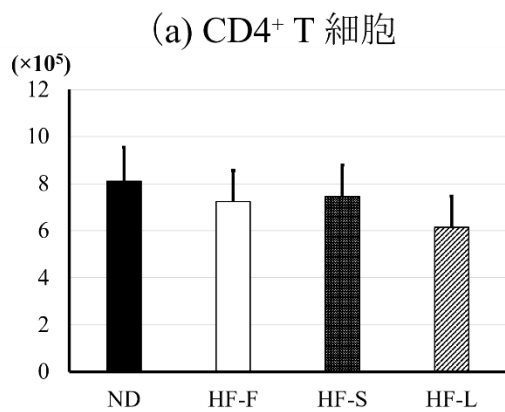


図 24 : 各種 LCHF の自由摂食が CP マウスの腹腔洗浄液中の免疫細胞に与える影響

マウス腹腔洗浄液中の、生体反応に関わる免疫細胞およびマクロファージの数と割合を、ND 群と脂肪の種類を変えた LCHF(魚油・大豆油・ラード)群で評価した。データは平均±標準誤差, *p<0.05 vs. ND, † p<0.05 vs. HF-F, §p<0.05 vs. HF-L, (Kruskal-Wallis rank sum test)。



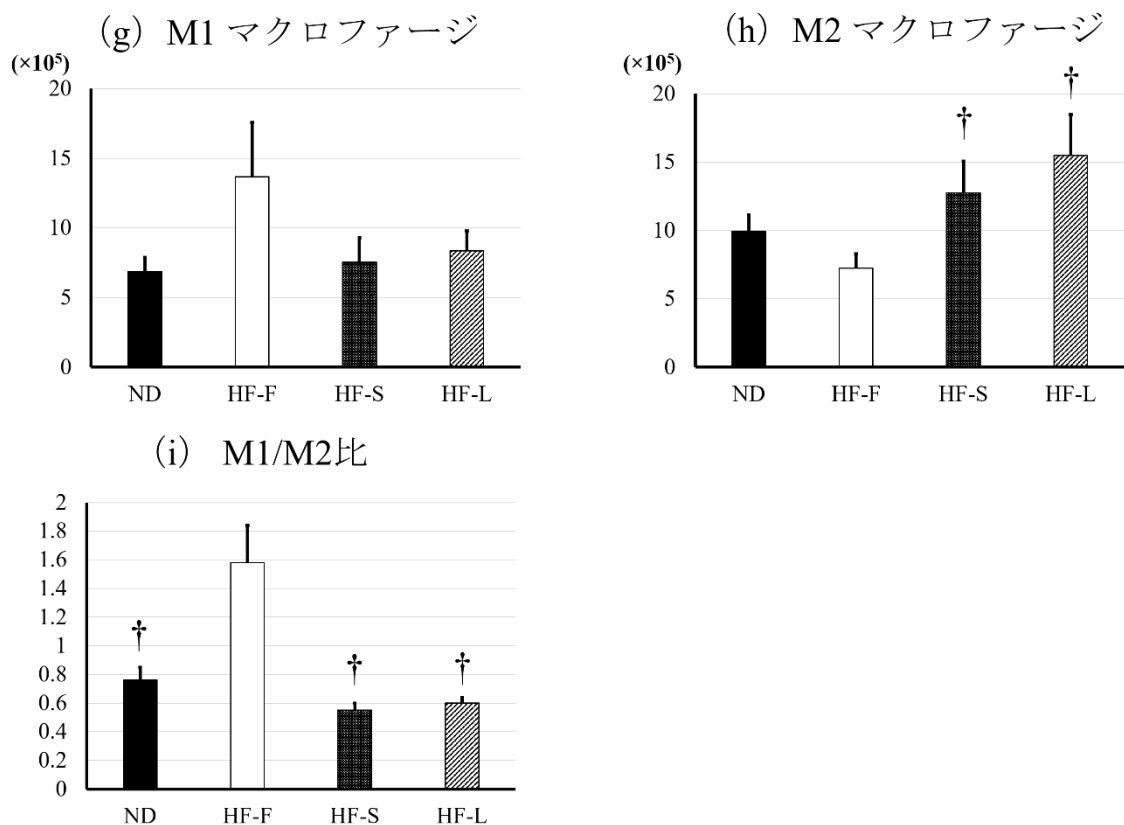


図 25 : 各種 LCHFD の自由摂食が CP マウスの腫瘍中の免疫細胞に与える影響

マウス腫瘍中の、免疫細胞およびマクロファージの数と割合を、ND 群と脂肪の種類を変えた LCHFD(魚油・大豆油・ラード)群で評価した。データは平均±標準誤差, * $p < 0.05$ vs. ND, † $p < 0.05$ vs. HF-F, (Kruskal-Wallis rank sum test)。

7-3-4：血漿アディポネクチンレベルの評価

各種 LCHFD を開始して 35 日目の血漿中のアディポネクチン濃度は、HF-F 群において他 3 群と比較して高値であった。(図 26)

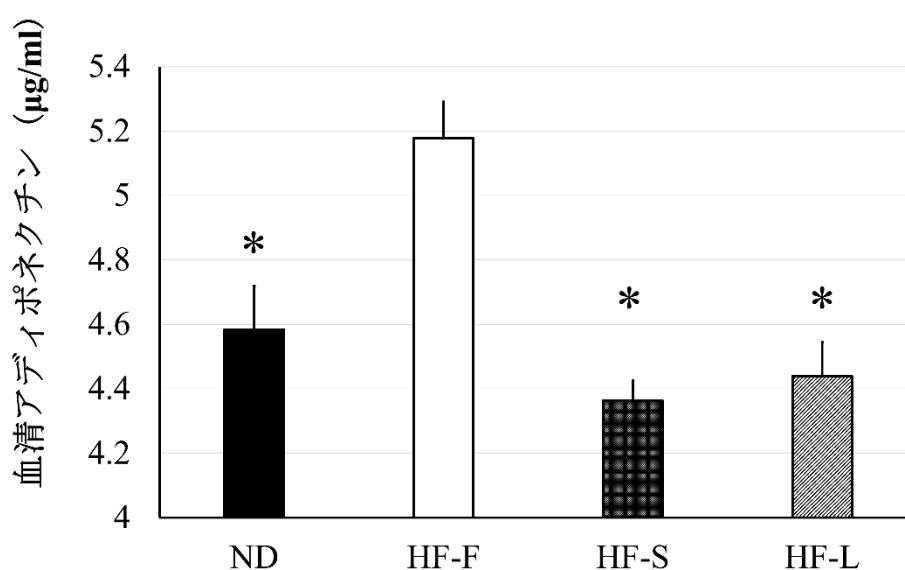


図 26：各種 LCHFD を自由摂食した CP マウスの血漿アディポネクチン
ND および各種 LCHFD (魚油・大豆油・ラード)を 35 日間摂食させた CP マウスの血漿アディポネクチン濃度は、HF-F 群で他 3 群と比較して高値を示した。データは平均±標準誤差、* $p < 0.01$ vs. HF-F, (Kruskal-Wallis rank sum test)。

7-3-5：血漿ケトン体レベルの評価

我々の使用した LCHFD の影響が、ケトン食でみられるような高ケトン症 (BHB > 1mM 以上) を引き超すことによって惹起されているのか否かを調べるために、血漿ケトン体レベルを測定した。高ケトン症の主な指標として使われている、血中のケトン体 BHB 濃度は、HF-L 群で ND 群、HF-S 群と比較して有意に高値であったが、1mM 以上には至らなかった。(図 27)

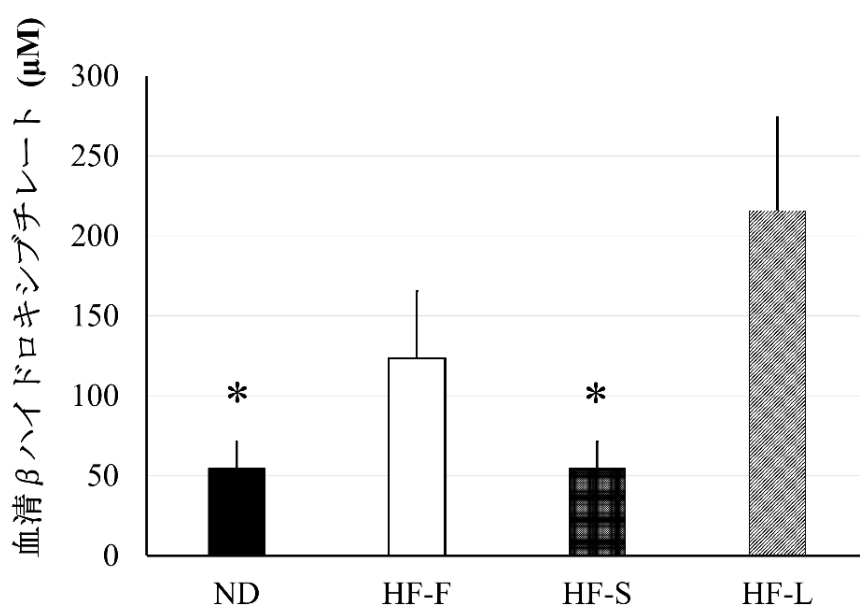


図 27：各種 LCHFD を自由摂食した CP マウスの血漿ケトン体濃度

ND および各種 LCHFD(魚油・大豆油・ラード)を 35 日間摂食させた CP マウスの血漿βヒドロキシブチレート濃度(BHB)は、HF-L 群で ND 群および HF-S 群と比較して高値を示した。データは平均±標準誤差、* $p < 0.05$ vs. HF-L, (Kruskal-Wallis rank sum test)。

7-3-6：がん増殖に関わるシグナル経路・転写因子の評価

がん細胞の増殖や生存に関わるシグナル伝達経路として代表的である、

PI3K-Akt-mTOR 経路の Akt と、MAPK 経路のシグナルたんぱく質である

ERK1/2 と JNK のリン酸化割合を評価した。[63, 64] 腫瘍中の Akt リン酸化割

合は、ND 群と比較して LCHFD の 3 群で高く、特に HF-S 群で有意差を示し

た。(図 28 (a)) その一方で MAPK 経路においては、ERK1/2 のリン酸化割合が

HF-F 群で他の 3 群より低値であった。(図 28 (b)) JNK のリン酸化割合は 4 群間

で有意差は認められなかった。(図 28 (c))

次に、腫瘍形成およびがんの進行に関わる転写因子である、COX-2、NF κ B、

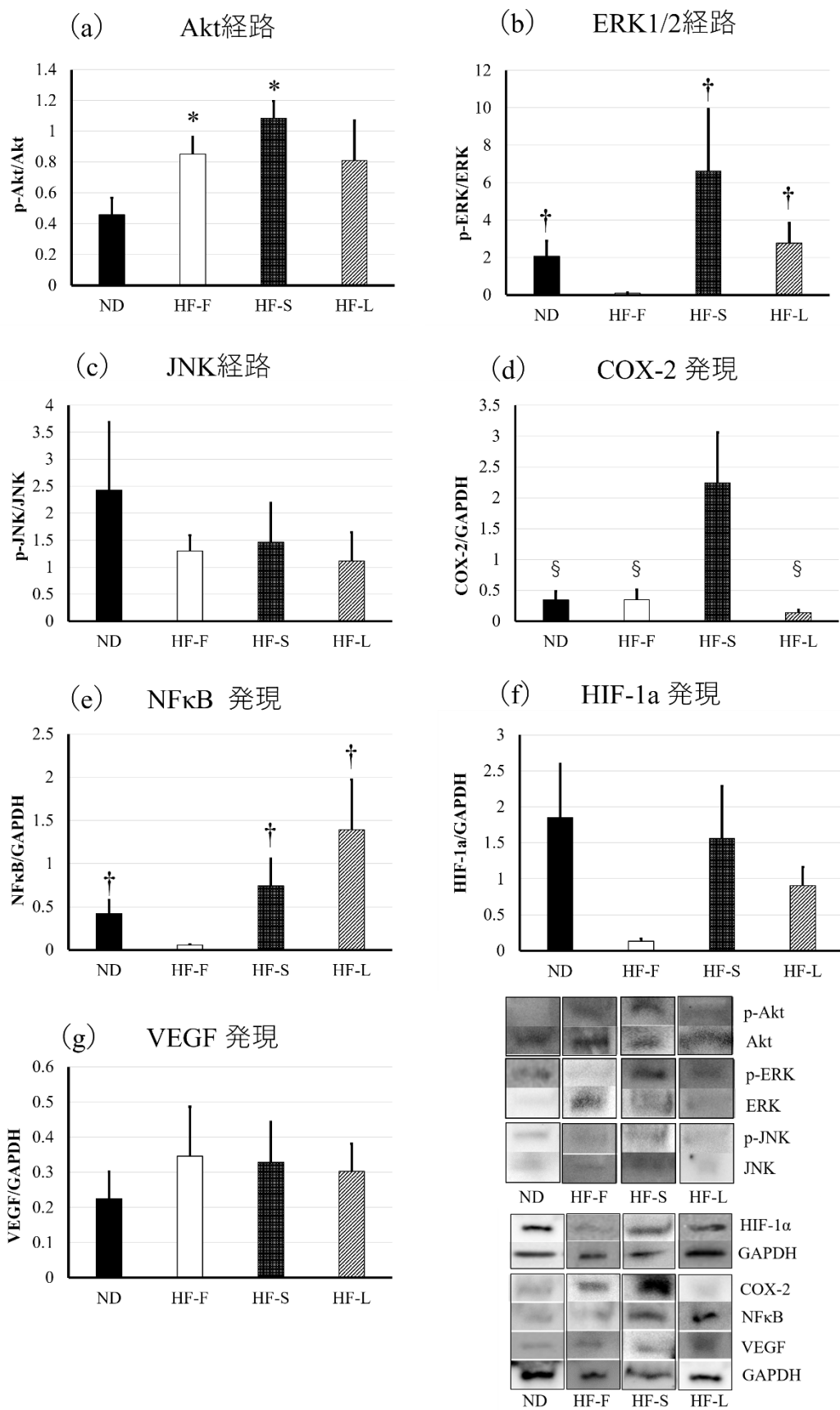
HIF-1 α 、VEGF の発現を評価した。プロスタグランジン E2 (PGE2) 合成酵素

である COX-2 発現は、HF-S 群で他群と比較して高値を示した。(図 28 (d)) 一

方で炎症を惹起する核内転写因子である NF κ B や低酸素誘導因子 HIF-1 α の発現

は、HF-F 群において他群と比較して低値であった。(図 28 (e) (f)) VEGF の発

現は 4 群間で有意差は認められなかった。(図 28 (g))



**図 28 : 各種 LCHFD の自由摂食が腫瘍中の免疫反応に関わるシグナル
たんぱく質に与える影響**

35 日目の腫瘍中の細胞増殖・炎症反応に関わるシグナル伝達経路(Akt, ERK1/2, JNK)およびシグナルたんぱく質(COX-2, NFκB, HIF-1α, VEGF)を、ND および脂肪の種類を変えた LCHFD(魚油・大豆油・ラード)を摂食したマウスで評価した。データは平均±標準誤差, *p<0.05 vs. ND, † p<0.05 vs. HF-F, §p<0.05 vs. HF-S, (Kruskal-Wallis rank sum test)。

7-4：考察及び小括

本検討により、エネルギー比率としての脂肪の割合が同じ LCHFD であっても、強化した脂肪の種類によってそれぞれ特徴的な影響を Panc02CP マウスモデルに及ぼすことが分かった。

ラード強化の LCHFD を摂取した Panc02 がん性腹膜炎マウスモデルでは、腹腔洗浄液中の Treg の増加と、TAM の M2 極性化が観察された。これは第 3 章で観察された結果と同様であり、免疫抑制性の細胞が増えたことでがん免疫が低下し、その結果生存が悪化したと推察された。機序として SFA 強化の高脂肪食が NF κ B 発現を促進している可能性がある。

大豆油を強化とした LCHFD (n-6:n-3=7:1) を与えられた CP マウスでは、腹腔洗浄液中の抗腫瘍性サイトカインの IL-12、IFN- γ 、M1 型マクロファージ数、腫瘍中の NK 細胞数が ND と比べて減少した。自己免疫寛容に関わる PD-1 受容体の増加が、腹腔内の CD8⁺T 細胞上でみられ、更にシグナルたんぱく質では COX-2 発現が他群と比較して 4 倍以上に増加した。

大豆油の主な脂肪酸である n-6 PUFA は一般的に炎症促進性に作用する。[20] n-6 PUFA はアラキドン酸に代謝され、細胞膜上の膜タンパク質によってさまざまな生理活性物質に代謝される。その中でも COX-2 によって産生される PGE2 は炎症誘発物質作用が強く、がんの増殖に関わる。[65, 66] PGE2 はリンパ球

の CTL、NK 細胞への分化および機能を抑制することが報告されている。[60, 65] また TAM においては、PGE2 はマクロファージを抗腫瘍性の M1 型から免疫抑制性の M2 型へ分極する。[67] M1 型は IL-12 を分泌し、T 細胞や NK 細胞の増殖を誘導すると共に IFN- γ 分泌も増加させる。[68] 一方 M2 型マクロファージは IL-10 や TGF- β などの産生を通じて抗腫瘍性の免疫細胞の働きを抑制する。IFN- γ は CTL を誘導してがん細胞の認識およびアポトーシスを引き起こし抗腫瘍性に働く。

近年の研究で Wang らは、ヒト肺がん細胞を用いた実験において、PGE2 関連経路の活性化は、自己免疫寛容を引き起こし、CD8⁺T 細胞上の PD-1 受容体発現を高めることを示している。[69] PD-1 受容体は免疫チェックポイント分子で、活性化した細胞上に発現して増強した免疫反応を抑える役割を持つ。[70] 担がん患者における CD8⁺T 細胞上 PD-1 受容体発現は、がんの予後とも深く相関し、高発現が予後不良に繋がることが示されている。[71, 72] 我々の結果でも PD-1 受容体発現が大豆油強化高脂肪食群で増加しており、T 細胞の疲弊化の可能性が示唆された。

総じて n-6 PUFA を強化した LCHFD の摂食は、抗腫瘍性サイトカインの減弱と、PGE2 産生増加による抗腫瘍性の免疫細胞数の低下、更に自己免疫寛容といった多方面の因子が重なることで、腹膜播種の増悪と生存の悪化につながった

可能性がある。

非常に興味深いことに、n-3 PUFA を多量に含有する魚油を強化して、大豆油と魚油を n-6PUFA:n-3PUFA が 2 : 1 になるように配合すると、がん細胞の増殖・転移に関わるサイトカインである IL-6 や MCP-1 レベル、腫瘍中の TAM の M2 極性化、CD8⁺T 細胞上の PD-1 発現が他群(ND 群、HF-S 群、HF-L 群)と比較して抑えられた。細胞内シグナル伝達たんぱく質の、ERK、NFκB、HIF-1α、のレベルも低下した。その一方で、抗腫瘍性の因子である血液中の IFN-γ、IL-12、アディポネクチンのレベルや、腹腔洗浄液中の CD8⁺T 細胞や CTL 数が他群と比較して高く保たれた。

炎症を増強して、がん進展に関わるシグナルたんぱく質としては、NFκB、HIF-1、ERK が様々な種のがん細胞において、恒常的に活性化している。[73] 中でも HIF-1 と NFκB は同じ活性化物質、調節遺伝子やターゲット遺伝子により誘導され、がんの血管新生、腫瘍増大や治療抵抗性と関連することが報告されている。[74, 75] がん細胞中の ERK の活性化は、乳がんモデルにおいて、MCP-1 の産生を通じてマクロファージの M2 極性化と、Treg を増加させ、がんの治療抵抗性の主な原因になると考えられている。[73, 76, 77] ERK については、乳がんモデルにおいて n-3 PUFA の投与と逆相関することが示されているが、他のがんモデルでは報告が少ない。[78] また、ERK は PD-

1 の受容体である programmed death-1 ligand (PD-L1) および CD8⁺T 細胞上の PD-1 発現を増加させ、この現象が更に ERK を活性化させるという正のフィードバックを起こすと考えられている。[76] 更に最近の研究では、腫瘍中の ERK 自体が HIF-1 α と NF κ B の、発現および活性化を増加させる可能性が報告された。[73, 79] 今回の我々の実験では、魚油強化 LCHFD 群で、これらがんの増殖を高める NF κ B、HIF-1 α 、ERK の腫瘍中における活性化が抑えられていた。

本実験では更に HF-F の摂食によって腹腔洗浄液中 CD8⁺T 細胞、CTL 数が維持された。n-3 PUFA が直接 T 細胞の機能を活性化して抗腫瘍効果を高めるという報告はこれまでに無かったが、我々の実験によって NF κ B や PD-1 発現抑制を介して、CD8⁺T 細胞の数と機能を n-3 PUFA が維持するというメカニズムが示唆された。

本実験では、HF-F 摂食は血漿アディポネクチンのレベルを増加させた。血漿アディポネクチンは、脂肪細胞から分泌される生理活性物質の一種である。[80]インスリン抵抗性改善や抗炎症作用を持ち、がん細胞の血管新生、転移を阻害して抗腫瘍に働くと考えられている。[81, 82] また加藤らはアディポネクチンが直接 Panc02 がん細胞のアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を持つと報告している。[83] 先行研究でも *in vivo* において魚油はアディポネクチンの分

泌増加因子と考えられており、Warburg effect の抑制、NFκB 抑制による抗炎症作用、インスリン抵抗性改善などによりがん抑制効果が報告されている。[84, 85] 我々の実験結果もこれを支持するものである。

総じて n-3 PUFA を含む HF-F を摂食したマウスでは、がん増殖に関わる炎症や低酸素、免疫抑制などのがん細胞に有利な環境が、他の LCHFD 摂食マウスのように形成されず、抗腫瘍免疫が維持された可能性がある。

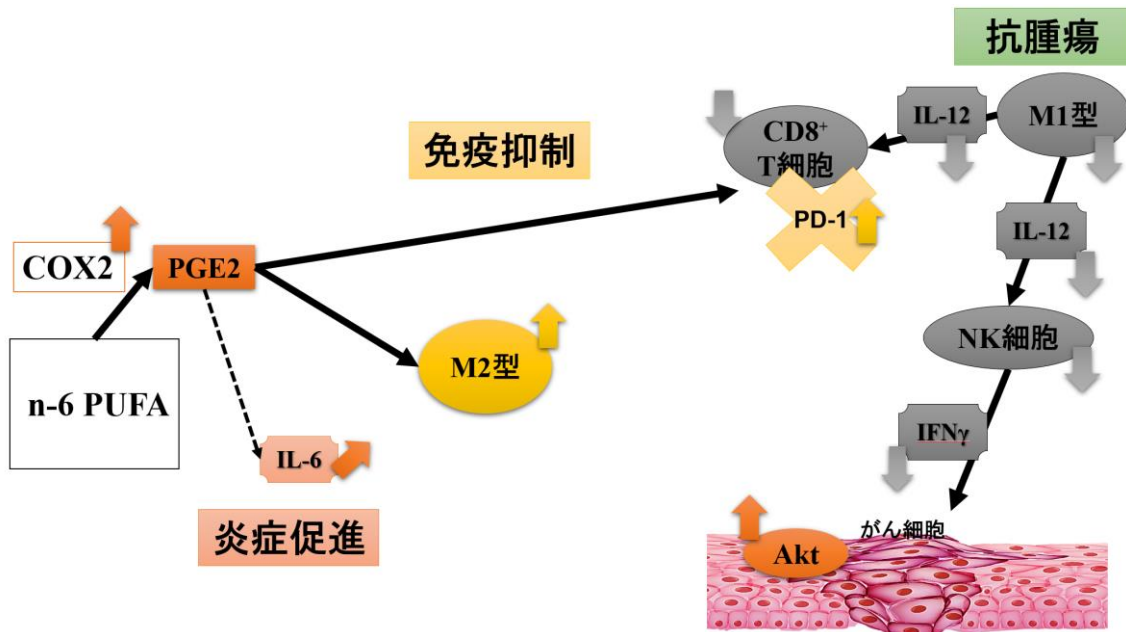
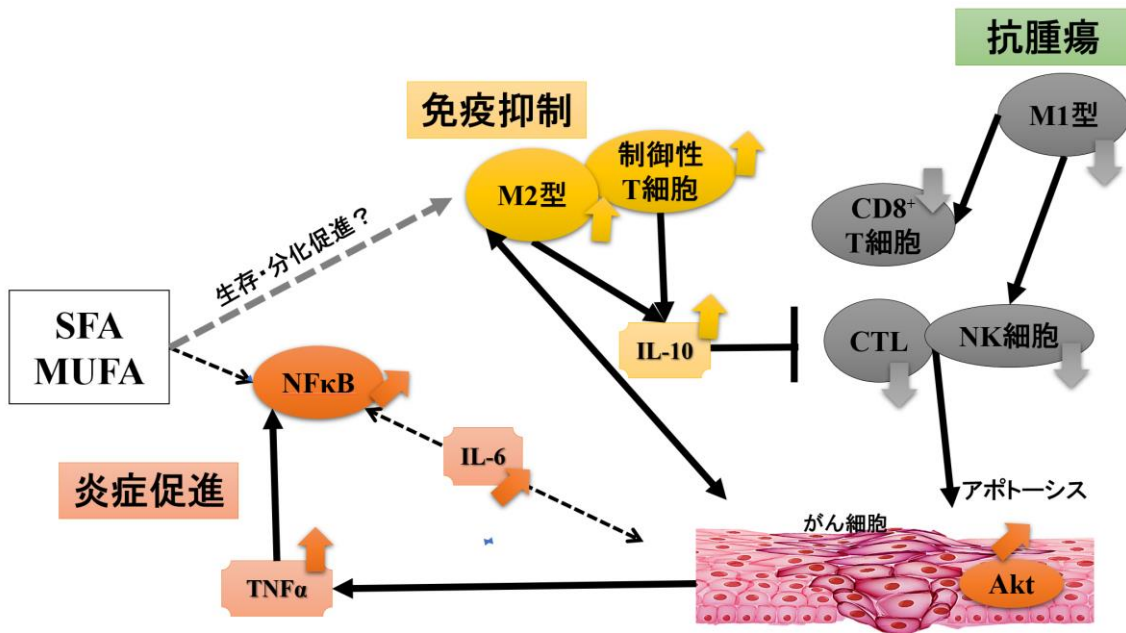
がん治療における脂肪の作用としては、第 4 章の考察でも触れたように KD の抗腫瘍効果が注目されている。脂肪のエネルギー比率を 80~90% に設定した KD では、さまざまながんモデルで腫瘍の増殖が抑制されることが示されている。KD の効果はケトーシスによると考えられている。[86] そこで我々の LCHFD でもケトン体が産生されているか否かを検討した。ケトン体のがん抑制効果を報告している先行研究では、BHB 濃度が 1mM 以上であるのに対し、我々の研究では 50~200 μM と低値であること、また脂肪をエネルギー比で 10% しか含まない ND 群と各種 LCHFD 群で有意差は見られなかったことから、今回の各種 LCHFD は KD の効果を見ているものではないと言える。[87] 一般的にケトン食と呼ばれる食事は、極端な炭水化物制限による結果であり、炭水化物の含有量がエネルギー比 10% 未満である。C57BL/6J マウスを用いた研究では、炭水化物が 15% 以上の餌では BHB の産生率が極端に低下すると報告されており、本モデル

では 20%であったことと矛盾しない。[88] 治療効果があるとガイドラインで示される KD は、実際は長期間継続して摂取することが難しい食事内容である。今回の研究は脂肪の割合を摂食上問題ない程度に増やした LCHFD を用いたものであり、ケトン食の効果を検討したものではない。

今回の検討では、先に餌を開始した後にがん細胞を接種した。HF-F 群では他の LCHFD 群だけでなく ND 群と比較しても腫瘍重量が減少したが、その機序に Panc02 がん細胞の生着を抑制した可能性も否定できない。今後は、Panc02 を先に接種し、腹腔内への生着を確認した後に同様の餌を与えて、その効果を検討する必要がある。また今回の検討項目に基づく、ND 群でも、HF-S、HF-L 群と比較して抗腫瘍性に働く可能性がある。しかし本研究および様々な先行研究で、n-3 PUFA 投与による抗腫瘍効果が報告されている。今回使用したマウスモデルにおいて、HF-F 群と ND 群は予後に差は無かったが、その他のがんに対する生体反応のデータから、HF-F の有用性については確かなものと考えている。

本検討を通して、ESPEN ガイドラインが示すがん患者への代謝上の有利性を根拠とした、低糖質高脂肪食投与を行う場合には、強化する脂肪の種類に特段の注意を払う必要があることが示唆された。魚油を強化した LCHFD は、代謝の点のみならず抗炎症・がん免疫維持の点からがん患者の栄養療法として期待できるかもしれない。(図 29) ただヒトとマウスでは、栄養素が最も効果を発揮する

容量、濃度が異なる可能性があり、ヒトに最適な LCHFD の検討を行うことで更なる改善効果が期待できるかもしれず、今後の研究課題といえる。



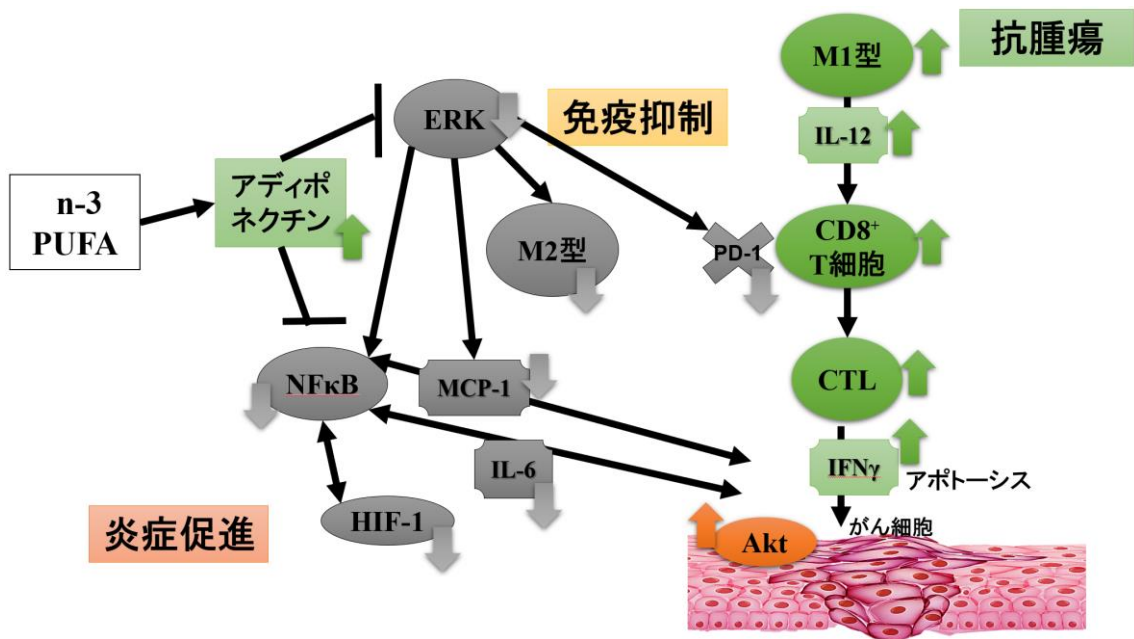


図 29 : LCHF ががん性腹膜炎マウスモデルの免疫反応および生存に及ぼす影響

Panc02 マウス膵臓がん細胞を用いて作成した、がん性腹膜炎マウスモデルに、脂肪の種類を変えた低糖質高脂肪食を投与して、免疫反応と生存に及ぼす影響について調べた。各項目についての矢印 (↑ ↓) は ND と比べての増減を示す。また斜めの矢印は傾向($p < 0.1$)を示す。

8. 総括

本研究結果をまとめると、マウスがん性腹膜炎モデルにおける低糖質高脂肪食の影響として

- 1) 飽和脂肪酸・一価不飽和脂肪酸を含むラード強化の低糖質高脂肪食を与えたマウスでは、通常食と比較して播種腫瘍の増悪、生存が低下した。腹膜播種が形成された時点の腹腔洗浄液中と腫瘍中では、制御性 T 細胞および M2 型マクロファージが高値を示した。この結果よりラード強化の低糖質高脂肪食は、マウスの抗腫瘍性の免疫を強く抑制し、がん促進性に働く可能性が示された。
- 2) n-6 系 PUFA を主に含む大豆油強化の低糖質高脂肪食を与えたマウスでは、通常食と比較して生存が低下した。腹膜播種が形成された時点の腹腔洗浄液中または腫瘍中で、マクロファージの M1/M2 比の低下と CD8⁺T 細胞上の PD-1 受容体の発現が高値を示し、宿主免疫の抑制が示唆された。さらに抗腫瘍性に働く IL-12、IFN γ 、CD8 陽性 T 細胞数、ナチュラルキラー細胞数が低値を示した。これらの機序に、n-6 系 PUFA 摂食増加による腫瘍中の COX-2 発現の上昇が一因と考えられた。上記の結果より大豆油強化の低糖質高脂肪食は、特に抗腫瘍性免疫を減弱し、がん促進性に働く可能性が示された。

3) 大豆油と魚油を n-6 系 PUFA:n-3 系 PUFA=2:1 になるように調整した低糖質高脂肪食を与えたマウスでは、体重は他の低糖質高脂肪食を摂取したマウスより高く維持され、播種腫瘍の総重量は他の低糖質高脂肪食群および通常食群と比較して低値を示し、生存にも悪影響を及ぼさなかった。腫瘍中の ERK、NF κ B、HIF-1 の発現低下により免疫抑制や炎症反応が阻害され、抗腫瘍性のサイトカインレベルおよび免疫細胞数が維持された。その機序に血漿アディポネクチンレベルの上昇が考えられた。この結果より、魚油を強化した低糖質高脂肪食では炎症や免疫抑制などのがん細胞の増殖に有利な環境が、他の低糖質高脂肪食を摂取したマウスのように形成されず、抗腫瘍免疫を維持できる可能性が示された。

以上のことが判明した。

進行がん患者の栄養状態を良好に保つことは、手術や化学療法といった治療の奏効率にも関わるため、エネルギー源として脂肪という栄養素を活用することは有用であろう。しかし、がん免疫や炎症反応の観点から、糖の代用として LCHFD の利用を積極的に勧めるには、さまざまな問題が存在することが示唆された。今回の結果が実臨床でも見られるか否かを検証するには、まず後ろ向き研究により、進行がん患者を対象に脂肪の種類別の摂取量と予後との関連等を評価するべきであろう。

がん患者を対象にした高脂肪食の研究では、先にも述べた通り KD が注目されている。基礎実験では抗腫瘍効果が多く報告される一方で、近年行われたがん患者を対象にした KD のシステマティックレビューでは、アドヒアランスが 49% と低いことが分かった。[89] 炭水化物の極端な制限に加えて、脂肪の摂取量が一般の西洋食の約 2 倍、あるいは日本人の一般的な食事の約 3 倍となる KD は、多くの人にとってそれまでの食事内容と乖離しており、持続性に課題がある。[89, 90] できるだけ実際の食生活に沿ったものであることが、治療効果を増すためにも重要である。

今回用いた LCHFD は、経口あるいは経腸からの摂取ができることを前提に、日常的に摂られている脂肪を用いた。ラードに含まれる SFA と MUFA は食事の動物由来の脂肪に含まれる脂肪酸であり、n-6 PUFA は植物由来の油の主な脂肪酸である。n-6 PUFA と n-3 PUFA はどちらも必須脂肪酸あるいは体内で合成できるが生理機能の重要性から、日々の食事で摂取することが推奨されている条件付き必須脂肪酸である。[91] PUFA は西洋諸国の食事の n-6/n-3 比が 10 以上に対して、日本は平成 30 年度国民栄養調査によると 4.4 である。

PUFA の摂取割合は、炎症制御や循環器系疾患予防の観点から n-6/n-3 比を 2~4 にすることが推奨されている。[58] がん患者においてもこの比に注目し、具体的に食事内容を提案していくことが、有効な栄養療法となる可能性がある。

今回の研究は、1) あくまでもマウスモデルでの検討である、2) 脂肪のエネルギー比率は60%のみでの検討である、3) 主にPanc02がんセルラインを用いたがん性腹膜炎モデルでの結果である、4) 臨床ではがんが進行してから様々な栄養療法を開始するケースが多いが、がん接種前からLCHFDを投与するモデルである(がん性腹膜炎が成立してからLCHFDを開始するモデルでの検討を、本研究グループで開始している)、などの問題点が存在する。しかし進行がん患者の予後に関わる栄養療法について研究が少ないなかで、低糖質高脂肪食ががん病態の生体反応と予後に及ぼす意義について非常に重要な知見を得られたと考えている。今後は、上記の諸問題にも取り組み、臨床効果も検証していくことで、安全で有効な進行がん患者の栄養療法の開発が可能と期待している。

9. 謝辞

本研究を行うにあたり、貴重な研究の場を与えて下さり、研究の基礎・論文執筆など本研究の全てにおいて長期にわたり御指導頂きました手術部・深柄和彦教授、実験手技の基本や実験プロトコールの作成において多くの御助言を頂きました手術部・村越智講師、Panc02 膵臓がん細胞を御提供頂きました病態栄養治療センター・伊地知秀明講師、ID8 卵巣がん細胞を御提供頂きました女性診療科・産科・田口歩助教、ならびに多岐にわたり御支援を頂きました手術部の教員の皆様、関係各位の皆様に心より御礼申し上げます。

10. 引用文献

1. Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Vidal PM, Camilo ME. Nutritional deterioration in cancer: the role of disease and diet. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2003; **15**: 443-50.
2. Arends J, Bodoky G, Bozzetti F et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Non-surgical oncology. *Clin Nutr* 2006; **25**: 245-59.
3. Mazaki T, Ishii Y, Murai I. Immunoenhancing enteral and parenteral nutrition for gastrointestinal surgery: a multiple-treatments meta-analysis. *Ann Surg* 2015; **261**: 662-9.
4. Klek S, Szybinski P, Szczepanek K. Perioperative immunonutrition in surgical cancer patients: a summary of a decade of research. *World J Surg* 2014; **38**: 803-12.
5. Caro MMM, Laviano A, Pichard C. Nutritional intervention and quality of life in adult oncology patients. *Clinical Nutrition* 2007; **26**: 289-301.
6. Bozzetti F, Zupec-Kania B. Toward a cancer-specific diet. *Clinical Nutrition* 2016; **35**: 1188-95.
7. Wallengren O, Bosaeus I, Lundholm K. Dietary energy density, inflammation and energy balance in palliative care cancer patients. *Clin Nutr* 2013; **32**: 88-92.
8. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009; **324**: 1029-33.
9. Turati F, Galeone C, Augustin LSA, La Vecchia C. Glycemic Index, Glycemic Load and Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis. *Nutrients* 2019; **11**.
10. Korber J, Pricelius S, Heidrich M, Muller MJ. Increased lipid utilization in weight losing and weight stable cancer patients with normal body weight. *Eur J Clin Nutr* 1999; **53**: 740-5.
11. Arends J, Bachmann P, Baracos V et al. ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clin Nutr* 2017; **36**: 11-48.
12. Soldati L, Di Renzo L, Jirillo E et al. The influence of diet on anti-cancer immune responsiveness. *J Transl Med* 2018; **16**: 75.
13. Golzar FAK, Fathi R, Mahjoub S. High-fat diet leads to adiposity and adipose tissue inflammation: the effect of whey protein supplementation and aerobic exercise training. *Appl Physiol Nutr Metab* 2019; **44**: 255-62.
14. Cho HJ, Kwon GT, Park H et al. A High-Fat Diet Containing Lard Accelerates Prostate Cancer Progression and Reduces Survival Rate in Mice: Possible Contribution of Adipose Tissue-Derived Cytokines. *Nutrients* 2015; **7**: 2539-61.
15. Tang FY, Pai MH, Chiang EP. Consumption of high-fat diet induces tumor progression and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer in a mouse

- xenograft model. *J Nutr Biochem* 2012; **23**: 1302-13.
16. Philip B, Roland CL, Daniluk J et al. A high-fat diet activates oncogenic Kras and COX2 to induce development of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Gastroenterology* 2013; **145**: 1449-58.
 17. Park H, Kim M, Kwon GT et al. A high-fat diet increases angiogenesis, solid tumor growth, and lung metastasis of CT26 colon cancer cells in obesity-resistant BALB/c mice. *Mol Carcinog* 2012; **51**: 869-80.
 18. Kimura Y, Sumiyoshi M. High-fat, high-sucrose, and high-cholesterol diets accelerate tumor growth and metastasis in tumor-bearing mice. *Nutr Cancer* 2007; **59**: 207-16.
 19. Beloribi-Djefaffia S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* 2016; **5**: e189.
 20. Teng KT, Chang CY, Chang LF, Nesaretnam K. Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. *Nutr J* 2014; **13**: 12.
 21. Tang F-Y, Pai M-H, Chiang E-PI. Consumption of high-fat diet induces tumor progression and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer in a mouse xenograft model. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2012; **23**: 1302-13.
 22. Kim EJ, Choi MR, Park H et al. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. *Breast Cancer Res* 2011; **13**: R78.
 23. Mavropoulos JC, Buschemeyer WC, 3rd, Tewari AK et al. The effects of varying dietary carbohydrate and fat content on survival in a murine LNCaP prostate cancer xenograft model. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; **2**: 557-65.
 24. Kim WG, Park JW, Willingham MC, Cheng SY. Diet-induced obesity increases tumor growth and promotes anaplastic change in thyroid cancer in a mouse model. *Endocrinology* 2013; **154**: 2936-47.
 25. Bahr I, Goritz V, Doberstein H et al. Diet-Induced Obesity Is Associated with an Impaired NK Cell Function and an Increased Colon Cancer Incidence. *J Nutr Metab* 2017: 1-14.
 26. White PB ZK, Swartz-Basile DA, Wang SS, Lillemoe KD, Pitt HA, Zyromski NJ. Obesity, but not high-fat diet, promotes murine pancreatic cancer growth. *J Gastrointest Surg* 2012; **16**: 1680-5.
 27. Parisi L, Gini E, Baci D et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res* 2018; **2018**: 8917804.
 28. Shrihari TG. Dual role of inflammatory mediators in cancer. *Ecancermedicalscience*

- 2017; **11**: 721.
29. Vykhovanets EV, Shankar E, Vykhovanets OV et al. High-fat diet increases NF-kappaB signaling in the prostate of reporter mice. *Prostate* 2011; **71**: 147-56.
 30. Rogero MM, Calder PC. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients* 2018; **10**.
 31. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose Expression of Tumor-Necrosis-Factor-Alpha - Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science* 1993; **259**: 87-91.
 32. McClellan JL, Davis JM, Steiner JL et al. Linking tumor-associated macrophages, inflammation, and intestinal tumorigenesis: role of MCP-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; **303**: G1087-95.
 33. Fujimoto H, Sangai T, Ishii G et al. Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *International Journal of Cancer* 2009; **125**: 1276-84.
 34. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 798-809.
 35. Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. *European Journal of Immunology* 2002; **32**: 404-12.
 36. Ajuwon KM, Spurlock ME. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 2005; **135**: 1841-6.
 37. Shevchenko I, Karakhanova S, Soltek S et al. Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2013; **133**: 98-107.
 38. Alwarawrah Y, Kiernan K, MacIver NJ. Changes in Nutritional Status Impact Immune Cell Metabolism and Function. *Front Immunol* 2018; **9**: 1055.
 39. Zitvogel L, Pietrocola F, Kroemer G. Nutrition, inflammation and cancer. *Nat Immunol* 2017; **18**: 843-50.
 40. Street SEA, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 2001; **97**: 192-7.
 41. Meza-Perez S, Randall TD. Immunological Functions of the Omentum. *Trends Immunol* 2017; **38**: 526-36.
 42. Higashijima J, Shimada M, Chikakiyo M et al. Effect of splenectomy on antitumor immune system in mice. *Anticancer Res* 2009; **29**: 385-93.

43. Hotta Y, Kasuya H, Bustos I et al. Curative effect of HF10 on liver and peritoneal metastasis mediated by host antitumor immunity. *Oncolytic Virother* 2017; **6**: 31-8.
44. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; **133**: 775-87.
45. Deng G. Tumor-infiltrating regulatory T cells: origins and features. *Am J Clin Exp Immunol* 2018; **7**: 81-7.
46. Oft M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunol Res* 2014; **2**: 194-9.
47. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation* 2012; **122**: 787-95.
48. Namgaladze D, Brune B. Macrophage fatty acid oxidation and its roles in macrophage polarization and fatty acid-induced inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1861**: 1796-807.
49. Batista-Gonzalez A, Vidal R, Criollo A, Carreno LJ. New Insights on the Role of Lipid Metabolism in the Metabolic Reprogramming of Macrophages. *Front Immunol* 2019; **10**: 2993.
50. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol* 2011; **186**: 3299-303.
51. Pacella I, Piconese S. Immunometabolic Checkpoints of Treg Dynamics: Adaptation to Microenvironmental Opportunities and Challenges. *Front Immunol* 2019; **10**: 1889.
52. Khodadadi S, Sobhani N, Mirshekar S et al. Tumor Cells Growth and Survival Time with the Ketogenic Diet in Animal Models: A Systematic Review. *Int J Prev Med* 2017; **8**: 35.
53. Freitas RDS, Campos MM. Protective Effects of Omega-3 Fatty Acids in Cancer-Related Complications. *Nutrients* 2019; **11**.
54. Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors. *Cell Metabolism* 2017; **26**: 49-70.
55. Mavropoulos JC, Buschemeyer WC, Tewari AK et al. The Effects of Varying Dietary Carbohydrate and Fat Content on Survival in a Murine LNCaP Prostate Cancer Xenograft Model. *Cancer Prev Res* 2009; **2**: 557-65.
56. D'Eliseo D, Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *J Clin Med* 2016; **5**.
57. Apte SA, Cavazos DA, Whelan KA, Degraffenried LA. A Low Dietary Ratio of Omega-6 to Omega-3 Fatty Acids May Delay Progression of Prostate Cancer.

- Nutrition and Cancer-an International Journal* 2013; **65**: 556-62.
58. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2002; **56**: 365-79.
 59. Zhu L, Zhao Q, Yang T et al. Cellular metabolism and macrophage functional polarization. *Int Rev Immunol* 2015; **34**: 82-100.
 60. Varshney P, Yadav V, Saini N. Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology* 2016; **149**: 13-24.
 61. Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2018; **132**: 41-8.
 62. D'Eliseo D, Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *Journal of Clinical Medicine* 2016; **5**.
 63. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* 2014; **4**: 64.
 64. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA et al. RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clinical Cancer Research* 2016; **22**: 1499-509.
 65. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 2012; **188**: 21-8.
 66. Hughes-Fulford M, Tjandrawinata RR, Li CF, Sayyah S. Arachidonic acid, an omega-6 fatty acid, induces cytoplasmic phospholipase A2 in prostate carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2005; **26**: 1520-6.
 67. Mizuno R, Kawada K, Sakai Y. Prostaglandin E2/EP Signaling in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2019; **20**.
 68. Seki S, Nakashima H, Nakashima M, Kinoshita M. Antitumor Immunity Produced by the Liver Kupffer Cells, NK Cells, NKT Cells, and CD8(+) CD122(+) T Cells. *Clin Dev Immunol* 2011.
 69. Wang J, Zhang L, Kang D et al. Activation of PGE2/EP2 and PGE2/EP4 signaling pathways positively regulate the level of PD-1 in infiltrating CD8(+) T cells in patients with lung cancer. *Oncol Lett* 2018; **15**: 552-8.
 70. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; **366**: 2443-54.
 71. Matson V, Fessler J, Bao R et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 2018; **359**: 104-+.
 72. Kumar R, Yu F, Zhen YH et al. PD-1 blockade restores impaired function of ex vivo

- expanded CD8(+) T cells and enhances apoptosis in mismatch repair deficient EpCAM(+)PD-L1(+) cancer cells. *Onco Targets Ther* 2017; **10**: 3453-65.
73. Lamberti MJ, Pansa MF, Vera RE et al. Transcriptional activation of HIF-1 by a ROS-ERK axis underlies the resistance to photodynamic therapy. *PLoS One* 2017; **12**: e0177801.
74. D'Ignazio L, Batie M, Rocha S. Hypoxia and Inflammation in Cancer, Focus on HIF and NF-kappaB. *Biomedicines* 2017; **5**.
75. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses. *FEBS J* 2016; **283**: 413-24.
76. Salaroglio IC, Mungo E, Gazzano E et al. ERK is a Pivotal Player of Chemo-Immune-Resistance in Cancer. *Int J Mol Sci* 2019; **20**.
77. Liu Q, Song J, Pan Y et al. Wnt5a/CaMKII/ERK/CCL2 axis is required for tumor-associated macrophages to promote colorectal cancer progression. *Int J Biol Sci* 2020; **16**: 1023-34.
78. Serini S, Calviello G. Modulation of Ras/ERK and Phosphoinositide Signaling by Long-Chain n-3 PUFA in Breast Cancer and Their Potential Complementary Role in Combination with Targeted Drugs. *Nutrients* 2017; **9**.
79. Chen B, Liu J, Ho TT et al. ERK-mediated NF-kappaB activation through ASIC1 in response to acidosis. *Oncogenesis* 2016; **5**: e279.
80. Parida S, Siddharth S, Sharma D. Adiponectin, Obesity, and Cancer: Clash of the Bigwigs in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2019; **20**.
81. Kelesidis I, Kelesidis T, Mantzoros CS. Adiponectin and cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 2006; **94**: 1221-5.
82. Izadi V, Farabad E, Azadbakht L. Serum adiponectin level and different kinds of cancer: a review of recent evidence. *ISRN Oncol* 2012; **2012**: 982769.
83. Kato M, Watabe K, Tsujii M et al. Adiponectin inhibits murine pancreatic cancer growth. *Dig Dis Sci* 2014; **59**: 1192-6.
84. Neschen S, Morino K, Rossbacher JC et al. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes* 2006; **55**: 924-8.
85. Gray B, Steyn F, Davies PS, Vitetta L. Omega-3 fatty acids: a review of the effects on adiponectin and leptin and potential implications for obesity management. *Eur J Clin Nutr* 2013; **67**: 1234-42.
86. Weber DD, Aminzadeh-Gohari S, Tulipan J et al. Ketogenic diet in the treatment of cancer - Where do we stand? *Mol Metab* 2020; **33**: 102-21.
87. Poff AM, Ari C, Seyfried TN, D'Agostino DP. The ketogenic diet and hyperbaric

- oxygen therapy prolong survival in mice with systemic metastatic cancer. *PLoS One* 2013; **8**: e65522.
88. Newman JC, Covarrubias AJ, Zhao M et al. Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell Metab* 2017; **26**: 547-57 e8.
 89. Sremanakova J, Sowerbutts AM, Burden S. A systematic review of the use of ketogenic diets in adult patients with cancer. *J Hum Nutr Diet* 2018; **31**: 793-802.
 90. Hagihara K, Kajimoto K, Osaga S et al. Promising Effect of a New Ketogenic Diet Regimen in Patients with Advanced Cancer. *Nutrients* 2020; **12**.
 91. Radzikowska U, Rinaldi AO, Celebi Sozener Z et al. The Influence of Dietary Fatty Acids on Immune Responses. *Nutrients* 2019; **11**.