

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18391

研究課題名(和文) ケトン食による腫瘍内代謝リモデリングを考慮した膠芽腫の新規統合療法の開発

研究課題名(英文) New integrated therapy for glioblastoma considering intratumoral metabolic remodeling with a ketogenic diet

研究代表者

田中 宏知 (Tanaka, Hirotomo)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10569239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ケトン食(KD)は、糖質を極度に制限しケトン体を生成する高脂肪低糖質ダイエットです。KDと血管新生阻害剤(ベバシズマブ(Bev))の併用は、脳腫瘍移植マウスの腫瘍増大抑制とマウスの生存期間延長を示した。メタボローム解析では、KD+Bevの治療群ではアスパラギン酸やグルタミン酸などの一部のアミノ酸は著明な変化をもたらし、腫瘍増殖能を極度の低下させた。これらの結果は、Bevと組み合わせたKDが、GBM患者にとって有用な治療戦略になる可能性があることを示唆しています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫に対するケトン食療法の効果は一定の見解がないが、多くの報告でカロリー制限した場合の効果は報告されていた。代謝解析の結果、VEGF阻害剤との併用療法によりアスパラギン酸とグルタミン酸がglioma組織において正常脳組織と異なる変化を示した。臨床研究においてVEGF阻害剤とケトン食療法の併用の研究は行われておらず、今後、膠芽腫患者への効果を評価するために併用療法の臨床研究が必要と考えられる。抗血管新生療法とケトン食療法は、単独ではすでに臨床的に用いられており、安全性は確立されているので、併用療法はすぐに導入可能であり、臨床試験を将来的に行っていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：The ketogenic diet (KD) is a high fat and low carbohydrate diet that produces ketone bodies through imitation of starvation. The combination of KD and Bevacizumab (Bev) is considered to further reduce the supply of glucose to the tumor. The metabolite changes in U87 glioblastoma mouse models treated with KD and/or Bev were examined using gas chromatography-mass spectrometry. The combination therapy of KD and Bev showed a decrease in the rate of tumor growth and an increase in the survival time of mice, although KD alone did not have survival benefit. In the metabolome analysis, the pattern of changes for most amino acids are similar between tumor and brain tissues, however, some amino acids such as aspartic acid and glutamic acid were different between tumors and brain tissues. The KD enhanced the anti-tumor efficacy of Bev in a glioblastoma intracranial implantation mouse model. These results suggested that KD combined with Bev may be a useful treatment strategy for patients with GBM.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma Ketogenic diet

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は脳内で発生する腫瘍で最も頻度が多い腫瘍の1つで、手術、放射線化学療法などの集学的治療を施行しても、生存期間中央値は2年未満と極めて悪性の脳腫瘍である。これまで、多くの研究が精力的に行われてきたが、画期的な治療はまだない。

膠芽腫は、FDG-PET 検査などでも明らかのように沢山のグルコース(糖)を取り込み、ATPなどのエネルギー産生や核酸、脂肪、細胞膜などの細胞小器官形成などの原料として使用している。また、膠芽腫ではミトコンドリア機能異常が起こっており、グルコースに依存した特殊な代謝経路が活性化されている (Int J Biochem Cell Biol. 2015;63:55-9)。つまり、グルコース濃度を低下させることで、膠芽腫細胞では容易にアポトーシスを起こす (Mol Cancer Res. 2006;4(5):319-30)。

これまでの研究より、神経細胞と膠芽腫細胞ではケトン体の代謝・エネルギー使用能力に差があることが *in vitro* の研究で明らかとなっている (Bmc Cancer. 2011;11:315)。つまり、膠芽腫細胞ではケトン体関連酵素である 3-hydroxybutyrate dehydrogenase(BDH1)や succinyl CoA:3-oxoacid CoA transferase(OXCT1)の発現が極めて低下しており、グルコースをエネルギーに変換する能力が低い(Nutr Metab (Lond). 2013;10(1):47)。膠芽腫細胞はケトン体を有効に利用することが出来ないため、食事をケトン食に切り替えて血糖を抑えることで、がん細胞において解糖系によるエネルギー代謝が抑制される状態になり、グリオーマの増殖抑制効果が期待される (Front Mol Neurosci. 2016;9:122)。また、動物実験においてもグルコースの抑制とケトン体の上昇で腫瘍内の代謝が変化し、腫瘍に影響を及ぼすことが分かっている (Br J Cancer. 2003;89(7):1375-82)。グルコースはインスリンの放出を誘導し、インスリン誘導性の Akt/mTOR シグナルの活性や Ras/MAP キナーゼ経路の活性を引き起こすことも知られており (Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2011;76:299-311)、血糖上昇によるインスリン上昇に付随する各種増殖シグナルの抑制はグリオーマの増大抑制に貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

ケトン食による腫瘍内代謝変化を質量分析器を用いて解析し、ケトン食で賦活される代謝経路を同定する。さらに、賦活した代謝経路をターゲットとした薬剤を探索し、ケトン食療法との併用で有効な薬剤を同定する。一方、現在臨床で使用されている薬剤とケトン食療法との併用効果を動物実験で検証する。

3. 研究の方法

方法として、8週齢の雄のヌードマウス (BALB/c-nu/nu) の脳内にヒト由来の GBM 細胞である U87MG を 1×10^6 個移植し、移植7日目にコントロール群、ケトン食群 (KD)、bevacizumab 群 (Bev)、併用療法 (KD + Bev) の4群に分けた。KD群と KD + Bev群はグループ分け後からケトン食を開始した。移植2週間後より Bev群と KD + Bev群には bevacizumab (10mg/kg) を尾静脈より週2回静注した。また実験中は体重、血糖値、血清ケトン値を計測した。移植4週間後にマウスを sacrifice し、脳を摘出、腫瘍を回収し、代謝解析 (GC-MS) とマイクロアレイ解析を行った。また同様の治療法を用いた生存解析も行った。*in vivo* imaging における腫瘍増殖解析には、iRFP720 を発現させた U87MG を使用し、先述の実験法を用いて解析した。

4. 研究成果

体重と血糖値の経過は4群間に有意な差はなかったが、血中ケトン値は KD群と KD + Bev群で有意に上昇しており、ケトン食投与によりケトン体が体内で生成されていることを示していた。(Fig.1) *in vivo* imaging を用いた腫瘍増殖解析に関し、KD単独群

はコントロール群と比較して抗腫瘍効果を示さなかったが、KD + Bev 群は KD 単独と比較して有意な増殖抑制を示し、コントロール群や Bev 単独と比較しても抑制傾向を示した。(Fig.2) 生存解析では KD 群とコントロール群では著明な差は認めなかったが、KD + Bev 群は他の群よりも生存期間が有意に延長した (vs control, KD: $p < 0.01$, vs Bev: $p = 0.025$) (Fig.3) 以上の結果から KD と Bev の併用が有意な抗腫瘍効果や生存利益を有していることが示された。

GC-MS による代謝物解析の結果、ケトン体である β -OHB の濃度は KD 群と KD + Bev 群の腫瘍と正常脳の両方で有意に上昇していた。(Fig.4) 主成分分析では KD と KD + Bev 群は明確に分類され、VIP スコアの解析の結果、乳酸、リン酸、アラニン、イノシトール、グルタミン酸、尿酸が分離の要因となる代謝物として同定された。ヒートマップにおいて各群は特徴的なパターンを示し、KD + Bev 群で他と異なる代謝変化が起きていることが示唆された。(Fig.5) アミノ酸の代謝解析では、腫瘍組織においていくつかのアミノ酸が KD 群で上昇し、KD + Bev 群で減少していた。アスパラギン酸はコントロール群と比較して KD 群で著明に増加しており、Bev 群と KD + Bev 群で減少していた。(Fig.6) また KD + Bev 群では、グルタミン酸、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、トリプトファンが KD 群よりも有意に低かった。(Fig.7) Bev 群と KD + Bev 群では大きな違いはなかった。(Fig.7) 腫瘍と正常脳の比較では、多くのアミノ酸の変化パターンに差はなかったが、アスパラギン酸とグルタミン酸が異なる変化を示しており、これらは KD 投与下の腫瘍細胞の代謝において重要になってくることが示唆された。

腫瘍増殖に関わる TCA サイクルや糖新生の代謝物の解析では、腫瘍組織において KD 群と比較すると KD + Bev 群で乳酸が有意に上昇し、フマル酸とリンゴ酸は低下していた。(Fig.8) 加えて、2-ケトグルタル酸は KD + Bev 群で上昇する傾向にあった。(Fig.8) 一方、正常脳ではそれぞれの代謝物に治療群間での有意な差は見られなかったが、リンゴ酸とピルビン酸 + オキサロ酢酸はコントロール群と比較すると KD 群で上昇しており、コハク酸は KD + Bev 群で上昇していた。(Fig.8) 腫瘍における TCA サイクル関連物質の mRNA 発現のマイクロアレイ解析では、治療群間で大きな差はみられなかった。

ケトン代謝に関わる酵素の解析では、ケトン体トランスポーター蛋白の中で MCT1 の mRNA の発現は KD + Bev 群で増加していたが、免疫学的な発現量に差は見られなかった。(Fig.9,10)

腫瘍の栄養供給に関わる血管新生に関し、Bev と KD + Bev 群で微小血管の濃度は有意に減少していた。(Fig.11) Ki-67 の染色は KD + Bev 群で染色される細胞の割合が有意に減少しており、核における cyclin D1 の蓄積量は KD + Bev 群で顕著に減少していた。(Fig.11) このことは KD と Bev の併用が単独治療よりも血管新生を抑制し、腫瘍細胞の増殖も抑制することを示していた。

Changes in body weight, blood glucose, and blood ketone body

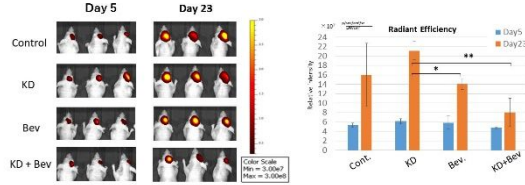


- No significant difference in body weight and blood glucose levels
- The blood ketone level was markedly elevated in the KD and KD + Bev group

→ Ketone bodies were produced in the body

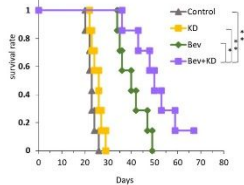
Fig 1

Comparison of the tumor growth



The KD alone did not show an anti-tumor effect compared to the control. However, the KD + Bev showed a significant decrease compared to the KD alone and a tendency to decrease compared to the control and Bev alone.

Comparison of the survival curves of the mice in each treatment group

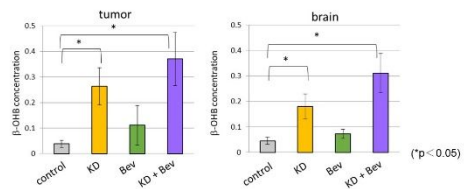


The survival time of KD+Bev was significantly prolonged compared to all other groups (vs control, KD; $p < 0.01$, vs Bev; $p = 0.025$)

→ The combination of KD and Bev have significant anti-tumor effect and survival benefit.

Fig 3

Comparison of beta-OHB concentration



The concentration of beta-OHB was significantly increased in both tumors and normal brain in the KD and KD + Bev groups

Fig 4

Heat map showing characteristic metabolite changes in the tumor tissue in each group.

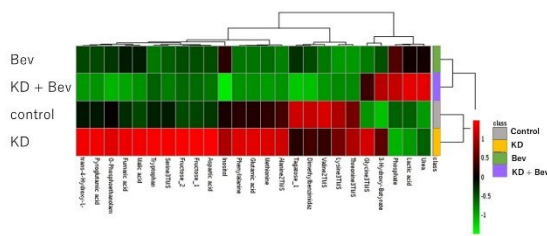


Fig 5

Comparison of the amino acid levels in the tumor

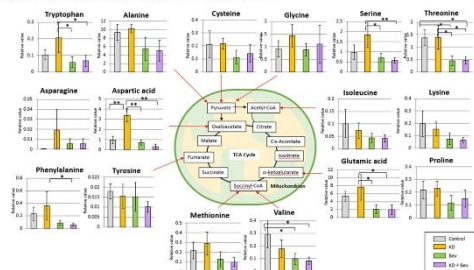


Fig 6

Comparison of the amino acid levels in the tumor and normal brain

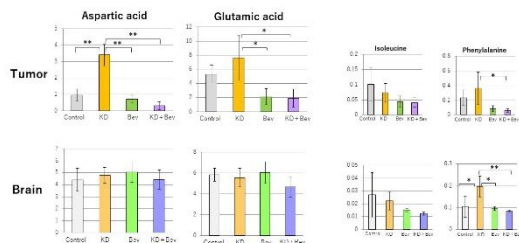


Fig 7

Metabolome analysis of TCA cycle-related metabolites

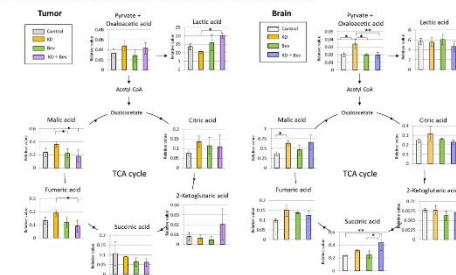


Fig 8

Comparison of mRNA expression levels of ketone metabolizing enzymes and ketone body transport proteins.

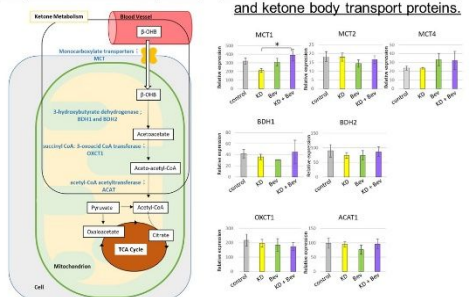


Fig 9

Immunostaining of ketone metabolizing and ketone body transport protein

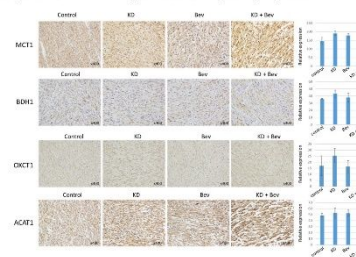


Fig 10

Comparison of the tumor tissue in each treatment group

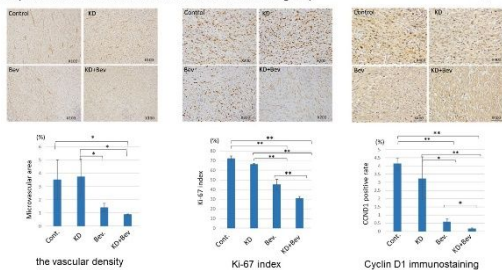


Fig 11

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maeyama M, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Tanaka H, Nishihara M, Fujita Y, Sekiguchi K, Kohta M, Mizukawa K, Hirose T, Itoh T, Kohmura E.	4. 巻 9
2. 論文標題 Multi-marker algorithms based on CXCL13, IL-10, sIL-2 receptor, and 2-microglobulin in cerebrospinal fluid to diagnose CNS lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 3048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hori T, Sasayama T, Tanaka K, Koma YI, Nishihara M, Tanaka H, Nakamizo S, Nagashima H, Maeyama M, Fujita Y, Yokozaki H, Hirose T, Kohmura E.	4. 巻 68
2. 論文標題 Tumor-associated macrophage related interleukin-6 in cerebrospinal fluid as a prognostic marker for glioblastoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci.	6. 最初と最後の頁 281-289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2019.07.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakata J, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Nakada M, Tanaka H, Hashimoto N, Kagawa N, Kinoshita M, Nakamizo S, Maeyama M, Nishihara M, Hosoda K, Kohmura E.	4. 巻 142
2. 論文標題 MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in glioblastoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroonco	6. 最初と最後の頁 241-251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-019-03113-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------