

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592019

研究課題名(和文) 希少糖の抗癌作用を用いた新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new cancer treatment using anticancer effect of D-allose

研究代表者

星川 広史 (HOSHIKAWA HIROSHI)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：70294767

研究成果の概要(和文)：D-allose の抗腫瘍効果のメカニズムとして、D-allose 投与による TXNIP の発現量の変化と細胞増殖抑制効果が相関することを確認した。X線照射の併用により腫瘍増殖抑制効果が増強され、X線照射により TXNIP の発現がさらに増加し、活性酸素の産生を促進し、抗腫瘍効果を高めていることが示唆された。ヌードマウス移植モデルによる *in vivo* の検討を行い、D-allose の局所投与が腫瘍増殖抑制に効果のあることを確認した。

研究成果の概要(英文)：D-allose exerts growth inhibitory effects on head and neck cancer cells *in vitro* and *in vivo*. The combination of D-allose and radiation significantly induced intracellular reactive oxygen species (ROS) and apoptosis compared to that induced by either agent alone. The sugar may act as an anti-proliferative agent via TXNIP induction and thus be useful as a novel anticancer drug.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：D-allose; anticancer effect; head and neck

1. 研究開始当初の背景

高松地域知的クラスター創成事業として「希少糖を核とした糖質バイオクラスター構想」が計画され、5年間の基礎的研究の結果、D-allose の抗腫瘍作用が発見された。

2. 研究の目的

耳鼻咽喉科領域の主要な癌である、扁平上皮癌細胞に対する D-allose の抗腫瘍効果を検

討し、新たな癌治療の開発を目的とした。

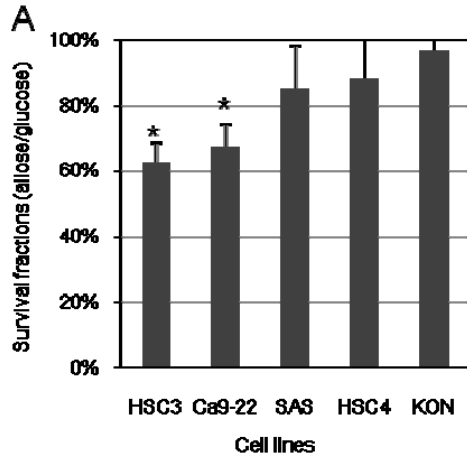
3. 研究の方法

- (1) 頭頸部由来の扁平上皮癌細胞株を用いて D-allose の抗腫瘍効果の有無を検討、
- (2) そのメカニズムを解明し、
- (3) さらに臨床応用に結びつけるためこれまでの治療法である放射線(RT)や抗がん剤との併用効果を検討し、至適投与法、投与量や

組み合わせについて検討した。

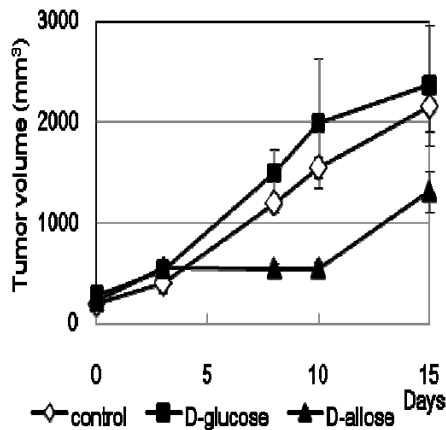
4. 研究成果

(1) 5種類の頭頸部由来の扁平上皮癌細胞を用いて D-allose の細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、D-allose 25mM 投与後 72 時間後では HSC3, Ca9-22 細胞株では有意な増殖抑制効果を確認したが、SAS, HSC4, KON 細胞株では有意な抑制効果を確認できなかった (図 1)。



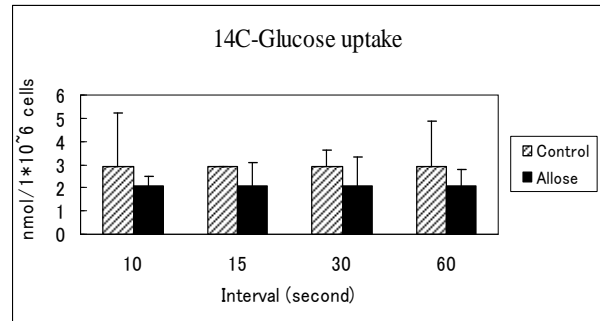
HSC3, Ca9-22 細胞株では濃度依存性に増殖抑制効果を示し、10mM 濃度で約 80%、25mM 濃度で約 60%、50mM 濃度で約 50%程度に抑制された。

さらに、生態内での効果を確認するため、ヌードマウス移植モデルによる効果を検討した。ヌードマウスの皮下に HSC3 細胞を移植後、D-allose 500mM 0.2ml を週 5 回局所投与した。2 週間継続し、投与終了時の体積を測定すると、D-glucose 投与群はコントロールと有意差を認めなかったが、D-allose 投与群では約 50%程度に腫瘍体積が抑制されていた (図 2)。



(2) D-allose による細胞増殖抑制効果のメカニズムを検討するため、細胞周期調節因子についてその変化を主に mRNA のレベルで検討した。Realtime PCR を用いた検討で、p53, p21

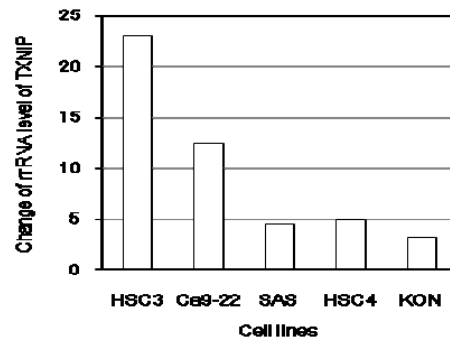
の発現が増加、cyclinA2, B1, CDC2 の発現が低下していた。さらにフローサイトメトリーを用いた検討で、D-allose 投与後には G1 期の細胞が減少、S 期の細胞が増加し、G2/M 期の停止が細胞増殖抑制に関与している可能性が示唆された。また、TUNEL 法を用いた検討で、D-allose 投与後には軽度ではあるがアポトーシスが誘導されることも確認された。さらに、¹⁴C-glucose を用いた RI の検討で、D-allose は細胞内への glucose 取り込みを阻害することも確認された (図 3)。



おそらく、glucose の細胞内への輸送の過程で競合阻害を起こし、細胞内でのエネルギー代謝に何らかの影響を及ぼすものと推察された。

DNA microarray を用いた検討で、肝細胞がんにおいて D-allose の添加により Thioredoxin interacting protein (TXNIP) が著明に上昇することが判明した。それを受けて、頭頸部扁平上皮癌でも同様の結果が得られるか、realtime PCR 法を用いて TXNIP の発現の変化を検討した。

その結果、D-allose によって有意な細胞増殖抑制効果を示した細胞 (HSC3, Ca9-22) では 10-20 倍の発現上昇を認めた。一方、細胞増殖抑制効果の乏しい細胞群 (SAS, HSC4, KON) では TXNIP の発現上昇は 5 倍以下に留まり、頭頸部扁平上皮癌においても D-allose の効果と TXNIP の発現の変化に相関を認めた (図 4)。



TXNIP の発現はタンパクレベルでも増加することが Western blot を用いた検討でも確認

された。
TXNIP は Redox 制御に関わる Thioredoxin の negative regulator であり、活性酸素 (ROS) の産生に与する可能性がある。そのため、D-allose 添加時の細胞内の ROS の変化を蛍光顕微鏡下で観察したところ、コントロールに比べ D-allose 添加時には ROS の産生が亢進している所見が観察された。

すなわち、D-allose の癌細胞抑制の作用機序のひとつとして、Redox 制御に関わる TXNIP の産生が更進することで結果として ROS の細胞内活性が高まり、細胞増殖抑制につながっているものと推察された。

(3) 次いで、従来の治療法との併用により効果の増強を認めるかどうかを検討した。2 次元培養法を用いて放射線照射 6 時間前に D-allose 10mM, D-allose 25mM を投与し、RT の増感作用の有無を検討したところ、10mM 投与で 1.61 倍、25mM 投与で 2.11 倍の増感効果を認めた。

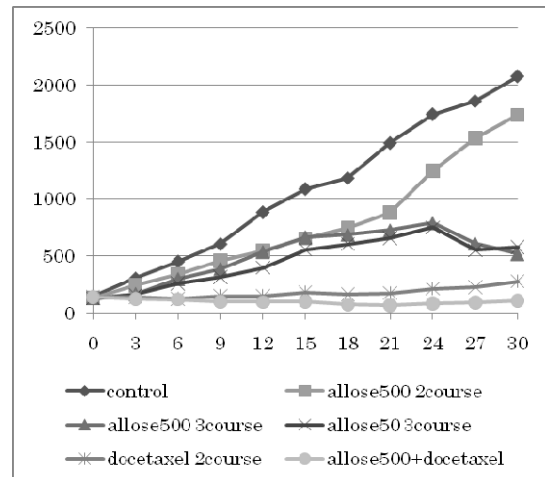
生態内での反応を模擬するため、3D 培養による検討を行ったところ、D-allose を加えることで RT 単独の 5 倍近い抑制効果を認めた。また、RT 単独、D-allose 単独に比べて併用することでアポトーシスが著明に増加し、効果発現の主要な原因と考えられた (表 1)。

Treatment	Ratio to Radiation	% Apoptosis
No treatment	0.76	0.7±0.64
Radiation	1.00	1.5±0.5
Allose	1.81	3.8±1.17
Allose+Radiation	4.96	12.9±1.81

TXNIP の発現は RT を併用することでより増加し、TRX はむしろ抑制される傾向を認めた。ROS の産生についても RT 単独、D-allose 単独、RT+D-allose の順に増加しており、細胞障害、アポトーシス促進の主たる要因となり得ると推察された。

最後に、抗がん剤との併用効果を検討すべく、頭頸部領域で多用される 3 剤 (CDDP, Docetaxel, 5-FU) について D-allose との併用効果を検討した。in vitro の 2 次元培養法による検討ではいずれの抗がん剤も D-allose との併用により相加的な効果を認めたが、それぞれ効果の発現機序が異なると考えられ、細胞周期への影響や放射線増刊作用などから、Docetaxel が最も併用効果が期待されると考えられた。そこで、in vivo での効果を確認すべくヌードマウス移植モデルを用いて検討した。前回の D-allose 単独

の抑制効果は 500mM 0.2ml を週 5 回、2 週間局所投与し、その効果を判定したが、投与終了後の観察期間が短く、腫瘍の再増大の可能性を認めたため、今回は用量、投与期間等を変更して D-allose の効果を再検討するとともに、Docetaxel との併用効果を観察した。その結果、D-allose 500mM 2 週投与群は投与終了時点では他の群と同程度の抑制効果を認めたが、その後再増殖を来し、コントロール群に近い増殖を認めた。一方、D-allose 500mM 3 週投与群、D-allose 50mM 3 週投与群は投与終了後も抑制効果が持続し、終了後 2 週間の時点でコントロール群に比べて 30% 程度の体積であった。両群の効果はほぼ同程度で、継続して投与すれば 50mM 濃度でも十分な効果を発現することが確認された。Docetaxel 110mg/kg を腹腔内に週 2 回投与した群では、コントロール群に比べ 15% 程度の体積に抑制され (治療開始時の体積の 2 倍)、D-allose 500mM を 2 週併用すると、治療開始時よりも縮小を認めた (0.8 倍) (図 5)。



in vitro, in vivo の結果から考察すると、D-allose は濃度にも依存するが、必要最低量を超えれば、むしろ継続的な暴露が効果発現にはより有効であることが示唆された。以上の結果より、D-allose を有効に投与することで、従来の抗がん剤や放射線治療の効果を増強することが期待でき、かつ、抗がん剤の減量、放射線の減量が可能となれば、副作用の軽減につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

① Hoshikawa H, Indo K, Mori T, Mori N.

Enhancement of the radiation effects by d-allose in head and neck cancer cells.

Cancer Lett. 2011 Mar 23. [Epub ahead of print] 査読有

②Hoshikawa H, Mori T, Mori N. In vitro and in vivo effects of D-allose: up-regulation of thioredoxin-interacting protein in head and neck cancer cells. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2010 Aug;119(8):567-71. 査読有

③Mitani T, Hoshikawa H, Mori T, Hosokawa T, Tsukamoto I, Yamaguchi F, Kamitori K, Tokuda M, Mori N. Growth inhibition of head and neck carcinomas by D-allose. Head Neck. 2009 Aug;31(8):1049-55. 査読有

[学会発表] (計2件)

①森照茂、星川広史、森望 頭頸部扁平上皮癌細胞株に対する D-allose の効果～ docetaxel との併用効果～ 第33回日本頭頸部癌学会 2009. 6. 11-12, ロイトン札幌

②Hiroshi Hoshikawa, Inhibitory effect of D-allose on cancer growth in vitro and in vivo, International Society of Rare Sugar Congress 2008, 2008. 11. 21-24 かがわ国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星川 広史 (HOSHIKAWA HIROSHI)
香川大学・医学部耳鼻咽喉科・准教授
研究者番号：70294767

(2) 研究協力者

森 照茂 (MORI TERUSHIGE)
NTT 西日本大阪病院・耳鼻咽喉科

印藤 加奈子 (INDO KANAKO)
香川大学・医学部耳鼻咽喉科・助教
研究者番号：90380188