

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09369

研究課題名(和文) 膠芽腫に対するアミノ酸代謝阻害併用ケトン食療法の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of ketogenic diet therapy with inhibitor of amino acid metabolism for glioblastoma

研究代表者

篠山 隆司 (Sasayama, Takashi)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：10379399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1) グリオーマ細胞にグルタミンナーゼ(GLS)阻害剤を投与すると、細胞の生存率が低下した。グリオーマ細胞の脳移植マウスにGLS阻害剤を投与し、腫瘍内のメタボローム解析を行うとアスパラギン、グルタミン、リジン、オルニチン、セリン、チロシン等のアミノ酸量が低下した。脳移植マウスにGLS阻害剤を投与すると極軽度生存期間を延長したが、有意では無かった。また、血管新生阻害剤と併用すると有意では無いが延長する傾向を示した。

2) グリオーマ細胞の脳移植マウスにケトン食と血管新生阻害剤を併用すると、生存期間は有意に延長した。以上より、ケトン食療법은グリオーマの治療に併用することは有用と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性の腫瘍で、生存期間中央値は2年未満であり、癌腫の中でも最も悪性の腫瘍である。従って、有用な治療法の確立が切望されている。脳は血液脳関門があり、薬剤の有効な到達が難しい臓器であるが、ケトン食療法による代謝変化を腫瘍にもたらすことは可能である。今回の研究ではGLS阻害剤の効果およびケトン食療法と抗癌剤との併用による効果を検証した。GLS阻害剤やケトン食療法では劇的な代謝変化が腫瘍細胞にもたらされることが明らかとなった。ケトン食との併用でより効果のある治療法を確立することは臨床的に非常に意義のあるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：1) Administration of a GLS inhibitor to glioma cells decreased cell viability. A GLS inhibitor was administered to mice with brain transplantation of glioma cells, and metabolome analysis of the tumors revealed that amino acid levels such as asparagine, glutamine, lysine, ornithine, serine, and tyrosine decreased. Administration of a GLS inhibitor to brain-transplanted mice prolonged minimal survival, but not significantly. In addition, when combined with an angiogenesis inhibitor, it showed a tendency to prolong, but not significantly.

2) Combining a ketogenic diet with an angiogenesis inhibitor significantly prolonged the survival period of glioma cell brain-transplanted mice. Based on the above, the ketogenic diet was thought to be useful in combination with the treatment of glioma.

研究分野：brain tumor

キーワード：ketogenic diet glioblastoma amino acid metabolism

## 1. 研究開始当初の背景

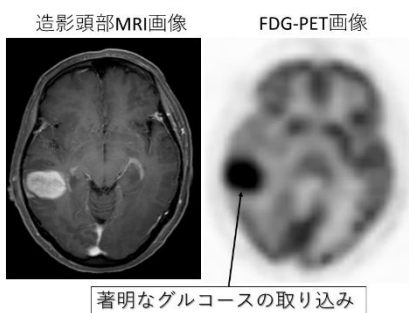
膠芽腫は脳腫瘍の中で最も悪性の腫瘍で、腫瘍の維持・増大のために大量の糖分を取り込んでいるが、低糖食であるケトン食による食事療法のみで有効性を示した報告はない。膠芽腫におけるケトン体代謝酵素の発現を解析すると、膠芽腫では BDH1 や SCOT (OXCT1) などの酵素が正常脳に比べて著明に低下していた。したがって、膠芽腫細胞はケトン体をうまく代謝利用できず、ケトン食療法により抗腫瘍効果を示すのではないかと期待した。膠芽腫細胞の脳移植マウスに、ケトン食を投与し、腫瘍の増大および生存期間を解析すると、ケトン食療法のみでは腫瘍の増大を抑制できず、生存期間の有意な延長も得られないことが判明した。そこで、普通食の腫瘍とケトン食の腫瘍をメタボローム解析で代謝物を網羅的に解析したところ、普通食腫瘍とケトン食腫瘍では明らかに腫瘍内代謝物のプロファイルが異なることが示された。

膠芽腫では、FDG-PET 検査を施行すると、正常脳よりも FDG の取り込みが亢進し、著明にグルコース代謝が亢進していることが確認できる。そして、グルコースの投与を極端に減らした末期の膠芽腫患者では腫瘍の進行が遅延したり、低糖食を摂取している患者では生存期間が延びていることを実地医療で経験している。したがって、グルコースは膠芽腫の増大・進行に欠かすことができない栄養素であることが分かる。

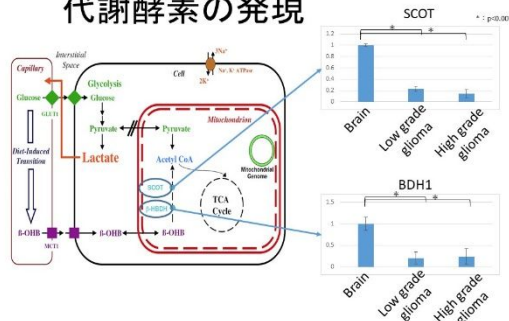
近年癌の代謝が注目され、癌特異的な代謝形態にリプログラミングされ、正常細胞では見られない Warburg 現象が起こっていることが確認されている。グリオーマでケトン体代謝酵素である SCOT や BDH1 の発現量を PCR で調べると、正常脳に比較して著明に発現が低下していた(右図)。したがって、グリオーマではケトン体を代謝してアセチル CoA に変換し、エネルギー源とする能力が低下していると考えられた。

申請者は膠芽腫のグルタミン代謝について以前より研究しており、膠芽腫細胞を低グルコース・無グルタミン培地で培養すると、オートファジーを起こして腫瘍が死滅することを観察している。また、膠芽腫細胞を mTOR 阻害剤とグルタミナーゼ阻害剤の 2 剤で代謝を抑制すると、mTOR 阻害剤単独では得られない抗腫瘍的效果が得られること確認し、報告した。(J Clin Invest. 2015 Apr;125(4)) したがって、グルコース代謝抑制とグルタミン代謝抑制は膠芽腫の治療戦略として有望であると考えられる。

膠芽腫におけるグルコースの集積  
(FDG-PET検査)



グリオーマでのケトン体  
代謝酵素の発現



## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ケトン食療法に併用する有効な治療法を探索することが目的である。その目的のため、これまでケトン食療法単独で詳細に研究してきた。自験例では、ケトン食により、膠芽腫細胞でアミノ酸代謝のリプログラミングが生じており、特にアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン量が著明に上昇していることが明らかとなった。申請者らは以前の研究で、膠芽腫細胞に

対して、mTOR 阻害剤とグルタミナーゼ阻害剤(GLS-i)との併用で mTOR 単独よりも相乗的な抗腫瘍効果を得られたことを報告している (J Clin Invest., 2015, 125(4))。mTOR はグルコース代謝や脂質代謝を抑制することが知られているが、更に GLSi によりグルタミン酸産生を抑制することで、腫瘍がアポトーシスを引き起こすことを認めている。このように、代謝リプログラミングをターゲットとした癌治療という点が、独自および創造的であると思われる。

### 3. 研究の方法

#### 1) GLS 阻害剤の膠芽腫細胞に対する効果

膠芽腫細胞株 U87、U87Viii, SVGp12 を培養し、グルタミナーゼ阻害剤 (GLSi) を投与したものとしていないもので 48 時間後、96 時間後の細胞増殖抑制効果を検討した。また、膠芽腫細胞株に対しグルタミナーゼ阻害剤 (GLSi) とテモゾロミドを投与したものと、していないもので 48 時間後、96 時間後の細胞増殖抑制効果を検討した。

#### 2) グルタミン代謝阻害剤と血管新生阻害剤併用による腫瘍内代謝の網羅的メタボローム解析

ヌードマウスの脳内に、膠芽腫培養細胞(U87MG)を移植する。移植後、グルタミン代謝阻害剤および血管新生阻害剤のベバシズマブを投与する。GLSi は腹腔内投与で、ベバシズマブは尾静脈からの血管内投与を行った。その後腫瘍を取り出し、腫瘍組織をガスクロマトグラフィー/質量分析器(GC/MS)を用いて代謝物を測定し、メタボローム解析を行い、上昇あるいは低下している代謝物を同定する。

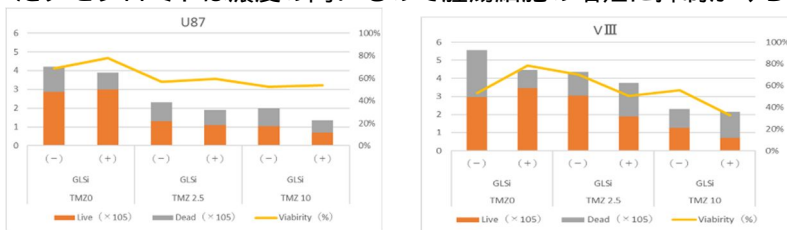
#### 3) ケトン食による抗腫瘍効果

膠芽腫細胞移植マウスを用い、ケトン食を食べさせて生存期間を観察する。また、脳腫瘍モデルマウスに GLSi および血管新生阻害剤であるベバシズマブを投与して、生存期間延長効果を調べる。

### 4. 研究成果

#### 1) GLS 阻害剤による膠芽腫細胞に対する効果

U87、V では時間経過により細胞数の増加はあるが、コントロールに比べて GLS 阻害剤では total の細胞数は少なく、viability も低下した。また、U87、V では GLSi ありのもの、またテモゾロミドは濃度の高いもので腫瘍細胞の増殖に抑制がみられる傾向があった。



#### 2) ケトン食とグルタミン代謝阻害剤併用による腫瘍内メタボローム解析

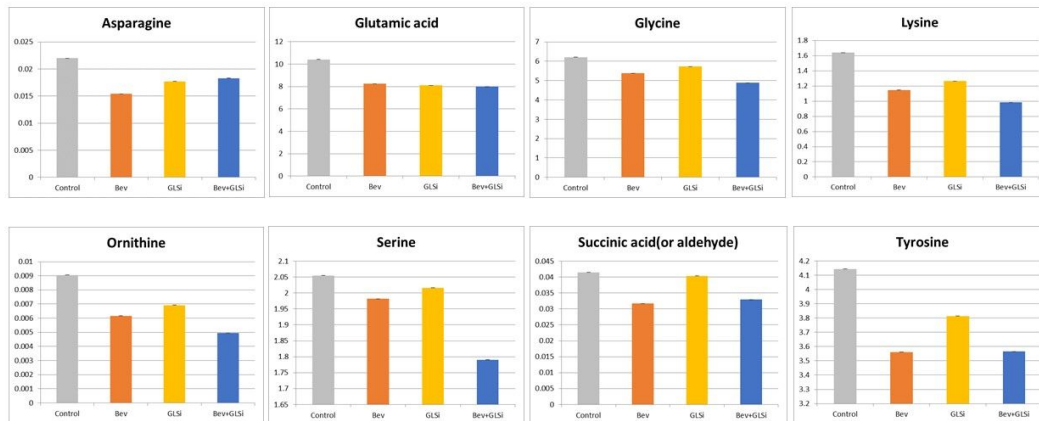
GLS 阻害剤(GLSi)を投与して下記の様に腫瘍を採取した。



採取した腫瘍組織をメタボローム解析を GC/MS で行うと、下記の様にコントロールに比較してアスパラギン、グルタミン、リジン、オルニチン、セリン、チロシンが低下した。最も低下

していたのはチロシンで、コントロールの60%ほどの量であった。しかし、血管新鋭阻害剤であるベバシズマブと比較すると、すべて低下は緩やかであった。セリンはGLSiとベバシズマブとの併用で著明に低下していた。チロシンはベバシズマブのみで著明に低下しており、併用での効果は認めなかった。一方、併用で低下していたのは、セリンのほかにはオルニチン、リジンなどであった。一方、アルギニン併用で増加していた。

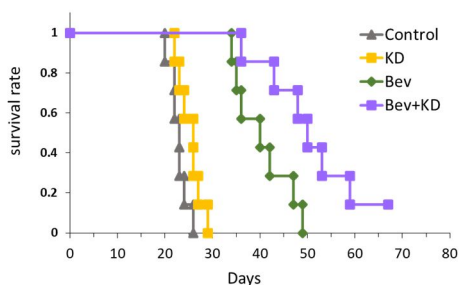
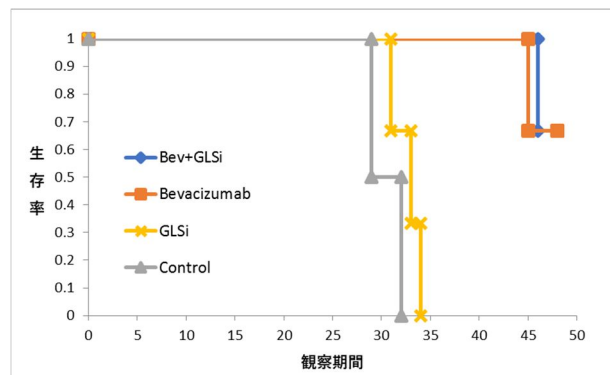
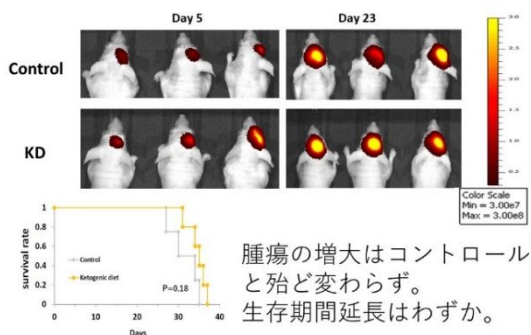
メタボローム解析 (in vitro)



### 3) ケトン食による抗腫瘍効果

ケトン食単独では有意な生存期間の延長は見られなかった。また、GLSiのみでもマウスの生存期間を有意に延長しなかった。一方、血管新生阻害剤は有意に生存期間を延長した。また、GLSiにベバシズマブを併用すると、わずかに延長したが、有意ではなかった。また、ケトン食に血管新生阻害剤を併用して生存期間を解析すると、有意に生存期間を延長した。

ケトン食のみでの抗腫瘍効果は少ない。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Maeyama Masahiro, Tanaka Kazuhiro, Nishihara Masamitsu, Irino Yasuhiro, Shinohara Masakazu, Nagashima Hiroaki, Tanaka Hiroto, Nakamizo Satoshi, Hashiguchi Mitsuru, Fujita Yuichi, Kohta Masaaki, Kohmura Eiji, Sasayama Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolic changes and anti-tumor effects of a ketogenic diet combined with anti-angiogenic therapy in a glioblastoma mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79465-x	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 Hashiguchi Mitsuru, Tanaka Kazuhiro, Nagashima Hiroaki, Fujita Yuichi, Tanaka Hiroto, Kohta Masaaki, Nakai Tomoaki, Uozumi Yoichi, Maeyama Masahiro, Somiya Yuichiro, Kohmura Eiji, Sasayama Takashi	4. 巻 160
2. 論文標題 Glutamic Acid and Total Creatine as Predictive Markers for Epilepsy in Glioblastoma by Using Magnetic Resonance Spectroscopy Before Surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e501 ~ e510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2022.01.056	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 Yamashita S., Fujita A., Kohta M., Sasayama T., Kohmura E.	4. 巻 21
2. 論文標題 Bone-destructive osseous arteriovenous fistula at the jugular bulb mimicking a glomus jugular tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochirurgie	6. 最初と最後の頁 206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuchi.2021.09.003	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 Kimura Hidehito, Osaki Susumu, Hayashi Kosuke, Taniguchi Masaaki, Fujita Yuichi, Seta Takeshi, Tomiyama Akio, Sasayama Takashi, Kohmura Eiji	4. 巻 152
2. 論文標題 Newly Identified Hemodynamic Parameter to Predict Thin-Walled Regions of Unruptured Cerebral Aneurysms Using Computational Fluid Dynamics Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e377 ~ e386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2021.05.107	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 Minami Noriaki, Tanaka Kazuhiro, Sasayama Takashi, Kohmura Eiji, Saya Hideyuki, Sampetrear Oltea	4. 巻 11
2. 論文標題 Lactate Reprograms Energy and Lipid Metabolism in Glucose-Deprived Oxidative Glioma Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 325 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11050325	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 Tanaka Kazuhiro, Sasayama Takashi, Nagashima Hiroaki, Irino Yasuhiro, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Uno Takiko, Satoh Naoko, Kitta Akane, Kyotani Katsusuke, Fujita Yuichi, Hashiguchi Mitsuru, Nakai Tomoaki, Kohta Masaaki, Uozumi Yoichi, Shinohara Masakazu, Hosoda Kohkichi, Bamba Takeshi, Kohmura Eiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Glioma cells require one-carbon metabolism to survive glutamine starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 1186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01114-1	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 Matsuo Kazuya, Hosoda Kohkichi, Tanaka Jun, Yamamoto Yusuke, Imahori Taichiro, Nakai Tomoaki, Irino Yasuhiro, Shinohara Masakazu, Sasayama Takashi, Kohmura Eiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Geranylgeranylacetone attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through the augmentation of HSP 27 phosphorylation: a preliminary study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12868-021-00614-7	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 Nakahara Masahiro, Imahori Taichiro, Tanaka Kazuhiro, Okamura Yusuke, Arai Atsushi, Yamashita Shunsuke, Iwahashi Hirofumi, Mori Tatsuya, Sasayama Takashi, Kohmura Eiji	4. 巻 16
2. 論文標題 Iatrogenic intracranial vessel dissection during mechanical thrombectomy rescued by emergent stenting: 2 case reports	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiology Case Reports	6. 最初と最後の頁 835 ~ 842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radcr.2021.01.040	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 Tanaka Kazuhiro, Sasayama Takashi, Nagashima Hiroaki, Irino Yasuhiro, Takahashi Masatomo, Izumi Yoshihiro, Uno Takiko, Satoh Naoko, Kitta Akane, Kyotani Katsusuke, Fujita Yuichi, Hashiguchi Mitsuru, Nakai Tomoaki, Kohta Masaaki, Uozumi Yoichi, Shinohara Masakazu, Hosoda Kohkichi, Bamba Takeshi, Kohmura Eiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Glioma cells require one-carbon metabolism to survive glutamine starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01114-1	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 Maeyama Masahiro, Tanaka Kazuhiro, Nishihara Masamitsu, Irino Yasuhiro, Shinohara Masakazu, Nagashima Hiroaki, Tanaka Hiroto, Nakamizo Satoshi, Hashiguchi Mitsuru, Fujita Yuichi, Kohta Masaaki, Kohmura Eiji, Sasayama Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolic changes and anti-tumor effects of a ketogenic diet combined with anti-angiogenic therapy in a glioblastoma mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79465-x	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 Nakahara Masahiro, Imahori Taichiro, Sasayama Takashi, Nakai Tomoaki, Taniguchi Masaaki, Komatsu Masato, Kanzawa Maki, Kohmura Eiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Refractory communicating hydrocephalus after radiation for small vestibular schwannoma with asymptomatic ventriculomegaly: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Radiology Case Reports	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radcr.2020.04.063	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 Maeyama Masahiro, Sasayama Takashi, Tanaka Kazuhiro, Nakamizo Satoshi, Tanaka Hiroto, Nishihara Masamitsu, Fujita Yuichi, Sekiguchi Kenji, Kohta Masaaki, Mizukawa Katsu, Hirose Takanori, Itoh Tomoo, Kohmura Eiji	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 Medicine	6. 最初と最後の頁 4114 ~ 4125
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 Fujita Yuichi, Kohta Masaaki, Sasayama Takashi, Tanaka Kazuhiro, Hashiguchi Mitsuru, Nagashima Hiroaki, Kyotani Katsusuke, Nakai Tomoaki, Ito Tomoo, Kohmura Eiji	4. 巻 137
2. 論文標題 Intraoperative 3-T Magnetic Resonance Spectroscopy for Detection of Proliferative Remnants of Glioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 149 ~ 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2020.01.217	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 篠山隆司
2. 発表標題 グリオブラストーマに対するケトン食の臨床試験 - 神戸大学での取り組み -
3. 学会等名 第3回癌ケトン食研究会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠山隆司、田中一寛、橋口充、藤田祐一、田中宏知、西原賢在、谷口理章
2. 発表標題 膠芽腫関連てんかんの治療の現状と課題
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Sasayama, Kazuhiro Tanaka, Yuichi Fujita, Mitsuru Hashiguchi, Junichi Sakata, Masaaki Kohta, Masaaki Taniguchi
2. 発表標題 Current status of photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 篠山隆司、田中一寛、甲田将章、中井友昭、魚住洋一、藤田祐一、谷口理章、甲村英二
2. 発表標題 当院での悪性脳腫瘍に対する術中MRIの現状と有用性の検証
3. 学会等名 日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠山隆司、田中一寛、藤田祐一、橋口充、前山昌博
2. 発表標題 初発中枢神経悪性リンパ腫(PCNSL)に対するR-MPV療法の安全性と有用性について
3. 学会等名 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	田中 宏知  (TANAKA HIROTOMO)  (10569239)	神戸大学・医学研究科・医学研究員   (14501)	
研究分担者	西原 賢在  (NISHIHARA MASAMITSU)  (20452493)	神戸大学・医学研究科・医学研究員   (14501)	
研究分担者	田中 一寛  (TANAKA KAZUHIRO)  (70467661)	神戸大学・医学研究科・助教   (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	篠原 正和  (SHINOHARA MASAKAZU)  (80437483)	神戸大学・医学研究科・准教授    (14501)	

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