

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640106

研究課題名(和文)オリゴ糖の多様性を利用した安全な抗がん剤の開発

研究課題名(英文)Development of a safe anticancer drug by using oligosaccharide multiplicity

研究代表者

細見 修 (Hosomi, Osamu)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・客員教授

研究者番号：30134274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨髄性慢性白血病細胞の増殖を強く抑制する二糖(MeINH2, Gal 1-6GlcNH2)の開発や、その臨床応用に向けた研究を進めてきた。MeINH2が通常の抗がん剤のような副作用のない安全なものとなれば、広く社会に貢献できる。

がん細胞がMeINH2を取り込む機序の解明は残っているが、がん細胞のクロマチン凝集や小胞体からのカルシウムイオンの放出を招き、アポトーシスを誘導すると思われる。又メタロチオネインの異常発現から、がん細胞はMeINH2を排除するためメタロチオネインを総動員させると推測された。リボ核タンパク質がMeINH2と反応し、そのスプライシング機能を阻害することも推測された。

研究成果の概要(英文)：We have developed oligosaccharide (Gal 1-6GlcNH2) which suppresses proliferation of a human leukemia cell hard and have advanced a study for the effect of the oligosaccharide by using mice. If MeINH2 is a safe anticancer drug for body and has scarcely any side effect like a usual anticancer drug, we expect it can contribute widely to society.

Elucidation of the mechanism which a cancer cell takes MeINH2 in is left. However we find that MeINH2 causes chromatin aggregation of a cancer cell, and that release and cohesion of a calcium ion from ER. Thus we expect that these affects of MeINH2 to cancer cell induces apoptosis. We observed over expressions of metallothionein genes of K562 cell by a DNA microarray and RT-PCR, indicating that MeINH2 cytotoxicity against cancer cell exceeds the limit to which a cancer cell can correspond. Moreover, the binding reaction of hnRNP-A1 and MeINH2 was identified, indicating that a splicing activity of hnRNP-A1 is inhibited by MeINH2.

研究分野：糖鎖科学

キーワード：オリゴ糖 多様性 がん細胞 抗がん剤 アポトーシス グルコサミン 副作用

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現代の我が国の死亡原因は 1/3 が悪性新生物で、最も有効な薬剤等の開発が急がれている重要課題である。この「がん死」を防ぐには生活習慣の見直し・早期発見・早期治療が挙げられるが、依然として手遅れ・抗がん剤が効かないケース等、多くの課題が残されているのも現状である。

(2) 一方、糖類の中で希少糖の様々な機能が注目され、生活習慣病の改善効果があるとされるものもあるが、国内外でも糖類による「がん」抑制研究は始まったところと言える。我々は「がん」対策に副作用のない安全な抗がん作用を持つ糖類の発見・開発を進める中、単純な構造である Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> 等 6 種類を酵素合成し、ヒト慢性白血病細胞 K562 の増殖を劇的に抑制するものを見出した (Hosomi, et al. 2009)。類似の構造を持つ糖 (Gal $\beta$ 1-4GlcNH<sub>2</sub>, Gal $\beta$ 1-6GlcNH<sub>2</sub>) 等はほとんどその作用を示さなかった。この作用は他の哺乳類 (イヌ、ネコ、マウス) のがん細胞に対しても同様であった。

(3) この結果と共に、マウスを使った *in vivo* 実験でマウス腹水がんの腹腔や背部移植に対して Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> の静脈投与実験を行い、60~80%で背部固型がんの消失と 20~40%で委縮を観察した (Ito, et al. 2012)。更に、腹腔移植では顕著な転移抑制が認められ (Fujita, et al. 未発表)、Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> はヒトを始めとする哺乳類の「がん」に共通するメカニズムで抑制するものと予想するに至った。

## 2. 研究の目的

(1) マウスを使った *in vivo* がん移植実験で、Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> の投与方法として静注や直接投与以外に経口投与での効果の有無や過剰投与による副作用の有無、更に、他種移植がんに対する糖の効果を経口投与方法について明らかにする。

(2) *in vitro* 実験で、がん細胞が持っているレクチンの一種 galectin-1 (Gal-1) 分子と

Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> の結合性を分子間相互解析装置等で明らかにする。

(3) Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> はがんタンパク質の一つである H-Ras と galectin-1 の複合体形成に阻害的に作用するのか、又、アンカー分子 (脂質) との複合体形成を阻害するのか、更に、種々の MAPK のシグナル伝達系への影響について明らかにする。

(4) これらによって Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> が従来の抗がん剤と異なり、副作用のない安全でヒトの QOL を損なわない抗がん剤であることを明らかにする。

(5) 障害を持った人たちは、がん罹患によって更に社会的弱者に陥る可能性を持っている。この MeINH<sub>2</sub> が QOL を低下させないのであれば、広く社会に貢献できる。

## 3. 研究の方法

(1) がん細胞の培養系に MeINH<sub>2</sub> を添加して細胞のアポトーシスが誘導されるか否かを、小胞体からの Ca<sup>++</sup> 放出や収束を観測することで確認するために、Fluo-4M を添加して蛍光顕微鏡下で観察する。

(2) マウス腹腔や背部に移植したがん (例 EAC) に対し、抗がん作用を持つ Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> を経口投与し、その投与量・投与期間・副作用の有無について検討する。

(3) 他種移植がんについても、Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> の投与効果を尾静脈・経口投与等により確認すると共に、転移性のがんについても Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> の効果を確認する。これらがん細胞の動向は PC3M-luc2 や 4T1-luc2 を使ってイメージング解析して確認する。

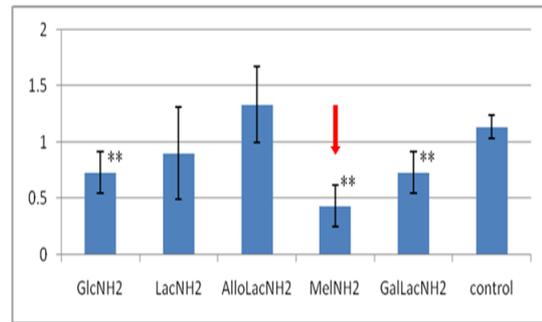
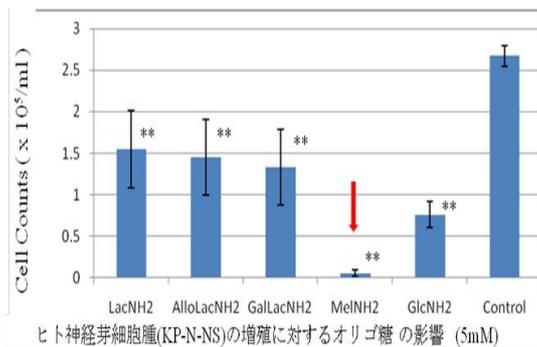
(4) 二糖類 Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> とがん細胞膜上の受容体と思われる galectin-1 や Ras、H-Ras がんタンパク質間の相互作用を分子間相互作用解析装置で確認する。

H-Ras-galectin-1 複合物を形成するどの過程で、Gal $\alpha$ 1-6GlcNH<sub>2</sub> は阻害的に作用するのか、更に下流の MAPK への影響を明らかにして

がん抑制作用の全容を解明する。

#### 4. 研究成果

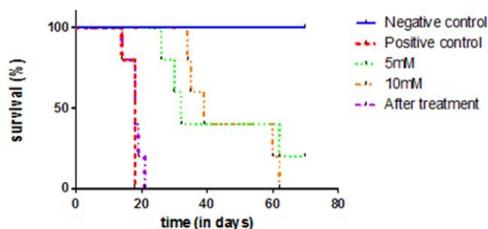
我々が開発した新規二糖類 MelNH<sub>2</sub> の培養がん細胞に対する作用を K562 やイヌリンパ腫で行った研究では、MelNH<sub>2</sub> を加えて短時間 (~2.5 時間) に小胞体から Ca<sup>++</sup> の放出が見られ、更に Ca<sup>++</sup> の収束も観察された。またクロマチンの凝集や細胞の観察され、更に委縮など、アポトーシスの誘導が観察された。また、K562 細胞では MelNH<sub>2</sub> に親和性を持つタンパク質として hnRNP-A1 が同定された。この hnRNP-A1 は pre-mRNA の成熟過程(splicing)の一部を担い、mRNA となって予定されたタンパク質の合成を行う。この重要な過程で MelNH<sub>2</sub> は pre-mRNA の成熟を阻害する可能性が考えられた。これらは MelNH<sub>2</sub> によって、がん細胞は小胞体へのストレス状態となって Ca<sup>++</sup> 放出やメタロチオネイン (群) の異常発現(over expression)を来すと考えられる。メタロチオネイン isozyme の 5~6 種類は、DNA マイクロアレー解析で対照の 8~32 倍の発現量という異常発現状態が見られた。これら MelNH<sub>2</sub> のがん細胞に対する作用は、最終的にアポトーシスを誘導するものと予想された。しかし、アポトーシスでは DNA のラダー状態が観察されるとされるが、今回の研究では明瞭な DNA ラダーは見られなかった。これは MelNH<sub>2</sub> のがん細胞への作用機序が典型的なアポトーシスとは異なる可能性を示しているとも考えられる。



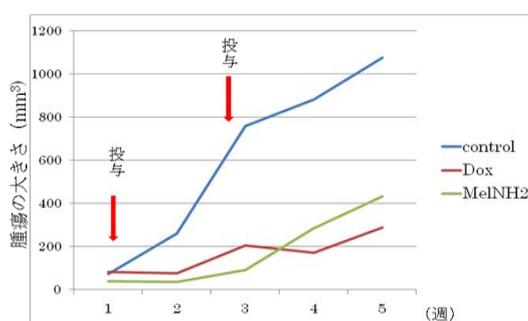
ヒト乳がん由来細胞(SK-BR-3)の増殖に対するオリゴ糖の作用(5mM)

また、ヒトトリプルネガティブ(「エストロゲン受容体」、「プロゲステロン受容体」、「ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2)」を発現していない)乳がんのモデル細胞である MDA-MB-231 用いて、MelNH<sub>2</sub> と GlcNH<sub>2</sub> の増殖抑制効果の比較検討と MelNH<sub>2</sub> の作用機序の解析を試みた。細胞の増殖や生存、アポトーシス、抗酸化作用などに関するいくつかのタンパク質の発現に顕著な変化が生じることが明らかとなった。MelNH<sub>2</sub> 処理した細胞では、細胞増殖やがん関連遺伝子などで大きな差が見られたが、とりわけ、thioredoxin interacting protein (TXNIP) の発現は Control と比較して 5 倍以上高く、gap junction protein-delta 2 は 170 倍、Toll-like receptor 8 は 10 倍ほど高かった。また、MelNH<sub>2</sub> 処理細胞では、lipopolysaccharide binding protein (LBP) の発現が Control と比較して 1/70 に、NADPH oxidase 1 の発現は 1/40 に、Glutathione peroxidase 6 の発現は 1/15 に、BCL2-like 10 (BCL2L0) の発現は 1/30 ほどにそれぞれ減少していた。更に、高転移性を有することが特徴であるが、galectin-9 や CD44 などがこのがん細胞の転移に関与している可能性も報告されている。MDA-MB-231 細胞への MelNH<sub>2</sub> の添加によって CD44 の発現はほとんど影響を受けなかったものの、galctin-9 の発現は上昇することが示された。これは、転移に際して CD44 が起点となって他組織(臓器)の HA(ヒアルロン酸)に結合して転移を行うことが明らかになっているが、galectin-9 はその転移を制

御する分子とされている。今回の実験では、細胞の増殖が抑制されることと共に、galectin-9の発現がMelNH<sub>2</sub>で上昇することが示唆され、がん転移に対しても効果的に抑える可能性が示された。



マウスエールリヒ腫水がん移植と糖投与の効果(生存日数)



マウス骨肉腫移植とMelNH<sub>2</sub>とDoxorubicin(抗がん剤)の尾静脈投与効果

小動物を使った研究では、マウス腹水がんや骨肉腫等を移植して、MelNH<sub>2</sub>の投与ががん組織に与える影響を観察した。腹腔に腹水がん細胞とMelNH<sub>2</sub>を投与すると、positive controlの二倍以上の生存日数が見られ、90日間の実験期間では全くがん発症(腹部膨満)が観察されなかった個体も見られた。しかし、腹腔移植後に腹部が膨満した状態でMelNH<sub>2</sub>を一度投与(腹腔内)しても、既にがん細胞の増殖を抑えることはできなかった。これは投与量や回数などを検討することが必要と考える。更に、背部への移植とMelNH<sub>2</sub>の投与によって、顕著にがん組織の委縮や消失が見られ、その程度は80%程度のマウスに観察された。この研究によって、MelNH<sub>2</sub>がマウス尾静脈経由でがん組織に到達し、効果的にがん細胞の増殖を抑制(死滅)することが明らかになった。また、マウスは

MelNH<sub>2</sub>(100mM)の投与(100~200 $\mu$ l)によっても日常的な活動に影響は見られず、更に二度の糖投与によってもアナフィラキシーなど免疫学的に重篤な症状を招くこともなかった。MelNH<sub>2</sub>の血流中の濃度を推測すると、10~20mMにもなる可能性があり、かなりの高濃度であると予想される。また、ヒト中皮腫の移植実験(ヌードマウス)では25mMのMelNH<sub>2</sub>を隔日投与(美静脈)することでも十分がんの播種を抑制することが観察された(Ithoら、未発表)。このin vivoの実験から、MelNH<sub>2</sub>の静脈投与は生体内にできた腫瘍に対して、分解されたり直ちに排出されたりすることなく患部組織に到達し、がん細胞の増殖抑制に働くことが証明できたと考える。これらのin vivo実験で、比較的高濃度のMelNH<sub>2</sub>(100mM)投与からは臨床的にはがん組織に集中的投与によって、短時間に高い抑制効果が期待できる可能性が確認できた。また、輸液等に混合して間欠的な投与によって、微小がんや他臓器に転移したがんに対しても、正常組織にダメージを与えることなく、効果的にその増殖を抑制することができる可能性が示された。しかし、経口投与も隔日投与を試みたが、効果は確認できなかった。これは、MelNH<sub>2</sub>の投与量が十分量でなかった可能性が高く、今後の検討課題といえる。

これらの研究によって、MelNH<sub>2</sub>は生体に対しても安全に且つ、効果的に投与することが可能であり、生活の質(QOL)を低下させることがないことが示唆された。また、従来の抗がん剤との併用を検討することも重要で、がん種に特異的な抗がん剤との併用で、患者負担の軽減が図れると考える。課題として、小動物での実験では規模が小さく(20頭程度)、更にMelNH<sub>2</sub>の抗がん作用を検証する必要がある。更に、肝臓・腎臓・脾臓など組織のがんに対するMelNH<sub>2</sub>の効果の確認が必須となる。更に、抗がん剤分子によっては

脳関門の通過が困難となることも問題となるので、MelNH<sub>2</sub>の投与が脳腫瘍へも効果が見られるかを明らかにする必要がある。

<引用文献>

Hosomi O, Misawa Y, Takeya A et al. Novel oligosaccharide has suppressive activity against human leukemia cell proliferation. *Glycoconj J* 2009; **26**: 189-98.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

上村郁人、山本菜々子、久保原禅、細見修、  
「骨肉腫を移植したマウスに投与したオリゴ糖(MelNH<sub>2</sub>, Galα1-6GlcNH<sub>2</sub>)と抗がん剤の作用の比較。第 29 回 日本キチン・キトサン学会(熊本、東海大学)2015, 8, 21-22.

牧岡優佳、山本菜々子、久保原禅、細見修、  
オリゴ糖添加による MDA-MB-231 (高転移性ヒト乳がん細胞)の増殖抑制と高発現するマーカーの減少について。第 29 回 日本キチン・キトサン学会(熊本、東海大学)2015, 8, 21-22.

藤田一樹、中里龍之介、牧岡優佳、山本菜々子、久保原禅、三澤義知、尾形慎、細見修、  
新規開発した二糖類 MelNH<sub>2</sub> (Galα1-6GlcNH<sub>2</sub>)の in vitro, in vivo におけるがん増殖抑制効果とそのメカニズム。「がん研究の特性を踏まえた支援活動」公開シンポジウム(ポスター発表)東京、一橋講堂、2016, 2, 8-9.

〔図書〕(計 1 件)

細見修、アミノ糖について。ジャパンフィットネス、2016, 総 55 頁(24-25)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

細見 修 (HOSOMI, Osamu)

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・客員教授

研究者番号：30134274

##### (2)研究分担者

佐々木 啓 (SASAKI, Hiraku)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・准教授

研究者番号：20384969