

令和元年5月13日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08497

研究課題名(和文) 希少糖D-アロースによるTXNIP発現誘導を介した癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new cancer therapy using D-allose-inducible tumor suppressive factor thioredoxin interacting protein (TXNIP)

研究代表者

神鳥 和代 (Kamitori, Kazuyo)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：40457338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、培養癌細胞で希少糖の一種D-アロースによりthioredoxin interacting protein (TXNIP)の発現が誘導され、それにより増殖抑制を引き起こすことがわかっており、この作用を利用した癌治療法の開発が期待されている。本研究ではこの発現誘導の分子メカニズムを解析し、p38MAPK 経路およびErk1/2経路、転写調節因子MondoAが重要な役割を担うことを明らかにした。また腫瘍モデルマウスでD-アロースが増殖抑制効果を示すこと、その際TXNIPを含む細胞周期制御因子の発現が増加することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D-アロースは入手が困難で高価なことから、その生理作用についてほとんどわかっていなかった。近年香川大学で大量生産が可能になったことから解析が進み、癌細胞の増殖を抑制することが明らかになった。この作用は将来D-アロースを癌治療に利用できる可能性を示しており、それに向けて作用機構の解析は必須である。そのため本研究ではD-アロースの癌細胞増殖抑制作用において中心的な役割を担うTXNIPの発現誘導機構の解析を行った。またD-アロースのモデルマウスにおける抗腫瘍効果およびその作用機構の解析から、臨床応用の可能性がさらに裏付けられた。

研究成果の概要(英文)：We have previously showed that rare sugar D-allose up-regulates thioredoxin interacting protein (TXNIP), which causes growth inhibition in cultured cancer cells. D-allose could be utilized for a new strategy of cancer therapy due to the anti-proliferative effect. Here we analyzed the molecular mechanism of TXNIP up-regulation. The result showed that p38MAPK cascade, Erk1/2 cascade, and transcription factor MondoA play important roles in TXNIP up-regulation. Further analysis in model mice revealed that D-allose exerts growth inhibitory effects on cancer cells in vivo. In addition, immunohistochemical analysis revealed the increase of TXNIP in D-allose-treated tumor tissues. Overall, present works elucidated physiological effects of D-allose and the regulatory mechanisms of TXNIP in cancer cells, and would make a great contribution to the establishment of a new strategy of cancer therapy utilizing D-allose and TXNIP.

研究分野：生理学

キーワード：希少糖 D-アロース TXNIP 癌治療

1. 研究開始当初の背景

当グループでは、希少糖の一種 D-アロース (D-グルコースの 3 位のエピマーである単糖) が、複数の株化癌細胞において Thioredoxin interacting protein (TXNIP) の遺伝子およびタンパク質発現を誘導し、そのことが細胞周期の停止を引き起こすことを明らかにしてきた。TXNIP の発現誘導物質は他にも報告されているが、その中で D-アロースの誘導効果は特に高いレベルを示した。TXNIP は多くの組織で正常細胞には発現しているが、癌組織および癌細胞においては、発現が著しく減少している癌抑制タンパク質である。また、癌組織で TXNIP の発現が持続している場合には予後が良好で転移が少ないこと、TXNIP の変異マウスは癌の発症率が高いことも報告された。以上の背景から、D-アロースの TXNIP 発現誘導作用を利用した新規癌治療法・予防法開発の可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

(1) TXNIP の発現量はどのように調節されているか？

正常組織では豊富に存在する TXNIP が減少すると細胞は癌化する傾向があるが、癌化に至るメカニズムは解明されていない。また TXNIP の癌細胞における発現制御機構もほとんど未解明である。本研究では TXNIP の発現を顕著に誘導する D-アロースを用い、この分子の発現制御に関与するシグナル伝達経路を解析することにより、新たな発癌機構の解明、さらには癌治療法、発癌の予防法の開発への基盤をつくる (図 1)。

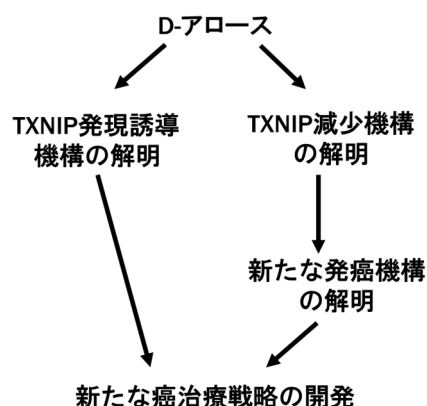


図1 D-アロースを用いた癌治療法開発

(2) D-アロースは *in vivo* において癌抑制効果を持つか？

ヌードマウスに癌細胞を皮下移植して作成した腫瘍モデルマウスを用いた実験から、D-アロースは腫瘍組織を縮小させること、さらに放射線または抗癌剤と併用することで、それらの抗腫瘍効果を顕著に増強させることが明らかになっている。この結果をさらに分子レベルで解析すること、及び最適な投与方法を検討することにより、D-アロースを利用した新規の癌治療法の開発へつなげる。

3. 研究の方法

(1) TXNIP の発現制御機構の解析：株化癌細胞に D-アロースを添加し、TXNIP の発現上昇に至るまでのシグナル伝達系を生化学的手法 (Western blots など) 、分子生物学的手法 (Real time PCR 法など) を用いて解析する

(2) TXNIP の減少による発癌機序解析：株化癌細胞において TXNIP が減少する際のシグナル伝達系を (1) と同様に生化学的、分子生物学的手法を用いて解析する。

(3) D-アロースの in vivo における癌抑制効果の分子レベルでの解析：腫瘍モデルマウスに D-アロースを投与した際のタンパク質発現パターンを免疫学的手法により解析する。

4. 研究成果

(1) D-アロースにより MAPK 経路を介して TXNIP の翻訳が誘導される；株化肝癌細胞 HuH-7 において、D-アロースにより 3 種類の MAP kinase Erk1/2, p38MAPK, JNK とシグナル伝達経路が一過性に活性化すること、またそれぞれの経路の阻害剤を用いてそれらの活性化が TXNIP の増加に関与することを明らかにした (図 2)。阻害剤を用いた Real time PCR による発現解析から、これらの経路は転写調節には関与していないことが示された。さらに D-アロースにより Erk1/2, p38MAPK の下流で働く Mnk1、その下流の翻訳開始因子 eIF4E が活性化されることが明らかになった。この結果は D-アロースによる Erk1/2, p38MAPK の活性化が TXNIP の翻訳の調節に関与していることを示唆している。

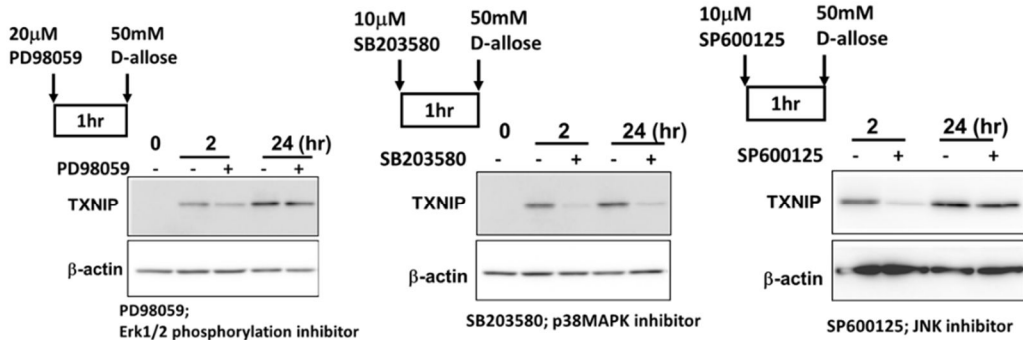


図 2 D-アロースによる TXNIP 誘導は MAPK 経路を介する

(2) D-アロースによる TXNIP の転写調節機構；株化肝癌細胞 HuH-7 において D-アロースにより転写調節因子 MondoA が核内で増加することを示した。MondoA は D-グルコース取り込み、リン酸化により増加し、D-グルコースの取り込みを制御する因子として知られている。しかし本研究では D-アロースによる MondoA の増加にはリン酸化合物は関与しないことが明らかになり、D-アロースと D-グルコースによる MondoA の増加経路は異なっていることを示唆した (図 3)。

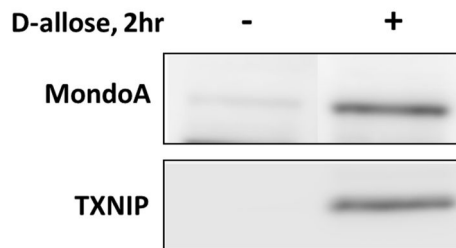


図 3 D-アロースにより転写因子 MondoA と TXNIP が核内で増加する

(3) TXNIPの減少による発癌機序解析；TXNIPは正常細胞では多く発現し、癌細胞では顕著に減少している。このことからすでに発現しているTXNIPの量が減少することは、細胞が癌化する過程を反映していると考えられ、このメカニズムを解析した。D-アロースにより発現誘導されたTXNIPは血清刺激により減少するが、この過程はユビキチン-プロテアソーム系による分解とタンパク質合成阻害によることを示す結果が得られた(図4)。さらにTXNIP合成阻害には、Erk1/2とp38MAPKシグナル伝達系の持続的な活性化が関与していることを明らかにした。

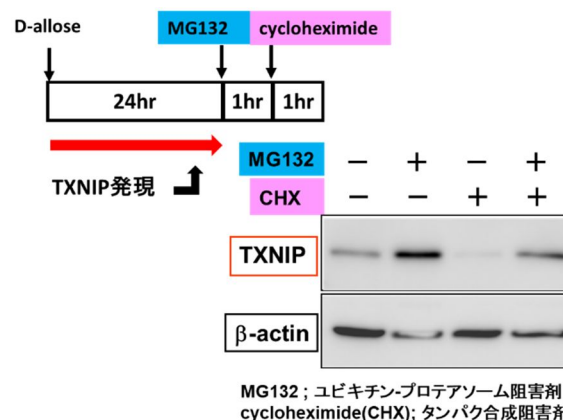


図4 TXNIPはタンパク合成阻害により減少し、プロテアソーム阻害により増加する

(4) D-アロースの *in vivo*における癌抑制効果の分子レベルでの解析；これまでにD-アロースはマウス腫瘍組織への皮下投与により腫瘍組織の体積を減少させること、また放射線照射および抗癌剤ドセタキセルとの併用効果があることを明らかにした。本研究では同様の系において分子レベルでの解析を行った。D-アロースを投与すると腫瘍体積の減少に伴い、TXNIPおよび細胞周期抑制因子 p27^{kip1}, p21^{cip1}が増加することから、D-アロースがTXNIPの増加、細胞周期進行の抑制を介して抗腫瘍効果を持つことを示した。また、放射線照射すると副作用で

皮膚において炎症反応が起きるが、D-アロースを併用したマウスの皮膚では炎症性サイトカインTNF-alphaが減少していることを明らかにした。この結果はD-アロースを併用することにより、抗腫瘍作用が増強されるだけでなく放射線による副作用を軽減させることを示唆している。さらに腫瘍モデルマウスにおいてD-アロースと抗癌剤シスプラチンとの併用が有効であることも明らかにした(図5)。

以上の結果はD-アロースがTXNIPの発現誘導することを利用した新たな癌治療法・予防法に向けた分子レベルでの重要な知見となる。

Lung squamous carcinoma EBC1

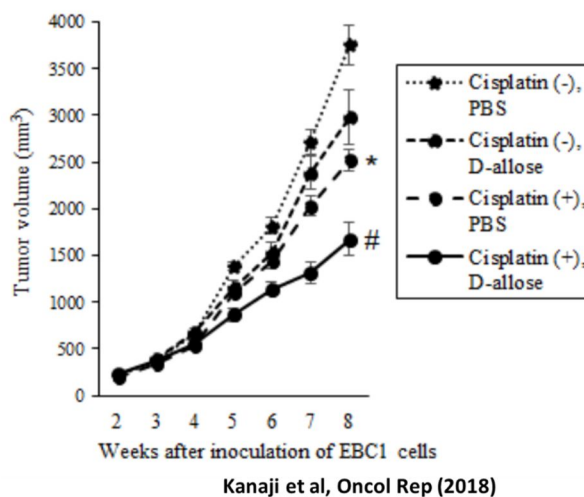


図5 *in vivo*におけるD-アロースとシスプラチンの相乗効果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- Noguchi C, Kamitori K, Hossain A, Hoshikawa H, Katagi A, Dong Y, Sui L, Tokuda M, Yamaguchi F. Tohoku J Exp Med. 査読有 238(2):131-41. 2016 doi: 10.1620/tjem.238.131.
- Shinohara N, Nakamura T, Abe Y, Hifumi T, Kawakita K, Shinomiya A, Tamiya T, Tokuda M, Keep RF, Yamamoto T, Kuroda Y. J Stroke Cerebrovasc Dis. 査読有 25(9):2184-8. 2016 doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.01.030.
- Kanaji N, Kamitori K, Hossain A, Noguchi C, Katagi A, Kadowaki N, Tokuda M. Oncol Rep. 査読有 39(3):1292-1298. 2018 doi: 10.3892/or.2018.6192.
- Hoshikawa H, Kamitori K, Indo K, Mori T, Kamata M, Takahashi T, Tokuda M. Oncol Lett. 査読有 15(3):3422-3428. 2018 doi: 10.3892/ol.2018.7787.
- Iwasaki Y, Sendo M, Dezaki K, Hira T, Sato T, Nakata M, Goswami C, Aoki R, Arai T, Kumari P, Hayakawa M, Masuda C, Okada T, Hara H, Drucker DJ, Yamada Y, Tokuda M, Yada T. Nat Commun. 査読有 9(1):113. 2018 doi: 10.1038/s41467-017-02488-y.
- Kamitori K, Yamaguchi F, Dong Y, Hossain A, Katagi A, Noguchi C, Hirata Y, Tsukamoto I, Hatano N, Tokuda M. FEBS Open Bio. 査読有 8(11):1804-1819. 2018 doi: 10.1002/2211-5463.12518.
- Mooradian AD, Haas MJ, Onstead-Haas L, Tani Y, Iida T, Tokuda M. Int J Vitam Nutr Res. 査読有 1-11. 2019 doi: 10.1024/0300-9831/a000517.

〔学会発表〕(計 9 件)

- 神鳥 和代、The 6th Joint Symposium between Kagawa University and Chiang Mai University、 2016
- 神鳥 和代、第 35 回日本糖質学会年会、 2016
- 神鳥和代、山口文徳、董有毅、徳田雅明 他、第 68 回日本生理学会中国四国地方会、 2016
- 神鳥 和代、Rare Sugar Congress 2016 in Kagawa、 2016
- 神鳥 和代、第 94 回日本生理学会大会、 2017
- 神鳥 和代、第 36 回日本糖質学会年会 2017
- 神鳥 和代、The 7th Joint Symposium between Kagawa University and Chiang Mai University、 2018
- 神鳥 和代、第 11 回かがわ糖質バイオフォーラム、 2019
- 神鳥 和代、藤原 祐一郎、9thFAOPS Congress、 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：徳田 雅明

ローマ字氏名：TOKUDA, masaaki

所属研究機関名：香川大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：10163974

研究分担者氏名：山口 文徳

ローマ字氏名：YAMAGUCHI, fuminori

所属研究機関名：香川大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：40271085

研究分担者氏名：董 有毅

ローマ字氏名：DONG, youyi

所属研究機関名：香川大学

部局名：医学部

職名：学内講師

研究者番号（8 桁）：90457341

(2)研究協力者 0 名