

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09177

研究課題名（和文）希少糖はグリオーマの新規治療となりうるか？

研究課題名（英文）Rare sugar as novel treatment for glioblastoma

研究代表者

小川 大輔 (Ogawa, Daisuke)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：70524057

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膠芽腫は脳腫瘍の中で最も予後が悪く、早急な追加療法の開発が望まれている。現在、単糖は希少糖を含め、約50種類ほどが確認されているが、グルコース以外はほとんどそのバイオロジーが研究されていない。その中でもD-alloseについては、近年抗酸化作用や、他癌腫においては抗腫瘍効果が報告されているものの、脳腫瘍についてはこれまで報告がない。今回、グリオーマ細胞株を用いて、D-alloseの有する抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* にて評価し、治療効果を確認、論文に投稿した。今後、その機序につき検討することで、単糖をターゲットとした全く新しい分野のがん治療を切り開く。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、脳腫瘍と希少糖との関係を研究した報告はない。本研究結果は世界初となる希少糖を用いた膠芽腫の治療戦略の基盤となりうる。他癌腫においては遺伝子発現への影響も報告されており、今回得られた希少糖の抗腫瘍効果について、今後の研究で膠芽腫においても同様の遺伝子発現の変化があれば、その発現をコントロールすることで、抗腫瘍効果を発揮させる真新しい治療戦略につながる可能性を秘めており、このことから本研究から得られる成果は、社会的に極めて大きなインパクトを与えると想定される。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma is known as the most aggressive form of brain neoplasm mandates the need to develop new therapeutic strategies. Very few biology is known about rare sugar and none have reported its interaction with glioblastoma. Herein we have researched for anti-tumor effect of D-allose both *in vitro* and *in vivo*, and its mechanism to explore for the novel target therapy.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 希少糖 D-allose 脳腫瘍

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、標準治療であるテモゾロマイド (**TMZ**) を投与しても、平均生存期間は **14** か月であり、早急な追加療法の開発が望まれている。自然界に多量に存在する単糖に対し、微量しか存在しない単糖を希少糖と総称しており、キシリトールなどが日本では認知されているが、単糖のバイオロジーは、グルコース以外研究されていない未知の領域であり、希少糖の生物学的機能や存在意義については、ほとんどわかっていない。これまで大量生産が困難であったアルロース、アロースといった希少糖を当大学で量産化に成功したものの、これまで脳腫瘍との関係は研究してこなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、**D-allose** をはじめとする希少糖に、膠芽腫に対する抗腫瘍効果があるのか同定すること、であるが、それ以上に、希少糖そのものの生物学的存在意義について明らかにする一端を担うこと、である。

具体的には、その抗腫瘍効果メカニズムについて、糖代謝が関連しているのか、あるいは、糖代謝とは全く独立して、遺伝子発現に変化をもたらすドライバー分子として働いているのか、といったエネルギー代謝と関連しない、系が存在するかを明らかにすることである。

希少糖による生物学的効果といえば、グルコースと競合的に本来の解糖系を阻害することで、細胞をエネルギー不足に陥らせるメカニズムが想像しやすい。しかし、これまでの当大学からの研究成果報告によれば、**D-allose** を投与することにより、**CDKN2B** などの **cell cycle** に関わる因子の発現上昇がみられるなど、**D-glucose** と独立した、エネルギー代謝だけではない、遺伝子発現の変化に関わっており、遺伝子のレスポンス・エレメントによる生物学的影響が抗腫瘍効果を発揮することが示唆されている。その結果、膠芽腫患者の予後の改善に寄与することが十分期待される。

### 3. 研究の方法

#### 1) 膠芽腫に対する希少糖の抗腫瘍効果を *in vitro* において評価する。

希少糖の中でも特に抗腫瘍効果が他癌腫において報告されている **D-allose** について、グリオーマ細胞株に対する抗腫瘍効果について検討した。コントロールとしての **D-glucose** とともに、濃度勾配を作成し、濃度依存性に増殖に対する影響を調べた。また、細胞株の違いを見るために、**U251MG**、**U87MG**、また毒性コントロールとして **MEF** を使用した。濃度は **3,5,10,30,50mM** とした。増殖抑制効果は **WST-1** を用いて評価した。

#### 2) グリオーマ細胞株に対する希少糖の抗腫瘍効果を *in vivo* で評価する。

*In vitro* にて抗腫瘍効果を確認できたため、**U87MG** を免疫不全マウスの皮下に移植し、生食ま

たは希少糖を毎日経腹腔的に投与し、経皮的に腫瘍径を測定し、腫瘍形成能を評価した。投与開始から **30** 日後に皮下腫瘍を摘出し、**HE** 染色、**Ki67**、 $\gamma$ H2AX を評価した。

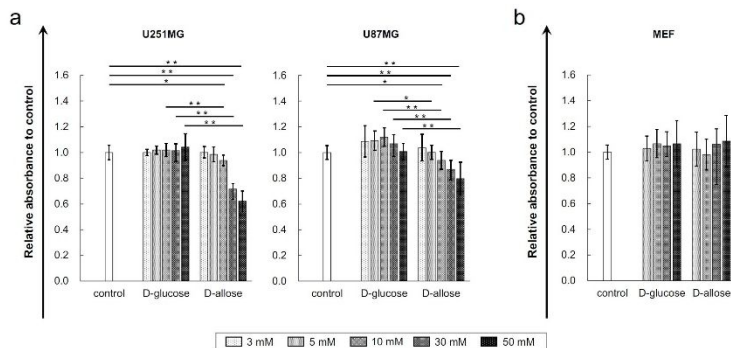
3) 抗腫瘍効果のメカニズムを検討する。

**D-allose** の抗腫瘍効果のメカニズムを解析するため、**cell cycle assay** およびアポトーシスを見るため、**AnnexinV assay** を行った。得られた結果の根拠を示すため、**CytoTell®** を用いた **assay** を行った。

#### 4. 研究成果

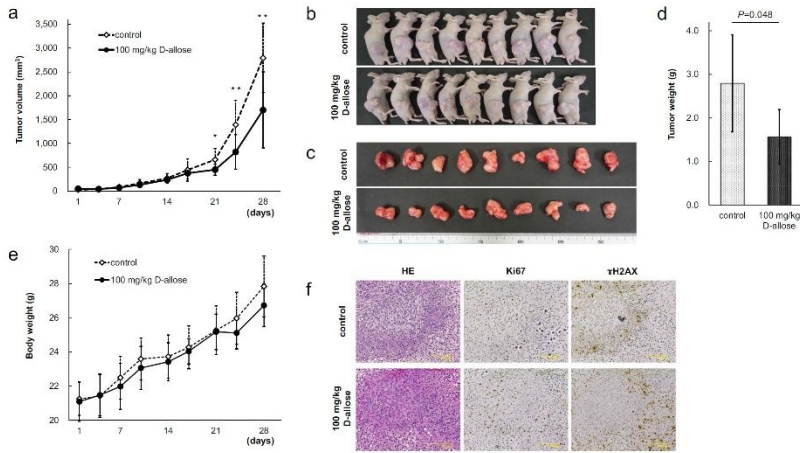
1) 膠芽腫に対する希少糖の抗腫瘍効果を *in vitro* において評価する。

**D-allose** を加えたところ、濃度依存性に腫瘍細胞に対する増殖抑制作用がみられた。コントロール群 **1** に対して、**U251MG** の **10**、**30**、**50-mM D-allose** 群ではそれぞれ  $0.94 \pm 0.04$ 、 $0.72 \pm 0.08$ 、 $0.62 \pm 0.08$  であり、**U87MG** の **10**、**30**、**50-mM D-allose** 群ではそれぞれ  $0.94 \pm 0.07$ 、 $0.87 \pm 0.08$ 、 $0.80 \pm 0.13$  となっており、いずれも有意に増殖抑制がみられた。また、毒性コントロールとして **MEF** を用いた系では **D-allose** を添加しても、増殖率に有意差は認めなかった。



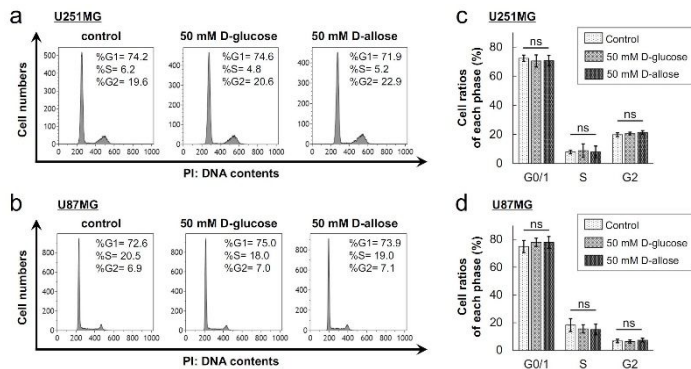
2) グリオーマ細胞株に対する希少糖の抗腫瘍効果を *in vivo* で評価する。

**U87MG** を免疫不全マウスの皮下に移植し、生食または **D-allose** を毎日腹腔内に投与し、腫瘍径を計測したところ、投与開始 **21** 日目より有意差が始め、コントロール群では  $659 \pm 238 \text{ mm}^3$  であったのに対し、**D-allose** 群では  $450 \pm 117 \text{ mm}^3$  と有意に増殖抑制を認めた。投与開始 **28** 日目ではコントロール群は  $2791 \pm 727 \text{ mm}^3$  に対し、**D-allose** 群では  $1700 \pm 796 \text{ mm}^3$  となっていた。両群のマウスに体重差はなく、**HE** 染色、**Ki67** 標識率、 $\gamma$ H2AX 染色に明らかな差は認めなかった。

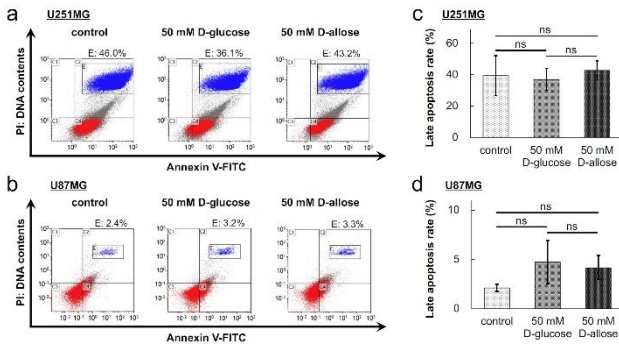


### 3) 抗腫瘍効果のメカニズムを検討する。

**Propidium Iodide** を用いてセルソーティングし、**G0/G1** のセルサイクルを調べたところ、**U251MG** においてコントロール群  $72.3\% \pm 2.2$ 、**D-glucose** 群  $70.5\% \pm 4.2$ 、**D-allose** 群  $70.7\% \pm 3.6$  であり、有意差を認めなかった。**U87MG** においても、コントロール群  $74.9\% \pm 4.4$ 、**D-allose** 群  $77.9\% \pm 4.2$ 、**D-glucose** 群  $78.0\% \pm 2.9$  であり、有意差を認めなかった。このことから、予想に反して、**D-allose** が細胞周期の割合に影響を与えないことが示された。

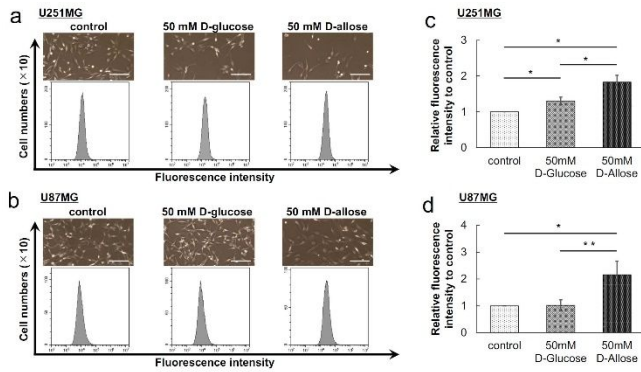


また、アポトーシスを調べるために **AnnexinV** 陽性率を調べたところ、**U251MG** のコントロール群  $39.3\% \pm 12.8$ 、**D-glucose** 群  $36.9\% \pm 7.0$ 、**D-allose** 群  $42.7\% \pm 6.0$  で有意差を認めなかった。また、**U87MG** においても、コントロール群  $2.1\% \pm 0.4$ 、**D-glucose** 群  $4.7\% \pm 2.2$ 、**D-allose** 群  $4.2\% \pm 1.2$  と、有意差を認めなかった。**D-allose** はアポトーシスを誘導していないようであった。



**D-Allose** による増殖抑制が、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導ではないことが明らかとなったため、細胞周期の早さを調べる **CytoTell® assay** を行ったところ、**U251MG** において、

コントロール群 **1.00** に対し、**D-glucose** 群  $1.30 \pm 0.11$ 、**D-allose** 群  $1.82 \pm 0.19$ 、また **U87MG** においても、コントロール群 **1.00** に対して **D-glucose** 群  $1.02 \pm 0.20$ 、**D-allose** 群  $2.15 \pm 0.51$  となり、**D-allose** 群が有意に細胞分裂を遅くしており、増殖抑制の一因となっていることが確認された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Kenta, Ogawa Daisuke, Kanda Takahiro, Fujimori Takeshi, Shibayama Yuki, Rahman Asadur, Ye Juanjuan, Ohsaki Hiroyuki, Akimitsu Kazuya, Izumori Ken, Tamiya Takashi, Nishiyama Akira, Miyake Keisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Antiproliferative effects of D-allose associated with reduced cell division frequency in glioblastoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-46796-4	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 Fujimori Takeshi, Shibayama Yuki, Kanda Takahiro, Suzuki Kenta, Ogawa Daisuke, Ishikawa Ryou, Kadota Kyuichi, Matsunaga Toru, Tamiya Takashi, Nishiyama Akira, Miyake Keisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of a monoclonal antibody against (pro)renin receptor on gliomagenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-28133-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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木健太、菅田峻光、藤森健司、小川大輔、柴山弓希、西山成、三宅啓介
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞に対する希少糖D-alloseの抗腫瘍効果
3. 学会等名 第22回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木健太、菅田峻光、藤森健司、小川大輔、柴山弓希、西山成、三宅啓介
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞に対する希少糖D-alloseの抗腫瘍効果（ポスター）
3. 学会等名 第81回 日本脳神経外科学会 学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅田峻光、鈴木健太、藤森健司、小川大輔、Asadur Rahman、秋光和也、何森健、西山成、三宅啓介
2. 発表標題 希少糖の膠芽腫の対する抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第10回Neuro-Oncology WEST
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanda T, Suzuki K, Fujimori T, Ogawa D, Rahman A, Akimitsu K, Nishiyama A, Tamiya T, Miyake K
2. 発表標題 Antitumor effect of D-allose on glioblastoma cell lines
3. 学会等名 Rare Sugar Congress 2023 (RSC2023) ; the 8th International Symposium of International Society of Rare Sugars (ISRS) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅田峻光、小川大輔、鈴木健太、藤森健司、Asadur Rahman、秋光和也、西山成、三宅啓介
2. 発表標題 希少糖 D-allose による神経膠芽腫細胞のエネルギー代謝
3. 学会等名 第 23 回 日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木健太、菅田峻光、藤森健司、小川大輔、西山成、三宅啓介
2. 発表標題 神経膠芽腫細胞に対する希少糖D-Allose の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第 41回日本脳腫瘍学会術集会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------