

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19640

研究課題名（和文）果糖は発がんおよびその進展にどう作用するのか？

研究課題名（英文）How does fructose affect on carcinogenesis and its progression?

研究代表者

村田 真理子（Murata, Mariko）

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10171141

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、果糖の消費は激増し、過剰摂取は生活習慣病のリスクとなる。本研究では果糖の発がんへの関与を検討した。果糖の特異的輸送体GLUT5の過剰発現をヒト胆管癌において見出した。GLUT5高発現癌細胞は果糖添加により細胞増殖およびATP産生が増加し、ヌードマウス皮下移植モデルでの果糖摂取は腫瘍成長を促進し、GLUT5阻害で腫瘍を抑制した（Gen Dis, 2022）。果糖は単離DNAに銅イオン存在下で酸化的DNA損傷マーカー8-OHdGを有意に生成し、過酸化水素の添加で増強した（Mutat Res, 2024）。果糖は解糖系活性化と活性酸素生成により発がんに寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果糖消費の激増は、特に高果糖コーンシロップを使用した加工食品による糖質の過剰摂取により、がんを含む生活習慣病のリスクとなる。糖の過剰摂取による糖尿病や肥満が発がんリスクの上昇につながるという研究がある一方、肥満や糖尿病とは独立して、果糖の摂取量が多い群の大腸癌リスクが増大するという疫学報告がある。我々は、果糖が自動酸化の過程で過酸化水素を生成し、金属イオンとともに酸化還元サイクルを形成することで、酸化的DNA損傷に寄与することを示し、また、GLUT5の過発現が発がんの進展に重要であることを明らかにした。本研究は果糖独自の発がんへの関与を示し、学術上意義深い。

研究成果の概要（英文）：In recent years, consumption of fructose has increased dramatically, and excessive consumption can cause lifestyle-related diseases. In this study, we investigated the involvement of fructose in carcinogenesis. Overexpression of GLUT5, a specific transporter of fructose, was found in human cholangiocarcinoma (CCA). In CCA cancer cells with high GLUT5 expression, cell proliferation and ATP production increased with the addition of fructose, and in a nude mouse subcutaneous implantation model, fructose ingestion promoted tumor growth, and GLUT5 inhibition by siRNA suppressed the tumor growth (Gen Dis, 2022). Fructose significantly produced 8-OHdG in isolated DNA in the presence of copper ions, which was significantly enhanced by the addition of hydrogen peroxide (Mutat Res, 2024). Fructose may contribute to carcinogenesis by the activation of glycolytic system and its ability to generate reactive oxygen species.

研究分野：環境衛生学

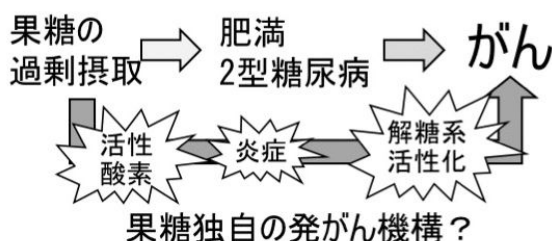
キーワード：果糖 解糖系 発がん 活性酸素 過酸化水素 GLUT5

1. 研究開始当初の背景

果糖は天然には果物に存在し、砂糖(ショ糖; ブドウ糖-果糖の二糖類)の構成分子でもあり、強い甘味をもつ。近年 30~40 年で果糖の消費は世界中で劇的に増加している。これは技術的に高果糖コーンシロップ(異性化糖、果糖ブドウ糖液糖ともいう)の大量生産が可能となり、高カロリー甘味料に使用され、日常でさまざまな飲料や甘い食品から摂取することによる。果物として摂取する場合にはビタミンや食物繊維が含まれ健康効果も期待できるが、高果糖コーンシロップを使用した加工食品による糖質の過剰摂取は、生活習慣病の原因となることが懸念される。

糖尿病や肥満、糖の過剰摂取により発がんリスクが高まるという疫学研究が報告されている。そのメカニズムとして、果糖の摂取量が多い群では肥満や糖尿病とは独立して、大腸癌リスクの増大が報告されている。高果糖コーンシロップを大腸癌易発症モデルマウス (APC 変異) に投与すると、腫瘍の増大と脂質新生が観察され、果糖が「解糖系」を介して重要な役割を果たすことが示唆された。また、果糖は酸化力が高いことが知られており、肥満や糖尿病のリスクと共通する機構と果糖独自に発がん進展に関わる作用機構が示唆される。果糖独自の分子機構は何かを明らかにすることを目指して、本研究を開始した。

2. 研究の目的



図に示すように肥満や糖尿病の発がんリスクと共通する機構と果糖独自にがんの進展に関わる作用起点があることが示唆される。本研究では糖尿病や肥満のリスクと共通する機構に対し、果糖独自の機構として、果糖およびその代謝物による解糖系の活性化、果糖の高い酸化力による活性酸素の生成に着目し、果糖の発がんへの関与を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 果糖による DNA 損傷性の解析

a) がん関連遺伝子の変異のホットスポット配列を含む単離 DNA の 5'末端を ^{32}P でラベル化し、果糖を含む糖類の DNA 損傷性を解析する。また、Maxam-Gilbert 法を応用して損傷塩基がホットスポットの損傷かを検討する。

b) 牛胸腺 DNA を用いて、上記 a と同様の条件で反応し酸化 DNA 損傷の指標である 8-OHdG を電気化学検出器付き HPLC で定量する。

(2) 果糖のヒト培養細胞における細胞増殖性、遊走性、浸潤性への影響解析

a) ヒト培養細胞 (がん細胞と対照となる不死化正常細胞) を果糖やブドウ糖を添加し一定期間培養する。

b) 上記を MTT アッセイにて細胞増殖性、Boyden チャンバー法にて遊走・浸潤性を解析する。

(3) 果糖の解糖系、炎症関連分子への影響解析

上記 2a) の処理細胞を用いて、解糖系、炎症関連分子について以下を検討する。

a) ウェスタンブロット、細胞免疫染色法あるいは RT-qPCR にて発現への影響を測定する。

b) 乳酸、ATP の生成量、果糖・ブドウ糖の細胞内取込み量、等をキットにより定量する。

c) 活性酸素の生成量をフローサイトメーターで測定する。また、細胞より DNA を抽出し、上記 1b) と同様に 8-OHdG を電気化学検出器付き HPLC で定量する。

d) 糖輸送体 (GLUTs) や解糖系の関連分子を阻害/活性剤や siRNA/発現プラスミドで処理して、作用起点を特定する。

(4) ノードマウス皮下移植実験

a) 上記 3 で明らかになった関連分子についてヒト培養がん細胞を用い、阻害あるいは活性化を行い、ノードマウス (免疫不全マウス) の腋窩皮下に、がん細胞を一定数移植し、果糖水溶液と蒸留水の 2 群に分け、自由飲水にて腫瘍径を観察する。また、果糖の発がんに関与する経路の分子に対する阻害物質等で処理する。一定期間後、腫瘍を摘出し、重量を比較する。

b) 摘出した腫瘍について、がん関連遺伝子 (Ras, p53, 等)、解糖系・果糖の代謝関連分子、炎症マーカー (NF- κ B, iNOS, COX-2, 等) について免疫染色法およびウェスタンブロット法を用いて比較定量する。

4. 研究成果

(1) 果糖による活性酸素の生成と DNA 損傷

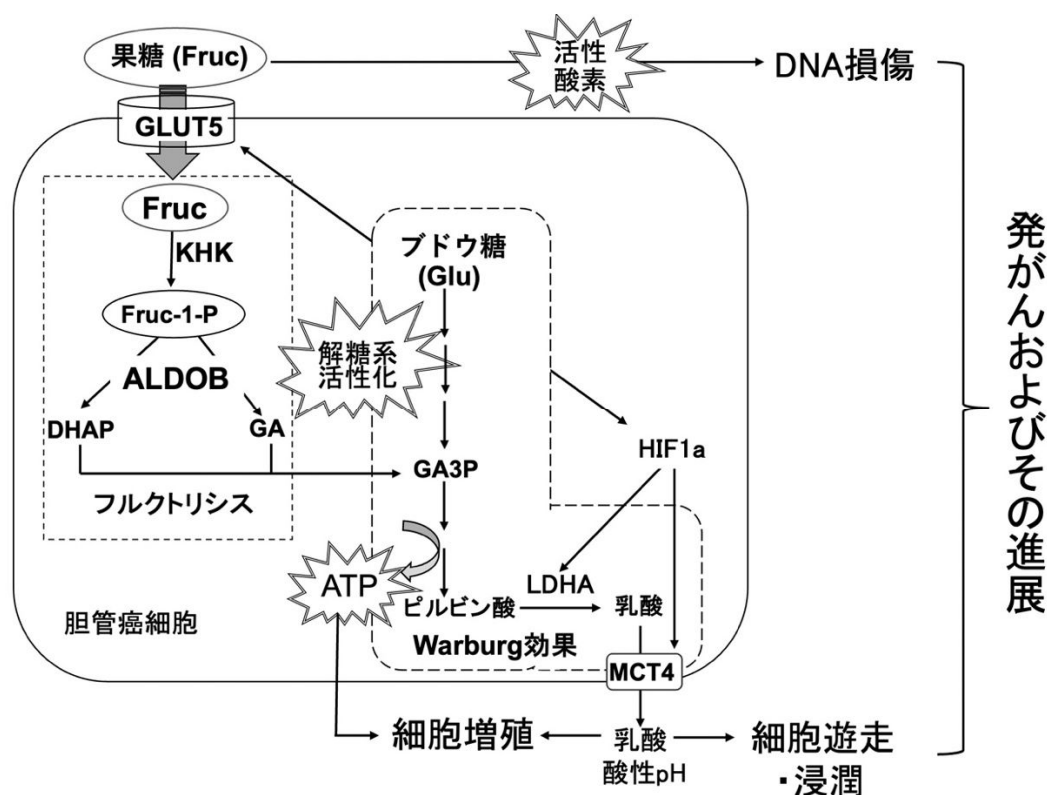
果糖は酸化力が高いことが知られており、単糖類 (果糖およびブドウ糖) による酸化ストレスについて単離 DNA およびヒト由来培養細胞を用いて検討した。単離 DNA を銅イオン存在下で処理したところ、果糖は酸化的 DNA 損傷の指標である 8-OHdG を有意に高く生成し、過酸化水素

の添加で著しく増強することを見出した。ブドウ糖は高濃度の場合のみ有意に酸化的 DNA 損傷が認められ、その酸化力はブドウ糖に比べ、果糖で著しく高かった。さらにラジオアイソトープで標識した DNA を用い、銅イオンと果糖とともに活性酸素消去剤や抗酸化酵素で処理することで DNA 損傷の活性種を推定した。1 価の銅のキレート剤および過酸化水素分解酵素であるカタラーゼにより DNA 損傷が抑制されたことから、銅酸素錯体が活性種であることが示唆された。ヒト正常胆管細胞由来 MMNK1 細胞を用いて、果糖 5mM および過酸化水素発生系である glucose oxidase (GO) で処理したところ、果糖あるいは GO 単独では当該実験条件下では有意な 8-OHdG の上昇は認められなかったが、果糖と GO を同時に処理すると、8-OHdG が有意に高く生成した。この結果は、単離 DNA での実験結果と一致し、酸化ストレス下では、果糖の DNA 損傷性は相乗的に高まることが示唆された。すなわち、果糖は自動酸化の過程で過酸化水素を生成し、金属イオンとともに酸化還元サイクルを形成することで、酸化的 DNA 損傷に寄与することが推定された (Mutation Research, 893, 503719, 2024)。したがって、果糖の過剰摂取は、肥満や糖尿病を介さない機構でも、発がんに寄与する可能性がある。

(2) ヒト胆管癌細胞におけるグルコーストランスポーター5の制御による果糖代謝への影響

細胞内代謝の変化は腫瘍の増殖や生存に寄与している可能性がある。グルコーストランスポーター (GLUT) の発現増加は、がんを促進する上で重要な役割を担う。GLUT5 は果糖の利用を調節し、その過剰発現はいくつかの癌において予後不良と関連している。しかし、その機序はまだ十分に理解されていない。我々は、RNA-seq 解析法を用いて、正常肝組織や正常胆管細胞株と比較して、ヒト胆管癌組織および胆管癌細胞株において、GLUT5 の発現が増加していることを明らかにした。GLUT5 が高発現している細胞は、特に果糖添加培地において、細胞増殖および ATP 産生の割合が増加していた。一方、GLUT5 を siRNA で抑制すると、細胞増殖、ATP 産生、細胞遊走・浸潤能を弱め、上皮間葉移行 (EMT) バランスを改善した。また、ヌードマウス皮下への胆管癌細胞株移植モデルにおいて、果糖摂取は腫瘍の成長を促進し、GLUT5 のサイレンシングで腫瘍増殖を抑制したことから、GLUT5 の発現抑制によるがん抑制効果が明らかになった。さらに、果糖分解-Warburg 効果の代謝経路において、ケトヘキソキナーゼ (KHK)、アルドラーゼ B (ALDOB)、乳酸デヒドロゲナーゼ A (LDHA)、モノカルボン酸トランスポーター 4 (MCT4) などの下流遺伝子および低酸素誘導性因子 1 (HIF1A) の発現レベルは GLUT5 発現依存的に変化した。これらの知見は、GLUT5 が代謝調節を介した CCA 治療アプローチのターゲットとなる可能性を示している (Genes & Diseases, 9, 1727-1741, 2022)。

以上より、果糖の自動酸化に伴う活性酸素の生成を介した DNA 損傷が発がんのイニシエーションに働き、果糖およびその代謝物による解糖系の活性化を介した細胞増殖や細胞遊走・浸潤能の促進が発がんのプロモーション・プログレッションに関与する可能性が示された (下図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Midorikawa Kaoru, Kobayashi Kokoro, Kato Shinya, Kawanishi Shosuke, Kobayashi Hatasu, Oikawa Shinji, Murata Mariko	4. 巻 893
2. 論文標題 Oxidative DNA damage: Induction by fructose, in vitro, and its enhancement by hydrogen peroxide	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 503719 ~ 503719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mrgentox.2023.503719	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 Kaewlert Waleeporn, Sakonsinsiri Chadamas, Lert-itthiporn Worachart, Ungarreevittaya Piti, Pairojkul Chawalit, Pinlaor Somchai, Murata Mariko, Thanan Raynoo	4. 巻 24
2. 論文標題 Overexpression of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) Relates to Poor Prognosis and Promotes Proliferation, Stemness, Migration, and Oxidative Stress Resistance in Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2428 ~ 2428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24032428	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
1. 著者名 Suwannakul Nattawan, Armarmuntree Napat, Thanan Raynoo, Midorikawa Kaoru, Kon Tetsuo, Oikawa Shinji, Kobayashi Hatasu, Ma Ning, Kawanishi Shosuke, Murata Mariko	4. 巻 9
2. 論文標題 Targeting fructose metabolism by glucose transporter 5 regulation in human cholangiocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes and Diseases	6. 最初と最後の頁 1727-1741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gendis.2021.09.002	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
1. 著者名 Suwannakul Nattawan, Midorikawa Kaoru, Du Chunping, Qi Ya-Peng, Zhang Jie, Xiang Bang-De, Murata Mariko, Ma Ning	4. 巻 12
2. 論文標題 Subcellular localization of HMGB1 in human cholangiocarcinoma: correlation with tumor stage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Discover Oncology	6. 最初と最後の頁 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12672-021-00446-1	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 該当する

〔学会発表〕 計33件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林こころ、翠川薫、加藤信哉、川西正祐、小林果、及川伸二、村田真理子.
2. 発表標題 フルクトースによるDNA 損傷性の検討.
3. 学会等名 第11回日本酸化ストレス学会東海支部学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Waleeporn Kaewlert, Chadamas Sakonsinsiri, Worachart Lert-itthiporn, Somchai Pinlaor, Raynoo Thanan, Mariko Murata.
2. 発表標題 Long-term oxidative stress and estrogen induce insulin receptor substrate 1 (IRS1)-mediated cholangiocarcinoma progression.
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
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
研究分担者	翠川 薫 (Midorikawa Kaoru) (20393366)	鈴鹿大学・こども教育学部・教授 (34105)	

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		
タイ	コンケン大学		