

希少糖 D-アロースの生理的機能について

平田 祐子・徳田 雅明*

(香川誠陵中学校高等学校・*香川大学 医学部)

はじめに

希少糖とは、香川大学に本部のある国際希少糖学会での定義によると“自然界ごくわずかに存在する単糖およびその誘導体”と定義されている。D-グルコース（ブドウ糖）、D-フラクトース（果糖）などは自然界に豊富に存在するが、種類は7種類のみであり、これらで自然界の99%を占めている。残り50種類以上が希少糖であり、ガムなどに使われているキシリトールも希少糖の1種である（図1）。それまでの希少糖は入手ができないか、一部は試薬として販売されているものの1gが数万円と高価なため生理的機能の研究が十分されていなかった。1991年に何森らのグループは、新規酵素D-タガトース3-エピメラーゼを発見し、D-フラクトースからD-プシコースに変換する方法を確立した¹⁾。またその後、D-プシコースから酵素L-ラムノースイソメラーゼによりD-アロースに変換することも発見している。D-プシコースとD-アロースなど数種類の希少糖は、大量に生産することが可能となり、香川大学を中心としたグループで研究が盛んに行われている。特に、D-アロースは香川大医学部を中心として活性酸素産出の抑制²⁾、癌細胞増殖抑制効果³⁾の報告をしている。また、香川大学農学部を中心に農薬としての可能性の効果の報告もしている。今回の報告ではD-アロースの生理活性について、筆者が携わっていた研究を中心に、医学分野で期待ができ

る効果をまとめている。

D-アロースについて

D-アロースはD-グルコースと同じアルドースであり、C-3エピマー体である（図2）。しかし、D-グルコースと違いカロリーはゼロで、甘さは砂糖の8割程度である。以下の効果があることが判っている。

活性酸素産生の抑制効果

D-アロースは約20年前に免疫抑制の効果があると報告されていた（US pat. No. 560960, 1997）。香川大学医学部の徳田らのグループでは、ホセインらが免疫抑制剤FK506とD-アロースを併用することでラット肝臓移植後の生存率を上昇させることを報告した⁴⁾。移植時に起こる虚血（血流が滞るか止まる状態）とその後の再灌流時に生じる過還流（血管が拡張して大量の血液が流れる状態）で臓器において白血球の蓄積が起こり、その白血球から産出される活性酸素が臓器障害を助長するため、この生存率改善効果はD-アロースによる活性酸素産生抑制が関与している可能性を考えた。そして、白血球を用いたin vitroの系において活性酸素の産生抑制作用が認められることを証明した²⁾。この効果より、活性酸素が引き起こしているさまざまな障害や病態に対してD-アロースは有効であると考えられた。臓器が虚血状態から再灌流状態するとき活性酸素が大量に産出される。砂ネズミを用いた脳の虚血—再灌流モデルによる神経細胞死の系では、D-アロースを投与することにより活性酸素の産生を抑え、そ

平成27年11月20日受理

連絡先 〒761-8022 香川県高松市鬼無町佐科469-1

香川誠陵中学校高等学校

TEL 087(881)7800 FAX 087(881)7878

Email yff10258@nifty.com

希少糖(Rare Sugars)

自然界に微量にしか存在しない単糖とその誘導体

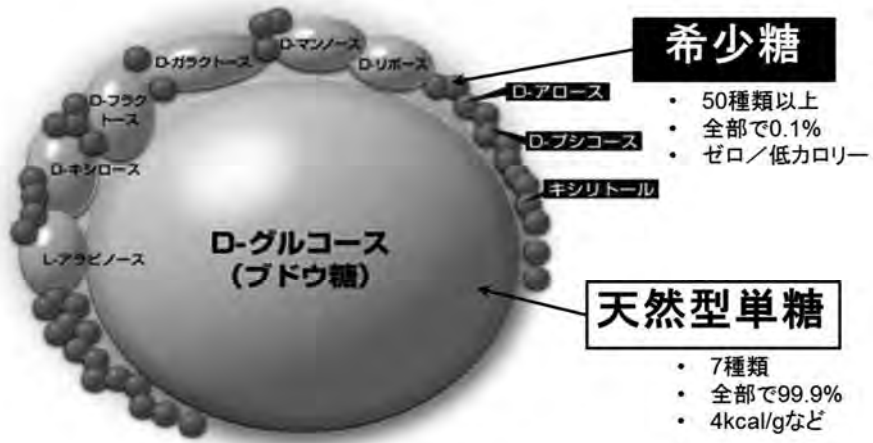


図1

酵素による希少糖の生産

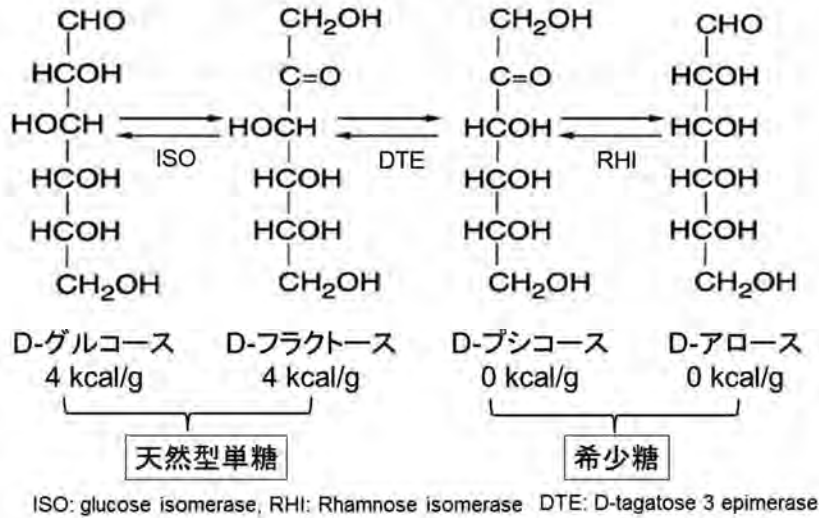


図2

の後興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を抑えることで、虚血—再灌流による細胞死が抑制されていることが分かった。同様の機序が、他にも眼球の網膜、肝臓、皮膚、腎臓で確認されている^{5, 6)}。D-アラロースは医薬品としての活用が期待されるようになった。

癌細胞増殖抑制効果

D-アラロースの抗癌作用の研究も香川大学医学部の徳田らにより2000年頃から始まった。随らが2005年に報告したのは、子宮頸癌細胞株であるHeLa、卵巣癌細胞株であるOVCAR-3、肝癌細胞株である

D-アロースは癌細胞の増殖を抑制する

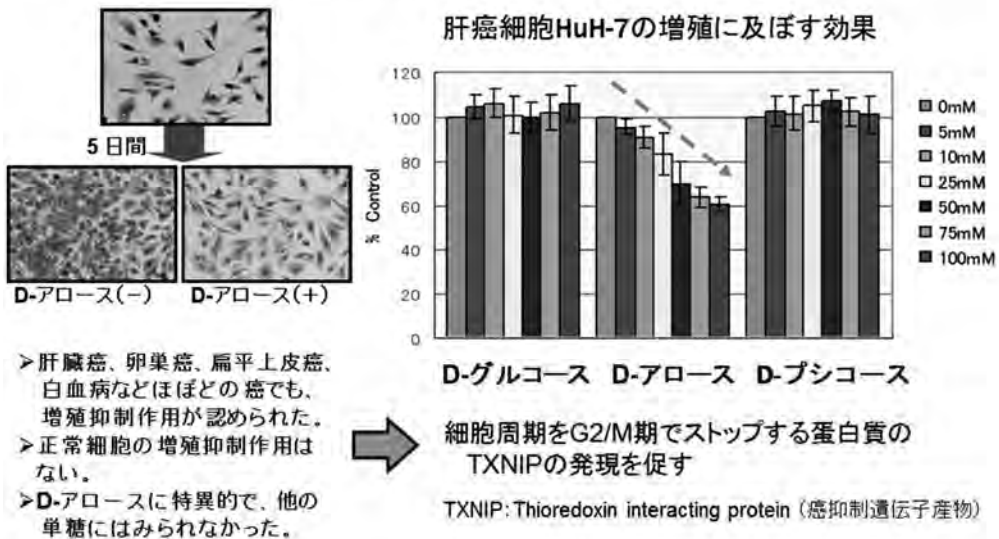


図3

HuH-7、HepG2などで細胞増殖抑制効果が見られた^{3, 7)}。D-アロースを投与したOVCAR-3とHepG2はフローサイトメトリーを用いて調べると、細胞周期のG2/M期でとどまっていることが分かった。細胞周期を制御する数種類の蛋白質の量をウェスタンブロッティングで調べたところ、細胞周期にブレーキをかける蛋白質であるp21^{CIP1/WAF1}、p27^{kip1}の量が上昇していることが分かった。つまり、D-アロースは細胞周期を止める効果があることが判ったわけである。

2008年に山口らの報告では、D-アロースを投与した肝臓癌細胞株HuH-7でも増殖抑制効果がみられ(図3)、細胞内の変化をマイクロアレイ法で調べたところ、thioredoxin interacting protein (TXNIP)が増えていることが分かった⁸⁾。TXNIPは細胞の酸化還元状態を調整すると知られているが、癌抑制、転移抑制を有する蛋白質としても知られている。また、HuH-7ではG1期に留まる細胞数が上昇しており、p27^{kip1}が著明に増えていた。前述のようにp27^{kip1}は細胞周期のG1期からDNAの複製が行われるS期に進むステップにブレーキをかける蛋白質である。通常、細胞核内に存在するp27^{kip1}はJAB1という蛋白質と結合して細胞質へ運ばれ、分解さ

れてしまうが、正常細胞ではTXNIPが豊富に存在するため、この機構を抑制することが知られている。しかし癌細胞ではTXNIPが何故か非常に少ないため、上記の機構を抑制することができず、ブレーキ役のp27^{kip1}は分解され減少してしまう。そのため癌細胞はいつまでも増殖してしまう。ところが、D-アロースを投与することで核内にTXNIPの細胞内での発現が促進されて存在量が上昇するため、TXNIPはJAB1と結合しp27^{kip1}と結合できなくなってしまうので、p27^{kip1}は安定化され細胞周期の進行を止め、細胞増殖が抑えられることも報告している(図4)。

D-アロースの癌細胞増殖抑制効果を研究しているときから、癌細胞株でもD-アロースの効果がみられる細胞とみられない細胞があることが分かっていた。効果の差について筆者が調べた。白血病細胞株5種類を用いてD-アロース、D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトースを投与しても細胞増殖抑制効果の違いを調べた。明らかな細胞増殖抑制効果がみられる細胞(MOLT-4F)とみられない細胞(Daudi)が分かった(図5)。増殖抑制効果がみられたMOLT-4Fでは、D-アロースの濃度を高くすると抑制効果が強くなることが認められた。

細胞周期におけるD-アロースとTXNIPの役割

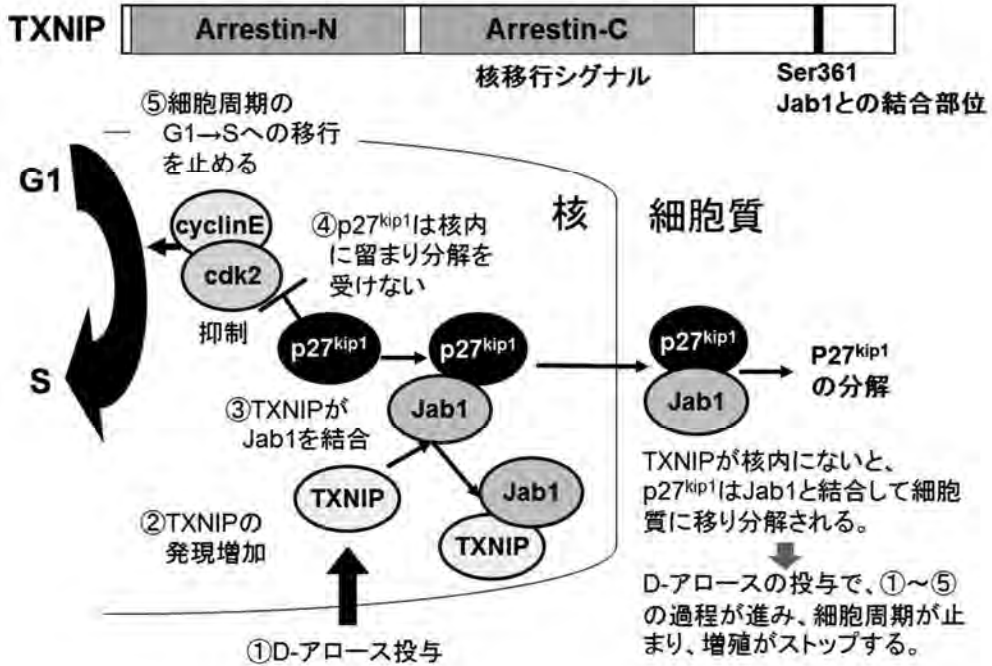


図 4

各種白血病細胞増殖に対する糖の効果

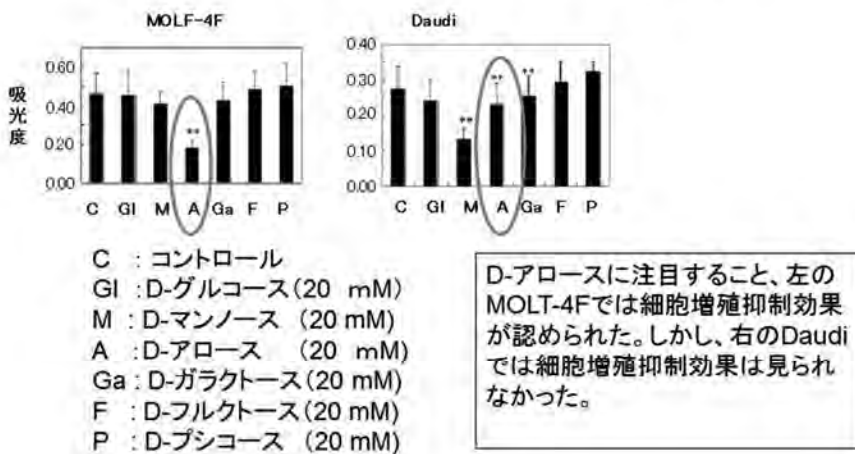


図 5

この効果の機序のひとつとして、D-グルコースと構造のよく似ているD-アロースが、癌細胞の栄養となるD-グルコースの細胞内への取り込みを阻害している可能性があると考えた。D-アロースに対して過剰量のD-グルコースを培地に添加してもD-アロースの増殖抑制効果は消去しなかったため、D-アロースは細胞のD-グルコースの取り込み阻害以外の機序も存在していることが分かった。それが前述のTXNIPの関与であるということである。事実MOLT-4Fでも、細胞周期はHuH-7と同様にG1/S期でストップして、S期が減少していることが分かった。MOLT-4F細胞でのTXNIPの発現量は、何も処理していない細胞と比べると蛋白質レベルで 8.8 ± 1.4 倍であり、 $p27^{kip1}$ は 2.3 ± 0.7 倍に増えていた(図6)。また、アイソトープで炭素をラベルした2-デオキシ D-グルコースを使い、D-アロースを処理して2時間後(TXNIPが細胞内に発現し始める時間)と48時間後(TXNIPの発現量が多い)の細胞での取り込み実験を行ったところ、この差は見られなかった。これはTXNIPがD-グルコースの取り込みを阻害していないことを示している⁹⁾。この報告で、D-アロースの細胞増殖抑制効果がみられる細胞内ではTXNIPの発現量に差がみられることが重要な原因となっていることが分かった。以上のようにD-アロースの癌細胞増殖抑制効果とTXNIPに

は重要な関係があることを証明した。TXNIPのリン酸化の影響など詳細な制御機構は現在研究中である。

D-アロースが抗癌剤としての使用が期待されるが、この時点での課題は高濃度(20mM~50mM)でないと効果がみられないことである。この濃度は通常の薬として使用する濃度に比べるとかなりの高濃度であり、摂取等で問題となる。そこで、抗癌剤の併用も考えられた。フルオロウラシル(5-FU)は抗癌剤の一種である。5-FUは大腸癌、胃癌、肝臓癌などの抗癌剤として用いられ、DNA合成を阻止する働きがある。また5-FUはTXNIP発現を誘導するという報告もある。我々は、肝癌細胞株HuH7において、5-FUとD-アロースの併用実験を行った¹⁰⁾。5-FUとD-アロース併用では増殖抑制効果がみられ、TXNIPの発現もD-アロースのみと5-FUのみと比べると上昇している(図7)。また、癌細胞を移植したマウスに対して抗癌剤とD-アロースの効果を調べた研究では併用効果が認められた。以上のことから、D-アロースが抗癌剤の使用量を減らすことができることを示した。

以上のことから、D-アロースは抗癌剤または癌予防薬としての開発の可能性があり、将来医療に多大な貢献をすると期待される。

MOLT-4F における細胞周期関連タンパク質の発現

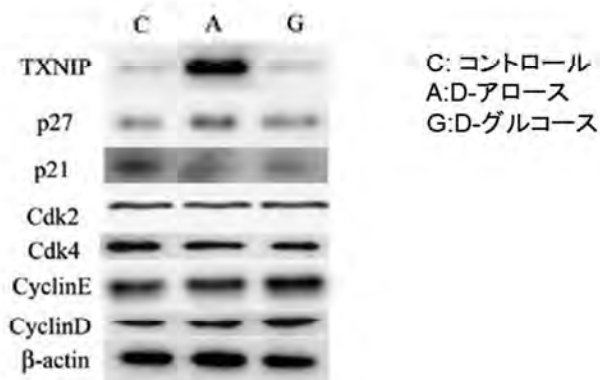


図6

骨粗鬆症改善作用

D-アロースによって細胞内にTXNIPが特異的に発現することが分かった。TXNIPはチオレドキシン (Thioredoxin) と結合し、その還元作用を抑制する作用もある。そのため、チオレドキシンが関係する機構にも作用するのではないかと考えられた。

チオレドキシンが関係する機構の一つに破骨細胞と骨芽細胞との関係がある。破骨細胞は古くなった

骨組織を破壊し、その後に骨芽細胞が新しい骨を形成することにより、骨の新陳代謝に重要な役割を果たし、両者の良好なバランスにより骨の機能が維持される。そして破骨細胞の分化には、細胞質のチオレドキシンの核内への移行が引き金になっていることが知られている。また、分化誘導因子であるRANKL (Receptor Activator of NF-kappa B Ligand) を添加すると、前駆細胞は多核大型化した破骨細胞に分化誘導される。破骨細胞の分化過程においては、TXNIPによる発現抑制が認められ、また、TXNIPの過剰発現はチオレドキシンを結合することで核に移行するチオレドキシンを減少させ破骨細胞への分化を抑制すると考えられる。そこで、我々は、D-アロースがTXNIP発現を促すことにより、チオレドキシンの効果を抑えて、破骨細胞の分化に影響を及ぼすのではないかと仮説を立てた (図8)。破骨細胞の前駆細胞として知られているマウスマクロファージ様細胞株であるRAW264細胞を、RANKLにより破骨細胞へと分化誘導する系にD-アロースを添加し、その影響を検討した結果、D-アロース投与により破骨細胞への分化が明らか

D-アロースと5-FU の併用効果

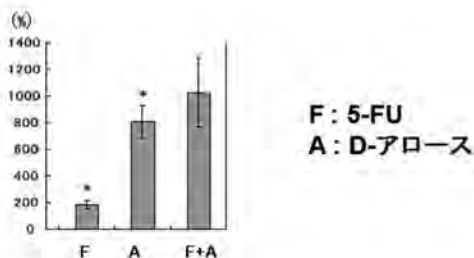


図7

破骨細胞の分化をD-アロースが抑制する

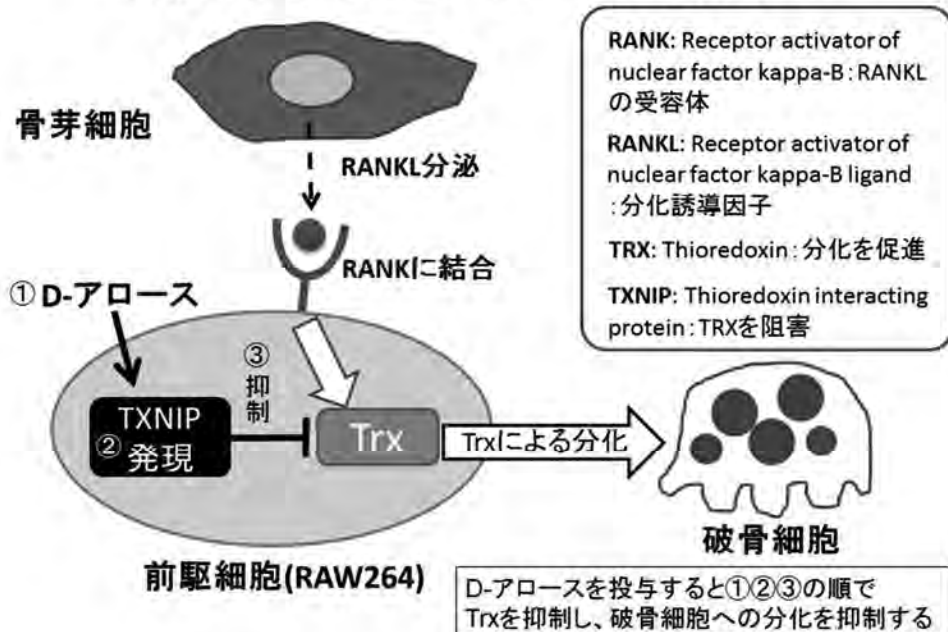


図8

D-アロースで破骨細胞への分化は抑制される

分化誘導因子のRANKLがあれば、骨を壊す破骨細胞への分化が進む。
これにD-アロースを加えると、分化の度合いが低くなる。

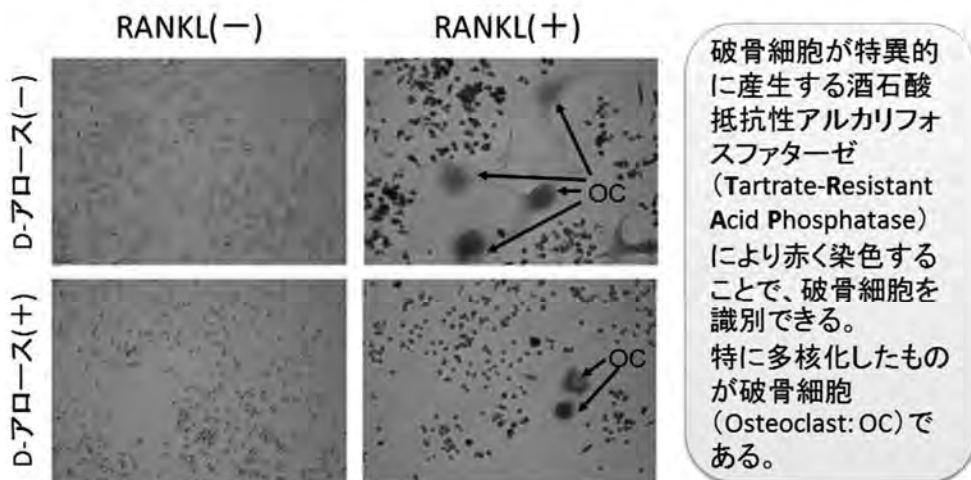


図9

に抑制されることがわかり (図9), D-アロースにより破骨細胞への分化をコントロールできる可能性が示唆された¹¹⁾。加齢と共に、破骨細胞と骨芽細胞のバランスが崩れ、破骨細胞優位になることが骨粗鬆症の発症につながっていると考えられるため、今後D-アロースを骨粗鬆症の治療などへ応用することが考えられる。

まとめ

希少糖と一言で言われるが、その一つ一つの機能はさまざまであり、50種類以上ある希少糖のほとんどについて機能解明が進んでいない状況である。今回の報告で扱ったD-アロースは医学分野、食品分野そして農業分野で注目されるべき素材で、2000年頃から香川大学が中心となって研究が進められている。自然界に存在している糖であり、動物実験でもD-アロースの安全性が証明され、副作用の少ない安全な医薬品としての可能性があるが、他にも予防薬としての応用の可能性もあり、今後さまざまな活用が検討されるであろう。

希少糖はまだまだ大きな研究の余地のある魅力あ

る研究分野である。筆者自身も他分野で研究活動を行っていたが、希少糖と出会いその面白さに惹かれて研究を行ってきた。本報告を見て希少糖に興味を抱き、希少糖研究に加わってくれる人が出てくれることを希望したいと思う。

謝辞

本報告は、筆者が関わった知的クラスター創成事業 (文部科学省、2002-2006) の支援で行われていた研究内容を中心に述べた。

参考文献

- 1) Izumori, K. (2002) : Bioproduction strategies for rare hexose sugars, *Naturwissenschaften*, **89**, 120-124
- 2) Murata, A., Sekiya, K., Watanabe, Y., Yamaguchi, F., Hatano, N., Izumori, K., and Tokuda, M. (2003) : A novel effect of D-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils, *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 89-91
- 3) Sui, L., Dong, Y., Watanabe, Y., Yamaguchi,

- F., Hatano, N., Tsukamoto, I., Izumori, K., and Tokuda, M. (2005) : The inhibitory effect and possible mechanisms of D-allose on cancer cell proliferation, *Int. J. Oncol.*, **27**, 907-912
- 4) Hossain, M. A., Wakabayashi, H., Goda, F., Kobayashi, T., Maeba, T., and Maeta, H. (2000) : Effect of the immunosuppressants FK506 and D-allose on allogenic orthotopic liver transplantation in rats, *Transplant. Proc.*, **32**, 2021-2023
- 5) Hossain, M. A., Izuishi, K., Tokuda, M., Izumori, K., and Maeta, H. (2004) : D-Allose has a strong suppressive effect against ischemia/reperfusion injury: a comparative study with allopurinol and superoxide dismutase, *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, **11**, 181-189
- 6) Hirooka, K., Miyamoto, O., Jinming, P., Du, Y., Itano, T., Baba, T., Tokuda, M., and Shiraga, F. (2006) : Neuroprotective effect and possible mechanisms of D-allose against retinal ischemia-reperfusion injury, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **4**, 1653-1657
- 7) Sui, L., Dong, Y., Watanabe, Y., Yamaguchi, F., Hatano, N., Izumori, K., and Tokuda, M. (2005) : Growth inhibitory effect of D-allose on human ovarian carcinoma cells *in vitro*, *Anticancer Res.*, **25**, 2639-2644
- 8) Yamaguchi, F., Takata, M., Kamitori, K., Nonaka, M., and Tokuda, M. (2008) : Rare sugar D-allose induces specific up-regulation of TXNIP and subsequent G1 cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells by stabilization of p27^{kip1}, *Int. J. Oncol.*, **32**, 377-385
- 9) Hirata, Y., Saito, M., Tsukamoto, I., Yamaguchi, F., Sui, L., Kamitori, K., Dong, Y., Konishi, R., Janjua, N., and Tokuda, M. (2009) : Analysis of the inhibitory mechanism of D-allose on MOLT-4F leukemia cell proliferation, *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 562-568
- 10) Yamaguchi, F., Kamitori, K., Sanada, K., Horii, M., Dong, Y., Sui, L., and Tokuda, M. (2008) : Rare sugar D-allose enhances anti-tumor effect of 5-fluorouracil on the human hepatocellular carcinoma cell line HuH-7, *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 248-52
- 11) Yamada, K., Noguchi, C., Kamitori, K., Dong, Y., Hirata, Y., Hossain, M. A., Tsukamoto, I., Tokuda, M., and Yamaguchi, F. (2012) : Rare sugar D-allose strongly induces thioredoxin-interacting protein and inhibits osteoclast differentiation in Raw264 cells, *Nutrition Res.*, **32**, 116-123