

令和元年6月27日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07964

研究課題名(和文) 土壌微生物「細胞性粘菌」由来の薬理活性物質DIFの研究

研究課題名(英文) Research on pharmacologically active molecule DIF found in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*

研究代表者

久保原 禪 (Kubohara, Yuzuru)

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・教授

研究者番号：00221937

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)：DIF-1は細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*の分化誘導因子かつ走化性運動制御因子である。我々はDIF-1とその誘導体が抗腫瘍活性や細胞の糖代謝促進活性を有することを発見し、DIFをシードとした新規抗がん剤ならびに肥満/糖尿病治療薬等の開発を進めてきた。本研究において我々は、1) DIF誘導体の抗腫瘍作用の機構解析と新規抗がん剤の開発、2) DIF誘導体の糖代謝促進作用の機構解析と新規肥満・糖尿病治療薬の開発、並びに3) 細胞性粘菌におけるDIFの作用機序解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんや肥満/糖尿病等に起因する生活習慣病は我が国の死亡原因の上位を占めており、これら疾病に対する新規薬剤開発(創薬)に対する社会的ニーズは大きい。しかしながら、新規な創薬資源の探索/開発は容易ではない。我々は土壌微生物の一群である「細胞性粘菌類」を「未利用創薬資源」と位置づけ、粘菌由来の化合物の探索と、それらをシードとした薬剤開発を進めてきた。

とりわけ、本研究では粘菌由来のDIFをシードとしたまったく新しいタイプの抗がん剤と肥満/糖尿病治療薬の開発を進めており、社会的意義は大きいものと考えている。

研究成果の概要(英文)：DIF-1 is a differentiation-inducing factor and chemotaxis regulator in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. We have found that DIF-1 and its derivatives possess antitumor activity and glucose-consumption promoting activity, and have advanced development of novel anticancer agents and anti-obesity/anti-diabetic agents using DIF as a seed. In this study, we proceeded with the followings; 1) Analysis of the mechanism underlying the antitumor actions of DIF derivatives, and development of novel anticancer drugs; 2) Analysis of the mechanism underlying the glucose-consumption promoting action of DIF derivatives, and development of novel anti-obesity/anti-diabetic drugs; and 3) analysis of the action mechanisms of DIF-1 in *D. discoideum*.

研究分野：細胞生物学・生化学

キーワード：細胞性粘菌 創薬 がん 糖尿病 ミトコンドリア 走化性運動 トリパノソーマ

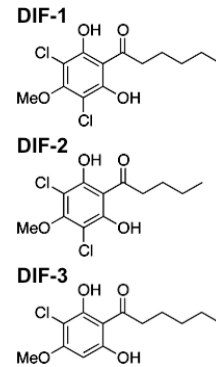
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

土壌微生物の一群である「細胞性粘菌類」はカビ(真菌)に良く似た子実体(孢子塊と柄細胞から成る構造体)を形成するが、細胞性粘菌類と真菌類は分類学的に異なる「界」に属している。細胞性粘菌の一種 *Dictyostelium discoideum* (和名「キイロタマホコリカビ」、以後、単に「粘菌」)は単純なライフサイクルを有し、かつ、育成や遺伝子操作が簡単なことから、細胞生物学・発生生物学分野のモデル生物として古くより研究されて来た。

Differentiation-inducing factor-1 (DIF-1), DIF-2, DIF-3 (右図)は、粘菌の柄細胞分化誘導因子として英国の研究グループによって単離・同定された低分子化合物(ポチケチド)である(引用文献①, ②)。近年我々は、DIF-1とDIF-2には粘菌細胞の走化性運動を制御する機能があることを発見している(文献⑩)。

さらに1990年代以降、我々の研究グループは、DIFsとそれらの誘導体が哺乳類細胞に対する複数の薬理活性(抗腫瘍活性、糖代謝促進活性、他)を有することを発見し、DIFの作用機序解析とDIFをリード化合物とした新規抗がん剤および糖尿病治療薬の開発等を進めてきた(文献③-⑩, ⑫ 他)。さらに、我々は、DIF誘導体の有する複数の生物活性/薬理活性は、DIFの側鎖修飾によって分離できる可能性を示してきた: 総じて、DIF-3誘導体は抗腫瘍活性に優れ、DIF-1誘導体は糖代謝促進活性が強い(文献⑧-⑩ 他)。



<参考文献>

- ① Morris HR, Taylor GW, Masento MS, Jermyn KA, & Kay RR. *Nature* 328, 811-814. (1987).
- ② Morris HR, Masento MS, Taylor GW, Jermyn KA, & Kay RR. *Biochem. J.* 249, 903-906. (1988)
- ③ Asahi K, Sakurai A, Takahashi N, Kubohara Y, Okamoto K, & Tanaka Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 1036-1039. (1995).
- ④ Kubohara Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 418-422. (1997).
- ⑤ Kubohara Y. *Eur. J. Pharmacol.* 381, 57-62. (1999).
- ⑥ Kanai M, Konda Y, Nakajima T, Izumi Y, Nanakin A, Kanda N, Kubohara Y, & Chiba T. *Oncogene* 22, 548-554. (2003).
- ⑦ Shimizu K, Murata T, Tagawa T, Takahashi K, Ishikawa R, Abe Y, Hosaka K, & Kubohara Y. *Cancer Res.* 64, 2568-2571. (2004).
- ⑧ Gokan N, Kikuchi H, Nakamura K, Oshima Y, Hosaka K, & Kubohara Y. *Biochem. Pharmacol.* 70, 676-685. (2005).
- ⑨ Omata W, Shibata H, Nagasawa M, Kojima I, Kikuchi H, Oshima Y, Hosaka K, & Kubohara Y. *FEBS J.* 274, 3392-3404. (2007).
- ⑩ Kubohara Y, Kikuchi H, & Oshima Y. *Life Sci.* 83, 608-612. (2008).
- ⑪ Kuwayama H, & Kubohara Y. Differentiation-inducing factor-1 and -2 function also as modulators for *Dictyostelium* chemotaxis. *PLoS ONE* 4(8), e6658. (2009).
- ⑫ Kubohara Y, Kikuchi H, Matsuo Y, Oshima Y, & Homma Y. Mitochondria are the target organelle of differentiation-inducing factor-3, an anti-tumor agent isolated from *Dictyostelium discoideum*. *PLoS ONE* 8, e72118. (2013).

2. 研究の目的

本研究は、DIFsとそれらの誘導体に関する包括的な研究であり、主に以下の3つのプロジェクトを進める。

- (1) DIF誘導体の抗腫瘍作用の機構解析、および新規抗がん剤の開発。
- (2) DIF誘導体の糖代謝促進作用の機構解析、および新規肥満・糖尿病治療薬の開発。
- (3) 粘菌細胞の細胞分化と走化性運動を制御するDIFの作用機序解析。

3. 研究の方法

- (1) DIFの抗腫瘍作用の解析。

- (1-1) DIFの増殖抑制作用の解析

- ① 各種DIF誘導体を合成し、種々の腫瘍細胞の増殖に対する阻害効果を検討した。
- ② マウス肝臓から、Sucrose密度勾配遠心法によりミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア酸素消費に対するDIF誘導体の効果を検討した(DIF誘導体のuncoupling能を検討した)。
- ③ 種々の腫瘍細胞を用いて、細胞内シグナル伝達関連酵素活性に対する各種DIF誘導体の効果を検討した。

- (1-2) DIFの遊走阻害作用の解析(以下の2種類のアッセイ系を利用する)。

マウス骨肉腫LM8細胞とBoyden chamber(二層式細胞培養系:上層と下層は、コラーゲンコートしたポアメンブレンで仕切られている)を用いて、リゾフォスファチジン酸(LPA)誘導性のLM8細胞遊走に対する各種DIF誘導体の阻害効果を検討した:二層式の培養wellの下層に100 nM LPA、上下両層に0.1% EtOH(vehicle control)あるいは10 μM DIF誘導体を添

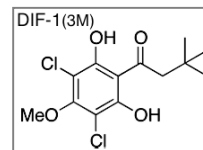
加し、LM8 細胞を上層に入れる→CO₂ incubator で 3 時間培養後、上層から下層へ移動した細胞数を測定する。

ヒト MDA-MB-231 乳がん細胞をトランスウェル中で DIF 存在下/非存在下で数時間培養し(上段ウェル培地に細胞を添加、下段ウェル培地に 5%牛胎児血清を添加、上下段ウェルに DIF を添加)、下段に遊走した細胞数を比較検討する。

(2) DIF の糖代謝促進作用の解析 (活性の強い DIF-1 と DIF-1(3M)を用いる) .

①メタボローム解析.

マウス 3T3L1 細胞を Confluent 状態になるまで in vitro 培養(10 cm dish 中) した後、0.1% DMSO (vehicle control)、20 μM DIF-1 あるいは 20 μM DIF-1(3M) (右図) 存在下でさらに 3 時間培養する。細胞内の代謝産物を回収し、CE-TOF-MS 法 (キャピラリー電気泳動-Time-of-flight Mass Spectrometry) により、糖代謝産物を定量する。



② 1 型糖尿病モデルラットの血糖値に対する DIF-1 の効果.

ストレプトゾトシン(STZ)処理したラット (1 型糖尿病モデル) を作成し、血糖値に対する DIF-1 (30 mg/kg の単回経口投与と 30 mg/kg/day の 7 日間連続経口投与) の効果を検討した。

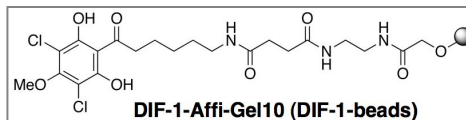
(3) 粘菌細胞における DIF の機能解析.

①粘菌の走化性運動に対する DIF の作用解析.

粘菌細胞は cAMP に対する走化性を示すことから、走化性運動 (免疫細胞の遊走やがん細胞の転移等) の機序解析のモデル系として利用されている。粘菌細胞の懸濁液を寒天培地上に置き、その近傍に cAMP 溶液を置く数時間後に粘菌細胞は cAMP を添加した方向に移動する。この系を利用して、粘菌走化性運動に対する DIF の効果を検討した。

②粘菌細胞における DIF 受容体の同定.

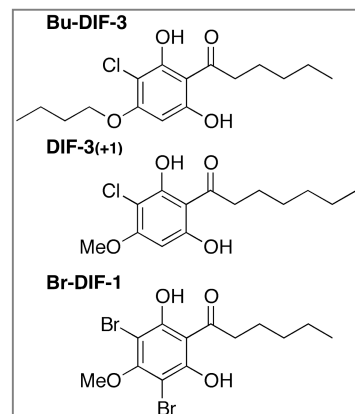
細胞性粘菌における DIF 受容体は未だ同定されていない。そこで、DIF-1-beads (右図) を利用して、粘菌細胞の DIF-binding proteins (DBPs) を粗精製し、SDS-PAGE で展開後、バンドを切り出し、LC-MS/MS 法によって DBPs を同定する。



4. 研究成果

(1) DIF の抗腫瘍作用の解析.

①Boyden chamber の上層のマウス骨肉腫 LM8 細胞は、LPA (下層に添加) に対する走化性運動 (遊走) によって下層に移動する。この系を用いて各種 DIF 誘導体の阻害効果を検討した結果、いくつかの DIF 誘導体が LM8 の遊走を強力に阻害することを見出した: Bu-DIF-3 や DIF-3(+1) 等の誘導体は LM8 細胞の増殖と遊走の両者を強力に阻害し、Br-DIF-1 は遊走のみを強力に阻害した (IC₅₀ は 5 μM 程度)。また、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP も LM8 の遊走を阻害することを示した。これらの結果は、DIF 誘導体が少なくとも一部ミトコンドリア活性を阻害することによって、LPA 誘導体の LM8 細胞の遊走を阻害することを示唆している: DIF 誘導体をリード化合物とした抗がん剤 (浸潤/転移の阻害剤) を開発できる可能性が示された [論文⑫]。



②ヒト MDA-MB-231 乳がん細胞は、血清に誘因されてトランスウェル上段から下段に遊走する。この系を用いて各種 DIF 誘導体の阻害効果を検討した結果、いくつかの DIF 誘導体が LM8 の遊走を強力に阻害することを見出した: Bu-DIF-3 は MDA-MB-231 細胞の増殖と遊走の両者を阻害し、Br-DIF-1 は遊走のみを強力に阻害した (IC₅₀ は 5 μM 程度)。

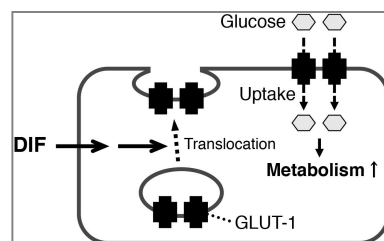
さらに Br-DIF-1 の遊走阻害活性に着目し、17 種類程の Br-DIF 誘導体を合成し、それらの遊走阻害活性を検討した。その結果、いくつかの Br-DIF 誘導体が強力な遊走阻害活性を発揮する一方、それら誘導体の増殖抑制活性は小さい事が判明した (論文投稿中)。これら Br-DIF 誘導体は既存抗がん剤との併用による転移阻害剤として利用できる可能性がある。

(2) DIF の糖代謝促進作用の解析

①糖尿病モデルラットの血糖値に対する DIF-1 の作用解析.

我々は、これまでに DIF-1 や DIF-1(3M) が GLUT1 (Glucose transporter 1) を介して哺乳類細胞の糖取り込みを促進することを示して来た (Omata et al. FEBS J. 2007 他; 右模式図)。

今回我々は、STZ 処理したラット (1 型糖尿病モデルラット) を作成し、血糖値に対する DIF-1 (経口投与) の効果を検討した。その結果、DIF-1 (30 mg/kg) 投与後 2 時間で、STZ ラットの血糖値が有意に下降した。さらに、



Glucose (2.5 g/kg) を投与後3時間後の血糖値は、Control群に比べてDIF-1投与群で有意に低い値となった(右図)。

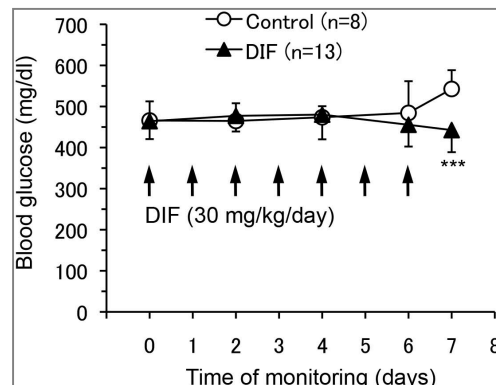
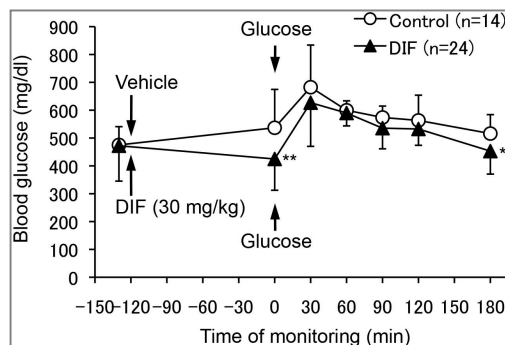
また、STZラットの血糖値に対するDIF-1の連続投与(30 mg/kg/day)の効果を検討した結果、Control群では8日目の血糖値が上昇し始めたが、DIF-1投与群では上昇は抑制されていた(右下図)。

DIF-1は、これらSTZラットの血糖値以外の血液成分には大きな影響を与えなかった。

これらの結果は、DIF-1とその誘導体が1型糖尿病の治療薬として臨床応用できる可能性を示唆している[論文⑨]。

②糖代謝を制御する細胞内シグナルに対するDIFの効果の検討。

一般にミトコンドリア毒はATP産生を阻害し、AMP kinaseを活性化することによって糖取込みを促進することが知られている。そこで、マウス3T3-L1細胞におけるAMP kinase活性に対するDIF-1やDIF-1(3M)の効果を検討した。その結果、DIFは少なくとも一部AMP kinaseを介さない経路によって細胞の糖取込みや糖代謝を促進することが示唆された(論文準備中)。



(3) 細胞性粘菌におけるDIFの作用機序解析。

①我々は、DIF-1とDIF-2は細胞性粘菌の走化性運動(cAMPが誘因物質)を正負のmodulatorsであることを示して来た(Kuwayama & Kubohara, *PLoS ONE*, 2009 他)。我々は、DIF-2の作用機序を解析し、DIF-2が粘菌のTwo component system(histidine kinase系)を介して、走化性運動を制御していることを見いだした(論文⑩)。

②DIFsの発見(1987年、1988年)以降、細胞性粘菌におけるDIFsの受容体は未だ同定されていない。そこで我々は、DIF-1-beads(前頁図参照)を作製し、粘菌細胞溶出物からDIF-binding proteins(DBPs)を粗精製し、SDS-PAGEで展開後、バンドを切り出し、LC-MS/MS法によっていくつかのDBPs候補タンパク質を同定した。そして、Glutathione S-transferase 4(GST4)がDBPの1つであり、子実体のサイズを調節している可能性を示した(論文⑦)。

5. 主な発表論文等

(下線は研究代表者と研究分担者)

[雑誌論文](計12件)

- ① Kubohara Y, & Kikuchi H. *Dictyostelium*: an important source of structural and functional diversity in drug discovery. *Cells*, 8(1), 6. (2019). doi: 10.3390/cells8010006. 査読有
- ② Kubohara Y, Kikuchi H, & Oshima Y. Derivatives of *Dictyostelium* differentiation-inducing factors inhibit serum-dependent cell migration of murine osteosarcoma LM8 cells. *Juntendo Med. J.* 65(1), 71-76. (2019). 査読有
- ③ Kikuchi H, Ito I, Takahashi K, Ishigaki H, Iizumi K, Kubohara Y, & Oshima Y. Isolation, synthesis and biological activity of chlorinated alkylresorcinols from *Dictyostelium* cellular slime molds. *J. Nat. Prod.* 80(10), 2716-2722. (2017). doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00456. 査読有
- ④ Takahashi K, Kikuchi H, Nguyen VH, Oshima Y, Ishigaki H, Nakajima-Shimada J, & Kubohara Y. Biological activities of novel derivatives of differentiation-inducing factor-3 from *Dictyostelium discoideum*. *Biol. Pharm. Bull.* 40(11), 1941-1947. (2017). doi: 10.1248/bpb.b17-00484. 査読有
- ⑤ Kubohara Y, Kikuchi H, Nguyen VH, Kuwayama H, & Oshima Y. Evidence that differentiation-inducing factor-1 controls chemotaxis and cell differentiation, at least in part, via mitochondria in *D. discoideum*. *Biology Open* 6, 741-751. (2017). doi: 10.1242/bio.021345. 査読有
- ⑥ Nguyen VH, Kikuchi H, Sasaki H, Iizumi K, Kubohara Y, & Oshima Y. Production of novel bispyrone metabolites in the cellular slime mold *Dictyostelium giganteum* induced by zinc(II) ion. *Tetrahedron* 73(5), 583-588. (2017). doi: 10.1016/j.tet.2016.12.040. 査読有
- ⑦ Kuwayama H, Kikuchi H, Oshima Y, & Kubohara Y. Glutathione S-transferase 4 is a

putative DIF-binding protein that regulates the size of fruiting bodies in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Rep.* 8, 219-226. (2016). doi: 10.1016/j.bbrep.2016.09.006. 査読有

- ⑧ Zhang J, Yamada O, Kida S, Matsushita Y, Murase S, Hattori T, Kubohara Y, Kikuchi H, & Oshima Y. Identification of brefelamide as a novel inhibitor of osteopontin that suppresses invasion of A549 lung cancer cells. *Oncol. Rep.* 36(4), 2357-2364. (2016). doi: 10.3892/or.2016.5006. 査読有
- ⑨ Kawaharada R, Nakamura A, Takahashi K, Kikuchi H, Oshima Y, & Kubohara Y. Oral administration of *Dictyostelium* differentiation-inducing factor 1 lowers blood glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 155, 56-62. (2016). doi: 10.1016/j.lfs.2016.04.032. 査読有
- ⑩ Kuwayama H, & Kubohara Y. Differentiation-inducing factor 2 modulates chemotaxis via the histidine kinase DhkC-dependent pathway in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 590(6), 760-768. (2016). doi: 10.1002/1873-3468.12111. 査読有
- ⑪ Nguyen VH, Kikuchi H, Kubohara Y, Takahashi K, Katou Y, & Oshima Y. Development of novel DIF-1 derivatives that selectively suppress innate immune responses. *Bioorg. Med. Chem.* 23(15), 4311-4315. (2015). doi: 10.1016/j.bmc.2015.06.027. 査読有
- ⑫ Kubohara Y, Komachi M, Homma Y, Kikuchi H, & Oshima Y. Derivatives of *Dictyostelium* differentiation-inducing factors inhibit lysophosphatidic acid-stimulated migration of murine osteosarcoma LM8 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463(4), 800-805. (2015). doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.016. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 久保原禪、佐々木啓、菊地晴久、大島吉輝「DIF-1 とその誘導体が有する抗菌活性の研究」日本細胞性粘菌学会第 7 回例会 2017 年 10 月 22 日 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市)
- ② 高橋克典、Nguyen Van Hai、菊地晴久、大島吉輝、嶋田淳子、久保原禪「新規 DIF-3 誘導体、DIF-3(+3)と Hex-DIF-3、の生物活性の検討」日本細胞性粘菌学会第 7 回例会 2017 年 10 月 21 日 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市)
- ③ 久保原禪、菊地晴久、Nguyen Van Hai、桑山秀一、大島吉輝「DIF-1 の機能とミトコンドリアの関係」日本細胞性粘菌学会第 6 回例会 2016 年 10 月 16 日 上智大学 (東京)
- ④ 中里隆之佑、細見修、尾形慎、佐々木啓、飯泉恭一、久保原禪「ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 に対する MelNH₂(Gal α 1-6GlcNH₂)の作用」第 30 回キチン・キトサン学会大会 2016 年 8 月 18 日 ウェスタ川越 (埼玉県川越市)
- ⑤ 中島徹、田中進、田中佑季、秋山琉璃、久保原禪、保坂公平「Jurkat T 細胞においてマイトジェン刺激で活性化される転写調節因子のマンガンによる影響」日本生化学会第 88 回大会 2015 年 12 月 3 日 京都国際会議場
- ⑥ 河原田律子、中村彰男、高橋克典、菊地晴久、大島吉輝、久保原禪「1 型糖尿病モデルラットの血糖値に対する DIF-1 (経口投与) の効果」日本細胞性粘菌学会第 5 回例会 2015 年 10 月 10 日 弘前大学
- ⑦ 桑山秀一、久保原禪「DIF-2 による粘菌走化性運動の制御メカニズム」日本細胞性粘菌学会第 5 回例会 2015 年 10 月 10 日 弘前大学
- ⑧ 牧岡優佳、山本菜々子、久保原禪、細見修「ヒトがん細胞が高発現するマーカーとオリゴ糖添加による影響」第 29 回日本キチン・キトサン学会大会 2015 年 8 月 20 日 東海大学熊本キャンパス

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：抗菌剤

発明者：久保原禪、菊地晴久、大島吉輝

権利者：久保原禪

種類：特許

番号：特許第 6478378 号

取得年：2019 年 2 月

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=5490>
http://square.umin.ac.jp/jun_health_LS/index.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大島 吉輝

ローマ字氏名：OSHIMA Yoshiteru

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院薬学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：00111302

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。