

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15581

研究課題名(和文) 乳がんにおけるDIF-1の抗腫瘍活性および抗転移活性の検討

研究課題名(英文) Evaluation of anti-tumor and anti-metastatic activities of DIF-1 on breast cancer

研究代表者

有岡 将基 (Arioka, Masaki)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20733554

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)：Differentiation Inducing Factor-1(DIF-1)は細胞性粘菌が分泌する天然物質で、様々ながん細胞株において、抗腫瘍効果を発揮することを我々は見出したが、乳がんにおける効果は明らかでない。乳がんの5年生存率は、ステージ および で90%以上であるのに対して、ステージ では22%とがん遠隔転移が著しく生命予後を悪化させる。本研究はDIF-1の抗腫瘍薬としての創薬を目指し、乳がんに対するDIF-1の抗腫瘍効果を検討した。DIF-1は試験管内およびマウスの実験どちらにおいても抗腫瘍効果を発揮した。DIF-1は乳がんへの有効な抗腫瘍薬になりうるということがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の抗腫瘍薬はがん細胞の細胞増殖を強制的に拘束し、細胞を殺すことができる一方で、正常な細胞も殺すことで強い副作用が患者の体を衰弱させる原因となっている。DIFは細胞性粘菌が分泌する天然物質である。自然界から見つかった抗生物質や植物アルカロイドなどは、微生物や植物が身を守るための「毒」である。しかしDIFは「毒」ではなく、粘菌の遺伝子発現を調節し、細胞の形を変化させることをもたらす生理活性物質である。ゆえ、DIFは生体内において細胞毒性を示さない。DIFは「がんを殺さず、がんとの共存する、有害反応の少ない抗がん薬」という新しいコンセプトの薬が開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Differentiation-inducing factor 1 (DIF-1) identified in Dictyostelium discoideum has been reported to inhibit the proliferation of various malignant tumor cells, but this anti-tumor effect has been unknown on breast cancer. Breast cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer-related deaths among women worldwide. According to the American Cancer Society, ~12% of American women develop breast cancer in their lifetime. In 2012, ~14.1 million women got a diagnosis of breast cancer and over 8 million women died of this disease all over the world. We investigated anti-tumor effects of DIF-1 on breast cancer. DIF-1 exerted anti-proliferative and anti-metastatic effects in both in-vitro and in-vivo effects. DIF-1 could be a lead chemical compound for novel anti-breast cancer agents.

研究分野：薬理学

キーワード：DIF-1 乳がん 細胞増殖 がん転移 STAT3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Differentiation Inducing Factor-1(DIF-1)は細胞性粘菌が分泌する天然物質である。当研究室では、DIF-1 が子宮頸癌、骨肉腫、扁平上皮癌、大腸癌、悪性黒色腫のがん細胞株において、抗腫瘍効果を発揮することを見出した。その機序を検討したところ、DIF-1 が GSK-3 の活性化を通じて G1 期の細胞周期進行に必要なとされる cyclin D1 および c-Myc のタンパク質分解を誘導することで G1 期で細胞周期を拘束し、またがん形成・増大に関与する Wnt/  $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を抑制することで、細胞増殖を抑制することを報告した。腫瘍増大に必要な血管新生を抑制することも報告している。さらに、DIF-1 の生体内での作用について、がんモデルマウスを用いて検討を行い、DIF-1 が骨髄抑制や体重減少などの深刻な副作用を起こすことなしに、抗腫瘍効果を持つことを報告した。

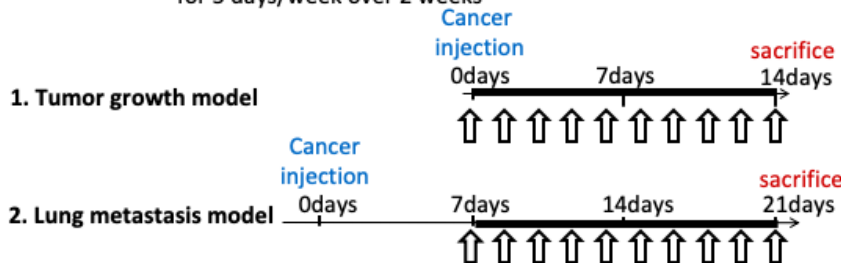
## 2. 研究の目的

本研究はがん細胞において抗腫瘍効果を発揮する Differentiation inducing factor-1 (DIF-1) の“抗腫瘍薬”としての臨床応用を目指す橋渡し研究である。当研究室は DIF-1 がグリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK)-3 の活性化を介して、細胞周期の G1 期に関わる因子である cyclin D1 および c-Myc のタンパク質分解と、がん形成・増大に関与する Wnt/  $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を抑制することで、子宮頸癌、骨肉腫、扁平上皮癌、大腸癌、悪性黒色腫の細胞増殖を阻害することを明らかにしてきたが、DIF-1 の“がん転移”に及ぼす影響は検討していない。乳がんの 5 年生存率は、ステージ および で 90%以上であるのに対して、ステージ では 22%とがん遠隔転移が著しく生命予後を悪化させることが知られている(アメリカがん協会, 2016)。したがって、乳がんに対して転移抑制効果を示す抗腫瘍薬の開発は生命予後を改善する治療薬になりうる。さらに、エストロゲンレセプター発現・プロゲステロンレセプター発現・HER2 過剰発現がいずれも認められない高悪性で高転移性の“トリプルネガティブ乳がん”における効果的な化学療法は少なく、新規抗腫瘍薬の開発が求められている。そこで、本研究は DIF-1 の抗腫瘍薬としての創薬を目指し、乳がん細胞を用いて細胞増殖・細胞遊走・細胞接着・癌転移に対する DIF-1 の効果を検討した。

## 3. 研究の方法

- (1) 三種混合麻酔薬(塩酸メドミジン 0.15 mg/kg; ミダゾラム 2 mg/kg; 酒石酸ブトルファンロール 2.5 mg/kg) を腹腔内注射し、ルシフェラーゼ恒常発現したトリプルネガティブ乳がん 4T1-luc 細胞 ( $1.0 \times 10^4$  個) をマトリゲル 20 $\mu$ l と混和して、8 週齢の雌 BALB/c マウスの乳房脂肪体に 27G の針で 20 $\mu$ l を注入した。コントロール群は大豆油を DIF 投与群は 450mg/kg/day (朝 300mg/kg 夜 150mg/kg) を 5 日/週、経口投与する。細胞注入後、1 週間毎に 4 週間後まで、4 週間後に、骨髄抑制の副作用を評価するために、開胸し 25G の針で心臓より採血し、腫瘍組織を評価するために原発がん、肺の転移の有無を確認するために肺を摘出した。骨髄抑制は全自動血球計数器「セルタック」MEK-6450 を用いた血球測定で評価し、原発がんは大きさ、重量、ルシフェラーゼ活性を評価した。乳がんの中でもっとも高頻度で認められる PI3K 変異乳がん細胞として MCF-7 細胞を乳房脂肪体に注入して腫瘍の大きさ重量を評価した。

↑: Dosing every 12 h(150mg/kg in the morning, 150mg/kg in the evening)  
for 5 days/week over 2 weeks



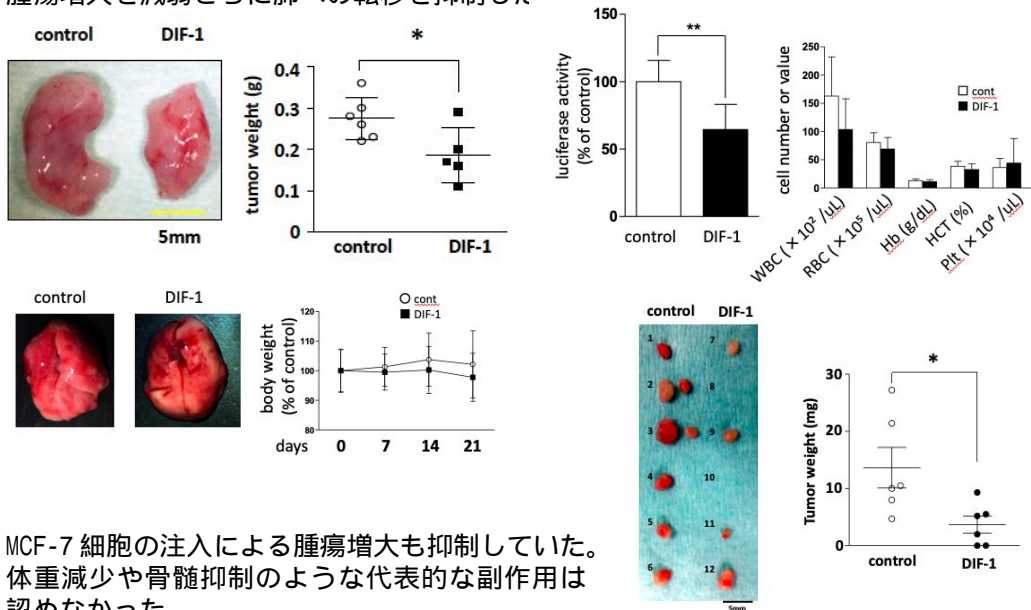
**Assessment:** Tumor weight, Body weight, Lung luciferase activity, Blood cell counts

- (2) 4T1 細胞、MCF-7 細胞を 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 気相下、10%FBS 含有 DMEM で培養した。様々な濃度の DIF-1 を投与し、24 時間毎に 72 時間まで細胞数をカウントすることで、細胞増殖への影響を評価した。次に DIF-1 で 24 時間処理し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期への影響を評価した。作用機序の解明のため、DIF-1 が GSK-3 のリン酸化レベル、cyclin D1、のタンパク質発現を評価した。プロテアソーム阻害剤 (MG132) を用いてタンパク質分解への影響、qRT-PCR を用いて転写に与える影響を評価した。

- (3) Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)は40%の乳がん細胞で恒常的に活性化しており、cyclinD1の発現を調節することが報告されている。リン酸化とトータルのSTAT3のタンパク質発現に与えるDIF-1の影響をウェスタブロット法で評価した。
- (4) DIF-1のがん転移が成立するために不可欠である細胞遊走・浸潤に対する効果を検討する。
- (5) 細胞遊走は24穴プレートにコンフルエントに細胞を播種し、200- $\mu$ lの黄色のチップでスクラッチし、経時的に傷の領域を測定するwound healing assayで遊走能を評価した。細胞浸潤は10  $\mu$ gのマトリゲルでコーティングした8  $\mu$ m-Boyden chamberを用いて浸潤した細胞数をクリスタルバイオレットで染色し評価した。機序の解明のため、Wnt標的遺伝子で細胞遊走・浸潤に関与する因子として知られている、Matrix metalloproteinase-2(MMP-2)と間葉系マーカー(Vimentin)の発現を評価した。
- (6) がん転移の成立には、遊走・浸潤したがん細胞が脈管に進入し、転移臓器の血管内皮細胞に接着する必要がある。そのため、DIF-1の細胞接着に対する効果を検討する。細胞外マトリックス(フィブロネクチン、コラーゲン type 、ラミニン、フィブリノーゲン、コラーゲン type )がコーティングされた48穴プレートに $1.0 \times 10^5$ 細胞/wellの濃度で播種し、DIF-1とともに1時間培養後、接着細胞数を評価する。

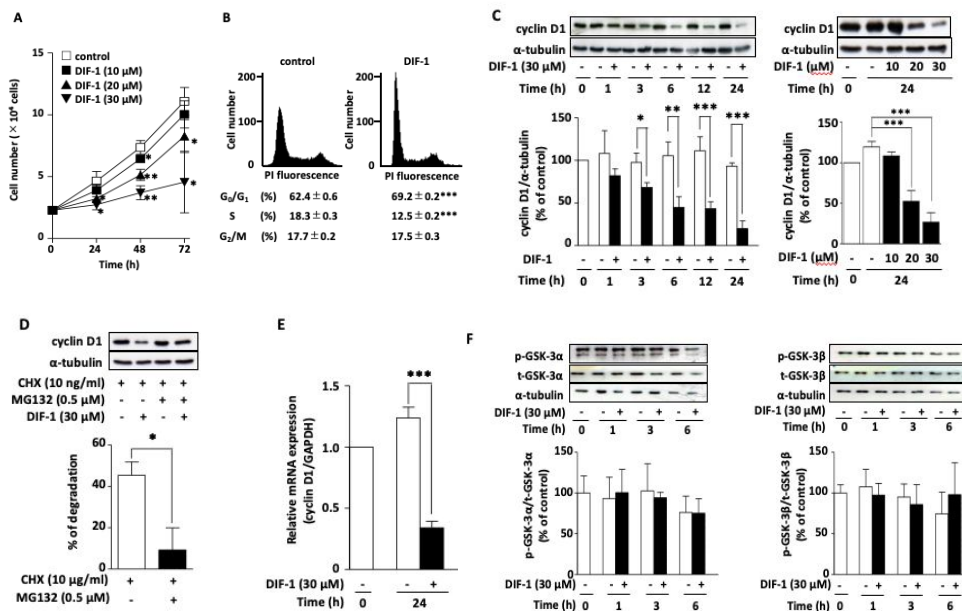
#### 4. 研究成果

- (1) DIF-1の経口投与は4T1細胞の注入による腫瘍形成モデルおよび腫瘍転移モデルにおいて、腫瘍増大を減弱さらに肺への転移を抑制した



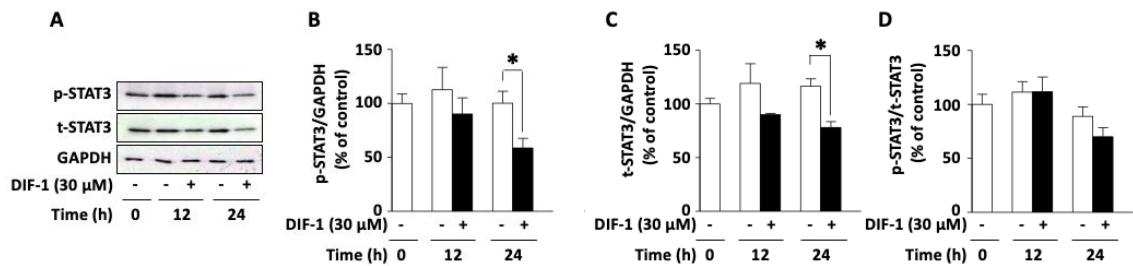
MCF-7細胞の注入による腫瘍増大も抑制していた。体重減少や骨髄抑制のような代表的な副作用は認めなかった。

- (2) DIF-1はMCF細胞の細胞増殖を濃度依存的・時間依存的に抑制した。細胞周期はG0/G1期

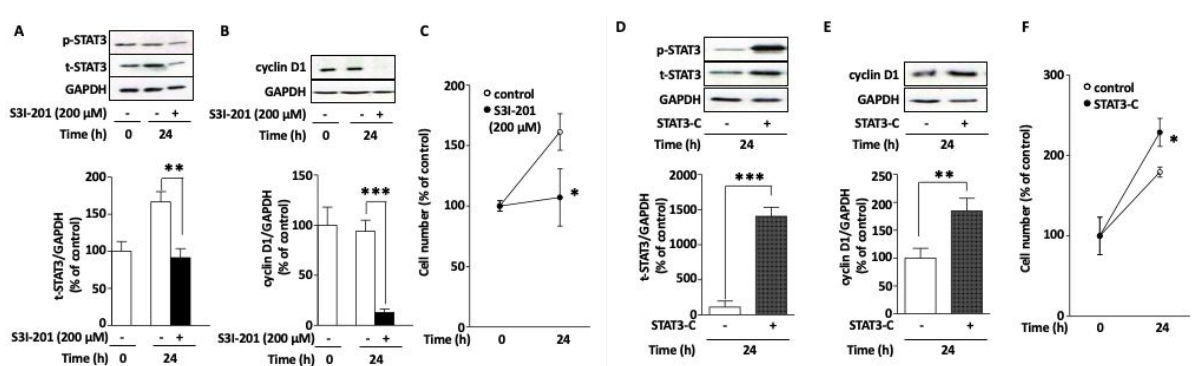


で拘束していた。DIF-1 は cyclinD1 のタンパク質分解を誘導しているだけでなく転写も抑制していた。しかし、MCF-7 細胞において DIF-1 は GSK-3 に影響を与えなかった。この結果から、乳がん細胞は他の癌腫と違い、GSK-3 を介さない経路で細胞増殖抑制効果を発揮していることが分かった。そのため、この作用機序探求が必要となった。

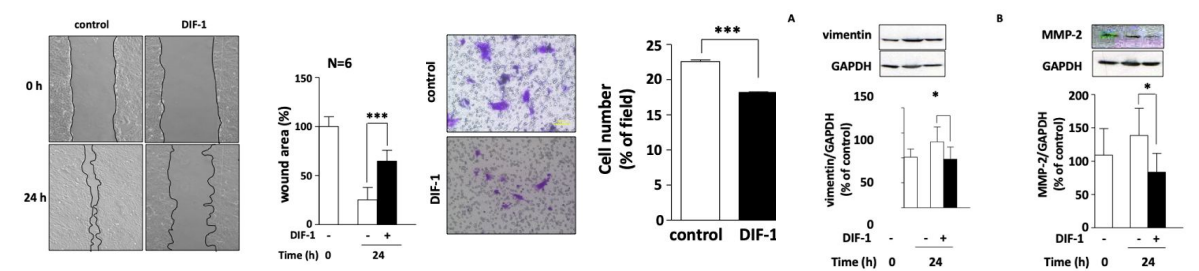
- (3) 方法で述べたように、STAT3 の活性化が乳がん細胞で生じていること、cyclinD1 の regulator になりうる転写因子であることから、STAT3 の評価を行った。DIF-1 は MCF-7 において、STAT3 のリン酸化およびトータルのタンパク質レベルいずれも減少させることがわかった。



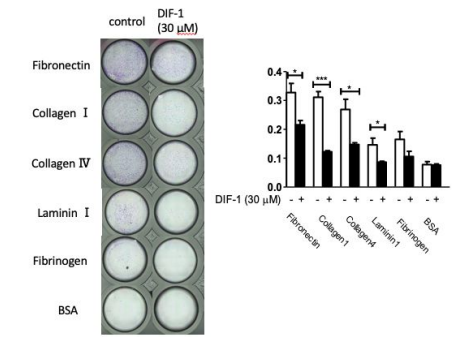
- (4) STAT3 の cyclinD1 調節による増殖への関与を調べるために、STAT3 阻害剤と過剰発現による実験を行った。MCF 細胞において、STAT3 阻害剤により cyclinD1 が減少し、細胞増殖が抑制された。反対に、STAT3 を過剰発現させることで、cyclinD1 の発現は上昇し、細胞増殖も加速した。



- (5) In vivo 実験から、DIF-1 が癌転移を抑制することから、作用機序探索を in vitro 実験で行った。4T1 細胞において、DIF-1 は細胞遊走および浸潤を抑制した。癌細胞を上皮間葉移行へと誘導する転写因子の snail の発現を減少させ、遊走に関わる MMP-2 および vimentin の発現を減少させた。



- (6) さらに、4T1 細胞において、DIF-1 は腫瘍の細胞外基質と接着を有意に抑制することがわかった。





## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Tetsuo F, **Arioka M**, Kai M, Kubo M, Igawa K, Tomooka K, Takahashi-Yanaga F, Nishimura F, Sasaguri T. Differentiation-inducing factor-1 abrogates STAT3-mediated cyclin D1 expression in human breast cancer cell line MCF-7. *Biochem Pharmacol* (Under review)
2. **Arioka M**, Takahashi-Yanaga F. (2019) Glycogen synthase kinase-3 inhibitor as a multi-targeting anti-rheumatoid drug. *Biochem Pharmacol* (in press) doi:10.1016/j.bcp.2019.02.020
3. Chen CH, Coyac BR, **Arioka M (equally contributed author)**, Leahy B, Tulu US, Aghvami M, Holst S, Hoffmann W, Quarry A, Bahat O, Salmon B, Brunski JB, Helms JA. (2019) A Novel Osteotomy Preparation Technique to Preserve Implant Site Viability and Enhance Osteogenesis. *J Clin Med* 8(2), 170 doi: 10.3390/jcm8020170
4. Yoshihara T, Zaitzu M, Shiraishi F, Arima H, Takahashi-Yanaga F, **Arioka M**, Kajioka S, Sasaguri T. (2019) Influence of genetic polymorphisms and habitual caffeine intake on the changes in blood pressure, pulse rate, and calculation speed after caffeine intake: A prospective, double blind, randomized trial in healthy volunteers. *J Pharmaco Sci* (in press)
5. **Arioka M**, Zhang X, Li Z, Tulu US, Liu Y, Wang L, Yuan X, Helms JA. (2019) Osteoporotic Changes in the Periodontium Impair Alveolar Bone Healing. *J Dent Res* (in press) doi: 10.1177/0022034518818456
6. Zhang X, Yuan X, Xu Q, **Arioka M**, Van Brunt LA, Shi Y, Brunski J, Helms JA. (2019) Molecular Basis for Periodontal Ligament Adaptation to In Vivo Loading. *J Dent Res* 98(3), 331-338 doi:10.1177/0022034518817305
7. Chen CH, Wang L, Serdar Tulu U, **Arioka M**, Moghim MM, Salmon B, Chen CT, Hoffmann W, Gilgenbach J, Brunski JB, Helms JA. (2018) An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair. *Bone* 112, 212-219 doi: 10.1016/j.bone.2018.04.019
8. Chen CH, Pei X, Tulu US, Aghvami M, Chen CT, Gaudilliere D, **Arioka M**, Maghazeh Moghim M, Bahat O, Kolinski M, Crosby TR, Felderhoff A, Brunski JB, Helms JA. (2018) A Comparative Assessment of Implant Site Viability in Humans and Rats. *J Dent Res* 97(4), 451-459 doi:10.1177/0022034517742631
9. **Arioka M (corresponding author)**, Takahashi-Yanaga F, Tatsumoto N, Sasaguri T. (2017) Inorganic phosphate-induced impairment of osteoclast cell-cell fusion by the inhibition of AP-1-mediated DC-STAMP expression. *Biochem Biophys Res Commun* 493(1), 9-13 doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.096
10. **Arioka M**, Takahashi-Yanaga F, Kubo M, Igawa K, Tomooka K, Sasaguri T. (2017) Anti-tumor effects of differentiation-inducing factor-1 in malignant melanoma: GSK-3-mediated inhibition of cell proliferation and GSK-3-independent suppression of cell migration and invasion. *Biochem Pharmacol* 138, 31-48 doi: 10.1016/j.bcp.2017.05.004
11. **Arioka M**, Sasaki M, Ishii K, Kanamoto M, Yamashiro T, Mori Y. A case of pediatric mandibular osteonecrosis caused by leakage of arsenic trioxide. *Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2017, 63, 1, 15-20.
12. Akihiro Nagano, **Masaki Arioka (equally contributed author)**, Fumi Takahashi, Etsuko Matsuzaki, Toshiyuki Sasaguri, Celecoxib inhibits osteoblast maturation by suppressing the expression of Wnt target genes, *Journal of Pharmacological Sciences*, 133, 1, 18-24, 18-24, 2017.01.
13. Issei Egashira, Fumi Takahashi-yanaga, Risa Nishida, **Masaki Arioka**, Kazuhiro Igawa, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu, Takanari Kitazono, Toshiyuki Sasaguri, Celecoxib and 2,5-dimethylcelecoxib inhibit intestinal cancer growth by suppressing the Wnt/beta-catenin signaling pathway, *Cancer Science*, 108, 1, 108-115, 108-115, 2017.01.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 久保 桃子、**有岡 将基**、哲翁 ふみ、笹栗 俊之、DIF-1 は STAT3 シグナルの阻害により悪性黒色腫細胞の遊走・浸潤を抑制する(口演) 第 71 回 日本薬理学会西南部会(11/17: 福岡)
2. 哲翁 ふみ、**有岡 将基**、久保 桃子、高橋 富美、西村 英紀、笹栗 俊之、Differentiation-inducing factor-1 のトリプルネガティブ乳癌に対する抗腫瘍効果(ポ

スター) 第71回 日本薬理学会西南部会(11/17:福岡)

3. Tetsuo F, Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Nishimura F, Sasaguri T. Differentiation-inducing factor-1 suppresses proliferation, migration and metastasis of breast cancer (poster), WCP2018 Kyoto (18<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology)(7/1-6)
4. Kubo M, Arioka M, Sasaguri T. Differentiation-inducing factor-1 suppresses migration and invasion of malignant melanoma cells by inhibiting Stat3 phosphorylation (poster), WCP2018 Kyoto (18<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology)(7/1-6)
5. 哲翁 ふみ、有岡 将基、笹栗 俊之、乳癌の増殖・転移に対する DIF-1 の抑制効果(口演) 第70回 日本薬理学会西南部会(11/18:鹿児島)

〔図書〕(計 1件)

笹栗 俊之、宮田 篤郎 編著(2018) ベッドサイドの薬理学, 丸善出版

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。