

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590284

研究課題名（和文）細胞性粘菌由来 G1 期阻害物質 DIF の抗腫瘍薬としての臨床応用に向けた検討

研究課題名（英文） Examination of the effect of DIF, an inhibitor of G1 phase transition derived from *Dictyostelium*, as a new anti-cancer drug.

研究代表者

高橋 富美 (TAKAHASHI FUMI)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：50274436

研究成果の概要（和文）：

Differentiation-inducing factor (DIF：細胞性粘菌分化誘導因子) は細胞性粘菌が分泌する化学物質であるが、哺乳類の腫瘍細胞にも増殖抑制作用を持つことが報告されている。本研究は腫瘍細胞に対し強力な増殖抑制作用を持つDIF-1またはDIF様物質の抗悪性腫瘍薬としての臨床応用を目指すものである。この中で本申請課題では、DIF-1の生体内での動態を検討し、抗腫瘍薬としてのDIFの有効性についての検討を行った。

研究成果の概要（英文）：

Differentiation-inducing factor-1 (DIF-1), a morphogen of *Dictyostelium discoideum*, shows anti-tumor effect in several human tumor cells *in vitro*. To evaluate whether DIF-1 is applicable for the treatment of tumor *in vivo*, the pharmacodynamics and the effect of DIF-1 in mice were analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：抗腫瘍薬、サイクリンD1、G1期特異的、Wntシグナル伝達経路、モデル動物

1. 研究開始当初の背景

Differentiation-inducing factor (DIF：細胞性粘菌分化誘導因子) は細胞性粘菌 *Dictyostelium* が分泌する化学物質で、粘菌の分化を誘導する物質として単離され構造が決定されたが、その活性は粘菌にとどまらず哺乳類の腫瘍細胞や血管平滑筋細胞にも増殖抑制作用を持つことが報告されていた。

しかしながら、その分子基盤については標的分子を含めて明らかとされていなかった。我々はDIFの作用機序を明らかにするために検討を行い、DIFが種々のヒト由来がん細胞株の細胞周期をG₁期で停止させることを初めて見だし、glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) の活性化を介したサイクリンD1の発現量の著しい減少がその分子基盤で

あることを報告した。

従来型の抗腫瘍薬の大部分は細胞周期のなかで、DNA複製期であるS期と分裂期であるM期をターゲットにしているが、これらの薬剤は、がん細胞のみならず増殖の速い細胞（白血球系の細胞など）に致死作用をもたらし、しばしば重篤な副作用（有害反応）が現れる。一方、G₁期、特にその早期は、増殖・分化の決定がなされる重要な時期であるとともに、数多くのがん遺伝子・がん抑制遺伝子の産物が働いていることが知られており、新しい抗腫瘍薬のターゲットとして注目されている。しかし現在のところG₁期をターゲットとする抗腫瘍薬は少ない。

種々のがん細胞で過剰発現が報告されており、オンコジーンとして位置づけられているサイクリンD1は、外界からの増殖刺激を受けてG₁期早期に発現が誘導されるタンパク質であり、外界からの増殖刺激を細胞周期系に伝える調節分子センサーとして機能する（右図参照）。またサイクリンD1はがん細胞の増殖のみならず、腫瘍の増大および転移に大きな役割を果たす血管新生の過程でも、血管内皮細胞増殖のためのセンサーとして機能していることから、サイクリンD1はG₁期特異的抗腫瘍薬の期待できるターゲットと言える。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍細胞に対し強力な増殖抑制作用を持つDIF-1またはDIF様物質の抗悪性腫瘍薬としての臨床応用を目指すものである。この中で本申請課題では、DIF-1の生体内での投与方法および動態を検討した。また、DIF様物質の抗腫瘍活性の評価を病態モデルマウスを用いて行うとともに、生体内での作用機序の解明を行うために、DIF-1の抗腫瘍活性の分子レベルでの解析を行った。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞の培養には10%ウシ胎仔血清を加えたDMEM培地を用いた。

(2) マウスを用いたDIF-1の体内動態の解明
マウスに、腹腔内投与(30 mg/kg)または経口投与(150 mg/kg)によりDIF-1を投与し、一定時間経過後(30分~24時間)にマウスを安楽死させ、心臓より採血した。採取した血液を遠心分離後、血漿からDIF-1をクロロホルムで抽出しHPLC(Waters 2695)にて分析を行った。経口投与では、メチルセルロースにDIF-1を懸濁したものと、大豆油にDIF-1

を溶解したものの2種類の薬液を用いて、投与しその血中濃度の推移の比較検討を行った。

(3)ヌードマウスとマトリゲル（基底膜再構成基質）を用いたDIF-1の抗腫瘍活性の評価

①腫瘍サイズへの影響と分子レベルでの解析

ヒト腫瘍細胞をマトリゲルに混入し、ヌードマウス背部皮下に注入するという方法で腫瘍塊を形成させる。腫瘍サイズの評価は1~2週間後に行う。このときマトリゲルにDIF-1を加えたものを用意し、DIF-1がin vivoでも抗腫瘍作用を発揮するか否かを検討する。

②血管新生に対する影響のin vivoおよびin vitroの系での解析

in vivoにおける血管新生に対する効果の評価:血管新生作用を有するサイトカインVEGFを混入したマトリゲルやヒト腫瘍細胞を混入したマトリゲルを、ヌードマウス背部皮下に注入し、マトリゲルに向かって形成される新生血管を評価した。

また、in vitroにおける血管新生に対する効果の評価:血管新生に対するDIF-1の作用を系統的に解析するために、血管内皮細胞の遊走能および管腔形成能に及ぼすDIFの影響について検討を行った。

(4)ヌードマウスを用いたDIF-1投与と腫瘍の増大に対する効果の評価

ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞をヌードマウス背部皮下にマトリゲルとともに注入した。DIF-1を大豆油で溶解したものを経口投与し、3週間後に腫瘍の摘出を行った。摘出腫瘍塊は重量を測定後分割し、ウェスタンブロットのサンプルを作成し、タンパク質の解析を行った。

(5)ウェスタンブロット

腫瘍塊を破碎後、SDS-PAGEにてタンパク質を分離した。タンパク質を転写したメンブレンを一次抗体(cyclin D1、GAPDH)と反応させ、抗体と結合したタンパク質を検出した。

4. 研究成果

マウスを用いたDIF-1の体内動態の解明を目指し、DIF-1をマウスに腹腔内および経口にて投与し、一定時間経過後にマウスを安楽死させ、心臓より採血した。採取した血液から、DIF-1を抽出しHPLCにて分析を行った。DIF-1

は腹腔内および経口投与により血中に移行していたが、腹腔内投与では半減期が早く血中濃度の維持が困難であることが明らかとなった(図1)。

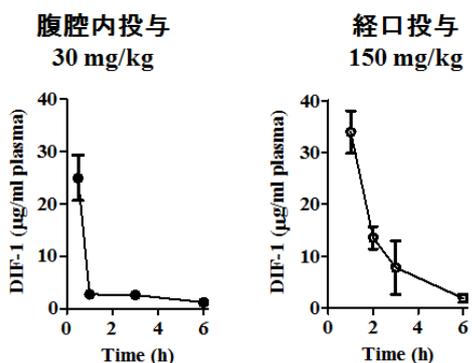


図 1

次に、経口投与時に使用する溶剤の比較検討を行った。水溶性の低い薬剤の経口投与方法として一般的な、薬剤をメチルセルロースに懸濁しマウスに経口投与を行う方法では、急激な血中濃度上昇を示し、濃度の維持が困難なことが明らかとなった。そこで、DIF が脂溶性の高い物質であることに着目し、大豆油に溶かして経口投与を行ったところ、緩やかな血中濃度の上昇と良好な血中濃度維持を示した(図2)。

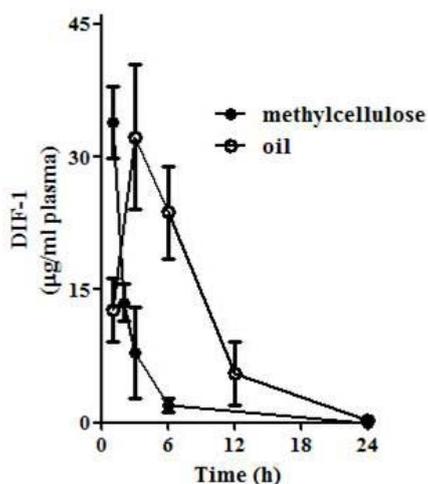


図 2

この結果に基づいて、DIF のモデル動物への投与は corn oil に溶かして経口投与を行った。

また、これと並行してヌードマウスとマトリゲル(基底膜再構成基質)を用いたDIF-1の局所投与による抗腫瘍活性評価を行った。ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞をマトリゲルに混入し、ヌードマウス背部皮下に注入するという方法で腫瘍塊を形成させた。このときマトリゲルにDIF-1を加えたものでは腫瘍サイズが明らかに減少し、DIF-1がin vivoでも抗腫瘍作用を発揮することが明らかとなった。また、血管新生に対する影響をin vitroおよびin vivoの系での解析を行い、DIF-1が血管新生を抑制することを見出した(論文4)。

さらに、ヌードマウスの背部皮下にヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa をマトリゲルと混入して注入し、腫瘍を形成させ、このマウスに大豆油に溶解したDIF-1を経口にて3週間投与を行ったところ、コントロール群と比較して腫瘍の増大を抑えることができた(図3)。

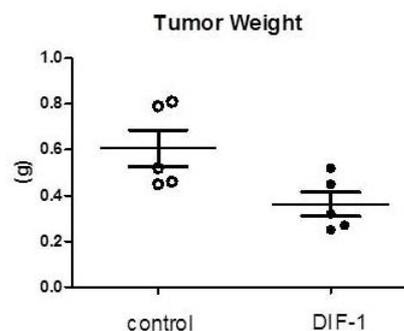


図 3

また、新たに大腸がん細胞株に及ぼすDIFの作用機序についての検討もを行い、DIFの新規ターゲット分子を見出した(論文1)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5件)

1. Jingushi, K., Takahashi-Yanaga, F., Yoshihara, T., Shiraishi, F., Watanabe, Y., Hirata, M., Morimoto, S., & Sasaguri, T. (2012) DIF-1 Inhibits the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway by Inhibiting TCF7L2 Expression in Colon Cancer Cell Lines. *Biochemical Pharmacology* 83(1), 47-56 査読あり doi:10.1016/j.bcp.2011.10.001

2. Fan, X., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Zhan, D.-Y., Igawa, K., Tomooka, K., & Sasaguri, T. (2011) Celecoxib and 2,5-dimethyl-celecoxib prevent cardiac remodeling inhibiting Akt-mediated signal transduction in an inherited DCM mouse model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338(1), 2-11 doi:10.1124/jpet.111.179325. 査読あり
3. Takahashi-Yanaga, F. & Kahn, M. (2010) Targeting Wnt Signaling: Can We Safely Eradicate Cancer Stem Cells? *Clin. Cancer Res.* 16(12), 3153-3162 査読あり
4. Yoshihara, T., Takahashi-Yanaga, F., Shiraishi, F., Morimoto, S., Watanabe, Y., Hirata, M., Hoka, S., & Sasaguri, T. (2010) Anti-angiogenic effects of differentiation-inducing factor-1 involving VEGFR-2 expression inhibition independent of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cancer* 9(1), 245 査読あり
5. Matsuda, T., Takahashi-Yanaga, F., Yoshihara, T., Maenaka, K., Watanabe, Y., Miwa, Y., Morimoto, S., Kubohara, Y., Hirata, M., & Sasaguri, T. (2010) Dictyostelium differentiation-inducing factor-1 binds to mitochondrial malate dehydrogenase and inhibits its activity. *J. Pharmacol. Sci.* 112(3), 320-326 査読あり
3. 吉原 達也、高橋 富美、笹栗 俊之
DUSP-1 の抑制により differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果は増強する
第 32 回 日本臨床薬理学会年会
2011/12/2 浜松
4. 吉原 達也、高橋 富美、笹栗 俊之
DUSP-1 の抑制により differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果は増強する
第 70 回 日本癌学会学術総会
2011/10/3 名古屋
5. Jingushi, K., Takahashi, F., Sasaguri, T.
Differentiation-inducing factor-1 inhibits the Wnt signaling pathway by reducing TCF7L2 expression in colon cancer cells
第 70 回 日本癌学会学術総会
2011/10/4 名古屋
6. 高橋 富美、吉原 達也、笹栗 俊之
Wnt シグナル阻害剤 Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍活性の検討
第 70 回 日本癌学会学術総会
2011/10/3 名古屋
7. 高橋 富美、吉原 達也、中津 可道、續 輝久、中別府 雄作、笹栗 俊之 酸化ストレス誘発小腸腫瘍に対する Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果 第 69 回 日本癌学会学術総会 2010/9/22 大阪
8. 吉原 達也、高橋 富美、笹栗 俊之
Differentiation-inducing factor-1 は VEGFR2 の発現を低下させることにより in vitro および in vivo において血管新生を阻害する
第 68 回 日本癌学会 2009/10/1 横浜

[学会発表] (計 8 件)

1. 吉原 達也、高橋 富美、笹栗 俊之
The inhibition of DUSP-1 expression enhances anti-tumor effects of differentiation-inducing factor-1 in HeLa cells<DUSP-1 発現抑制による differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍活性の増強効果> 第 85 回 日本薬理学会学術総会 2012/3/15 京都
2. 神宮司 健太郎、高橋 富美、中村 俊央、笹栗 俊之
細胞性粘菌由来分化誘導因子 DIF-1 はヒト大腸癌由来 HCT-116 細胞において c-Myc の発現を低下させる
第 85 回 日本薬理学会学術総会
2012/3/14 京都
6. 研究組織
(1) 研究代表者
高橋 富美 (TAKAHASHI FUMI)
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号：50274436
(2) 研究分担者
渡辺 裕 (WATANABE YUTAKA) 4 0
愛媛大学・理工学研究科・教授
研究者番号：40114722
(3) 連携研究者
平橋 美奈子 (MINAKO HIRAHASHI)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：90529877