

平成21年 4月15日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590136  
 研究課題名（和文）土壌微生物由来の薬理活性物質 DIF の作用機構解析と有用 DIF 誘導体の開発  
 研究課題名（英文）Analysis of the mechanisms of the actions of DIF, a bio-active compound isolated from a soil micro-organism, and development of effective DIF derivatives  
 研究代表者  
 久保原 禪（KUBOHARA YUZURU）  
 群馬大学・生体調節研究所・准教授  
 研究者番号：00221937

研究成果の概要：我々は、細胞性粘菌由来の低分子化合物 DIF-1 およびその誘導体の薬理活性（抗腫瘍活性と細胞の糖代謝促進活性）を解析し、1) DIF 様因子の有する2つの薬理活性は、DIF の側鎖修飾によって分離できる可能性があること、2) DIF-1 による糖代謝促進作用は、細胞内の GLUT1 を細胞膜に移動させることによって発揮されること、3) DIF-1 の誘導体 DIF-1(3M)は、KKay マウスの食後の血糖値下降を促進する作用があること等を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：細胞性粘菌、分化誘導因子、がん、糖尿病、肥満

## 1. 研究開始当初の背景

下等真核微生物の1種である細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、発生過程の最後に孢子塊と柄細胞より成る子実体を形成する。DIF-1 は、*D. discoideum* 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同定された「2つの塩素原子を含む低分子化合物 (chlorinated alkylphenone)」である (Morris et al., Nature, 1987)。

1995 年、我々は DIF-1 が抗腫瘍活性を有することを発見し (Asahi et al., BBRC)、以来、その作用機構の解析と、より有効な DIF 誘導体 (抗がん剤) の開発を進めてきた。

また、正常細胞 (non-transformed cells)

に対する DIFs の毒性を検討している過程で、「DIF-1 が細胞の糖代謝を促進する」ことを発見し、この新しい DIF-1 の機能についても研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

本研究の主目的は以下の2つである。

- ① DIF 様因子の抗腫瘍作用の機構解析、および有用 DIF 誘導体の開発。
- ② DIF 様因子の糖代謝促進作用の機構解析、および有用 DIF 誘導体の開発。

将来的には、本研究を土台とした新規抗癌剤、および新規肥満治療薬・糖尿病治療薬の開発を目指している。

### 3. 研究の方法

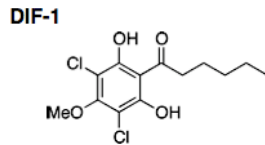
主に以下のアッセイ系等を利用して、DIFの作用機構解析と有用誘導体の開発を行った。

- ①ヒト K562 白血病細胞、マウス 3T3-L1 細胞（正常細胞）を各種 DIF 誘導体存在下で 3 日間 in vitro 培養を行い、細胞数を比較検討し、増殖抑制効果を調べる。
- ②Confluent 状態のマウス 3T3-L1 細胞を各種 DIF 誘導体存在下で数時間 in vitro 培養し、培地中のグルコース濃度を測定する。グルコースの代謝速度を計算、比較検討し、糖代謝を促進する DIF 誘導体をスクリーニングする。
- ③in vitro アッセイ系で「有効」と判断された DIF 誘導体について、モデルマウスを用いて、毒性や血糖値に対する作用を検討する。
- ④細胞を DIF 誘導体存在下で in vitro 培養し、細胞を回収、western blot 法等により、細胞内のシグナル伝達系の変化を調べ、DIF の作用機序の解明を行う。
- ⑤もともと DIF-1 は細胞性粘菌の柄細胞分化誘導因子として単離、同定された物質である。そこで、本研究において合成された新規 DIF 誘導体について、粘菌の柄細胞分化誘導活性を検討する。

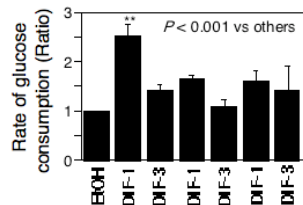
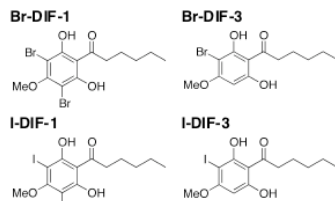
### 4. 研究成果

本研究の主な研究成果を以下に列記する。

- ①我々は、正常細胞に対する DIF-1 (図) の毒性を検討する過程で、DIF-1 が Confluent 状態のマウス 3T3-L1 細胞の糖代謝を促進することを発見し、その作用機序を解析した。



その結果、1) DIF-1 は PI3-kinase を介さない系（すなわち、インスリンとは異なる系）で細胞の糖取込みを促進すること、

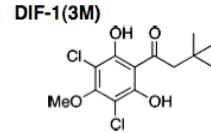


**細胞の糖代謝に対するDIF誘導体の効果**  
Confluent状態の3T3L1細胞を各種DIF誘導体で刺激し、細胞の糖消費量を比較した。DIF-1以外の誘導体は強い抗腫瘍活性を有するにも拘わらず、糖代謝促進活性は小さい。

2) DIF-1 は細胞内の GLUT1 (glucose transporter1) を細胞膜に移動させることによって糖取込みを促進すること等を明らかにした。さらに、3T3-L1 脂肪細

胞においても、DIF-1 が GLUT1 の移動を促進することを見出した。

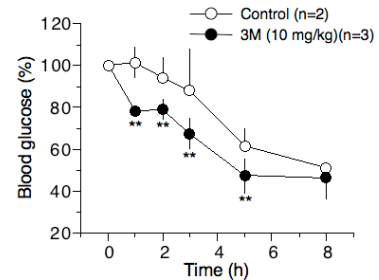
また、各種 DIF 誘導体を用いて(右図は、解析結果の一部)、化学構造-活性相関を解析し、調べた DIF 誘導体の中で DIF-1 の糖代謝促進活性が最も高いこと、DIF 様因子の有する「抗腫瘍活性」と「糖代謝促進活性」は、側鎖修飾によって分離できる可能性があることを示した。



- ②Confluent 状態のマウス 3T3-L1 細胞に対する糖代謝促進活性を指標として、新たにいくつかの DIF 誘導体をスクリーニングした結果、DIF-1 (3M) と命名した化合物 (上図) の活性が DIF-1 よりもやや強いことを見出した。DIF-1 (3M) は 3T3-L1 細胞の増殖にはほとんど影響せず、また DIF-1 (3M) の抗腫瘍活性は DIF-1 よりも小さかったことから、この化合物は副作用の少ない「糖代謝促進剤」「肥満・糖尿病治療薬」として利用できる可能性が示唆された。

そこで、糖尿病モデルマウスである KKay マウスの食後の血糖値変化に対する

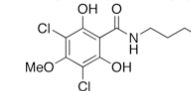
DIF-1 (3M) の効果を検討し、腹腔内に投与した DIF-1 (3M) が食後の血糖値の下降を



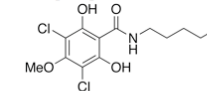
コントロールと比して促進することを示した (グラフ)。

これらの結果は、DIF-1 (3M) あるいはその誘導体が糖尿病や肥満治療薬として臨床応用できる可能性を示唆している。

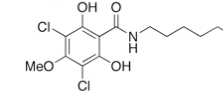
**DIF-1[amide] = DIF-1[A]**



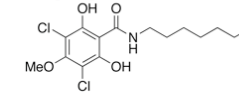
**DIF-1[A+1]**



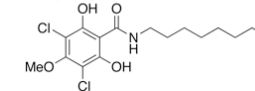
**DIF-1[A+2]**



**DIF-1[A+3]**



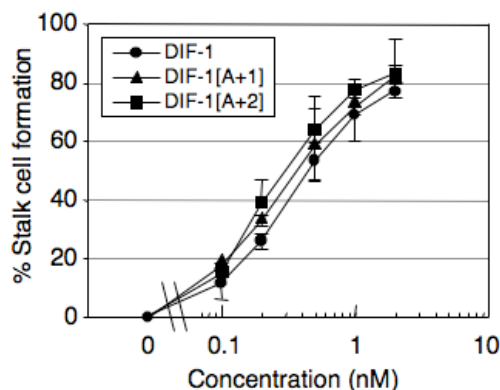
**DIF-1[A+4]**



- ③我々は、DIF-1 のエステル体、アミド体 (右図) を合成し、それら誘導体の生物活性を検討した。その結果、これら誘導体もある程度の薬理活性 (抗腫瘍活性や糖代謝促進活

性)を有することがわかった。

さらに興味深いことに、細胞性粘菌におけるこれら誘導体の柄細胞(Stalk cell)分化誘導活性を比較検討した結果、DIF-1[A+1]とDIF-1[A+2]は、人工物でありながらDIF-1と同程度の分化誘導活性を有することを発見した(下図グラフ)。これらの結果は、DIF-1アミド体が細胞性粘菌の柄細胞分化の機序解明に利用できることを示している。



## 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7件)

- ① Kikuchi H, Hoshi T, Kitayama M, Sekiya M, Katou Y, Ueda K, Kubohara Y, Sato H, Shimazu M, Kurata S, & Oshima Y. Novel diterpene pyrone-type compounds, Metarhizins A and B, isolated from entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* and their structural requirements for inhibiting cellular proliferation. *Tetrahedron*, 65, 469-477. 2009. 査読有
- ② Hosomi O, Misawa Y, Takeya A, Matahira Y, Sugahara K, Kubohara Y, Yamaura F, & Kudo S. Novel oligosaccharide has suppressive activity against human leukemia cell proliferation. *Glycoconjugate J.* 26, 189-198. 2009. 査読有
- ③ Kikuchi H, Ishiko S, Oshima Y, Gonkan N, Hosaka K, & Kubohara Y. Biological activities of novel derivatives of DIF-1 isolated from *Dictyostelium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1012-1017. 2008. 査読有
- ④ Kubohara Y, Kikuchi H, & Oshima Y. Exploitation of the derivatives of *Dictyostelium* differentiation-inducing factor-1, which promote glucose consumption in mammalian cells. *Life Sciences*, 83, 608-612. 2008. 査読有

- ⑤ Kikuchi H, Nakamura K, Kubohara Y, Gokan N, Hosaka K, Maeda Y, & Oshima Y. Dihydrodictyopyrone A and C: New members of dictyopyrone family isolated from *Dictyostelium* cellular slime molds. *Tetrahedron Lett.* 48, 5905-5909. 2007. 査読有

- ⑥ Omata W, Shibata H, Nagasawa M, Kojima I, Kikuchi H, Oshima Y, Hosaka K, & Kubohara Y. *Dictyostelium* differentiation-inducing factor-1 induces glucose transporter 1 translocation and promotes glucose uptake in mammalian cells. *FEBS Journal*, 274, 3392-3404. 2007. 査読有

- ⑦ 久保原禎、細胞性粘菌由来の薬理活性物質DIF-1が示す抗腫瘍作用と糖代謝促進作用、細胞工学、26巻、1052-1053、2007、査読無

[学会発表] (計7件)

- ① Kikuchi H, Ishiko S, Amagai A, Maeda Y, Hosaka K, Kubohara Y, & Oshima Y. Biologically active small molecules produced by cellular slime molds, International *Dictyostelium* conference. 2008. 9. 16, Tsukuba.
- ② Kubohara Y, Kikuchi H, & Oshima Y. Biological activities of DIF-1 derivatives, International *Dictyostelium* conference. 2008. 9. 16, Tsukuba.
- ③ 瀬谷和彦、(他9名)、久保原禎、古川賢一、胚性癌腫細胞(P19.CL6)の心筋細胞への分化におけるBr-DIF-1の役割、日本薬学会第128年会、2008. 3. 27、横浜
- ④ 久保原禎、哺乳類細胞に対するDIF-1の薬理作用、第10回細胞性粘菌研究会、2007. 11. 4、弘前
- ⑤ 久保原禎、小俣和香、柴田宏、小島至、保坂公平、菊地晴久、大島吉輝、哺乳類細胞に対するDIF-1およびその誘導体の糖代謝促進作用、第10回細胞性粘菌研究会、2007. 11. 4、弘前
- ⑥ 久保原禎、小俣和香、柴田宏、小島至、保坂公平、菊地晴久、大島吉輝、哺乳類細胞に対するDIF-1の糖代謝促進作用、第10回細胞性粘菌研究会、2007. 11. 3、弘前
- ⑦ 久保原禎、後閑直美、保坂公平、菊地晴久、大島吉輝、Anti-leukemic activities of *Dictyostelium* secondary metabolites: A novel aromatic metabolite, 4-methyl-5-n-pentylbenzene-1, 3-diol, isolated from *Dictyostelium mucoroides* suppresses cell growth in human leukemia K562 and HL-60 cells. 細胞生物・発生生物合同学会、2007. 5. 30、福岡

[図書] (計1件)

①小島至、久保原禪 (他7名)、ブックレット群馬大学1「群馬に多い病気～生活習慣病を知り、克服する」、上毛新聞社刊、全72頁、2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

①名称: Method of lowering blood glucose and method of preventing or treating blood glucose and method of preventing or treating diabetes and obesity.

発明者: 久保原禪、柴田宏

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 11/923,064

出願年月日: 2007年10月24日

国内外の別: 国外 (米国)

②名称: 新規 DIF-1 誘導体

発明者: 久保原禪

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-25149

出願年月日: 2009年2月5日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molgen/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保原 禪 (KUBOHARA YUZURU)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号: 00221937

### (2) 研究分担者

小島 至 (KOJIMA ITARU)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号: 60143492

保坂 公平 (HOSAKA KOHEI)

群馬大学・医学部・教授

研究者番号: 70108992