

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591090  
 研究課題名 (和文) PPARs 活性化剤が示す膵がん細胞の細胞周期停止機構の解明  
 研究課題名 (英文) Functional analysis of novel PPAR agonist on the growth of pancreatic cancer cells.

研究代表者  
 佐藤 眞友美 (SATO MAYUMI)  
 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
 研究者番号 50124459

研究成果の概要：受容体型転写因子 PPAR のアゴニストは 19 種のがん細胞の増殖を抑制するが、その機構は不明である。この受容体のアゴニストである新規創成化合物 TIPP703 を用いて、PPAR $\gamma$  応答領域を介して増殖抑制に関与する標的分子を探索した。TIPP703 は膵がん細胞の 90 % を G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> 期 (DNA 合成準備期) に留めることで DNA 合成を阻害し細胞の増殖を抑制した。さらにマイクロアレイ法と RNAi 法を用いて、TIPP703 が ANGPTL4 の発現を誘導し、すい癌の増殖を抑制するという新事実を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：核内受容体、PPAR、膵がん、細胞周期、RXR、ANGPTL4、網羅的解析、RNAi

## 1. 研究開始当初の背景

核内受容体 PPAR は受容体型転写因子であり、そのリガンドは乳がん、大腸がん、脂肪肉腫など 19 種類のがんに対して増殖抑制効果を示す事が報告されている。しかし PPAR $\gamma$  レスポンスエレメントを介して増殖抑制に直接的に関与する PPAR $\gamma$  の標的分子は不明であり、増殖抑制機構も未解明である。

新規創製フェニルプロピオン酸化合物が株化したヒト膵がん細胞 (PT-45, 及び Panc-1) を G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> 期 (DNA 合成準備期) に拘束し、S 期 (DNA 合成期) への細胞周期への進行を阻害することをみいだした。特に Panc-1 細胞においては、この化合物の処理で、細胞内に多量の脂肪滴の貯留と増殖停止が観察された。細胞の分化やアポトーシスは G<sub>0</sub> 期で

おこるので、この化合物による膵がん細胞の G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> 期 (DNA 合成準備期) への拘束は、がん細胞の分化誘導療法やアポトーシスによるがん細胞の死滅誘導療法に繋がる有用な機能である。このフェニルプロピオン酸誘導体は、東京大学分子細胞生物学研究所の宮地宏幸博士との共同研究で脂肪細胞の分化誘導能を指標に創製した核内受容体 PPARs (peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha, \beta, \gamma$ ) のリガンドである。脂肪細胞の分化誘導能は既存の II 型糖尿病治療薬の中でも最強の PPAR $\gamma$  リガンドであるロジグリタゾンと同等であったが、膵がん細胞の増殖抑制効果はロジグリタゾンより強く、増殖抑制機能への PPAR $\alpha$  の関与が示唆され

た。新しい構造のフェニルプロピオン酸化合物を3日間処理した膵がん細胞は、90%がG<sub>0</sub>G<sub>1</sub>期(DNA合成準備期)に止まり、増殖停止状態にあり、S期(DNA合成期)への移行が阻害されていた。更にこの時点で枯渇したグルコースや増殖因子を再添加後24時間経過しても、細胞はG<sub>0</sub>G<sub>1</sub>期に止まり分裂を開始しなかった。このような活性は既存のチアゾリジン化合物誘導体には見られなかったため、フェニルプロピオン酸化合物の活性は非常に強いと予想される。(M. Sato et al. 2006年日本癌学会総会記事)。

近年 PPAR $\gamma$ リガンドによる脂肪肉腫、甲状腺がん、乳がん、大腸がんを初めとする19種のがん細胞のin vitroにおける増殖抑制効果が報告されているが、PPAR $\gamma$ リガンドが示す非常に強いインスリン抵抗性改善効果と比較するとそれらが示すがん細胞にたいする増殖抑制効果は弱い。これらの実験結果は、がん細胞の増殖抑制効果を指標にした、新しい構造のPPAR $\gamma$ リガンドの創製の必要性を示しており、我々が創製した新しい構造のフェニルプロピオン酸化合物を駆使して、早急にPPAR $\gamma$ リガンドの標的蛋白を見出す事は、PPARsの新しい機能の発見であると同時に、その成果は制がん剤の開発につながることから非常に重要である。

## 2. 研究の目的

(1) フェニルプロピオン酸化合物を創成し、その中から膵がん細胞に対して増殖抑制効果が高く、かつ低細胞毒性の新規 PPAR アゴニストを選択する事。

(2) この新規創製 PPAR アゴニストを用いて人膵がん細胞への作用機作の解析。

(3) 選択した新規創成 PPAR アゴニストがどのような遺伝子の発現を介して増殖を抑制するか明らかにする。網羅的解析法を駆使して PPAR $\gamma$ レスポンスエレメントを有し、かつ膵がんの増殖抑制に直接的に関与する PPAR $\gamma$ の標的遺伝子の探索と RNAi を用いた検証。

## 3. 研究の方法

(1) PPAR $\gamma$ の既知の機能である脂肪細胞の分化誘導能を指標にして高活性、低細胞毒性の PPAR アゴニストを選択する。

(2) MTT assay にて増殖阻害効果を調べる。

(3) フローサイトメトリーにより TIPPP703 の細胞周期調節作用を解析する。

(4) DNA マイクロアレイ解析により増殖抑制に関与する PPAR の標的遺伝子を同定し、特異的 RNAi を用いて検証する。

## 4. 研究成果

多数のフェニルプロピオン酸化合物の中から高活性、低細胞毒性の新規 PPAR アゴニスト TIPPP703 を見いだした。TIPPP703 は PPAR $\alpha\beta\gamma$  を活性化する特徴を有していた。この TIPPP703 は未分化膵がん細胞を G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> (DNA 合成準備期)にとどめる事で増殖を阻害する事を見いだした。TIPPP703 を作用させた膵がん細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、ANGPTL4 (angiopoietinlike 4) が特異的に発現誘導されることを見いだした。ANGPTL4 特異的 RNAi を細胞にトランスフェクトすると TIPPP703 による増殖抑制効果が解除された。これらの実験結果より、TIPPP703 による増殖抑制効果が ANGPTL4 の発現を介している事を見いだした。

## 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 6 件)

- ①Kunimasa, K., Kuranuki, S., Matsuura, N., Ikeda, M., Ito, A., Sashida, Y., Mimaki, Y., Yano, M., Sato, M., Igarashi, Y., Oikawa, T.  
Identification of nobiletin, a polymethoxy flavonoid, as an enhancer of adiponectin secretion. Bioorg. Med. Chem. Lett., 19, 2062-2064 (2009) (査読有)
- ②Kasuga J, Yamasaki D, Ogura K, Shimizu M, Sato M, Makishima M, Doi T, Hashimoto Y, Miyachi H. SAR-oriented discovery of peroxisome proliferator-activated receptor pan agonist with a 4-adamantylphenyl group as a hydrophobic tail. Bioorg Med Chem Lett. 18, 1110-1115 (2008) (査読有)
- ③矢島由起子, 佐藤眞友美: 脂肪細胞の分化におけるカルパインの役割. 生体の科学, 59, 181-188, (2008) (査読有)
- ④Akiko Saito, Akira Sugawara, Akira Uruno, Masataka Kudo, Hiroyuki Kagechika, Yasufumi Sato, Yuji Owada, Hisatake Kondo, Mayumi Sato, Masahiko Kurabayashi, Masue Imaizumi, Shigeru Tsuchiya and Sadayoshi Ito. All-trans retinoic acid induces in vitro angiogenesis via retinoic acid receptor: possible involvement of paracrine effects of endogenous vascular endothelial growth factor signaling. Endocrinology 148 1412-1423 (2007) (査読有)
- ⑤Lee S, Shinji C, Ogura K, Shimizu M, Maeda

S, Sato M, Yoshida M, Hashimoto Y, and Miyachi H. Design, synthesis, and evaluation of isoindolinone-hydroxamic acid derivatives as histone deacetylase (HDAC) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 17, 4895-4900 (2007) (査読有)

- ⑥ T. Oikawa, C. Onozawa, Kuranuki, Y. M. Sato, H. Ashino, M. Toi and S. Kurakata. Dipalmitoylation of radicicol results in improved efficacy against tumor growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Science* 98, 219-225 (2007) (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 佐藤眞友美, 矢島由起子, 小倉潔, 西藤泰昌, 宮地弘幸: 新規 PPARs リガンドによる膵がん細胞の細胞周期停止機構の解明. 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 2008. 5. 16-5. 18, 青森.
- ② 浪川愛子, 倉貫早智, 佐藤眞友美, 安住美亜, 五十嵐康弘, 及川勉, 糸状菌が産生する dechloro- griseofulvin によるアディポネクチン発現促進作用. 日本薬学会第 128 年会, 2008. 3. 26-28, 横浜
- ③ Miyachi, H., Kasuga, J., Ohyama, T., Sato, M., Mokishima, M., Doi, T., Morikawa, K., Hashimoto, Y.,: Design, stereo-controlled synthesis and evaluation of optically active substituted phenylpropanoic acid-based peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) pan agonists. Symposium on Molecular Chirality 2008, 2008. 5. 22-23, Okayama.
- ④ Sato, M., Yajima Y., Ogura, K., Shimizu, M., Miyachi H.,: TIPP-703, A peroxisome proliferator-activated receptor pan agonist, induces a G1-phase arrest in human pancreatic carcinoma cell lines. 33rd FEBS Congress - 11th IUBMB Conference "Biochemistry of Cell Regulation" 2008. 6. 28-7. 3, Greece.
- ⑤ Ogura, K., Kawashima, I., Sato, M., Shimizu, M.: Effects of Hgs on metastasis ability of mouse melanoma B16 cells. The 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, 2008. 6. 27-7. 3, Athens (Greece).
- ⑥ Miyachi H., Kasuga, K., Sato, M., Makishima M., Doi, T., Morikawa, K., Hashimoto, Y., SAR-oriented discovery of substituted phenyl propan-oic

acid-based PPAR pan agonists as candidate antipancreatic cancer agents. International Symposium CBI 2008. 10. 22-24, Tokyo.

- ⑦ Sato, M., Yajima Y., Ogura, K., Shimizu, M., Nishito, Y., Miyachi H.,: A novel PPAR alpha/beta/gamma-pan agonist inhibits cell growth in human pancreatic cancer cell lines. 67th Annual Meeting of the Japanese cancer association. 2008. 10. 28-30, Nagoya.
- ⑧ Ogura, K., Kawashima, I., Ishikawa, Y-I., Sato, M., Shimizu, M.: Comprehensive gene expression analysis of melanoma B16 cells that Hgs expression level changed metastasis activity. The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008. 10. 28-30, Nagoya.
- ⑨ Shimizu, M., Sato, M., Ogura, K., Nishito, Y., Takeda, Y., Mizuguchi, J, Yoshimoto, T.: Analysis of antitumor activity of IL-2. The 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2008. 10. 28-30, Nagoya.
- ⑩ Sato, M., Yajima Y, Ogura K., Shimizu, M. Nishito Y., Miyachi H., A novel PPAR alpha/beta/gamma-pan agonist inhibits cell growth in human pancreatic cancer cell lines. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2007. 10. 3-5, Yokohama.
- ⑪ 佐藤眞友美, 小倉潔, 矢島由起子, 国政和宏, 太田敏郎, 宮地弘幸: PPAR  $\alpha$   $\gamma$  デュアルリガンドによる膵がん細胞の細胞周期調節作用. 第 80 回日本内分泌学術集会, 2007. 6. 14-16, 東京.
- ⑫ Sato, M., Ogura, K., Shimizu, M., Kunimasa, K., Ohta, T., Kaji, K., Miyachi, H.: Novel PPAR  $\alpha$ ,  $\gamma$  dual agonists induce a G1-phase arrest in pancreatic cancer cells. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2007. 10. 3-5, Yokohama.
- ⑬ Ogura, K., Horiguchi, S., Sato, M., Shimizu, M.: Effects of RNA interference of GEF-1/Hgs on metastasis of mouse melanoma B16 cells. The 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2007. 10. 3-5, Yokohama.
- ⑭ Shimizu, M., Sato, M., Ogura, K., Takeda, Y., Mizuguchi, J, Yoshimoto, T.: Role of macrophages and neutrophils in antitumor activity of Fas ligand

(CD95L)-expressing tumor. The 66th  
Annual Meeting of the Japanese  
Cancer Association,  
2007. 10. 3-5, Yokohama

- ⑮宮地弘幸, 春日淳一, 佐藤眞友美, 槇島誠,  
土井健史, 橋本祐一: 構造活性相関に基づ  
いた PPAR パンアゴニストのピンポイント  
創製とその抗腫がん活性. 第 26 回 メディ  
シナルケミストリーシンポジウム,  
2007. 11. 28. -30, 相模原

[その他]

ホームページ

<http://www.rinshoken.or.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 眞友美 (SATO MAYUMI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨  
床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号 50124459

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

及川 勉 (OIKAWA TUTOMU)

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・  
教授

研究者番号 40120141