

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07139

研究課題名(和文)細胞性粘菌由来の生物活性物質をリードとした創薬～新規抗がん剤と抗菌薬の開発～

研究課題名(英文) Drug development using biologically active substances derived from *D. discoideum* as seeds

研究代表者

久保原 禪 (Kubohara, Yuzuru)

順天堂大学・大学院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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞性粘菌の一種 *Dictyostelium discoideum* (和名：キイロタマホコリカビ) から発見されたDIF-1とその誘導体(DIFs)は抗腫瘍活性と抗菌活性を有する低分子化合物である。本研究において我々は、DIFsをリードとした新規抗がん剤と抗菌剤の開発と、DIFsの作用機序解析を進めた。その結果、いくつかのDIFsが乳がん細胞の増殖と遊走を阻害すること、いくつかのDIFsが乳がん細胞におけるPD-L1の糖鎖修飾を阻害すること、いくつかのDIFsが多剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)などのグラム陽性菌の生育を強力に阻害すること等を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の死因トップ1はがんであり、がん対策は喫緊の課題となっている。また、かつては減少傾向にあった肺炎が近年の死因トップ3にランクインしている。一方、ペニシリンの発見以降、真菌類や放線菌等の微生物は「創薬資源」として人類に貢献してきたが、既存薬に耐性を有する細菌やがん細胞が出現し大きな社会問題となっており、新たな薬剤の開発に加え、新たな創薬資源の探索・開発も重要な課題になっている。このような状況下において、我々の研究の学術的・社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：DIF-1, isolated from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*, and its derivatives (DIFs) are low-molecular-weight compounds that possess antitumor and antibacterial activities. In this study, we tried to develop new anticancer drugs and antibacterial agents using DIFs as leads, and proceeded to analyze the mechanisms of actions of DIFs. We found that (1) some DIFs inhibit the proliferation and migration of breast cancer cells, (2) some DIFs inhibit glycosylation of PD-L1 in breast cancer cells, and (3) some DIFs strongly inhibit the growth of Gram-positive bacteria such as multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE).

研究分野：細胞生物学、発生生物学

キーワード：細胞性粘菌 DIF 抗がん剤 抗菌薬 マラリア 糖尿病 創薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

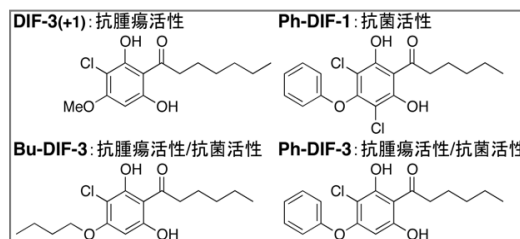
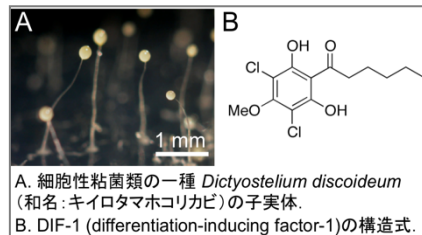
### 1. 研究開始当初の背景

我が国の死因トップ1はがんであり、がん対策は喫緊の課題となっている。また、かつては減少傾向にあった肺炎が近年の死因トップ3にランクインしているが、かねてより薬剤耐性菌が引き起こす感染症が人類にとって大きな脅威となっている。当然、これらの疾病治療を目的とした創薬に対する社会的ニーズは極めて高く、新規な創薬シーズの発見・開発が学術的な課題となっている。

細胞性粘菌の一種 *D. discoideum*: (図A:以下「粘菌」) は「モデル生物」として世界中で研究されてきたが、近年我々は細胞性粘菌類を「未利用創薬資源」と位置づけ、各種粘菌由来の生物活性物質(低分子化合物)の単離・同定と、それらをシードとした創薬研究を進めている。

DIF-1 (図B)は、粘菌の柄(え)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・同定された化合物だが(文献①)、後に我々は、DIF-1が抗腫瘍活性を有することを発見した(文献②)。

さらに我々は、約30種類のDIF誘導体を合成し、化学構造-活性相関を詳細に検討した(右下図: DIF誘導体の生物活性検討結果の一部)。その結果、DIF-3(+1)やBu-DIF-3等の誘導体ももっとも強力な抗腫瘍活性を有することが明らかとなった(文献③-⑨, 他)。さらに、近年我々は、Ph-DIF-1やPh-DIF-3等の誘導体が *in vitro* で強力な抗菌活性を有すること、また、それら誘導体がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)に対しても強力な抗菌作用を発揮することを発見した(特許申請中)。



<参考文献>

- Morris HR, Taylor GW, Masento MS, Jermyn KA, & Kay RR. *Nature* 328, 811-814. (1987).
- Asahi K, Sakurai A, Takahashi N, Kubohara Y, Okamoto K, & Tanaka Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 1036-1039. (1995).
- Kubohara Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 418-422. (1997).
- Kubohara Y. *Eur. J. Pharmacol.* 381, 57-62. (1999).
- Kanai M, Konda Y, Nakajima T, Izumi Y, Nanakin A, Kanda N, Kubohara Y, & Chiba T. *Oncogene* 22, 548-554. (2003).
- Shimizu K, Murata T, Tagawa T, Takahashi K, Ishikawa R, Abe Y, Hosaka K, & Kubohara Y. *Cancer Res.* 64, 2568-2571. (2004).
- Gokan N, Kikuchi H, Nakamura K, Oshima Y, Hosaka K, & Kubohara Y. *Biochem. Pharmacol.* 70, 676-685. (2005).
- 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).
- Oladimeji P, Kubohara Y, Kikuchi H, Oshima Y, Rusch C, Skerl R, & Diakonova M. *Int. J. Cancer Clin. Res.* 2, 1-6. (2015).

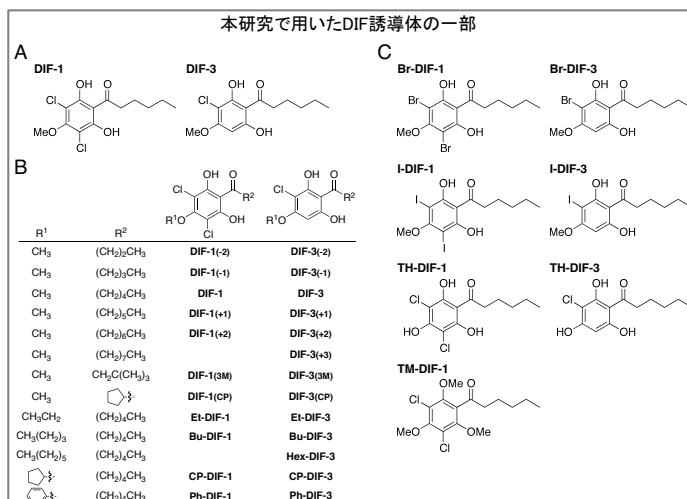
### 2. 研究の目的

本研究の目的は、DIF-1をリード化合物としたまったく新しいタイプの(1)抗がん剤(増殖と浸潤・転移の両者を阻害する薬剤)と(2)抗菌薬(既存薬剤耐性菌も駆逐する薬剤)の開発、並びに(3)それら薬剤の作用機序解析を進めることにある。また、これらの目的達成に寄与すべく、(4)DIF誘導体の有する様々な生物活性に関する研究も進めた。

### 3. 研究の方法

#### (1)DIF誘導体の化学合成

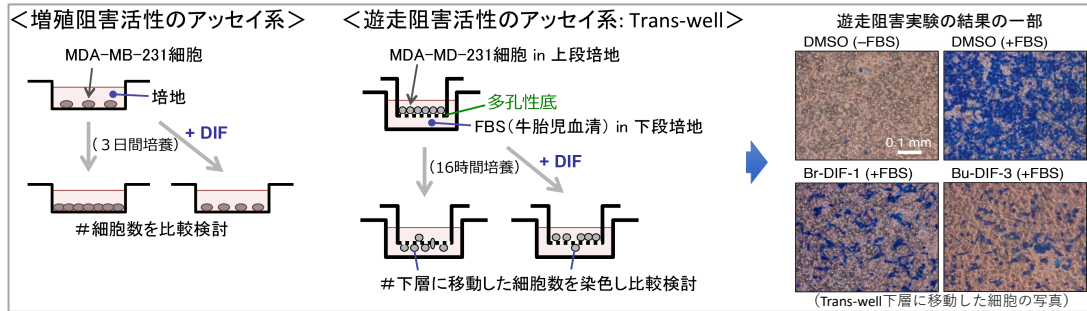
- 我々の先行論文[Gokan et al. 2005]に記載のごとく、各種DIF誘導体を合成した(右図)。
- また、2019年に発表した論文に記載のごとく、ハロゲン置換DIF誘導体を合成した[Kubohara et al. 2019]。



## (2) DIF の抗腫瘍作用の解析

### DIFs の増殖抑制作用の解析 (下図)

- ①ヒトトリプルネガティブ乳がんのモデルである MDA-MB-231 細胞をプラスチックディッシュ中で、DIF 存在下/非存在下で 3 日間培養した。
- ②細胞数を比較検討することで、DIF の増殖抑制活性を算定した。



### DIF の遊走阻害作用の解析 (上図)

- ① MDA-MB-231 細胞をトランスウェル中で、DIF 存在/非存在下 (以後「±DIF」と表記) で 16 時間培養した (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)。
- ②下段に遊走した細胞を染色し、遊走細胞数を比較検討することで、DIF の遊走阻害活性を算定した。

### PD-L1 発現と糖鎖修飾に対する DIF の作用解析

- ①MDA-MB-231 細胞を ±DIF で適当な培養した。
- ②細胞を回収し、Real time PCR 法で PD-L1 mRNA, PD-L2 mRNA, Cyclin D1 mRNA, GAPDH mRNA などの発現量を検討した。
- ③細胞を回収し、Western blot 法によって、PD-L1, PD-L2, Cyclin D1, GAPDH などのタンパク質発現量と糖鎖修飾状態を検討した。

### DIF の作用機序解析: Western blot 法他

- ①各種腫瘍細胞を ±DIF で in vitro 培養し、タンパク質と RNA を回収した。
- ②回収したタンパク質や RNA を用いて、増殖や遊走 (転移) に関わるシグナル伝達関連タンパク質等の発現や活性変化を、Western blot 法、Real-time PCR 法、あるいは DNA micro-array 等を利用して解析した。
- ③得られた結果を基に、RNAi 法、各種酵素阻害剤を利用して ±DIF での培養細胞中のシグナル伝達関連分子等の発現や活性変化を同様に解析した。

## (3) DIF の抗菌作用の解析

### DIF の MIC (Minimum inhibitory concentration: 最小発育阻止濃度) の検討

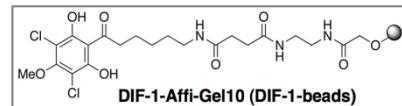
- ・各種細菌株を ±DIF (新たに合成した DIF 誘導体) で一晩 in vitro 培養後、MIC を算定した。

### 電子顕微鏡観察

- ・細菌 (*Staphylococcus aureus* or *Enterococcus faecalis* 他) を ±DIF で数時間培養後、細胞を固定し、一連の操作を経て、細菌細胞切片を電子顕微鏡で観察した。

### DIF の標的分子 (DIF-binding proteins: DBPs) の同定 (進行中)

- ①各種腫瘍細胞あるいは細菌から適当な detergent 溶液でタンパク質を抽出し、DIF-1-beads (右図) を利用して、DBPs を部分精製する。
- ②部分精製サンプルを 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。さらに、
- ③同定した DBPs を Knock down あるいは Knock out した細胞の性状解析を行ない、それら DBPs が本当に DIF の作用を媒介する標的分子であるかどうかを検討する。



## 4. 研究成果

### (1) DIF の抗腫瘍作用の解析

#### DIF の増殖抑制作用と遊走阻害作用の解析 [Totsuka et al. 2019]

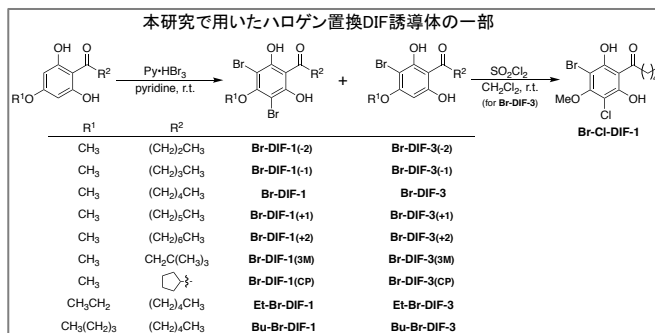
ヒトトリプルネガティブ乳がんは、高転移性で悪性度が高い。我々は、ヒトトリプルネガティブ乳がんのモデル MDA-MB-231 細胞に対する各種 DIF 誘導体 (約 25 種類) の抗腫瘍活性を in vitro で検討した。その結果、いくつかの DIF 誘導体が細胞の増殖と遊走を強力に阻害するこ

とを見出した。さらに DIF の塩素を臭素に置換した誘導体を 18 種類作製し (下図)、それらの抗腫瘍活性を検討した結果、強力な増殖抑制活性と遊走阻害活性を有する誘導体を見出した。

これらの結果は、乳がん細胞の増殖と浸潤・転移の両者を DIF 誘導体が阻害できる可能性を示唆している。

### PD-L1 の糖鎖修飾に対する DIF の効果 [Hirayama et al., 2023]

悪性度の高いがん細胞はしばしば Programmed death-ligand 1 (PD-L1) を発現しており、免疫細胞からの攻撃を逃れることができる。PD-L1 発現の阻害剤は「がん免疫療法」に臨床応用できる可能性がある。ヒトトリプルネガティブ乳がん MDA-MB-231 細胞は PD-L1 を発現しているため、我々は、この細胞の PD-L1 発現に対する DIF 誘導体の効果を検討した。その結果、ある種の DIF 誘導体が PD-L1 タンパク質の糖鎖修飾を抑制することを見出した。PD-L1 が機能するためには糖鎖修飾を受けることが重要であり、我々の結果は、DIF 誘導体がん免疫療法に利用できる可能性を示唆している。



### (2) DIF の抗菌作用の解析と新たな誘導体の開発 DIF の抗菌作用の解析 [Kubohara et al., 2019]

これまでの研究成果から、DIF 誘導体が様々な生物活性を有することが判明している。今回我々は DIF 誘導体の抗菌活性について検討した。その結果、いくつかの DIF 誘導体が黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA、腸球菌、バンコマイシン耐性腸球菌 VRE などのグラム陽性菌に対する強力な抗菌活性を有することを発見した (表 1)。さらに、Ph-DIF-1 と Bu-DIF-3 存在下で培養した MRSA では特徴的 (異常) な膜構造が形成されることを見出した (右写真)。

これらの結果は、DIF 誘導体が抗菌剤として臨床応用できる可能性を示唆している。現在我々は、DIF の標的分子の同定と、より有効な DIF 誘導体の開発を進めている。

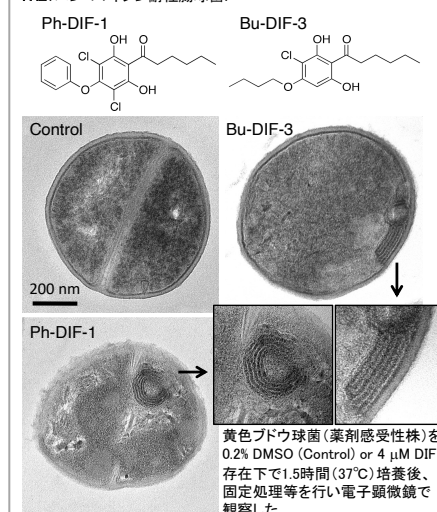
### 水溶性 DIF 誘導体の抗菌活性 [進行中]

既存の DIF 誘導体は、5%アルブミン存在下で抗菌活性が消失することが判明した。このことは、DIF がアルブミンに吸着したことが原因と思われた。そこで我々は、水溶性を高めたいくつかの DIF 誘導体を合成し、抗菌活性の検討を行っている。

表 1. DIF 誘導体とバンコマイシンの最小発育阻止濃度(MIC)

化合物	黄色ブドウ球菌	MRSA	腸球菌	VRE
DIF-1	12.5 (μM)	12.5	25	50
Ph-DIF-1	1.56	1.56	3.13	3.13
Bu-DIF-3	0.78	0.39	1.56	1.56
バンコマイシン	0.69	1.38	2.76	>88

上記菌株を各種 DIF 誘導体存在下で一晩(37°C)培養後、最小発育阻止濃度 (MIC) を算定した。MRSA: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌。VRE: バンコマイシン耐性腸球菌。



### (3) DIF の有する様々な生物活性の研究

これまでに我々は、DIF 誘導体が様々な生物活性を有することを発見してきた。DIF の有する生物活性の探索や DIF の作用機序を明らかにすることは、DIF の抗腫瘍作用や抗菌作用の機序解析にも役立つ可能性が高い。そこで、以下の研究を進めた。

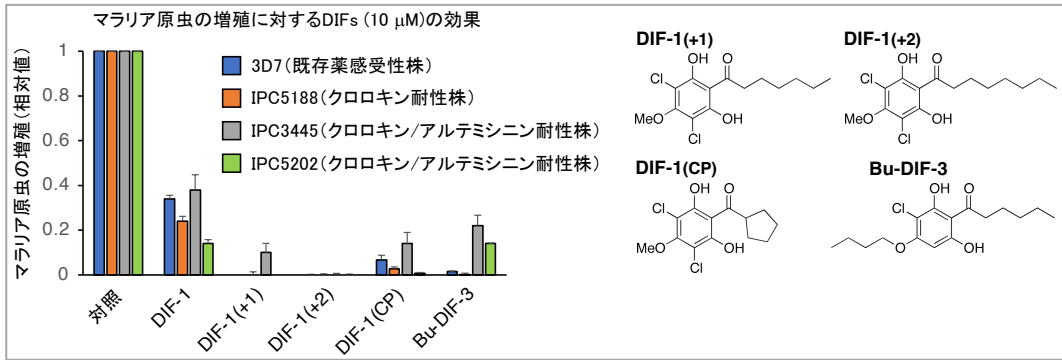
### DIF-1 の糖代謝促進作用の研究 [Kubohara et al., 2021]

我々は、DIF-1 が哺乳類細胞の糖代謝 (糖取り込み) を促進する活性を有することを報告してきた (Omata et al., FEBS J. 2007; Kubohara et al., Life Sci. 2008)。本研究において我々は、DIF-1 が少なくとも一部 AMP kinase を活性化することによってマウス 3T3-L1 細胞の糖取り込みを促進することを見出した。一連の成果は、DIF-1 が肥満や糖尿病治療薬開発のためのリード化合物として利用できる可能性を示唆している。

### DIF の抗マラリア作用の研究 [Mita et al., 2021]

マラリアは世界三大感染症の 1 つであり、毎年多くの感染者と死亡者を出している人類の脅威である。本研究では、ヒト熱帯熱マラリア *Plasmodium falciparum* (4 つの株) の増殖に対する 41 種類の DIF 誘導体の効果を *in vitro* で検討し、いくつかの DIF 誘導体が強力な抗マラリア活性を有することを見出した [特許申請中]。その中で最も有望な化合物 DIF-1(+2) は既存マラリア治療薬であるアルテミシニン耐性株とクロロキン耐性株に対しても強力な増殖抑制作用を示した (次頁図)。また、マウス腹腔内投与した DIF-1(+2) は、マウスに感染させた齧歯類熱帯熱マラリア *Plasmodium berghei* の増殖を有意に抑制し、マウスの生存率を上げた。

これらの結果は、DIF が抗マalaria薬として臨床応用できる可能性を示唆している。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mita Toshihiro, Hirai Makoto, Maki Yoshiko, Nahar Saifun, Yoshida Naoko, Oshima Yoshiteru, Kikuchi Haruhisa, Kubohara Yuzuru	4. 巻 194
2. 論文標題 Derivatives of Dictyostelium differentiation-inducing factors suppress the growth of Plasmodium parasites in vitro and in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114834 ~ 114834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2021.114834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki Hitomi, Kubohara Yuzuru, Ishigaki Hirotsuka, Takahashi Katsunori, Eguchi Hiromi, Sugawara Akihiro, Oshima Yoshiteru, Kikuchi Haruhisa	4. 巻 25
2. 論文標題 Two New Terpenes Isolated from Dictyostelium Cellular Slime Molds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2895 ~ 2895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25122895	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kubohara Yuzuru, Homma Yoshimi, Shibata Hiroshi, Oshima Yoshiteru, Kikuchi Haruhisa	4. 巻 22
2. 論文標題 Dictyostelium Differentiation-Inducing Factor-1 Promotes Glucose Uptake, at Least in Part, via an AMPK-Dependent Pathway in Mouse 3T3-L1 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2293 ~ 2293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kubohara Y, Shiratsuchi Y, Ishigaki H, Takahashi K, Oshima Y, & Kikuchi H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Antimicrobial activities of Dictyostelium differentiation-inducing factors and their derivatives.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom9050163.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Totsuka K, Makioka Y, Iizumi K, Takahashi K, Oshima Y, Kikuchi H, & Kubohara Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Halogen-substituted derivatives of Dictyostelium differentiation-inducing factor-1 suppress serum-induced cell migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom9070256.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 HIRAYAMA AIRI, ISHIGAKI HIROTAKA, TAKAHASHI KATSUNORI, MIURA YUSUKE, KIKUCHI HARUHISA, KUBOHARA YUZURU	4. 巻 69
2. 論文標題 Dictyostelium Differentiation-inducing Factor Derivatives Reduce the Glycosylation of PD-L1 in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Juntendo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 105 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14789/jmj.JMJ22-0039-OA	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 久保原禪, 本間好, 大島吉輝, 菊地晴久
2. 発表標題 DIF-1による糖代謝促進作用とAMP kinase
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保原禪, 戸塚響子, 牧岡優佳, 飯泉恭一, 大島吉輝, 菊地晴久
2. 発表標題 ハロゲン置換した DIF 誘導体の抗腫瘍作用
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保原禪, 白土佳子, 石垣宏尚, 高橋克典, 大島吉輝, 菊地晴久
2. 発表標題 DIF誘導体の有する抗菌活性
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田龍, 矢野敏史, 山越正汰, 菊地晴久, 久保原禪, 原太一
2. 発表標題 オートファジー制御における細胞性粘菌由来の生物活性物質DIF-1とその誘導体の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田龍, 矢野敏史, 山越正汰, 菊地晴久, 久保原禪, 原太一
2. 発表標題 細胞性粘菌由来の生物活性物質DIF-1とその誘導体によるタンパク質代謝制御機構の解析
3. 学会等名 日本栄養食糧学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 美田敏弘, 平井誠, 吉田菜穂子, 菊地晴久, 久保原禪
2. 発表標題 DIF誘導体が熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害する
3. 学会等名 日本細胞性粘菌学会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Fukunaga Y, Nakanishi K, Sugita H, Kubohara Y.
2. 発表標題 DIF-1 promotes glucose uptake in mouse C2C12 myotube cells
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田菜穂子、平井誠、菊地晴久、久保原禪、美田敏宏
2. 発表標題 細胞性粘菌 (Dictyostelium discoideum) 柄細胞分化誘導因子を用いた新規誘導体の抗マalaria活性
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マalaria予防治療薬	発明者 美田敏宏、久保原 禪、菊地晴久、大島 吉輝	権利者 学校法人 順天堂
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-055575	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>順天堂大学スポーツ健康科学部健康学科健康生命科学研究室HP  <a href="http://square.umin.ac.jp/jun_health_LS/index.html">http://square.umin.ac.jp/jun_health_LS/index.html</a></p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菊地 晴久  (Haruhisa Kikuchi)  (90302166)	東北大学・薬学研究科・准教授    (11301)	
研究分担者	原 太一  (Taichi Hara)  (00392374)	早稲田大学・人間科学学術院・教授    (32689)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関