

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07292

研究課題名(和文)細胞性粘菌分化誘導因子DIF-1のがん転移抑制機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of suppressing cancer metastasis by differentiation-inducing factor 1

研究代表者

有岡 将基 (Arioka, Masaki)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：20733554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：循環腫瘍細胞の血管への接着に着目し、細胞性粘菌分化誘導因子-1(DIF-1)の抗転移作用のメカニズムの解明を試みた。がん細胞を接種前みのDIF-1胃内投与で、マウス肺転移モデルの肺コロニー形成が抑制された。DIF-1はがん細胞のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)への接着を有意に阻害した。DIF-1はがん細胞の接着関連タンパク質の発現量には影響しなかったが、mTORC1-p70 S6キナーゼシグナル抑制を介したタンパク質翻訳の抑制により、HUVECの血管細胞接着分子-1(VCAM-1)の発現量を有意に低下させた。DIF-1は、抗転移性を有する抗がん剤開発のためのリード化合物として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術療法はがん治療の有効な手段であるが、手術によって転移が引き起こされるリスクが懸念されている。DIF-1が脈管内に侵入した循環腫瘍細胞の活性を抑制し、血管内皮細胞への接着を抑制することで、がん転移を防ぐことができれば、周術期のがん標準治療を改革しうる。従来の抗腫瘍薬は、細胞を殺すことで作用するため、有害反応が起こる可能性が高いが、DIF-1は正常細胞に対する影響が少なく、有害反応が少ない化合物であるため、体力が落ちた患者にとっても使用できる有用な治療薬となりうる。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) exhibits anti-cancer effects in various mammalian cancer cells. In the present study, we tried to identify the mechanism of the anti-metastatic effect of DIF-1 by focusing on the circulating tumor cell adhesion to blood vessels. We found that intragastric administration of DIF-1 prior to cancer cell inoculation via tail vein suppressed lung colony formation in murine pulmonary metastasis model and that DIF-1 significantly inhibited adhesion of cancer cells to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Although DIF-1 did not affect the expression levels of adhesion related proteins on the cancer cells, DIF-1 significantly decreased the expression levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) on HUVECs by suppression of protein translation via repression of mTORC1-p70 S6 kinase signaling. DIF-1 is expected to be a lead compound for the development of anti-cancer drugs.

研究分野：薬理学、腫瘍学

キーワード：細胞接着 DIF-1 mTORC1 転移 VCAM-1 S6K

## 1. 研究開始当初の背景

がんの転移は、がん患者さんの予後を著しく悪化させる。がん死亡の 90%以上が転移によるものだ。転移は、局所的な手術や放射線治療で治ることが多い原発性腫瘍とは異なり、全身に及ぶ疾患である。そのため、化学療法、標的療法、免疫療法などの全身的なアプローチが、転移の予防と治療の主軸となっている。がん死亡率を改善するがん治療法が開発されてきたにもかかわらず、あらゆる種類の転移性がん患者の大多数は、診断から 5 年以内に死亡している。したがって、転移を予防もしくは治療することは、依然として課題となっている。現在、転移患者の予後を改善する有効な手段はほとんどなく、新規の治療薬が早急に求められている。

細胞性粘菌分化誘導因子 (Differentiation-inducing factors: DIF) は、*Dictyostelium discoideum* で同定された低分子化合物で、細胞性粘菌を移動体から柄細胞へと分化誘導する。興味深いことに、DIF の作用は粘菌だけにとどまらず、DIF (特に DIF-1 と DIF-3) は、毒性反応を伴わずに *in vitro* での様々な哺乳類がん細胞の細胞増殖と *in vivo* でのがん増殖を共に強く抑制する。さらに、DIF-1 は悪性黒色腫細胞による *in vitro* の細胞運動 (遊走・浸潤) や *in vivo* の肺コロニー形成も阻害することが報告されている。したがって、DIF は腫瘍の増殖や転移を抑制することができる抗がん剤として期待されている。

## 2. 研究の目的

肺への転移形成のステップでは、脈管内で循環する腫瘍細胞が毛細血管内皮細胞に接着し、肺実質に浸潤し、その中で増殖する。私たちの以前の報告では、DIF-1 が抗増殖および抗浸潤作用を示し、DIF-1 を繰り返し経口投与すると、メラノーマ細胞を尾静脈に接種したマウス肺転移モデルにおいて肺コロニー形成が著しく減少することが示されている。しかし、この実験モデルにおける転移性肺コロニー形成は、浸潤や増殖だけでなく、血管への接着も影響している。DIF-1 を繰り返し経口投与すると、腫瘍サイズだけでなく数も減少していたことから、DIF-1 は接着に影響を与えている可能性が示唆された。

本研究では、循環腫瘍細胞と血管内皮細胞との接着に対する DIF-1 の効果を 3 つの観点から検討した。第一に、メラノーマ細胞接種前の DIF-1 の経口投与が肺転移に及ぼす影響を、*in vivo* マウスモデルで評価した。第二に、がん細胞と血管内皮細胞との接着に対する DIF-1 の効果を明らかにした。第三に、DIF-1 による接着阻害の分子機構を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) DIF-1 の転移への効果を検討 (*in vivo*):

マウスの尾静脈から悪性黒色腫細胞株 B16BL6 を接種し、肺にコロニーを形成する転移モデルを用いた。Control 群、DIF 群、リポポリサッカライド (LPS) 群、LPS+DIF 群の 4 群を設定した。腫瘍細胞が肺の毛細血管にとどまる期間で、DIF の増殖抑制効果を反映させないために、DIF-1 の経口投与は、腫瘍細胞接種前の 3 日間のみとした。LPS は接種前の二日間、腹腔内投与した。2 週間後に肺を摘出し評価した (研究成果①の A を参照)。

### (2) DIF-1 の癌細胞と血管内皮細胞の接着に及ぼす影響の検討 (*in vitro*, 細胞接着実験):

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を 96 ウェルプレートに播種した。24 時間後、HUVEC を PBS で洗浄し、改良型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現する癌細胞 (メラノーマ細胞株の B16BL6 と A2058、大腸癌細胞株の HCT116) を、 $1 \times 10^5$  細胞/ウェルの密度で、DIF-1 もしくは LPS と共に 37°C で 6 時間培養した。ウェルを PBS で 3 回注意深く洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (PFA) で 30 分間固定し、PBS で洗浄した。HUVEC に付着した GFP 発現癌細胞を顕微鏡で撮影し、接着細胞数を定量評価した。

### (3) DIF-1 が血管内皮細胞における VCAM-1 発現に及ぼす影響の検討 (*in vitro*):

HUVEC を DIF-1 もしくは LPS と共に 37°C で 6 時間培養して、血管内皮細胞表面に発現している接着因子の VCAM-1 の発現を、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー、蛍光免疫染色を用いて評価した。

### (4) DIF-1 の VCAM-1 タンパク質発現の減少機序の検討 (*in vitro*):

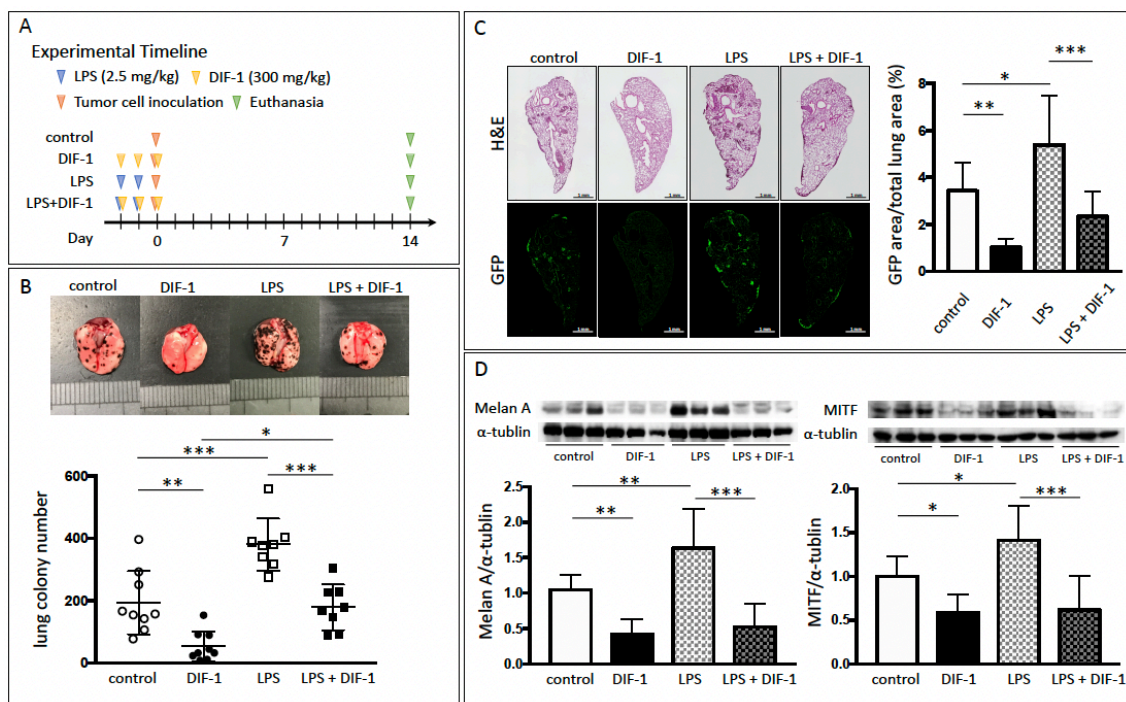
タンパク質合成・分解の各ステップの阻害剤を用いて解明を試みた。転写抑制には Actinomycin D (AcD) を、タンパク質翻訳には Cycloheximide (CHX) を、タンパク質分解には MG132 を使用した。LPS で 3h 前処理を行った後、AcD, CHX, MG132 で 30 分処理した後に、DIF-1 を 3h 投与し、ウェスタンブロット法で VCAM-1 の発現を評価した。

タンパク質翻訳に重要な、p70S6K に対する DIF-1 の影響もウエスタンブロット法を用いて評価した。

- (5) DIF-1 の VCAM-1 タンパク質発現減少が mTORC1 を介しているかの検討 (*in vitro*) : DIF-1 の VCAM-1 発現減少がこの mTORC1 経路に依存しているかどうかを、mTORC1 の ATP 競合阻害剤である Torin2 と AZD8055 を用いることで検討した。

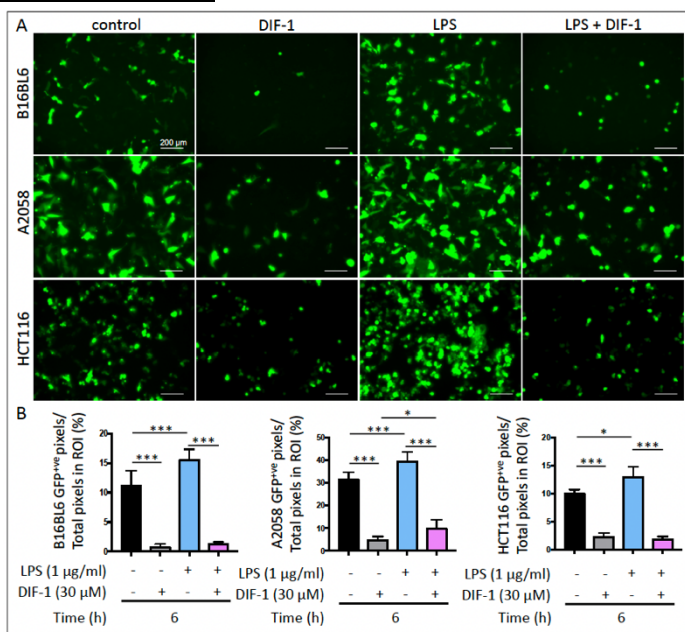
#### 4. 研究成果

- (1) DIF-1 の癌細胞接種前の経口投与は肺コロニー形成を抑制する  
DIF-1 の腫瘍接種前の経口投与は顕著に肺コロニー形成を抑制していた。LPS 投与で、肺コロニー数が増加したが、これも DIF-1 は抑制することがわかった。GFP 発現量およびメラノーマ細胞のマーカーである Melan A と MITF の発現レベルについても同様の結果が得られた。

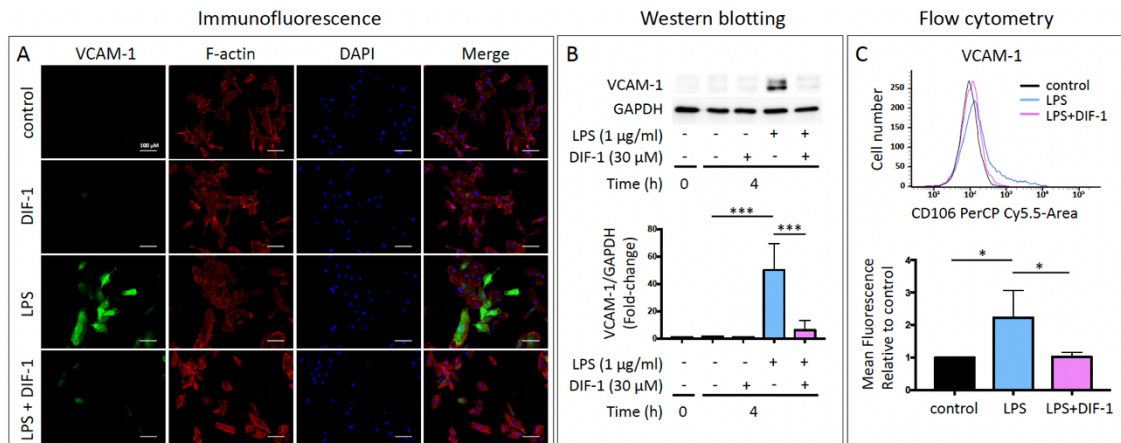


- (2) DIF-1 は癌細胞と血管内皮細胞の接着を阻害する

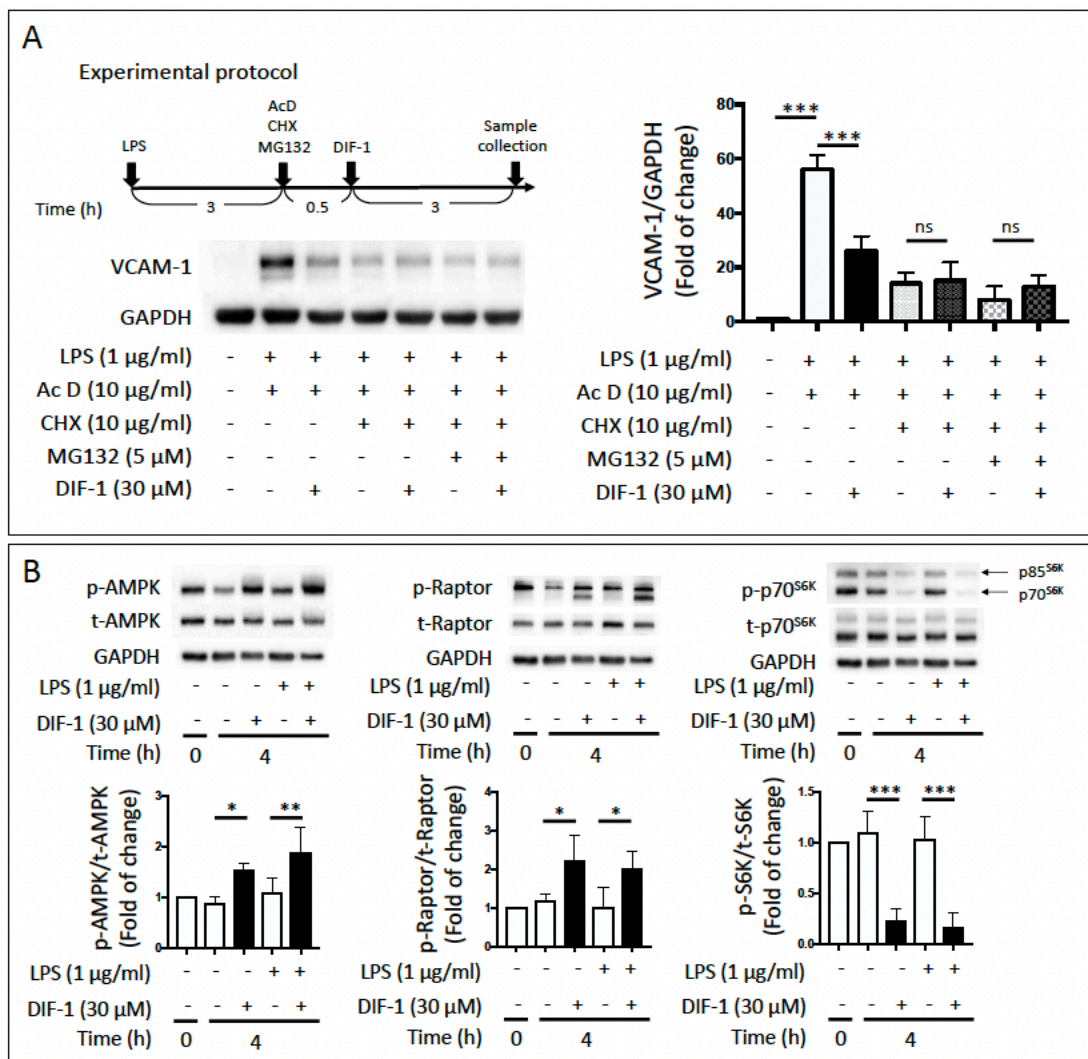
いずれの癌においても、播種の際に DIF-1 投与すると、その接着細胞数が顕著に減少した。LPS で炎症を惹起したものは、がん細胞の接着細胞数は増加したが、DIF-1 はこれに対しても著しく細胞接着を抑制した。



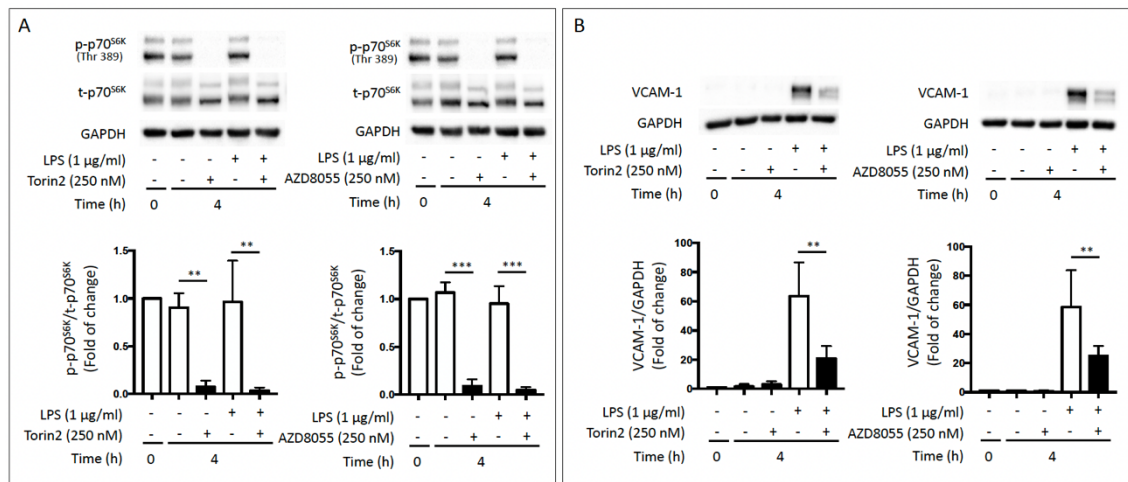
- (3) DIF-1 は血管内皮細胞における VCAM-1 の発現を減少させる  
 HUVEC は通常 VCAM-1 を発現していなかったが、LPS で刺激すると、発現することが蛍光免疫染色で確認された。DIF-1 は LPS による VCAM-1 の発現を抑制した。ウェスタンブロット法とフローサイトメトリーで定量したところ、同様の結果が得られた。



- (4) DIF-1 は mTORC1 の抑制を介したタンパク質翻訳を阻害することで VCAM-1 を減少させる  
 DIF-1 は AcD で転写を抑制しても、VCAM-1 の発現を減少させたが、タンパク合成阻害薬の CHX 存在下では DIF-1 の効果が完全にキャンセルされた。この結果から、DIF-1 は翻訳を抑制することで VCAM-1 の発現を減少させた。  
 DIF-1 は AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化させ、mTORC1 の構成因子である Raptor を不活性化し、タンパク質合成に重要な p70S6K の活性を抑制することを明らかにした。



- (5) mTORC1 阻害剤は DIF-1 の VCAM-1 への影響を再現した  
 DIF-1 と同様に、mTORC1 阻害剤は Torin2 と AZD8055 のどちらにおいても、p70S6K の活性を抑制し、LPS 存在下での VCAM-1 の発現が抑制し、DIF-1 の効果を再現できることがわかった。



以上の結果から、DIF-1 は、mTORC1 シグナルによるタンパク質合成の阻害を介して、VCAM-1 の発現を抑制することで癌細胞の血管内皮細胞への接着を抑えた可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Takeru, Miura Koichi, Han Ruzhe, Seto-Tetsuo Fumi, Arioka Masaki, Igawa Kazunobu, Tomooka Katsuhiko, Sasaguri Toshiyuki	4. 巻 152
2. 論文標題 Differentiation-inducing factor 1 activates cofilin through pyridoxal phosphatase and AMP-activated protein kinase, resulting in mitochondrial fission	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 39 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.02.009	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 Seto-Tetsuo Fumi, Arioka Masaki, Miura Koichi, Inoue Takeru, Igawa Kazunobu, Tomooka Katsuhiko, Sasaguri Toshiyuki	4. 巻 117
2. 論文標題 DIF-1 exhibits anticancer activity in breast cancer via inhibition of CXCLs/CXCR2 axis-mediated communication between cancer-associated fibroblasts and cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 109913 ~ 109913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2023.109913	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 Hirata Akie, Ishikane Shin, Takahashi-Yanaga Fumi, Arioka Masaki, Okui Tasuku, Nojiri Chinatsu, Sasaguri Toshiyuki, Nakashima Naoki	4. 巻 45
2. 論文標題 Increased risk of metastasis in patients with incidental use of renin-angiotensin system inhibitors: a retrospective analysis for multiple types of cancer based on electronic medical records	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1869 ~ 1881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-022-01038-4	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 Coyac Benjamin R., Wolf Benjamin J., Bahat Daniel J., Arioka Masaki, Brunski John B., Helms Jill A.	4. 巻 49
2. 論文標題 A WNT protein therapeutic accelerates consolidation of a bone graft substitute in a pre clinical sinus augmentation model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 782 ~ 798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcpe.13674	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 Seto-Tetsuo F, Arioka M, Miura K, Inoue T, Igawa K, Tomooka K, Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T.	4. 巻 40
2. 論文標題 DIF-1 inhibits growth and metastasis of triple-negative breast cancer through AMPK-mediated inhibition of the mTORC1-S6K signaling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5579-5589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-021-01958-4	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 Takiguchi Tomohiro, Takahashi-Yanaga Fumi, Ishikane Shin, Tetsuo Fumi, Hosoda Hiroshi, Arioka Masaki, Kitazono Takanari, Sasaguri Toshiyuki	4. 巻 909
2. 論文標題 Angiotensin II promotes primary tumor growth and metastasis formation of murine TNBC 4T1 cells through the fibroblasts around cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 174415 ~ 174415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2021.174415	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 Arioka M., Dawid I.M., Cuevas P.L., Coyac B.R., Leahy B., Wang L., Yuan X., Li Z., Zhang X., Liu B., Helms J.A.	4. 巻 101
2. 論文標題 Accelerating Socket Repair via WNT3A Curtails Alveolar Ridge Resorption	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 102 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345211019922	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 Li Zhijun, Yuan Xue, Arioka Masaki, Bahat Daniel, Sun Qiang, Chen Jinlong, Helms Jill A.	4. 巻 108
2. 論文標題 Pro-osteogenic Effects of WNT in a Mouse Model of Bone Formation Around Femoral Implants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 240 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-020-00757-5	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 Pan Jie、Pilawski Igor、Yuan Xue、Arioka Masaki、Ticha Pavla、Tian Ye、Helms Jill A.	4. 巻 91
2. 論文標題 Interspecies comparison of alveolar bone biology: Tooth extraction socket healing in mini pigs and mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1653 ~ 1663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.19-0667	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 Yamamoto Misaki、Takahashi-Yanaga Fumi、Arioka Masaki、Igawa Kazunobu、Tomooka Katsuhiko、Yamaura Ken、Sasaguri Toshiyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Cardiac and renal protective effects of 2,5-dimethylcelecoxib in angiotensin II and high-salt-induced hypertension model mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 892 ~ 903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000002728	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 Pilawski I.、Tulu U.S.、Ticha P.、Sch?pbach P.、Traxler H.、Xu Q.、Pan J.、Coyac B.R.、Yuan X.、Tian Y.、Liu Y.、Chen J.、Erdogan Y.、Arioka M.、Armaro M.、Wu M.、Brunski J.B.、Helms J.A.	4. 巻 6
2. 論文標題 Interspecies Comparison of Alveolar Bone Biology, Part I: Morphology and Physiology of Pristine Bone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JDR Clinical & Translational Research	6. 最初と最後の頁 352 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2380084420936979	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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石兼 真、幾島 栄悟、岸上 趙大、井川 和宣、友岡 克彦、有岡 将基、高橋 富美
2. 発表標題 2,5-ジメチルセレコキシブは心虚血再灌流障害に伴う心臓リモデリングを抑制する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会総会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 有岡将基, 石兼真, 笹栗俊之, 高橋富美
2. 発表標題 細胞性粘菌分化誘導因子-1はVCAM-1のタンパク質合成の抑制を介してがん細胞の血管内皮細胞への接着を阻害する
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 富美, 有岡 将基, 岸上 赳大, 石兼 真
2. 発表標題 細胞性粘菌由来分化誘導因子DIF-1はYAPの分解促進によりEMTを阻害する
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸上 赳大, 石兼 真, 有岡 将基, 高橋 富美
2. 発表標題 2,5-ジメチルセレコキシブは抗炎症性マクロファージを集簇させ、冷凍障害心筋梗塞モデルマウスにおいて心臓線維化を抑制する
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有岡将基, 笹栗俊之, 石兼真, 高橋富美
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1は循環腫瘍細胞の血管壁への接着を抑制することで抗転移効果を発揮する
3. 学会等名 第81回日本癌学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有岡 将基、田浦 志央吏、哲翁 ふみ、笹栗 俊之
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1 exhibited anti-metastatic effects through suppressing tumor cell adhesion to vascular epithelial cells
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 哲翁 ふみ、田浦 志央吏、有岡 将基、笹栗 俊之
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1 affects cancer-associated fibroblasts (CAF) in triple negative breast cancer through CXCLs/CXCR2 axis
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有岡 将基、田浦 志央吏、哲翁 ふみ、笹栗 俊之
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1 exhibited anti-metastatic effects through suppressing tumor cell adhesion to vascular epithelial cells
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 哲翁 ふみ、田浦 志央吏、有岡 将基、笹栗 俊之
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1 affects cancer-associated fibroblasts (CAF) in triple negative breast cancer through CXCLs/CXCR2 axis
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田浦 志央吏、有岡 将基、哲翁 ふみ、三浦 浩一、笹栗 俊之
2. 発表標題 細胞性粘菌分化誘導因子DIF-1は膵臓癌でがん抑制遺伝子Let-7の発現を上昇させる
3. 学会等名 第74回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹栗 俊之、哲翁 ふみ、有岡 将基、三浦 浩一
2. 発表標題 Anticancer effect of Dictyostelium differentiation-inducing factor-1 through AMPK-mediated inhibition of mTORC1 signaling pathway
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（3/8-10：札幌）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有岡 将基、田浦 志央吏、哲翁 ふみ、久保 桃子、笹栗 俊之
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1 attenuated cellular motility of BRAFV600E mutation bearing malignant melanoma cells via altering mesenchymal features
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（3/8-10：札幌）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 哲翁 ふみ、有岡 将基、三浦 浩一、笹栗 俊之
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1 inhibits growth and metastasis of triple negative breast cancer cells through AMPK-mediated inhibition of mTORC1-S6K signaling pathway
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（3/8-10：札幌）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田浦 志央史、有岡 将基、哲翁 ふみ、久保 桃子、横山 武志、笹栗 俊之
2. 発表標題 細胞性粘菌分化誘導因子DIF-1はSTAT3シグナル伝達経路を介してBRAFV600E陽性悪性黒色腫の細胞運動を抑制する
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会 (11/21:熊本; オンライン開催)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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