

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22709

研究課題名(和文)細胞性粘菌分化誘導因子DIF-1の哺乳細胞におけるターゲット分子の同定

研究課題名(英文) Identification of target molecules of differentiation inducing factor-1 in mammalian cells

研究代表者

哲翁 ふみ (Tetsuo, Fumi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80875899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、粘菌が分泌する生理活性物質のDIF-1が、mTOR/S6Kを調節することで、腫瘍増殖を阻害することを明らかにしている。本研究ではS6Kを調節するAMPKに着目しDIF-1のターゲット探索を行った。乳癌細胞を用いた実験で、DIF-1はAMPKのリン酸化レベルを上昇(活性化)させ、それに伴いRaptorのリン酸化レベルを上昇(活性化)、S6Kの脱リン酸化(不活性化)を促した。DIF-1は乳癌細胞の増殖抑制と遊走・浸潤抑制を行うが、その共通メカニズムとしてDIF-1によるAMPKの活性化が明らかとなった。本研究で、DIF-1が新規抗がん剤の開発のための有望なリード化合物であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは既存の治療薬に耐性を獲得し、遠隔転移といったがん進行を許すことで著しく生命予後を悪化させる。それゆえ、抗転移効果も含んだ新規抗腫瘍薬の開発が求められている。細胞性粘菌分化誘導因子 DIF-1は、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* が分泌し、柄細胞への分化を誘導する物質として単離・精製された低分子化合物である。DIF-1は蛋白質合成に重要なS6Kを調節するAMPKを活性化することで、細胞増殖抑制、細胞遊走・浸潤抑制効果を発揮することを見出した。DIF-1のターゲット分子を同定し、正確な作用機序を解明することで、抗腫瘍薬としての臨床応用への期待が高まる。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that DIF-1 inhibited tumor growth by regulating mTOR / S6K. From this result, it was predicted that the target of DIF-1 exists in the AMPK signaling pathway. This study investigated the effect of DIF-1 on AMPK signaling molecules using breast cancer cells. DIF-1 led to the phosphorylation (activation) of AMPK (Thr172) and phosphorylation (inactivation) of Raptor (Ser792), which is a direct substrate of AMPK, and dephosphorylation (inactivation) of p70S6K (Thr389), a major substrate of mTORC1. DIF-1 suppresses both TNBC growth and metastasis through a common signaling pathway, the AMPK-mTORC1 system. This study further strengthened our view that DIF-1 is a promising lead compound for the development of novel anticancer drugs.

研究分野：薬理学分野

キーワード：DIF-1 AMPK mTORC1 S6K トリプルネガティブ乳癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞性粘菌分化誘導因子 Differentiation inducing factor-1 (DIF-1) は、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* が分泌し、柄細胞への分化を誘導する物質として単離・精製された低分子化合物である。この物質の作用は細胞性粘菌にとどまらず、我々はこれまでに、様々な哺乳類のがん細胞において DIF-1 が腫瘍増殖抑制および肺転移モデルにおいて肺コロニー形成を抑制することを明らかにしてきた。それゆえ、DIF-1 は有望な抗腫瘍薬のリード化合物になると期待されている。

DIF-1 は細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* が飢餓状態に陥った時に分泌される生理活性物質で、柄細胞へ分化を誘導するため、エネルギー状態を認識するスイッチであると考えられる。ヒトにおいては、栄養を感知するシグナル伝達経路として、AMPK シグナルが重要な役割を担っている。飢餓状態でエネルギーが不足すると、細胞内の AMP が上昇することで活性化された LKB1 が、AMPK の Thr172 をリン酸化する。リン酸化された活性化 AMPK は「オートファジー誘導」および「mTOR/S6K を介した蛋白質合成阻害」の役割を果たす。我々は乳癌細胞株 MCF-7 を用いた研究で、DIF-1 は蛋白質合成に重要な S6K を介して STAT3 の翻訳を抑制することによって cyclin D1 の発現を減弱させ、その結果、がんの細胞増殖を抑制することを見出した。そこで、ヒト細胞における DIF-1 の作用は、AMPK シグナルに関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

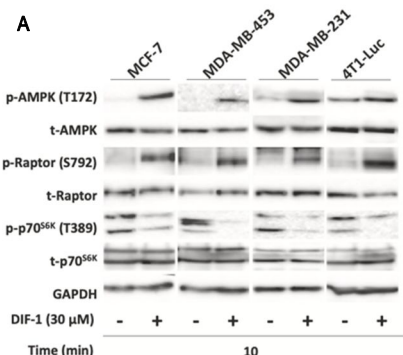
本研究は細胞性粘菌分化誘導因子 DIF-1 のターゲット分子を同定し、正確な作用機序を解明することで、DIF-1 の抗腫瘍薬としての臨床応用を目指す研究である。我々は乳癌細胞株 MCF-7 を用いた研究で、DIF-1 は蛋白質合成に重要な S6K を介して STAT3 の翻訳を抑制することによって cyclin D1 の発現を減弱させ、その結果、がんの細胞増殖を抑制することを見出した。この報告は DIF-1 のターゲットを探索する上で重要な発見であり、作用機序の解明に新たな視点をもたらした。しかし、S6K を調節する上流キナーゼへの DIF-1 の影響は未だ不明のため、本研究で検討する。

3. 研究の方法

- (1) 様々な乳癌細胞株 MCF-7、MDA-MB-453、MDA-MB-231、4T1-Luc 細胞を用いて、DIF-1 の AMPK-mTORC1-S6K シグナルへの影響をウエスタンブロット法で評価した。
- (2) トリプルネガティブ乳癌細胞株である 4T1-Luc 細胞、MDA-MB-231 細胞に焦点を置いて研究を進めた。DIF-1 による AMPK の活性化が S6K の抑制をもたらすかどうかを判断するために siAMPK と Compound C を用いてウエスタンブロット法で評価した。
- (3) DIF-1 によるトリプルネガティブ乳癌細胞株に対する細胞遊走・浸潤に対する効果とメカニズムを検討した。

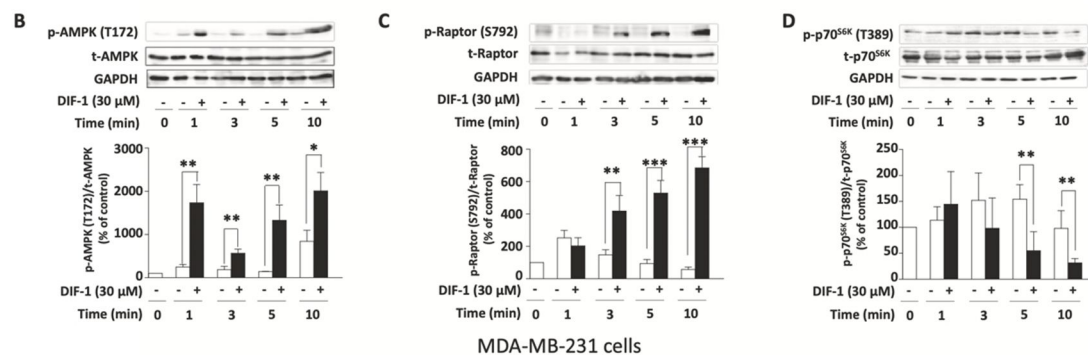
4. 研究成果

- (1) ウエスタンブロット法により、MCF-7、MDA-MB-453、MDA-MB-231、4T1-Luc 細胞で DIF-1 による AMPK のリン酸化(活性化)、AMPK の基質である Raptor のリン酸化(活性化)、mTORC1 の主な基質である S6K の脱リン酸化(不活性化)が認められた(左図 A)。

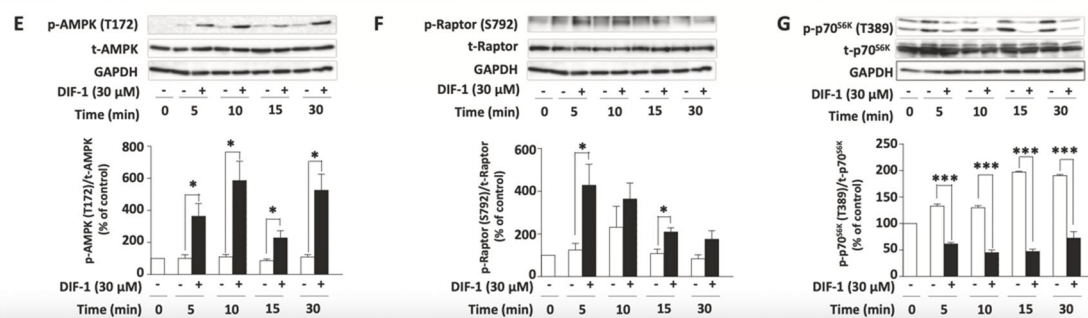


さらに、トリプルネガティブ乳癌細胞株であるマウス由来 4T1-Luc 細胞、ヒト由来 MDA-MB-231 細胞を用いて、DIF-1 の作用時間を検討したところ、4T1-Luc 細胞では 1 分以内、MDA-MB-231 細胞では 5 分以内と短時間で AMPK のリン酸化レベルを上昇させることがわかった(下図 B、E)。それに伴い、DIF-1 は Raptor のリン酸化レベルを上昇させ(下図 C、F) S6K の脱リン酸化(下図 D、G)を促した。

4T1-Luc cells

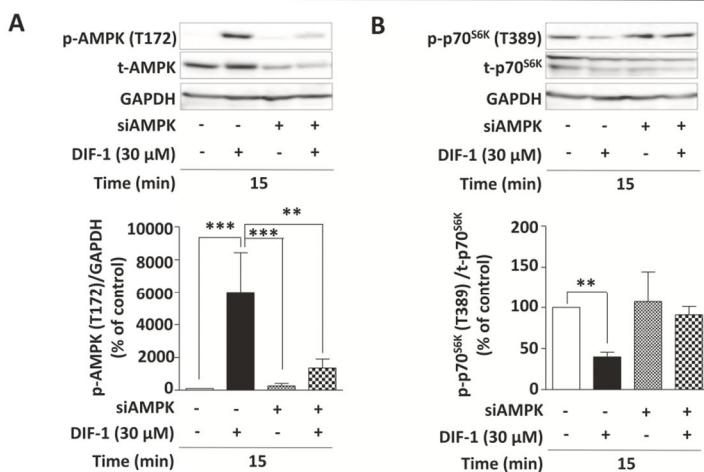


MDA-MB-231 cells

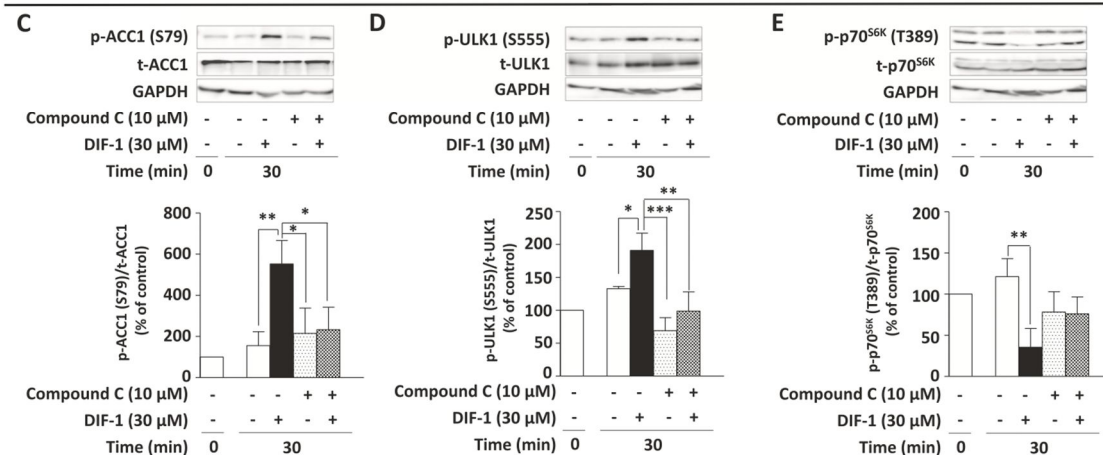


(2) AMPK 阻害剤 (siAMPK や Compound C) を用いた実験で、DIF-1 は S6K の不活性化を有意に減弱させた。このことから、DIF-1 は AMPK 活性化を介して S6K の不活性化を促すことがわかった。

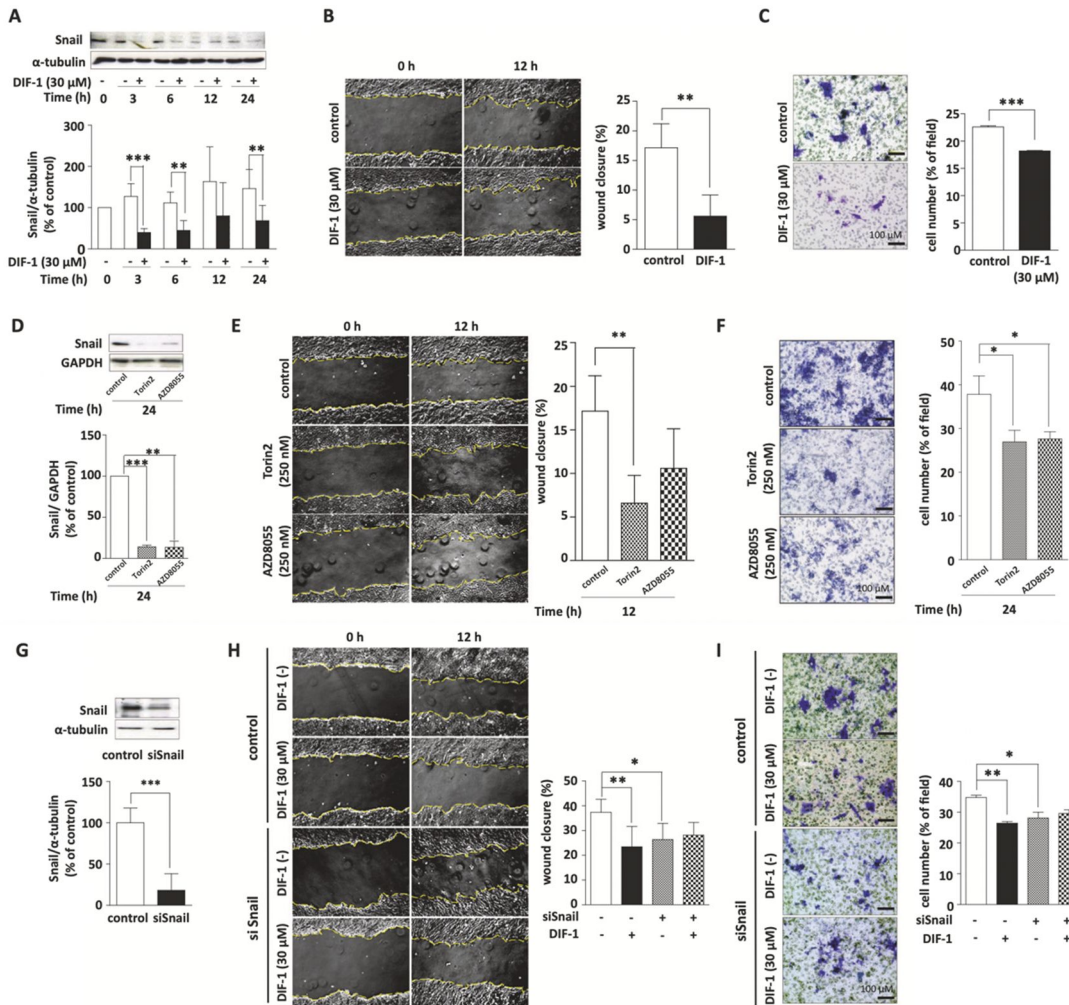
4T1-Luc cells



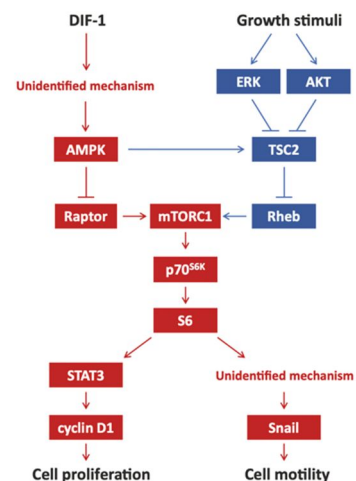
MDA-MB-231 cells



- (3) 細胞運動性に関する Snail タンパク質発現は DIF-1 によって強力に抑制される。siSnail を用いた実験で、Snail のノックダウンは細胞運動性を有意に抑制し、DIF-1 の効果は siSnail 存在下では消失した。Snail の発現は STAT3 によって制御を受けるとの報告があるため、STAT3 と Snail の関連について検討したところ、STAT3 のノックダウンは Snail タンパク質発現に影響を与えなかった。卵巣癌において、S6K は Snail の発現を増強することが報告されている。mTORC1-S6K シグナルと Snail 発現の関連について 4T1-Luc 細胞を用いて検討したところ、mTORC1 阻害剤 (Torin2 と AZD8055) は Snail のタンパク質発現を減少させ、細胞遊走・浸潤を有意に阻害した。この結果は、mTORC1-S6K1 シグナルは Snail の発現と細胞運動性に関与することを示唆した。これらの結果から、DIF-1 は S6K を不活性化し、Snail のタンパク質発現を低下させ細胞遊走・浸潤を抑制することが示された。



- (4) 本研究によって明らかとなった DIF-1 の作用メカニズムを示す。DIF-1 は AMPK を活性化し、活性化された AMPK は Raptor を不活性化することで mTORC1 の活性を抑制し、S6K の活性を低下させる。その結果 STAT3 の発現が低下し、続いて cyclin D1 の発現が低下し細胞周期が制御される。一方 S6K 活性の低下は Snail の発現を低下させ、細胞の運動性を抑制する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 (37)
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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 細胞性粘菌分化誘導因子DIF-1はAMPK-mTORC1-S6Kシグナルを介してトリプルネガティブ乳癌の増殖と転移を抑制する
3. 学会等名 第94回薬理学会年会
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は間葉系性質の変化を介してBRAFV600E陽性悪性黒色腫の細胞運動能を減弱する
3. 学会等名 第94回薬理学会年会
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 細胞性粘菌分化誘導因子DIF-1のAMPK-mTORC1経路を介する抗がん作用
3. 学会等名 第94回薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 哲翁 ふみ、有岡 将基、田浦 志央吏、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回薬理学会年会
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回薬理学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------