

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659138

研究課題名（和文） mPGES-1 発現阻害薬のリード化合物探索とターゲット分子同定

研究課題名（英文） Identification of an inhibitor of mPGES-1 expression and its target molecule

研究代表者

笹栗 俊之（SASAGURI TOSHIYUKI）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30261209

研究成果の概要（和文）：

我々は、細胞性粘菌が分泌する低分子化合物 DIF が、膜結合型プロスタグランジン E₂ 合成酵素-1 (mPGES-1) の遺伝子発現を強力に抑制することを見出した。本研究では、天然化合物ライブラリーから DIF 以外の新たな mPGES-1 発現阻害物質をスクリーニングし、その作用機序の解明を試みることを目的とした。スクリーニングにより、mPGES-1 プロモーター活性を DIF 以上に強力に抑制する物質 niclosamide が見出されたため、DIF と niclosamide で共通して変動し、炎症に関与する遺伝子を DNA マイクロアレイにより解析した。しかし、共通に増加もしくは減少する炎症関連遺伝子は、現時点では見出されていない。

研究成果の概要（英文）：

We previously found that DIF, synthesized by Dictyostelium discoideum, inhibited the expression of microsomal PGES-1 (mPGES-1). In this study, we tried to identify a new inhibitor of mPGES-1 by natural products library screening and found that niclosamide was more effective than DIF-1. Subsequently, we examined the changes of the gene expression profile induced by DIF-1, DIF-3 and niclosamide using DNA microarray chips. There were several genes affected by all these three compounds, whereas none of them did not seem to be related with inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：新規抗炎症薬、mPGES-1

1. 研究開始当初の背景

炎症は、創傷・感染・血管障害・腫瘍など、生体への外部および内部からの侵襲に対する組織・全身反応である。一般に抗炎症薬はステロイド薬と非ステロイド薬とに大別される。ステロイド薬は強力な抗炎症作用を有する一方、多様な生理活性を有しており、その副作用が問題とされてきた。非ステロイド

薬は炎症のメディエーターであるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) の生合成の初段階を担う酵素シクロオキシゲナーゼを阻害することにより抗炎症作用を発揮するが、生体の恒常性維持に関与している I 型シクロオキシゲナーゼをも阻害するため、胃腸障害や出血傾向などの副作用が問題とされてきた。このため炎症性反応により特異的に誘導される II

型シクロオキシゲナーゼ (COX-2) を選択的に阻害する薬剤が開発され、大きな期待を寄せられたが、心筋梗塞など心血管イベントの発生率上昇という深刻な有害反応 (副作用) が報告された。このため、COX-2 に変わる新たな創薬ターゲットが探索され、PGE₂ 合成酵素 (PGES) の1つである膜結合型 PGE₂ 合成酵素-1 (mPGES-1) が注目されている。

PGES は、種々のケミカルメディエーターを産生するいわゆる “アラキドン酸カスケード” において、シクロオキシゲナーゼよりも下流に位置し、プロスタグランジン類の中で、炎症反応の惹起物質として大きな役割を担う PGE₂ を合成する最終段階を担う酵素である。PGES として 3 種類 (cytosolic-PGES、mPGES-1 および mPGES-2) が知られている。他の 2 種類の PGES が恒常的に発現しているのとは異なり、mPGES-1 は炎症性刺激によりその発現が上昇し、炎症の進展・増悪に関与していることが示唆されているため、新規抗炎症薬のターゲットとして注目されている。

mPGES-1 を阻害する薬物の作用機序としては①活性阻害、②発現抑制の2つが考えられる。mPGES-1 は、一部ヒトの組織で恒常的に mRNA が高いレベルで発現しているが、これらの部位での mPGES-1 の果たす役割は未だ明らかではなく、生体の恒常性維持に役立っている可能性は否定できない。従って mPGES-1 を直接阻害する薬物は、PGE₂ を正常レベル以下にまで低下させてしまうため、生体の恒常性維持に影響し副作用が現れやすいのではないかと推定される。一方、発現抑制作用を有する物質では、炎症により誘導される mPGES-1 の発現を抑制するだけなので、副作用の軽減が見込まれる。

2. 研究の目的

DIF (Differentiation-inducing factor) は細胞性粘菌が産生分泌する低分子化合物であり、集合した粘菌細胞が子実体を形成する際、柄細胞への分化を誘導する活性因子である。我々は、1998 年頃より、DIF の哺乳類細胞における作用機序についての検討を、主にその細胞増殖抑制活性に着目して行い、グリコーゲン合成酵素キナーゼ (GSK-3 β) の活性化を介したサイクリン D1 の発現量の著しい減少が腫瘍細胞に対する増殖抑制作用

の分子基盤であることを報告した。その研究の一環として、がんの発生・進展に深く関与する炎症反応における DIF の効果についての検討を行い、DIF に炎症性刺激で惹起される mPGES-1 の発現を抑制する作用があることを新たに見出した (特願 2009-238935)。DIF のような mPGES-1 発現阻害薬は画期的な新規抗炎症薬となる可能性があると考えられたため、本研究では、類似の作用を有する物質をスクリーニングし、さらに情報伝達系を網羅的に解析することにより、mPGES-1 発現阻害薬の創薬ターゲット分子の探索を行なうこととした。

3. 研究の方法

1. mPGES-1 の遺伝子発現を抑制する化学物質のスクリーニング

スクリーニングの対象とするのは、理化学研究所の天然化合物バンクに登録されている化合物である。ヒト mPGES-1 のプロモーター領域をクローニングし、これをルシフェラーゼベクターに組み込んで培養細胞に導入する。ヒト子宮頸がん由来である HeLa 細胞では炎症性刺激を与えなくても高い mPGES-1 発現を認めたので、この細胞を用い検討を行った。

2. mPGES-1 遺伝子発現抑制と連動する遺伝子群の DNA マイクロアレイによる網羅的解析

DIF および 1. で見出した候補化合物を投与した HeLa 細胞の遺伝子発現プロファイルを、DNA マイクロアレイ解析により全遺伝子にわたって網羅的に探索する。遺伝子発現は経時的に解析し、時間軸に沿った発現変動遺伝子群を捕捉した。

4. 研究成果

理化学研究所の天然化合物バンクに登録されている化合物から、mPGES-1 のプロモーター活性を指標にスクリーニングを行ったところ、DIF-1 よりも強力にプロモーター活性を抑制する物質 niclosamide を見出した (図 1)。

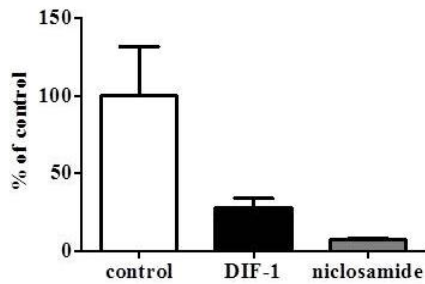


図1. DIF-1およびniclosamideによる mPGES-1プロモーター活性抑制

次に、DIF と niclosamide が mPGES-1 のプロモーター活性を抑制する共通の機序を見出すことを試みた。この目的のため、HeLa 細胞を DIF-1、DIF-3、niclosamide で 1.5、3、4.5 時間刺激した細胞から RNA を回収し、これを用いて遺伝子発現プロファイルの DNA マイクロアレイ解析を行った。

図 2 に示すように、各時間で共通に発現が増加もしくは減少している遺伝子を見出すことができた。しかしながら、この中からは、時間の経過に従って発現が増加もしくは減少する炎症関連遺伝子は、今のところ見出されていない。

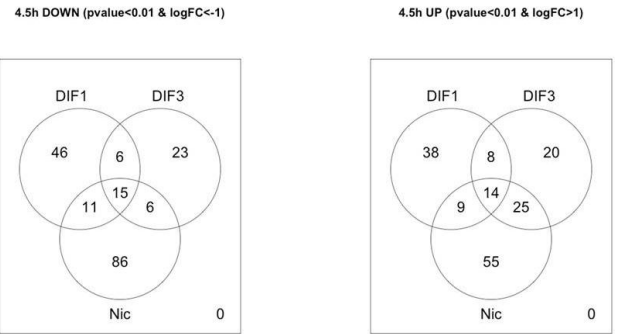
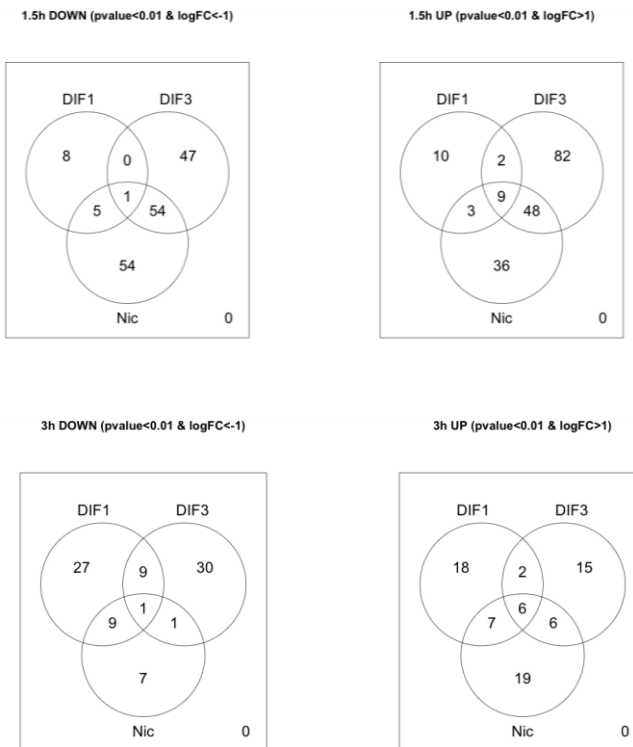


図2. DIFおよびniclosamideの共通変動遺伝子数

刺激後1.5、3、4.5時間後にRNAサンプルを回収し、DNAマイクロアレイ解析を行った。各時点で共通に発現が上昇した遺伝子を右に、共通に発現が減少した遺伝子を左に示す。数字は共通に変動した遺伝子数を表す。

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)

[学会発表] (計 15 件)

- 久保倉 尚哉、高橋 富美、松本 主之、笹栗 俊之 Anti-Tumor Effect of Differentiation-Inducing Factors on a Colon Cancer Cell Line HCT-116 <大腸癌細胞株 HCT-116 に対する Differentiation-Inducing Factor の抗腫瘍効果> (口演) 第 86 回 日本薬理学会年会 (2013/3/21-23 : 福岡)
- 有岡 将基、高橋 富美、佐々木 匡理、笹栗 俊之 Inhibition of GSK-3 β accelerates bone formation via the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway <GSK-3 β 阻害は Wnt/ β -catenin シグナル活性化を介して骨形成を促進する> (口演) 第 86 回 日本薬理学会年会 (2013/3/21-23 : 福岡)
- 高橋 富美、笹栗 俊之 Tumor suppression by GSK-3 β activator DIF-1 in colorectal and xenografted cancer model mice <GSK-3 β 活性化物質 DIF-1 の大腸がんおよび担がんモデルマウスにおける抗腫瘍効果> (ポスター) 第 86 回 日本薬理学会年会 (2013/3/21-23 : 福岡)
- 高橋 富美、吉原 達也、笹栗 俊之 Differentiation-inducing factor-1 のモデルマウスを用いた抗腫瘍作用の検討 (ポスター) 第 33 回 日本臨床薬理学会学術総会 (2012/11/29-12/1 : 宜野)

- 湾)
5. 永野 晃弘、高橋 富美、笹栗 俊之 セレコキシブによる Wnt シグナル伝達経路阻害を介した骨芽細胞の分化抑制 (ポスター) 第 33 回 日本臨床薬理学会学術総会 (2012/11/29-12/1: 宜野湾)
 6. 有岡 将基、高橋 富美、佐々木 匡理、笹栗 俊之 Wnt/ β -catenin シグナル活性化によるリチウムの骨形成促進作用 (口演) (優秀発表賞受賞) 第 65 回 日本薬理学会西南部会 (2012/11/23: 熊本)
 7. 有岡 将基、高橋 富美、佐々木 匡理、笹栗 俊之 リチウムの Wnt シグナル活性化作用による新生骨形成の促進 (口演) 第 31 回 臨床薬理阿蘇九重カンファレンス (2012/7/14-15: 別府)
 8. 高橋 富美、笹栗 俊之 Wnt シグナル阻害剤 DIF-1 の経口投与による抗腫瘍効果 (ポスター) 第 71 回 日本癌学会学術総会 (2012/9/19-21: 札幌)
 9. 久保倉 尚哉、高橋 富美、松本 主之、笹栗 俊之 大腸癌細胞株 HCT-116 に対する differentiation-inducing Factor の抗腫瘍効果 (ポスター) 第 71 回 日本癌学会学術総会 (2012/9/19-21: 札幌)
 10. 吉原 達也、高橋 富美、笹栗 俊之 The inhibition of DUSP-1 expression enhances anti-tumor effects of differentiation-inducing factor-1 in HeLa cells <DUSP-1 発現抑制による differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍活性の増強効果> 第 85 回 日本薬理学会学術総会 2012/3/15 京都
 11. 神宮司 健太郎、高橋 富美、中村 俊央、笹栗 俊之 細胞性粘菌由来分化誘導因子 DIF-1 はヒト大腸癌由来 HCT-116 細胞において c-Myc の発現を低下させる 第 85 回 日本薬理学会学術総会 2012/3/14 京都
 12. 吉原 達也、高橋 富美、笹栗 俊之 DUSP-1 の抑制により differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果は増強する 第 32 回 日本臨床薬理学会年会 2011/12/2 浜松
 13. 吉原 達也、高橋 富美、笹栗 俊之

- DUSP-1 の抑制により differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果は増強する 第 70 回 日本癌学会学術総会 2011/10/3 名古屋
14. Jingushi, K., Takahashi, F., Sasaguri, T. Differentiation-inducing factor-1 inhibits the Wnt signaling pathway by reducing TCF7L2 expression in colon cancer cells 第 70 回 日本癌学会学術総会 2011/10/4 名古屋
 15. 高橋 富美、吉原 達也、笹栗 俊之 Wnt シグナル阻害剤 Differentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍活性の検討 第 70 回 日本癌学会学術総会 2011/10/3 名古屋
6. 研究組織
(1) 研究代表者
笹栗 俊之 (SASAGURI TSHIYUKI)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 30261209
- (2) 研究分担者
高橋 富美 (TAKAHASHI FUMI)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 50274436