

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590110

研究課題名(和文) 土壌微生物「細胞性粘菌」由来の薬理活性物質DIFの研究

研究課題名(英文) Study on the bio-active molecule, DIF, found in the cellular slime mold
Dictyostelium discoideum

研究代表者

久保原 禪 (Kubohara, Yuzuru)

順天堂大学・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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞性粘菌類の一種「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(DIFと類似の人工化合物：DIFs)は、複数の生物活性(抗腫瘍活性、糖取り込み促進活性、他)を有する低分子化合物である。我々は、DIFsの構造を参考にした新しい抗がん剤(がん細胞の増殖と浸潤/転移を阻害する薬剤)の開発、肥満/糖尿病治療薬の開発、抗トリパノソーマ剤(トリパノソーマはシャーガス病を引き起こす寄生虫)の開発、並びにDIFsに関連する基礎研究を進めた。その過程で我々は、一部のDIFsは(少なくとも一部)ミトコンドリアの活動を阻害することによって機能すること等を見出した。

研究成果の概要(英文)：DIF-1, a low-molecular weight compound found in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*, and its derivatives possess multiple biological activities, such as anti-proliferative and glucose-uptake-promoting activities in vitro in mammalian cells. We have investigated the pharmacological functions of DIFs and indicated that DIFs may be good lead compounds for the development of novel anti-tumor, anti-obesity/anti-diabetes, and anti-Trypanosoma drugs. In addition, we have found that DIFs may function, at least in part, by disturbing mitochondrial activity in mammalian cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞性粘菌 DIF がん 糖尿病 ミトコンドリア 走化性運動 トリパノソーマ

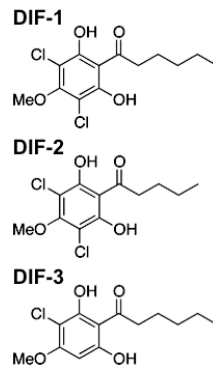
1. 研究開始当初の背景

土壤微生物「細胞性粘菌類」の一種 *Dictyostelium discoideum* (和名「キイロタマホコリカビ」、以後、単に「粘菌」) は、ライフサイクルの最後に孢子塊と柄細胞から成る子実体を形成する。粘菌は単純なライフサイクルを有し、かつ、育成や遺伝子操作が簡単なことから、細胞生物学・発生生物学分野のモデル生物として古くより研究されて来た。

Differentiation-inducing factor-1

(DIF-1), DIF-2, DIF-3 (右図) は、粘菌の柄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・同定された低分子化合物である (引用文献①, ②)。

1990年代以降、我々の研究グループは、DIFs とそれらの誘導体が哺乳類細胞に対する複数の薬理活性 (抗腫瘍活性、糖代謝促進活性、他) を有することを発見し、DIF の作用機序解析と DIF をリード化合物とした新規抗がん剤および糖尿病治療薬の開発等を進めてきた (文献③-⑩他)。さらに、我々は、DIF 誘導体の有する複数の薬理活性は、DIF の側鎖修飾によって分離できる可能性を示してきた: 総じて、DIF-3 誘導体は抗腫瘍活性に優れ、DIF-1 誘導体は糖代謝促進活性が強い (文献⑧-⑩他)。



<引用文献>

- ① Morris HR, Taylor GW, Masento MS, Jermyn KA, & Kay RR. *Nature* 328, 811-814. (1987).
- ② Morris HR, Masento MS, Taylor GW, Jermyn KA, & Kay RR. *Biochem. J.* 249, 903-906. (1988)
- ③ Asahi K, Sakurai A, Takahashi N, Kubohara Y, Okamoto K, & Tanaka Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 1036-1039. (1995).
- ④ Kubohara Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 418-422. (1997).
- ⑤ Kubohara Y. *Eur. J. Pharmacol.* 381, 57-62. (1999).
- ⑥ Kanai M, Konda Y, Nakajima T, Izumi Y, Nanakin A, Kanda N, Kubohara Y, & Chiba T. *Oncogene* 22, 548-554. (2003).
- ⑦ Shimizu K, Murata T, Tagawa T, Takahashi K, Ishikawa R, Abe Y, Hosaka K, & Kubohara Y. *Cancer Res.* 64, 2568-2571. (2004).
- ⑧ Gokan N, Kikuchi H, Nakamura K, Oshima Y, Hosaka K, & Kubohara Y. *Biochem. Pharmacol.* 70, 676-685. (2005).
- ⑨ Omata W, Shibata H, Nagasawa M, Kojima I, Kikuchi H, Oshima Y, Hosaka K, & Kubohara Y. *FEBS J.* 274, 3392-3404.

(2007).

- ⑩ Kubohara Y, Kikuchi H, & Oshima Y. *Life Sci.* 83, 608-612. (2008).

2. 研究の目的

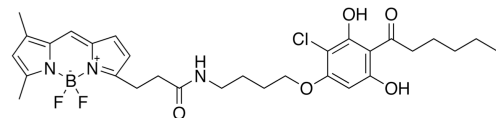
本研究は、DIFs とそれらの誘導体に関する包括的な研究であり、主に以下の2つのプロジェクトを進める。

- (1) DIF 誘導体の抗腫瘍作用の機構解析、および新規抗がん剤の開発。
- (2) DIF 誘導体の糖代謝促進作用の機構解析、および新規肥満・糖尿病治療薬の開発。

3. 研究の方法

- (1) DIF の抗腫瘍作用の機序解析。

① 緑色蛍光発色体を結合した DIF 誘導体 BODIPY-DIF-3G (下図) を合成し、HeLa 細胞における生物活性と局在を検討し、DIF の Target organelle を同定した。



② マウス肝臓から、Sucrose 密度勾配遠心法によりミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア酸素消費に対する DIF 誘導体の効果を検討した。

③ ヒト乳がん MCF-7 細胞を用いて、p21-activated kinase 1 (PAK1) 活性に対する各種 DIF 誘導体の阻害効果を検討した。

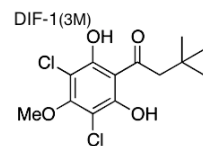
- (2) がん細胞の遊走に対する DIF の効果。

マウス骨肉腫 LM8 細胞と Boyden chamber (二層式細胞培養系: 上層と下層は、カラーゲンコートしたポアメンブレンで仕切られている) を用いて、リゾフォスファチン酸 (LPA) 誘導性の LM8 細胞遊走に対する各種 DIF 誘導体の阻害効果を検討した: 二層式の培養 well の下層に 100 nM LPA、上下両層に 0.1% EtOH (vehicle control) あるいは 10 μM DIF 誘導体を添加し、LM8 細胞を上層に入れる → CO₂ incubator で 3 時間培養後、上層から下層へ移動した細胞数を測定する。

- (3) DIF の糖代謝促進作用の解析。

① メタボローム解析。

マウス 3T3L1 細胞を Confluent 状態になるまで in vitro 培養 (10 cm dish 中) した後、0.1% DMSO (vehicle control)、20 μM DIF-1 あるいは 20 μM DIF-1(3M) 存在下でさらに 3 時間培養する。細胞内の代謝産物を回収し、CE-TOF-MS 法 (キャピラリー電気泳動-Time-of-flight Mass Spectrometry) により、糖代謝産物を定量する。



② 1型糖尿病モデルラットの血糖値に対する DIF-1 の効果.

ストレプトゾトシン (STZ) 処理したラット (1型糖尿病モデル) を作成し、血糖値に対する DIF-1 (30 mg/kg の単回経口投与と 30 mg/kg/day の 7日間連続経口投与) の効果を検討した。

(4) DIF の有する新規薬理活性の検討.

ヒト線維芽肉腫細胞 HT1080 を *in vitro* 培養下でトリパノソーマ原虫に感染させると、原虫は HT1080 内に侵入し、増殖する。この系を利用して、トリパノソーマ原虫の感染率と増殖に対する阻害活性を有する DIF 誘導体をスクリーニングした。また、マウスの腹腔内に DIF 誘導体 (50 mg/kg) を投与し、トリパノソーマ原虫を感染させ、14日後の血中原虫数を測定した。

(5) 粘菌の走化性運動の解析.

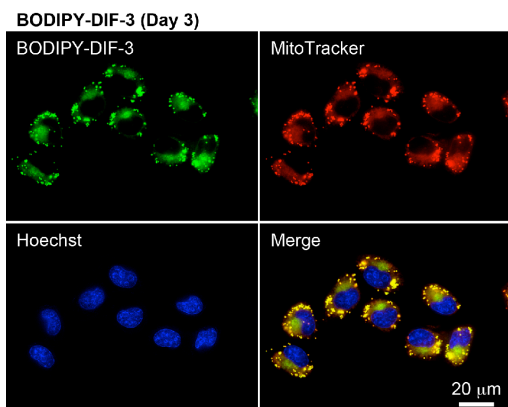
粘菌細胞は cAMP に対する走化性を示すことから、走化性運動 (免疫細胞の遊走やがん細胞の転移等) の機序解析のモデル系として利用されている。粘菌細胞の懸濁液を寒天培地上に置き、その近傍に cAMP 溶液を置くと数時間後に粘菌細胞は cAMP を添加した方向に移動する。この系を利用して、粘菌走化性運動に対する DIF の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) DIF の抗腫瘍作用のメカニズム解析.

① DIF の Target organelle の同定.

我々は、DIF の作用機序を解明するためのツールとして DIF 蛍光体である BODIPY-DIF-3G を合成した。BODIPY-DIF-3G (5-20 μ M) は、DIF-3 と同様に HeLa 細胞の増殖を濃度依存性に阻害した：生物活性を有することが確認できた。そこで、BODIPY-DIF-3G の細胞内局在を検討した結果、この化合物がミトコンドリアに局在すること (下図)、BODIPY-DIF-3 あるいは DIF-3 処理によってミトコンドリアが膨潤すること等が明らかとなった [論文⑥, ⑦]。



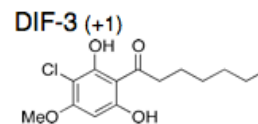
また、マウス肝臓から調整したミトコンドリアの酸素消費に対する DIF-3 や

BODIPY-DIF-3G の効果を検討した結果、それらがミトコンドリアの酸素消費を促進すること (ミトコンドリア脱共役剤として機能すること) が示された。さらに、既知の脱共役剤 CCCP や DNP が、HeLa 細胞の増殖抑制活性を有することも示された。

これらの結果は、DIF-3 やその誘導体は、少なくとも一部、ミトコンドリア脱共役剤として働くことで HeLa 細胞の増殖を阻害することを示唆している。

② DIF の Target タンパク質の同定.

P21-activated kinase 1 (PAK1) は、各種がん細胞の増殖に関与している。そこで我々は、ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて、各種 DIF 誘導体による増殖阻害活性と PAK1 活性阻害活性について検討した。その結果、いくつかの DIF 誘導体が PAK1 活性を阻害すること、とりわけ DIF-3(+1) は PAK1 活性と MCF-7 細胞の増殖



を強力に阻害することが明らかとなった。また、*in vitro* assay

系において、DIF 誘導体が recombinant PAK1 活性を直接阻害することも示した。これらの結果は、DIF 誘導体が少なくとも一部 PAK1 活性を阻害することによって MCF-7 細胞の増殖を阻害することを示唆している [論文③]。

(2) がん細胞の遊走に対する DIF の阻害効果.

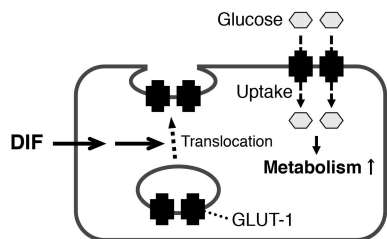
Boyden chamber の上層のマウス骨肉腫 LM8 細胞は、下層に添加した LPA に対する走化性運動によって下層に移動する。この系を用いて、各種 DIF 誘導体の阻害効果を検討した結果、いくつかの DIF 誘導体が LM8 の遊走を強力に阻害することを見出した (IC₅₀ は 5 μ M 程度)。また、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP も LM8 の遊走を阻害することを示した。これらの結果は、DIF 誘導体が少なくとも一部ミトコンドリア活性を阻害することによって、LPA 誘導体の LM8 細胞の遊走を阻害することを示唆している：DIF 誘導体をリード化合物とした抗がん剤 (浸潤/転移の阻害剤) を開発できる可能性が示された [論文⑤]。

(3) DIF の糖代謝促進活性の解析.

① メタボローム解析.

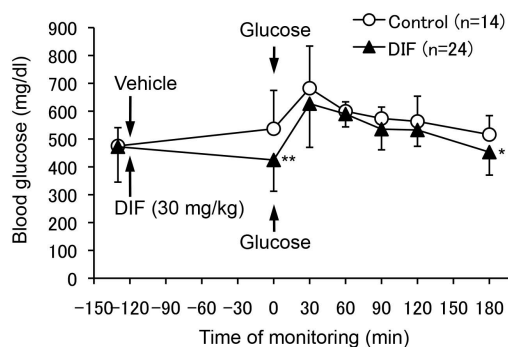
我々は、これまでに DIF-1 や DIF-1 (3M) が GLUT-1 (Glucose transporter 1) を介して哺乳類細胞の糖取り込みを促進することを示して来た。しかし、取り込まれた糖がどうなるのかは未解明であった。そこで、Confluent 状態のマウス 3T3L1 細胞を 0.1% DMSO、20 μ M DIF-1、20 μ M DIF-1 (3M) 存在下でそれぞれ 3 時間培養後、細胞内の代謝物を回収し、CE-TOF-MS 法によって、糖代謝産物を定量した。その結果、DIF 存在下の細

胞では、糖代謝が促進され、TCA 回路の代謝産物が蓄積することが示された [論文①]。

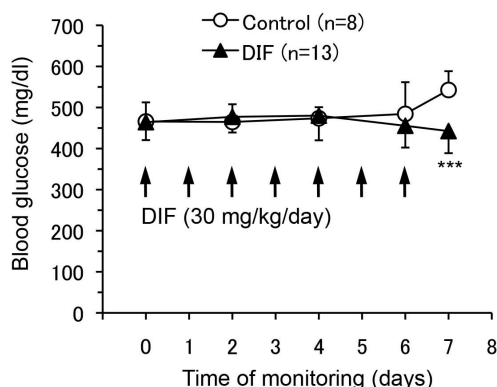


② STZ ラットの血糖値に対する DIF-1 の作用解析。

STZ 処理したラット (1 型糖尿病モデルラット) を作成し、血糖値に対する DIF-1 (経口投与) の効果を検討した。その結果、DIF-1 (30 mg/kg) 投与後 2 時間で、STZ ラットの血糖値が有意に下降した。さらに、Glucose (2.5 g/kg) を投与後 3 時間後の血糖値は、Control 群に比べて DIF-1 投与群で有意に低い値となった (下図)。



また、STZ ラットの血糖値に対する DIF-1 の連続投与 (30 mg/kg/day) の効果を検討した結果、Control 群では 8 日目の血糖値が上昇し始めたが、DIF-1 投与群では上昇は抑制されていた (下図)。

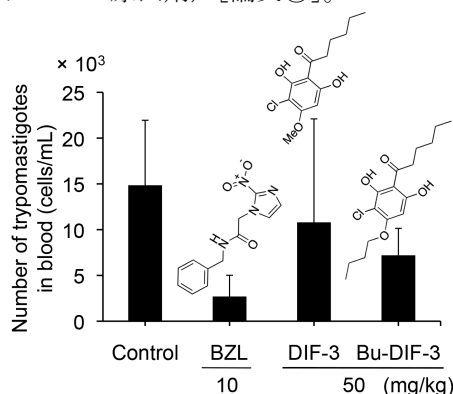


DIF-1 は、これら STZ ラットの血糖値以外の血液成分には大きな影響を与えなかった。これらの結果は、DIF-1 とその誘導体が 1 型糖尿病の治療薬として臨床応用できる可能性を示唆している [論文①]。

(4) トリパノソーマ原虫に対する DIF の作用解析。

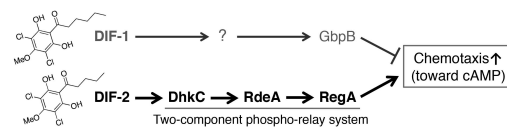
トリパノソーマは、南米の風土病であるシャーガス病を引き起こす寄生虫である：

シャーガス病に対する有効な治療法は確立されていない。そこで我々は、in vitro 培養系を利用して、トリパノソーマ原虫の宿主細胞への感染と宿主細胞内での増殖を阻害する DIF 誘導体をスクリーニングした。その結果、Bu-DIF-3 等のいくつかの誘導体が強力な抗トリパノソーマ活性を有することを発見した。さらに、マウス腹腔内投与した Bu-DIF-3 が、感染 14 日後の血中トリパノソーマ原虫数を有意に減少させることを見出した (下図; BZL は既存の抗トリパノソーマ原虫剤) [論文⑩]。



(5) 粘菌走化性運動に対する DIF の作用解析。

粘菌走化性運動 (走化性誘導因子=cAMP) の研究は、好中球やがん細胞の遊走/転移の研究にも繋がるモデル系と考えられている。これまでに我々は、DIF-1 と DIF-2 が粘菌走化性運動の modulators であることを示しているが、それらの作用機序の詳細は不明である。そこで、我々はシグナル伝達系に欠損のある各種 mutants を利用して、DIF-2 の作用機序解析を行った。その結果、DIF-2 は、DhkC-RdeA-RegA 系 (粘菌 two component system) を介して、cAMP に対する粘菌走化性運動を制御していることを明らかにした [論文②]。



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 12 件)

① Kawaharada R, Nakamura A, Takahashi K, Kikuchi H, Oshima Y, & Kubohara Y. Oral administration of *Dictyostelium* differentiation-inducing factor 1 lowers blood glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, in press. (2016). 査読有.

DOI: 10.1016/j.lfs.2016.04.032.

② Kuwayama H, & Kubohara Y.

- Differentiation-inducing factor 2 modulates chemotaxis via the histidine kinase DhkC-dependent pathway in *Dictyostelium discoideum*. **FEBS Lett.** 590, 760-768. (2016). 査読有.
DOI: 10.1002/1873-3468.12111.
- ③ Oladimeji P, Kubohara Y, Kikuchi H, Oshima Y, Rusch C, Skerl R, & Diakonova M. A Derivative of Differentiation-Inducing Factor-3 Inhibits PAK1 Activity and Breast Cancer Cell Proliferation. **Int. J. Cancer Clinic. Res.** 2, 3. (2015). 査読有.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4682050/>
- ④ Nguyen VH, Kikuchi H, Kubohara Y, Takahashi K, Katou Y, & Oshima Y. Development of novel DIF-1 derivatives that selectively suppress innate immune responses. **Bioorg. Med. Chem.** 23, 4311-4315. (2015). 査読有.
DOI: 10.1016/j.bmc.2015.06.027.
- ⑤ Kubohara Y, Komachi M, Homma Y, Kikuchi H, & Oshima Y. Derivatives of *Dictyostelium* differentiation-inducing factors inhibit lysophosphatidic acid-stimulated migration of murine osteosarcoma LM8 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 463, 800-805. (2015). 査読有.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.016.
- ⑥ Kubohara Y, Kikuchi H, Matsuo Y, Oshima Y, & Homma Y. Properties of a non-bioactive fluorescent derivative of differentiation-inducing factor-3, an anti-tumor agent found in *Dictyostelium discoideum*. **Biology Open** 3, 289-296. (2014). 査読有.
DOI: 10.1242/bio.20146585.
- ⑦ 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). 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0072118.
- ⑧ Yamada Y, Kubohara Y, Kikuchi H, Oshima Y, Wang HY, Ross S, & Williams JG. The *Dictyostelium* prestalk inducer DIF-1 directs phosphorylation of a bZIP transcription factor. **Int. J. Dev. Biol.** 57, 375-381. (2013). 査読有.
DOI: 10.1387/ijdb.130046jw.
- ⑨ Kikuchi H, Kubohara Y, Hai VN, Katou Y, & Oshima Y. Novel chlorinated dibenzofurans Isolated from the cellular slime mold, *Polysphondylium filamentosum*, and their biological activities. **Bioorg. Med. Chem.** 21, 4628-4633. (2013). 査読有.
DOI: 10.1016/j.bmc.2013.05.022.
- ⑩ Nakajima-Shimada J, Hatabu T, Hosoi Y, Onizuka Y, Kikuchi H, Oshima Y, & Kubohara Y. Derivatives of *Dictyostelium discoideum* differentiation-inducing factor-3 suppress the activities of *Trypanosoma cruzi* in vitro and in vivo. **Biochem. Pharmacol.** 85, 1603-1610. (2013). 査読有.
DOI: 10.1016/j.bcp.2013.03.007.
- ⑪ Kikuchi H, Matsuo Y, Katou Y, Kubohara Y, & Oshima Y. Isolation, synthesis and biological activity of biphenyl and *m*-terphenyl-type compounds from *Dictyostelium* cellular slime molds. **Tetrahedron** 68, 8884-8889. (2012). 査読有.
DOI: 10.1016/j.tet.2012.08.041.
- ⑫ Tanaka S, Masuda Y, Honma C, Hosaka K, Takahashi K, & Kubohara Y. Manganese promotes phorbol ester-induced interleukin-2 production via AP-1 activation in Jurkat T-cells. **Toxicol. Lett.** 211, 312-318. (2012). 査読有.
DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.04.015.
- [学会発表] (計 11 件)
- ① 中島徹、田中進、田中佑季、秋山琉璃、久保原禪、保坂公平「Jurkat T細胞においてマイトジェン刺激で活性化される転写調節因子のマンガンによる影響」日本生化学会第88回大会 2015年12月3日 京都国際会議場(京都府京都市)
- ② 河原田律子、中村彰男、高橋克典、菊地晴久、大島吉輝、久保原禪「1型糖尿病モデルラットの血糖値に対するDIF-1(経口投与)の効果」日本細胞性粘菌学会第5回例会 2015年10月10日 弘前大学(青森県弘前市)
- ③ 桑山秀一、久保原禪「DIF-2による粘菌走化性運動の制御メカニズム」日本細胞性粘菌学会第5回例会 2015年10月10日 弘前大学(青森県弘前市)
- ④ 牧岡優佳、山本菜々子、久保原禪、細見修「ヒトがん細胞が高発現するマーカーとオリゴ糖添加による影響」第29回日本キチン・キトサン学会大会 2015年8月20日 東海大学熊本キャンパス(熊本県熊本市)
- ⑤ 中島徹、田中進、田中佑季、秋山琉璃、久保原禪、保坂公平「マイトジェン刺激したJurkat T細胞のサイトカイン産生に対するマンガンの効果」日本生化学会第87回大会 2014年10月18日 京都国際会議場(京都府京都市)
- ⑥ Van Hai Nguyen、菊地晴久、久保原禪、大島吉輝「細胞性粘菌由来化合物DIF-1誘導体の自然免疫抑制作用とその構造活性相関」日本細胞性粘菌学会第4回例会 2014年10月11日 東北大学(宮城県仙台市)
- ⑦ 久保原禪、菊地晴久、大島吉輝、桑山秀

一「Glutathione S-transferase 4 (GST4) is a putative binding protein for DIFs that regulate the size of fruiting bodies in *D. discoideum*」日本細胞性粘菌学会第4回例会 2014年10月11日 東北大学(宮城県仙台市)

⑧ 嶋田淳子、細井友夏里、畑生俊光、菊地晴久、大島吉輝、久保原禪「南米シヤーガス病の病原虫トリパノソーマに対する DIF の効果」日本細胞性粘菌学会第3回例会 2013年10月13日 京都大学(京都府京都市)

⑨ 久保原禪、菊地晴久、松尾祐介、大島吉輝、本間好「生物活性の無い DIF-3 蛍光体の特性」日本細胞性粘菌学会第3回例会 2013年10月13日 京都大学(京都府京都市)

⑩ 高橋克典、村上正巳、菊池晴久、大島吉輝、久保原禪「細胞性粘菌由来の薬理活性物質によるインターロイキン-2(IL-2)発現制御」第59回日本臨床検査医学学術集会 2012年11月30日 京都国際会議場(京都府京都市)

⑪ 久保原禪、菊地晴久、松尾祐介、大島吉輝、本間好「HeLa細胞における DIF 蛍光体の局在と機能」日本細胞性粘菌学会第2回例会 2012年11月17日 東京大学(東京都)

〔図書〕(計 2件)

① 久保原禪 他、アイピーシー社、「細胞性粘菌(研究の新展開)～モデル生物、創薬資源、バイオ～」2012、全552頁。

② 久保原禪、小島至 他、上毛新聞社、「生活習慣病研究の最前線～メタボ、老化、がん研究から、iPS細胞まで」2012、全69頁。

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: 抗菌剤

発明者: 久保原禪、菊地晴久、大島吉輝

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-160596

出願年月日: 2014年8月6日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 4件)

名称: インターロイキン-2産生抑制剤

発明者: 久保原禪、村上正巳、高橋克典、大島吉輝、菊地晴久

権利者: 群馬大学、東北大学

種類: 特許

番号: 特許第5630751号

取得年月日: 2014年10月17日

国内外の別: 国内

名称: 走化性運動制御剤

発明者: 久保原禪、岡島史和、小町麻由美、

桑山秀一、大島吉輝、菊地晴久

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 特許第5626755号

取得年月日: 2014年10月10日

国内外の別: 国内

名称: 抗トリパノソーマ剤およびトリパノソーマ症治療薬

発明者: 久保原禪、嶋田淳子

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 特許第5610433号

取得年月日: 2014年9月12日

国内外の別: 国内

名称: 新規 DIF-1 誘導體

発明者: 久保原禪

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 特許第5476650号

取得年月日: 2014年2月21日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=5490>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

小島 至 (KOJIMA, Itaru)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号: 60143492

(3) 研究分担者

大島 吉輝 (OSHIMA, Yoshiteru)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 00111302