

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：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460334

研究課題名(和文) G1期阻害物質DIFの抗腫瘍薬としての臨床応用に向けた橋渡し研究

研究課題名(英文) Examination of the in vivo effect of DIF, an inhibitor of G1 phase transition derived from Dictyostelium, as a new anti-cancer drug

研究代表者

高橋 富美 (Takahashi, Fumi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50274436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Differentiation-inducing factor (DIF；細胞性粘菌分化誘導因子)は細胞性粘菌が分泌する化学物質であるが、哺乳類の腫瘍細胞にも増殖抑制作用を持つことが報告されている。本研究は腫瘍細胞に対し強力な増殖抑制作用を持つDIF-1またはDIF様物質の抗悪性腫瘍薬としての臨床応用を目指すものである。

本研究では、複数の動物モデル(担がんモデルマウス、自然大腸がん発症モデルマウス、悪性黒色腫肺転移モデルマウス)を用いて、経口投与によるDIFの抗腫瘍効果についての検討を行い、いずれのモデルにおいてもDIFによる抗腫瘍効果が確認できた。

研究成果の概要(英文)：We reported that differentiation-inducing factor-1 (DIF-1), synthesized by Dictyostelium discoideum, inhibited proliferation of various tumor cell lines in vitro. However, it remained unexplored whether DIF-1 also inhibits tumor growth in vivo. In the present study, therefore, we examined in-vivo effects of DIF-1 using three cancer models: Mutyh-deficient mice with oxidative stress-induced intestinal tumors and nude mice xenografted with cancer cells, and lung metastasis model mice.

We found that oral administrated DIF-1 significantly suppressed tumor growth in all examined models.

研究分野：分子薬理学

キーワード：新規抗腫瘍薬 経口抗腫瘍薬

1. 研究開始当初の背景

Differentiation-inducing factor (DIF: 細胞性粘菌分化誘導因子) は細胞性粘菌 *Dictyostelium* が分泌する化学物質で、粘菌の分化を誘導する物質として単離され構造が決定されたが、その活性は粘菌にとどまらず哺乳類の腫瘍細胞や血管平滑筋細胞にも増殖抑制作用を持つことが報告されていた。しかしながら、その分子基盤については標的分子を含めて明らかとされていなかった。我々は DIF の作用機序を明らかにするために検討を行い、DIF が種々のヒト由来がん細胞株の細胞周期を G₁ 期で停止させることを初めて見だし、glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) 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その分子基盤であることを報告した。

従来型の抗腫瘍薬の大部分は細胞周期のなかで、DNA 複製期である S 期と分裂期である M 期をターゲットにしているが、これらの薬剤は、がん細胞のみならず増殖の速い細胞 (白血球系の細胞など) に致死作用をもたらし、しばしば重篤な副作用 (有害反応) が現れる。一方、G₁ 期、特にその早期は、増殖・分化の決定がなされる重要な時期であるとともに、数多くのがん遺伝子・がん抑制遺伝子の産物が働いていることが知られており、新しい抗腫瘍薬のターゲットとして注目されている。しかし現在のところ G₁ 期をターゲットとする抗腫瘍薬は少ない。

種々のがん細胞で過剰発現が報告されており、オンコジーンとして位置づけられているサイクリン D1 は、外界からの増殖刺激を受けて G₁ 期早期に発現が誘導されるタンパク質であり、外界からの増殖刺激を細胞周期系に伝える調節分子センサーとして機能する。またサイクリン D1 はがん細胞の増殖のみならず、腫瘍の増大および転移に大きな役割を果たす血管新生の過程でも、血管内皮細胞増殖のためのセンサーとして機能していることから、サイクリン D1 は G₁ 期特異的抗腫瘍薬の期待できるターゲットと言える。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍細胞に対し強力な増殖抑制作用を持つ DIF-1 または DIF 様物質の抗悪性腫瘍薬としての臨床応用を目指すものである。この中で本申請課題では、DIF-1 の抗腫瘍活性評価を 3 種類の異なった病態モデルマウスを用いて行い、DIF-1 の経口抗腫瘍薬としての可能性についての検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト大腸がん由来 HCT-116 細胞、マウス悪性黒色腫 B16BL6 細胞の培養には 10% ウシ胎仔血清を加えた DMEM 培地を用いた。

(2) 恒常的ホタルルシフェラーゼ発現 B16BL6 細胞株の樹立

ホタルルシフェラーゼ発現用ベクターに薬剤耐性遺伝子を組み込み、薬剤を用いたスクリーニングを行うことにより、恒常的ホタルルシフェラーゼ発現 B16BL6 細胞株を樹立した。

(3) DIF-1 の経口投与

大豆油に DIF-1 を溶解し、マウスに経口投与を行った。

(4) ノードマウスを用いた DIF-1 投与と腫瘍の増大に対する効果の評価

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞をノードマウス背部皮下にマトリゲルとともに注入した。DIF-1 を大豆油で溶解したものを経口投与し、3 週間後に腫瘍の摘出を行った。摘出腫瘍塊は重量を測定後分割し、ウエスタンブロットのサンプルを作成し、タンパク質の解析を行った。

(5) 大腸がんモデルマウスを用いた DIF-1 投与と腫瘍の増大に対する効果の評価

DNA 修復遺伝子のひとつである *MutYh* を欠損したノックアウトマウスに 2% 臭素酸カリウム溶液を 12 週間飲水させることにより、小腸がんを形成した。その後 4 週間 DIF-1 および DIF-3 の経口投与を行った。摘出小腸は重量を測定後分割し、ウエスタンブロットのサンプルを作成し、タンパク質の解析を行った。

(6) 悪性黒色腫の肺転移モデルマウスを用いた DIF-1 投与と腫瘍の増大に対する効果の評価

マウス由来悪性黒色腫細胞 B16BL6 の恒常的ルシフェラーゼ発現細胞を樹立し、これをマウス尾静脈より注入し、肺転移モデルを作製した。その後、2 週間 DIF-1 および DIF-3 の経口投与を行った。摘出肺は重量を測定後分割し、ウエスタンブロットのサンプルを作成し、タンパク質の解析を行った。

(7) ウエスタンブロット

摘出サンプルを破砕後、SDS-PAGE にてタンパク質を分離した。タンパク質を転写したメンブレンを一次抗体 (cyclin D1、GAPDH) と反応させ、抗体と結合したタンパク質を検出した。

(8) ルシフェラーゼ活性測定

摘出サンプルを破砕後遠心し、上清を用いてルシフェラーゼ活性測定を行った。

4. 研究成果

ヌードマウスの背部皮下にヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa をマトリゲルと混入して注入し、腫瘍を形成させ、このマウスに大豆油に溶解した DIF-1 を経口にて3週間投与を行ったところ、コントロール群と比較して腫瘍の増大を抑えることができた(図1)。

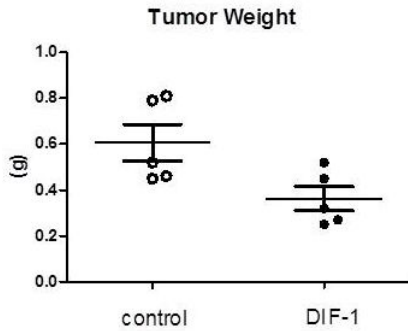


図1

また、大腸がん細胞株 HCT-116 を用いて同様の実験を行ったところ、大腸がん細胞株においてもコントロール群と比較して腫瘍の増大を抑えることができた(図2)。

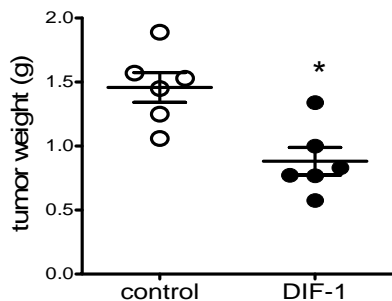


図2

さらに、Mutyh ノックアウトマウスを使った実験においても、小腸に形成された腫瘍の数および平均直径が DIF-1 および DIF-3 の投与により明らかに減少した(図3、4)。

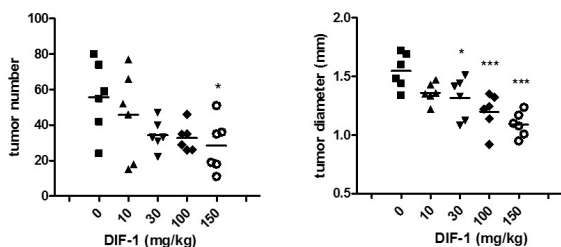


図3

また、悪性黒色腫転移モデルにおいても DIF-1 の経口投与により、明らかな転移抑制

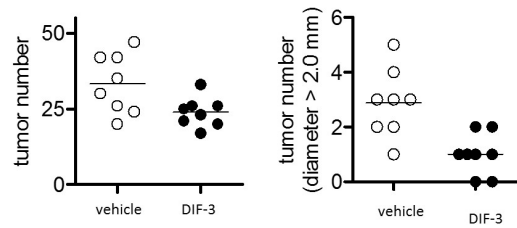


図4

効果が認められた(図5)。

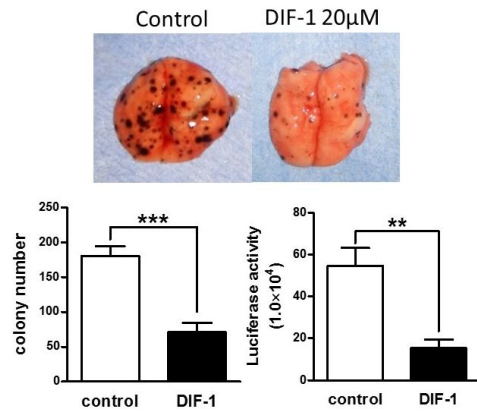


図5

以上の結果から、DIF は新規経口抗腫瘍薬として使用できる可能性が示唆された。

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 2件)

1. Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Jingushi K, Igawa K, Tomooka K, Watanabe Y, Morimoto S, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nakabeppu Y, Sasaguri T. (2014) DIF-1 inhibits tumor growth in vivo reducing phosphorylation of GSK-3 and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice. *Biochem Pharmacol* 89(3), 340-348 doi: 10.1016/j.bcp.2014.03.006. 査読あり
2. Kubokura N, Takahashi-Yanaga F, Arioka M, Yoshihara T, Igawa K, Tomooka K, Morimoto S, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nakabeppu Y, Matsumoto T, Kitazono T, Sasaguri T. (2015) Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth in vitro and in vivo. *J Pharmacol Sci* 127(4), 446-455. doi: 10.1016/j.jphs.2015.03.005 査読あり

[学会発表](計 8 件)

1. 有岡 将基、高橋 富美、笹栗 俊之 DIF-1 inhibits proliferation, infiltration and metastasis of malignant melanoma through GSK-3 activation <DIF-1 は GSK-3 の活性化を介して悪性黒色腫の増殖・浸潤・転移を抑制する> 第89回 日本薬理学会学術総会 2016/3/10 横浜
2. 高橋 富美、久保倉 尚哉、笹栗 俊之 Differentiation-inducing factor-3 は培養細胞および生体内で腸管腫瘍の増殖を抑制する 第36回 日本臨床薬理学会年会 2015/12/9 東京
3. 有岡 将基、高橋 富美、笹栗 俊之 DIF-1 は GSK-3 の活性化を介して悪性黒色腫に抗腫瘍効果をもたらす第36回 日本臨床薬理学会年会 2015/12/9 東京
4. 高橋 富美、久保倉 尚哉、中津 可道、續 輝久、中別府 雄作、笹栗 俊之 Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth in vitro and in vivo <DIF-3 は培養系および生体系において腸管腫瘍増殖を抑制する> 第74回 日本癌学会学術総会 2015/10/10 名古屋
5. 有岡 将基、高橋 富美、笹栗 俊之 DIF-1 exerts antitumor activity by suppressing the Wnt/ - catenin signaling pathway in melanoma cell line B16BL6 <Wnt/ -カテニンシグナルの抑制により DIF-1 は悪性黒色腫に抗腫瘍作用をもたらす> 第74回 日本癌学会学術総会 2015/10/9 名古屋
6. 久保倉 尚哉、高橋 富美、笹栗 俊之 Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth in vitro and in vivo < Differentiation-inducing factor-3 は培養細胞とモデルマウスにおいて腸腫瘍の増殖を抑制する> 第88回 日本薬理学会学術総会 名古屋
7. 高橋 富美、中津 可道、續 輝久、中別府 雄作、笹栗 俊之 DIF-1 inhibits tumor growth in vivo reducing phosphorylation of GSK-3 and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 <DIF-1 は GSK-3 のリン酸化抑制と cyclin D1 および TCF7L2 の発現低下により抗腫瘍効果を発揮する> 第73回 日本癌学会学術総会 2015/9/26 横浜
8. 高橋 富美第 GSK 3 と創薬 がん、心

不全、骨疾患の新規治療法を探る 12
回 口腔医科学フロンティア(3/8:東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 富美 (TAKAHASHI FUMI)
九州大学・医学研究院・講師
研究者番号：50274436

(2)連携研究者

井川 和宣 (IGAWA KAZUNOBU)
九州大学・先端物質化学研究所・助教
研究者番号：80401529