

36. 細胞性粘菌分化誘導因子 DIF の抗がん作用標的分子の同定

笹栗 俊之

九州大学 大学院医学研究院 生体情報科学講座 臨床薬理学分野

Key words : DIF, Wnt/ β -カテニン系, 悪性黒色腫, がん浸潤, がん転移

緒言

我々は、細胞性粘菌に由来する低分子化合物 DIF (主に DIF-1 と DIF-3) がもたらす細胞増殖抑制効果およびその作用機序について研究を続けてきた¹⁻⁹⁾。DIF は、種々のがん細胞や血管細胞の細胞周期を G0/G1 期で可逆性かつ完全に拘束するが、その主たる機序は、DIF が GSK-3 の活性化を通じてサイクリン D1 の分解を強力に促すこと、また β -カテニンの分解を促進して β -カテニン/TCF 依存性転写を抑制することによりその標的遺伝子 (サイクリン D1 も含まれる) の発現を強力に抑制することだと考えている。さらに、DIF-1 および DIF-3 の生体内動態と抗がん効果について、がんモデルマウスを用いて調査を行った結果、経口投与で血中濃度は十分上昇し、かつ骨髄抑制などの重篤な有害反応を起こすことなく抗がん効果を発揮することを認めた^{8,9)}。

従来型抗がん薬の大部分は S 期と M 期を阻害するため、増殖の速い骨髄や消化管の細胞にも強い傷害を与え、しばしば重篤な有害反応をもたらす。最近増えている分子標的型抗がん薬も、選択毒性は高まっているものの、しばしば重篤な有害反応を引き起こす。

種々のがん細胞で過剰発現が認められるサイクリン D1 は、外界からの増殖刺激を細胞周期系に伝えるセンサー分子で、G1 期早期に誘導される。また、腫瘍血管新生の過程でも内皮細胞増殖のセンサーとして働いている。サイクリン D1 を著減させ G0/G1 期で細胞周期を停止させる DIF は、興味深いことに、通常の濃度ではほとんど細胞毒性を示さず、増殖抑制は可逆性である。この性質を利用すれば、がん細胞の死滅はもたらさないかもしれないが、がん細胞を長く静止期にとどめ、正常細胞に対しては毒性の極めて小さいユニークな抗がん薬を作ることができるのではないかと期待できる。

しかし、直接的な DIF の標的分子 (DIF 結合タンパク質) はまだ同定されていない。そこで、本研究では、DIF の標的分子を探索し、同定することを目指した。また、悪性黒色腫細胞を用いて、増殖のみならず浸潤・転移について DIF がどのような効果をもたらすか、機序を含めて検討を行った。

方法および結果

1. DIF 結合タンパク質探索のための PEG 化 DIF の作製

幅広い分子と分子を結合させうる九員環 (九員環アルキン) と窒素が三つ連なったアジ基を持つ分子を混ぜると、触媒なしで簡単に分子同士が結合する¹⁰⁾。この全く新しい手法を用いて DIF 分子が結合するタンパク質の探索を行うため、DIF 分子の化学修飾を行うことにした。まず、DIF 分子の 2 位水酸基へポリエチレングリコール (PEG) を結合させた PEG 化 DIF-1 を作製した (図 1)。また、同様に PEG 化 DIF-3 も作製した。

HeLa 細胞の細胞増殖とサイクリン D1 タンパク質発現に対するこれらの効果を検討したところ、PEG 化 DIF-1、PEG 化 DIF-3 では、DIF-1、DIF-3 と同様の活性は得られないことが明らかとなった。そこで現在、他の部位への化学修飾導入を検討している。

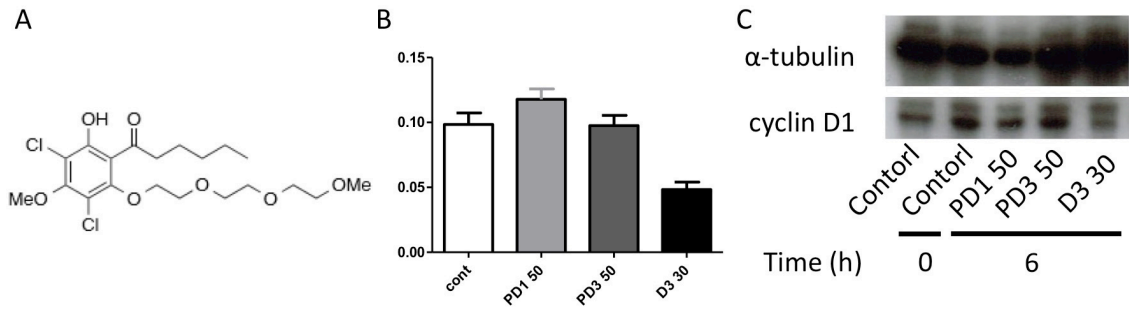


図1. PEG化DIFとその細胞増殖抑制活性

A) PEG化DIF-1の構造。B) PEG化DIF-1 (PD1)、PEG化DIF-3 (PD3)の増殖抑制活性。Cell counting kit-8 (Dojindo)にて測定した吸光度 (OD460)を示す。D3: DIF-3。濃度の単位は μM 。C) PEG化DIF-1、PEG化DIF-3のサイクリンD1発現への効果。

2. 悪性黒色腫細胞においてDIF-1はGSK-3を介して細胞増殖を抑制する

マウス悪性黒色腫由来細胞株B16BL6細胞を用いて、DIF-1の細胞増殖に及ぼす効果を検討した。まず、DIF-1はB16BL6細胞の増殖を強力に抑制し(図2A)、フローサイトメトリー解析によりG0/G1期およびG2/M期で細胞周期を拘束することがわかった(図2B)。また、DIF-1は不活性型であるSer21リン酸化GSK-3 α およびSer9リン酸化GSK-3 β を減少させることでGSK-3を活性化させ(図2C)、基質であるサイクリンD1およびc-Mycの分解を誘導することをウエスタンブロット法で確認した(図2D)。

さらに、DIF-1はcanonical Wntシグナル伝達系の転写因子である β -カテニンおよびTCF7L2を減少させることにより、TCF依存性の転写活性を抑制することがわかった(図3)。これらの結果は、他の細胞種における以前の結果と基本的に一致していた。

3. 悪性黒色腫細胞においてDIF-1はGSK-3を介さずに細胞遊走および浸潤を抑制する

DIF-1にがん転移抑制効果があるか否かについては調べられていない。そこで、B16BL6細胞を用いて、がんの転移成立に不可欠である細胞遊走・浸潤にDIF-1が及ぼす効果を検討した。細胞遊走はwound healing assayを用いて、細胞浸潤は、 $10\mu\text{g}$ のMatrigelをコーティングしたBoyden chamberを用い、10%ウシ血清を誘導因子としたmigration assayを行って解析した。また、GSK-3の関与を調べるために選択的GSK-3阻害薬であるSB216763を用いた。DIF-1は細胞遊走を抑制したが、SB216763はその効果に影響しなかった。また細胞浸潤も抑制したが、SB216763は影響を与えなかった。したがって、DIF-1はGSK-3を介さずに細胞遊走・浸潤を有意に抑制することが明らかとなった(図4A, B)。さらにその機序として、がん細胞遊走・浸潤に深く関与するmatrix metalloproteinase-2 (MMP-2)のタンパク質発現を有意に減少させることがわかった(図4C)。

4. 悪性黒色腫肺転移モデルマウスにおいて、DIF-1経口投与は肺コロニー形成を抑制する

ルシフェラーゼを恒常的に発現させたB16BL6細胞を8週齢の雌のマウスに 1×10^5 個静脈注射することで、悪性黒色腫肺転移モデルを作製した。マウスは3グループに振り分けた(Control群:大豆油の経口投与、Vehicle群:大豆油の経口投与およびB16BL6細胞の静注あり、DIF-1群:DIF-1の経口投与およびB16BL6細胞の静注あり)。DIF-1は週5日、12時間毎に朝300 mg/kgと夜150 mg/kgを経口投与した。B16BL6細胞の注入14日後にマウスを安楽死させ、肺を採取し、表面のコロニー数をカウントし、破碎したのちにルシフェラーゼ活性とタンパク質発現の解析を行った。

DIF-1の経口投与は肺コロニー形成を顕著に抑制した(図5A)。さらに、*in vitro*実験同様、サイクリンD1、c-Myc、TCF7L2、MMP-2のタンパク質発現を抑制した(図5B)。

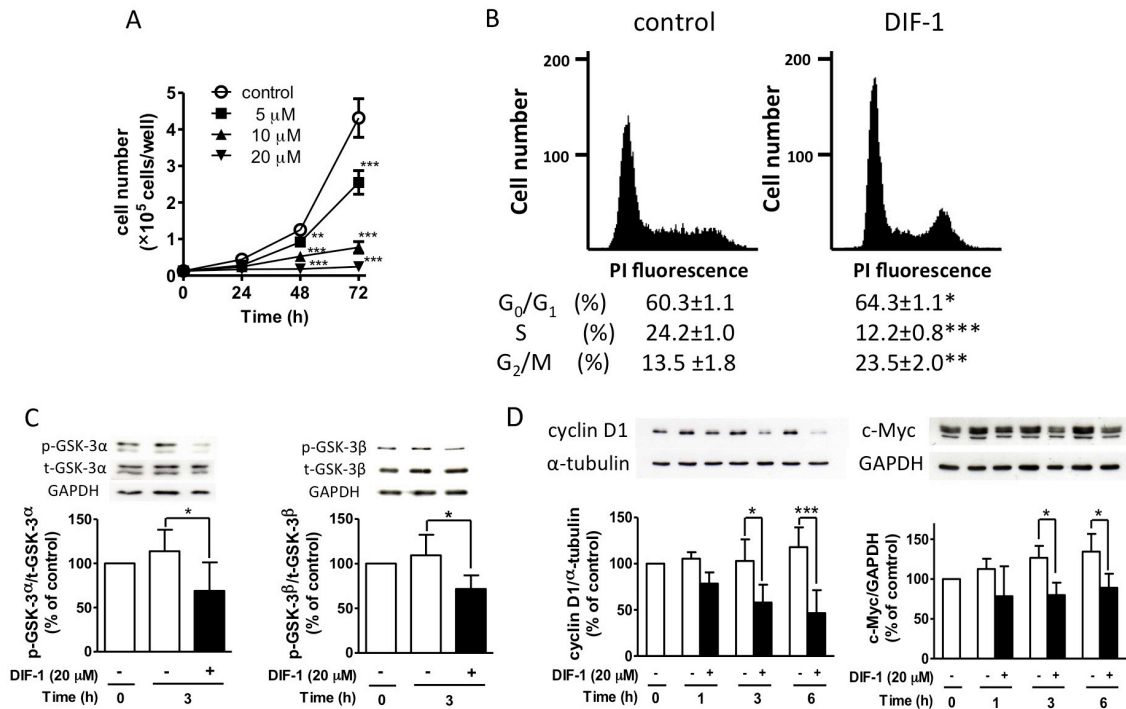


図2. DIF-1の悪性黒色腫細胞増殖への効果

A) 細胞増殖曲線。B) フローサイトメトリー解析による細胞周期解析。C) GSK-3 α とGSK-3 β のリン酸化への効果。D) サイクリンD1、c-Mycのタンパク質発現への効果。AとCでは one-way ANOVA と Bonferroni の多重比較検定、Bでは Student の t 検定、Dでは two-way ANOVA と Tukey の多重比較検定を行った。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001。

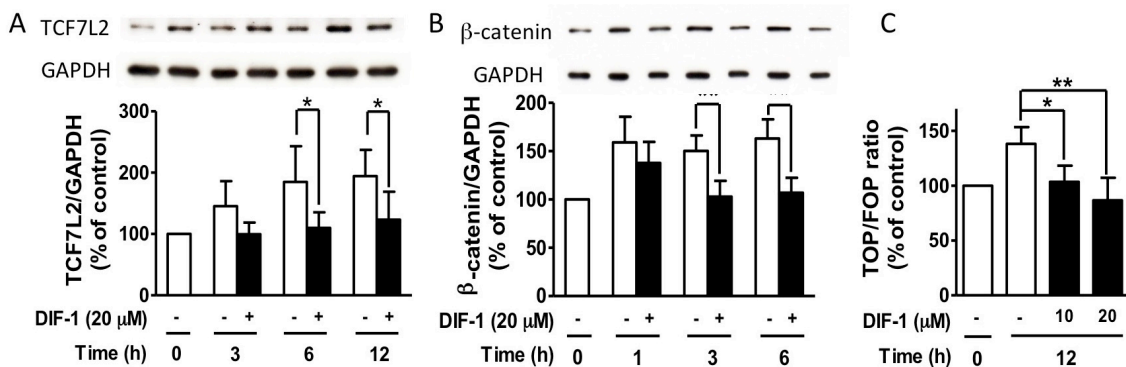


図3. DIF-1のWnt/ β -カテニン系への効果

A) DIF-1のTCF7L2のタンパク質発現への効果。B) β -カテニンのタンパク質発現への効果。C) TCF依存性転写活性への効果。AとBでは two-way ANOVA と Tukey の多重比較検定、Cでは one-way ANOVA と Bonferroni の多重比較検定を行った。*P < 0.05、**P < 0.01。

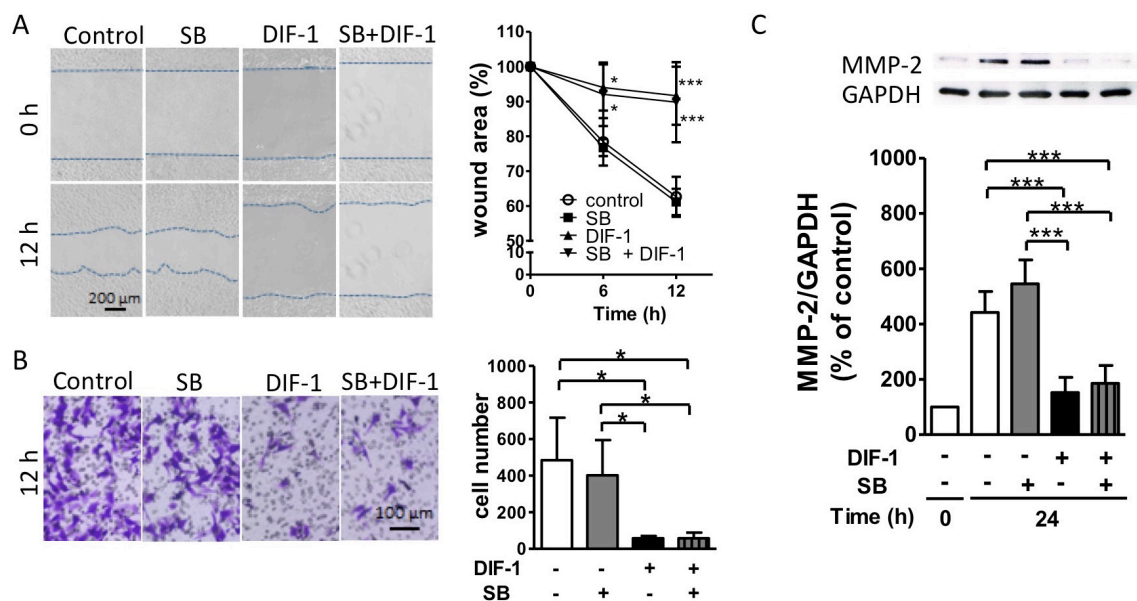


図 4. DIF-1 の細胞遊走・浸潤への効果

A) Wound healing assay. B) Migration assay. C) MMP-2 のタンパク質発現への効果。SB: SB216763。すべて one-way ANOVA と Bonferroni の多重比較検定を行った。*P < 0.05、***P < 0.001。

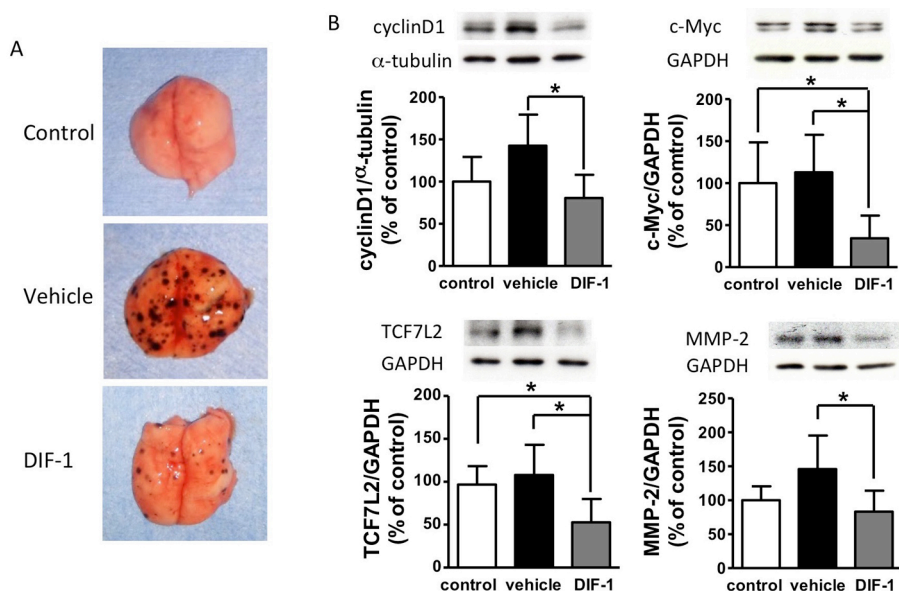


図 5. DIF-1 の悪性黒色腫肺転移への効果

A) DIF-1 の転移性肺腫瘍コロニー形成への効果。B) 肺組織におけるサイクリン D1、c-Myc、TCF7L2、MMP-2 のタンパク質発現への効果。One-way ANOVA と Bonferroni の多重比較検定を行った。*P < 0.05。

考 察

今回 DIF の標的分子を探索・同定するために行った DIF 分子の化学修飾は、残念ながら DIF の活性を喪失させてしまった。この結果を受け、現在、化学修飾部位についてさらに検討を行っている。しかし、悪性黒色腫を用いた検討によって、DIF の作用機序に関する新しい知見を得ることができた。

DIF-1 は、過去に検討した大腸癌、子宮頸癌、扁平上皮癌、骨肉腫などと同様に、悪性黒色腫細胞においても GSK-3 を介してサイクリン D1 および c-Myc の発現減少を誘導することにより細胞増殖を抑制すると考えられた。しかし、悪性黒色腫細胞は他の細胞よりも DIF-1 への感受性が高く、また G2/M 期でも細胞周期を拘束していたことから、別の機序が働いている可能性がある。

また今回の検討により、DIF-1 は、GSK-3 を介さない経路により細胞遊走・浸潤を抑制することが明らかになった。これらの抑制機序には MMP-2 の発現低下が関与している可能性がある。MMP-2 発現の調節機序に関しては今後さらに検討していく。

本研究は、DIF-1 が増殖抑制効果を発揮するだけでなく、浸潤・遊走・転移にも抑制効果を発揮することを明らかにし、さらに GSK-3 を介さない他の経路も存在することを示した。今後、DIF-1 あるいはその誘導体を新規抗がん薬としての創薬に結びつけるため、標的分子をはじめ詳細な作用機序をさらに解明していく。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院医学研究院の有岡将基、高橋富美、久保桃子、九州大学先端物質化学研究所の井川和宣、友岡克彦である。

文 献

- 1) Miwa Y, Sasaguri T, Kosaka C, Taba Y, Ishida A, Abumiya T, Kubohara Y. Differentiation-inducing factor-1, a morphogen of dictyostelium, induces G1 arrest and differentiation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000 Jan 7-21;86(1):68-75.
- 2) Takahashi-Yanaga F, Taba Y, Miwa Y, Kubohara Y, Watanabe Y, Hirata M, Morimoto S, Sasaguri T. Dictyostelium differentiation-inducing factor-3 activates glycogen synthase kinase-3 β and degrades cyclin D1 in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):9663-70. DOI: 10.1074/jbc.M205768200
- 3) Mori J, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Watanabe Y, Hirata M, Morimoto S, Shirasuna K, Sasaguri T. Differentiation-inducing factor-1 induces cyclin D1 degradation through the phosphorylation of Thr286 in squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res*. 2005 Nov 1;310(2):426-33. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.07.024
- 4) Takahashi-Yanaga F, Mori J, Matsuzaki E, Watanabe Y, Hirata M, Miwa Y, Morimoto S, Sasaguri T. Involvement of GSK-3 β and DYRK1B in differentiation-inducing factor-3-induced phosphorylation of cyclin D1 in HeLa cells. *J Biol Chem*. 2006 Dec 15;281(50):38489-97. DOI: 10.1074/jbc.M605205200
- 5) Matsuzaki E, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Hirata M, Watanabe Y, Sato N, Morimoto S, Hirofujii T, Maeda K, Sasaguri T. Differentiation-inducing factor-1 alters canonical Wnt signaling and suppresses alkaline phosphatase expression in osteoblast-like cell lines. *J Bone Miner Res*. 2006 Aug;21(8):1307-16. DOI: 10.1359/jbmr.060512
- 6) Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Shiraishi F, Morimoto S, Watanabe Y, Hirata M, Hoka S, Sasaguri T. Anti-angiogenic effects of differentiation-inducing factor-1 involving VEGFR-2 expression inhibition independent of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Cancer*. 2010 Sep 16;9:245. DOI: 10.1186/1476-4598-9-245
- 7) Jingushi K, Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Shiraishi F, Watanabe Y, Hirata M, Morimoto S, Sasaguri T. DIF-1 inhibits the Wnt/ β -catenin signaling pathway by inhibiting TCF7L2 expression in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2012 Jan 1;83(1):47-56. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.10.001
- 8) Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Jingushi K, Igawa K, Tomooka K, Watanabe Y, Morimoto S, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nakabeppu Y, Sasaguri T. DIF-1 inhibits tumor growth in vivo reducing phosphorylation of GSK-3 β and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice. *Biochem Pharmacol*. 2014 Jun 1;89(3):340-8. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.03.006
- 9) 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. Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth in vitro and in vivo. *J Pharmacol Sci*. 2015 Apr;127(4):446-55. DOI: 10.1016/j.jphs.2015.03.005
- 10) Ni R, Mitsuda N, Kashiwagi T, Igawa K, Tomooka K. Heteroatom-embedded medium-sized cycloalkynes: concise synthesis, structural analysis, and reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015 Jan 19;54(4):1190-4. DOI: 10.1002/anie.201409910