

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4452829号
(P4452829)

(45) 発行日 平成22年4月21日(2010.4.21)

(24) 登録日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G O 1 N	33/15	(2006.01)	G O 1 N	33/15	Z
G O 1 N	33/50	(2006.01)	G O 1 N	33/50	Z
A 6 1 K	31/05	(2006.01)	A 6 1 K	31/05	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	

請求項の数 3 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-166839 (P2005-166839)
 (22) 出願日 平成17年6月7日(2005.6.7)
 (65) 公開番号 特開2006-340615 (P2006-340615A)
 (43) 公開日 平成18年12月21日(2006.12.21)
 審査請求日 平成18年9月29日(2006.9.29)

(73) 特許権者 504145364
 国立大学法人群馬大学
 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100090516
 弁理士 松倉 秀実
 (74) 代理人 100089244
 弁理士 遠山 勉
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (72) 発明者 久保原 禪
 群馬県前橋市国領町1-11-27-12
 O2号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞性粘菌を利用した医薬候補物質のスクリーニング法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞性粘菌の培養系に化合物又は化合物を含む画分を添加し、細胞性粘菌の分化を誘導する化合物を糖代謝促進剤の候補物質として取得することを特徴とする、糖代謝促進剤の候補物質のスクリーニング方法。

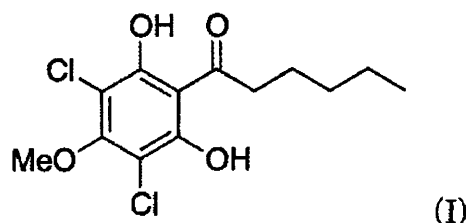
【請求項2】

細胞性粘菌がディクチオステリウム ディスコイディウム (*Dictyostelium discoideum*) である、請求項1に記載のスクリーニング方法。

【請求項3】

ディクチオステリウム ディスコイディウムが下記式(1)で示されるDIF-1を産生しない変異株である、請求項2に記載のスクリーニング方法。

【化1】



【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞性粘菌の培養系を利用した簡便な医薬候補物質のスクリーニング法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

新規医薬の開発は、社会の重要課題の1つである。その医薬開発の方法の1つとして、各種培養細胞の変化（分化状態や細胞増殖）を指標として天然物質や人工化合物の効果を検定し、医薬候補物質をスクリーニングする方法がある。従来、いろいろな細胞が医薬候補物質のスクリーニングに利用されており、たとえば、各種癌細胞を *in vitro* 培養して、サンプル化合物が癌細胞の増殖を抑制することができるかどうか評価することによって、抗癌剤の候補物質のスクリーニングが行われている。また、天然化合物（混合物）をこのようなスクリーニング系にかけ効果を確認しながら、混合物の中から有効成分を分離、精製することも行われている。

10

しかしながら、各種哺乳類細胞を利用した薬剤スクリーニングは相当数試みられており、従来の方法では、混合物中の既知の成分の効果がむしろ判定の邪魔になって、新規成分を分離、精製することが難しくなるケースもでてくる。

そこで、医薬候補物質をスクリーニングするための新たな細胞系の確立が必要となってくる。

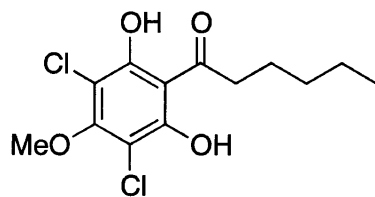
【0003】

20

下等真核生物である細胞性粘菌は、発生過程において2種類の細胞（孢子と柄細胞）より成る子実体を形成する。柄細胞への分化には、細胞が分泌している脂溶性低分子DIF-1（式（1））が必要であることが知られている。これまでに、細胞性粘菌の分化を指標として医薬候補物質のスクリーニングが行われたことはなかった。

【0004】

【化1】



(I)

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、新たな細胞培養系を利用した医薬候補物質のスクリーニング法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

40

本発明者は上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。その結果、細胞性粘菌の分化を誘導する化合物の中に、細胞増殖抑制作用や糖代謝促進作用などの薬効を発揮する化合物が存在することを発見した。このことから、細胞性粘菌の分化を指標にすることにより抗腫瘍剤や抗糖尿病剤などの医薬候補物質をスクリーニングできることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 細胞性粘菌の培養系に化合物又は化合物を含む画分を添加し、細胞性粘菌の分化を誘導する化合物を医薬候補物質として取得することを特徴とする、医薬候補物質のスクリーニング方法。

50

(2) 細胞性粘菌がディクチオステリウム ディスコイディウム (*Dictyostelium discoideum*) である、(1) のスクリーニング方法。

(3) ディクチオステリウム ディスコイディウムがDIF-1を産生しない変異株である、(2) のスクリーニング方法。

(4) 医薬候補物質が抗腫瘍剤の候補物質である、(1) ~ (3) のいずれかのスクリーニング方法。

(5) 医薬候補物質が糖代謝促進剤の候補物質である、(1) ~ (3) のいずれかのスクリーニング方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明のスクリーニング方法によれば、抗腫瘍剤や抗糖尿病剤などの医薬の候補物質を簡便に効率よくスクリーニングすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下に本発明を詳しく説明する。

本発明においては、細胞性粘菌の細胞分化を指標にして医薬候補物質をスクリーニングする。

細胞性粘菌の種類は特に制限されないが、世界的に研究に使用されている種としては、ディクチオステリウム ディスコイディウム (*Dictyostelium discoideum*)、*Dictyostelium mucoroides* (ディクチオステリウム ムコロイデス)、*Dictyostelium purpureum* (ディクチオステリウム パープリウム)、*Polysphondylium violaceum* (ポリスフォンデリウム ビオラシウム) などが挙げられる。この中では、ディクチオステリウム属の微生物が好ましく、特にディクチオステリウム ディスコイディウム (*Dictyostelium discoideum*) が好ましい。

細胞性粘菌は、自らが産生するDIF-1のような分化誘導因子の働きにより、アメーバ状の未分化細胞から細胞壁を有する柄細胞 (Stalk cell) に分化する (図1)。本発明においては、細胞性粘菌の培養系に化合物または化合物を含む画分を添加し、このような分化誘導因子様の働きをする化合物を選択する。

なお、細胞性粘菌の細胞分化は、上記のような柄細胞への分化を指標にしてもよいし、その他の形態への分化、例えば、孢子細胞への分化を指標にしてもよい。

【0010】

細胞性粘菌の培養系は、in vitroの単層培養などが挙げられる。例えば、適当な条件下で増殖させた細胞性粘菌の未分化細胞を、化合物又は化合物を含む画分を添加した分化誘導用培地に移して培養する。分化誘導用の培地には、サイクリックAMP (cAMP)、及び塩を加えることが好ましい。分化誘導用培地としては、例えば、5 mM cAMP, 2 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM MES-KOH, pH 6.2の培地を用いることができる。抗生物質を添加してもよい。

化合物を添加した分化誘導用培地での2日程度の培養により、柄細胞に分化した細胞は図1のように形態が変化する (液胞化して丸くなる) ため、位相差顕微鏡による観察によって簡単に判別することができる。

【0011】

なお、ディクチオステリウム ディスコイディウムを用いて化合物の分化誘導能を評価する場合、内因性の分化誘導因子DIF-1の影響をなくすために、DIF-1を産生しない変異株を用いることが好ましい。このような変異株としては、HM44株が挙げられる。HM44株は、粘菌研究者のHome page (<http://dictybase.org/>) からアクセス可能な「粘菌Stock Center」があり、そこから入手可能である。

ただし、本発明の方法に用いることのできる菌株はこれに限定されず、野生型の細胞性粘菌を紫外線や変異誘導剤、遺伝子操作などで変異処理し、DIF-1を産生できない菌株を選択することによって得られる菌株などを用いてもよい。

【0012】

10

20

30

40

50

添加する化合物の種類は特に制限されないが、低分子化合物、ペプチド、タンパク質、ポリマーなどが挙げられ、複数の種類の化合物を含む化合物ライブラリーの状態で添加してもよい。また、化合物を含む画分としては、細胞、植物、動物、カビ、キノコ、その他の微生物などからの抽出物や細胞培養上清などが挙げられる。このような画分を用いた場合、細胞性粘菌の分化誘導活性を示す画分について、さらに、分子量や電気的性質の違いなどを利用した各種分離法によって分離、分画を行い、活性を示す化合物を同定する。

【0013】

後述の実施例に示すように、細胞性粘菌の分化を促進する化合物の中に、癌細胞増殖抑制効果や糖代謝促進作用を有する化合物が含まれることが明らかとなった。したがって、上記のようにして選択された細胞性粘菌の分化を促進する化合物について、癌細胞増殖抑制効果や糖代謝促進作用などの薬理評価を行うことで抗腫瘍剤や抗糖尿病剤・抗肥満剤などの医薬の候補化合物を得ることができる。

10

薬効評価方法は特に制限されないが、例えば、白血病細胞の培養系に化合物を添加し、化合物が細胞の増殖を阻害し、再分化を誘導するかどうかの評価や、任意の細胞培養系に化合物を添加し、化合物が細胞による培地中の糖の消費を促進するかどうかの評価などが挙げられる。

【実施例】

【0014】

以下に実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

20

【0015】

(実施例1)

DIFを合成できない粘菌変異株HM44細胞を用いて、in vitro培養を行った。

DIFを生産できない粘菌変異株HM44細胞は、in vitro culture では柄細胞に分化できない。それに対して、外からDIF-1を与えてやればDIF-1の濃度に依存した数の柄細胞分化が起こる(図2)。

このHM44のin vitro culture系を利用して、外から加えた化合物に柄細胞分化誘導能があるか否かを検定した。分化した柄細胞は、位相差顕微鏡観察によって判別し、分化比率に基づいて分化誘導活性を定量化した。

【0016】

30

具体的には以下の手順に従って試験を行った。

未分化HM44細胞をバクテリアKlebsiella aerogenesと共に寒天培地(4.4 g KH_2PO_4 , 2 g Na_2HPO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.5 g glucose, 10 g Bacto-peptone, 1 g Yeast extract, 15 g agarを1 literの水に溶かし加熱後、agarを固めた培地)上で、21 インキュベーター内にて培養、増殖させた。なお、Klebsiella aerogenesは粘菌の餌として加えた。

次に、増殖した細胞を塩溶液(10 mM NaCl, 10 mM KCl:以下BSSと呼ぶ)で集め、遠心分離(1500~2500 rpm)によってバクテリアと分離し、BSSを加え何度か洗浄した。集めた細胞を 2×10^5 cells/well: 約 5×10^4 cells/cm²の細胞濃度で12-well plateに播き、試験化合物 2 nM を含む0.5 mL/wellの塩溶液(5 mM cAMP, 2 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 200 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate, 10 mM MES-KOH, pH 6.2:以下Stalk saltsと呼ぶ)で、21 で48時間培養した。

40

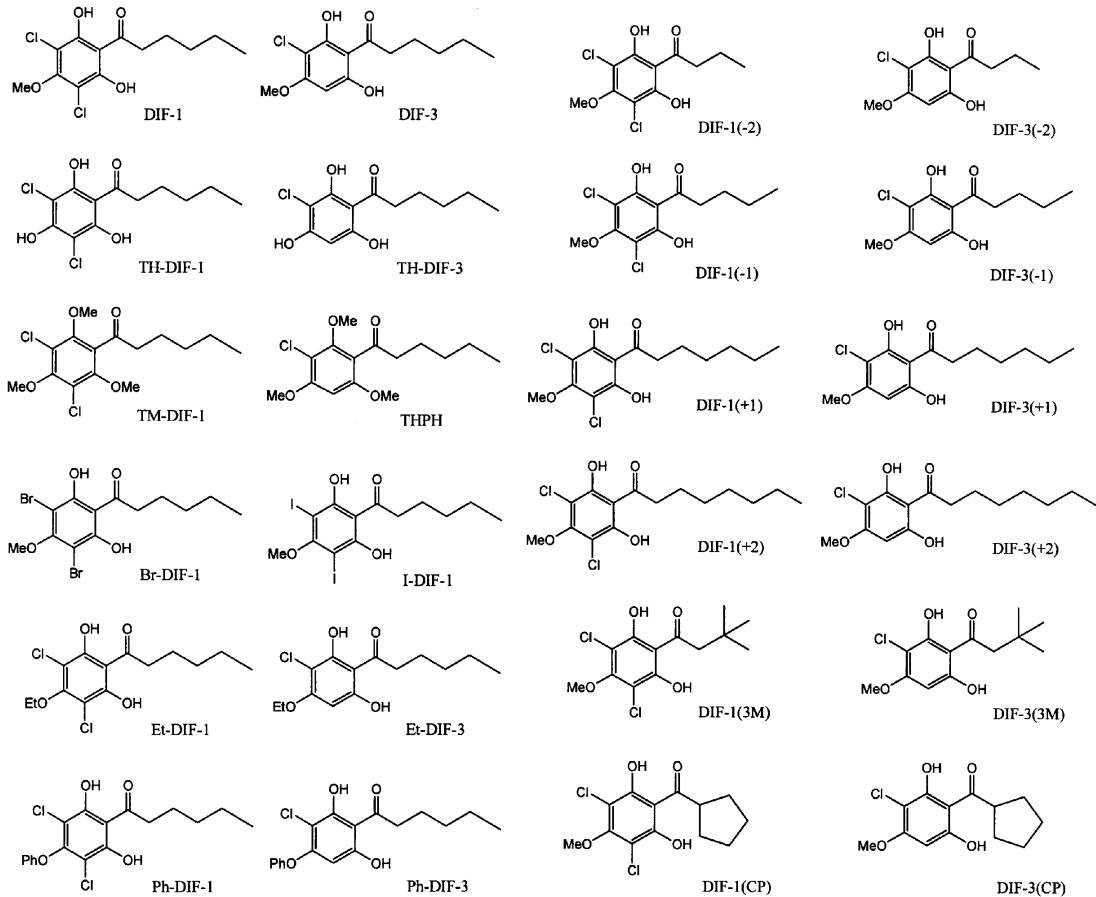
培養後、分化した柄細胞を位相差顕微鏡にて観察し、分化比率を算出した。

【0017】

下記に示す種々のDIF-1の構造類似体を人工的に合成し、それらの粘菌細胞分化に及ぼす作用を上記HM44細胞の検定系を用いて比較検討した(図3)。図3の値は、4回の独立実験の結果の平均と標準偏差を示している。これによると、評価した化合物のうちの多くがHM44細胞を分化させる活性を有することがわかった。

【0018】

【化2】



10

20

【0019】

(実施例2)

抗腫瘍活性の評価

K562ヒト白血病細胞に、上記DIF-1およびDIF-1類似化合物を15 μ M添加して培地中で *in vitro* 培養した。2日後に腫瘍細胞数を測定し、DIF様因子の増殖抑制能を調べた(図4)

30

この結果から、図3で柄細胞分化誘導活性を有していた化合物が、抗腫瘍活性も有することがわかった。これにより、柄細胞分化誘導物質が抗腫瘍剤の候補となりうることがわかった。

【0020】

(実施例3)

糖代謝促進活性の評価

マウス3T3L1繊維芽細胞を培地1ml中(12穴のプラスチック容器中)でコンフルエント状態になるまで数日間培養した。次に、DIF-1の溶剤である0.2%エタノールのみを加えた栄養培地(EtOH)、10 μ MのDIF-1またはその構造類似体(エタノールに溶解)を加えた栄養培地で、それぞれ12時間ほど培養し、培地中のブドウ糖の濃度を測定し、それぞれの細胞の糖代謝の速度を計算し、コントロール(EtOH)に対する比で表した(図5)。その結果、DIF-1及びその構造類似体の存在下では、細胞の糖代謝速度が上がる事が明らかとなった。なお、図5の値は4回の独立実験結果の平均と標準偏差である。

40

この結果から、図3で柄細胞分化誘導活性を有していた化合物が、糖代謝促進活性も有することがわかった。これにより、柄細胞分化誘導物質が抗糖尿病剤や抗肥満剤などとして有用な糖代謝促進剤の候補となりうる事がわかった。

なお、ここでは、DIF-1とその類似化合物について、粘菌分化誘導能や腫瘍細胞増殖抑

50

制能、糖代謝促進能を調べたが、それ以外の化合物についても、同様に粘菌分化誘導能を有する化合物をスクリーニングし、得られた化合物について腫瘍細胞増殖抑制能、糖代謝促進能などを調べてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】ディクチオステリウム ディスコイディウムの野生株のin vitroでの柄細胞分化の模式図。

【図2】ディクチオステリウム ディスコイディウムのDIF-1産生変異株のin vitroでの柄細胞分化の模式図。

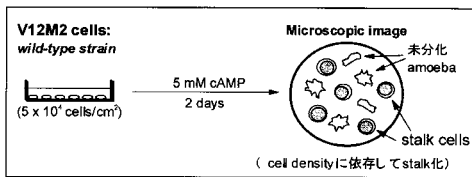
【図3】各化合物のディクチオステリウム ディスコイディウムの柄細胞分化誘導活性を示す図。

10

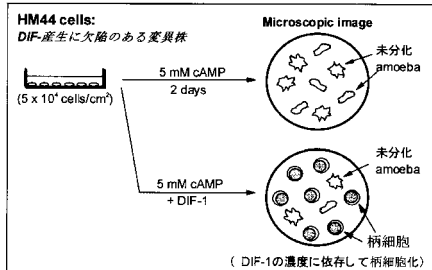
【図4】各化合物の白血球細胞増殖阻害活性を示す図。

【図5】各化合物の3T3L1細胞の糖代謝を促進する活性を示す図。

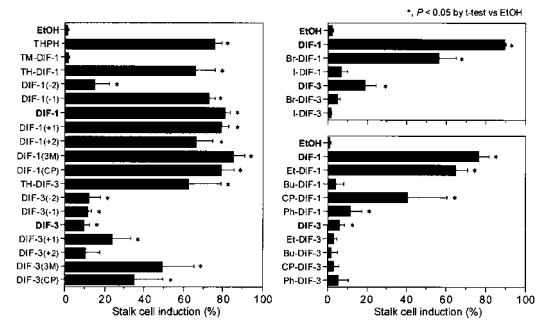
【図1】



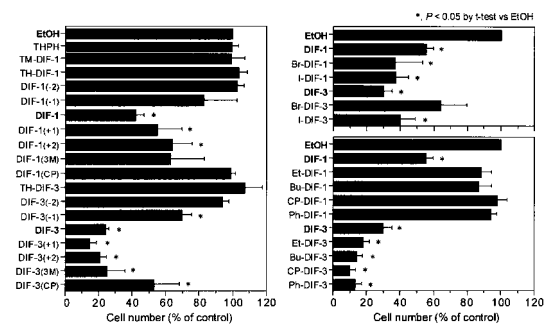
【図2】



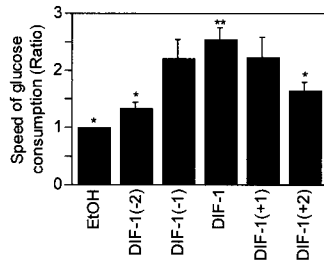
【図3】



【図4】



【 5 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 特表2004-516891(JP,A)
FEBS Lett., vol. 322, pages 73-75 (1993)
FASEB J., vol. 8, pages 869-874 (1994)
J. Natl. Cancer Inst., vol. 95, pages 990-1000 (2003)
Glycobiology, vol. 8, pages 373-381 (1998)
Cell, vol. 33, pages 397-403 (1983)
Mol. Cell, vol. 6, pages 1509-1514 (2000)
Develop. Growth Differ., vol. 49, pages 253-264 (2007)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 2
G 0 1 N 3 3 / 1 5
G 0 1 N 3 3 / 5 0
A 6 1 K 3 1 / 0 5
A 6 1 P 3 / 1 0
A 6 1 P 3 5 / 0 0
C A / B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I)