

氏 名 (生年月日)	すぎやま ゆうき 杉山 雄輝 (1993 年 8 月 6 日)
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	博 薬 第 224 号
学位授与の日付	2023 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	クマリン系化合物を基礎としたがん転移抑制薬の探索および 7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin のがん転移抑制作用の検証
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 芦 原 英 司 (副査) 教 授 加 藤 伸 一 (副査) 教 授 古 田 巧

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序章

薬学・医学の進歩により、多くの抗がん薬、分子標的治療薬が開発されているが、がん転移の有無は治療成績に大きな影響を与え、がん転移のある患者の生命予後は今もなお不良である。これまで、血管内皮細胞増殖因子やマトリックスメタロプロテアーゼを標的とした化合物が開発されたが、臨床段階におけるがん転移抑制効果は認められず、様々な副作用も確認され治療薬にまでは至っていない。以上のことから、新たな作用機序を有するがん転移抑制薬の開発は、がん治療における重要課題の 1 つである。これまで、本学が所有する化合物ライブラリーから転移抑制化合物のスクリーニングが行われ、クマリン系化合物の 1 つである 7,8-dihydroxycoumarin (daphnetin) が、がん転移の重要なステップである浸潤・遊走を抑制することが報告されている。しかし、daphnetin の浸潤・遊走抑制作用の詳細な作用機序や *in vivo* におけるがん転移抑制薬としての有効性は明らかとされていない。

本研究では、初めに細胞増殖抑制を示さない濃度域で浸潤抑制作用を有するクマリン系化合物を探索した。次に、その結果発見した 7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin (DHC) の作用機序の解明を進めるとともに、*in vivo* におけるがん転移抑制作用を検討した。

### 第 1 章 浸潤・遊走抑制作用を有するクマリン系化合物の探索

浸潤・遊走抑制作用を有するクマリン系化合物を探索するため、マトリゲルでコーティングされたトランスウェルチャンバーを用いた評価系により、肺への転移能が高いマウス骨肉腫 LM8 細胞を用い、ベンズアルデヒド誘導体から合成した 3-phenylcoumarin 誘導体 (27 化合物) の活性評価を行った。その結果、27 化合物の中で 18 化合物が、細胞増殖に影響を及ぼさない濃度域で LM8 細胞の浸潤を有意に抑制することが明らかになった。さらに、daphnetin 処置により浸潤した細胞数が  $56 \pm 8\%$  ( $30 \mu\text{M}$ ) に減少した (無処置時の浸潤細胞数を 100%とした) のに対して、DHC では  $14 \pm 4\%$  ( $30 \mu\text{M}$ ) と daphnetin よりも強力な浸潤抑制作用を示した。また、DHC は遊走抑制作用も有するとともに、高転移性ヒト骨肉腫細胞 (143B 細胞) に対しても浸潤・遊走抑制効果を示すことが明らかとなった。

## 第2章 7,8-Dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin (DHC) の薬理評価

### 第1節 浸潤・遊走抑制作用を有する DHC の作用機序解明

前章で明らかとなった DHC の浸潤・遊走抑制作用の機序を解明するために、マウス骨肉腫 LM8 細胞およびヒト骨肉腫 143B 細胞に対して、DHC 処置による細胞運動に関わる細胞内アクチンフィラメント形成への影響を、ファロイジンを用いた蛍光染色法を用いて検証した。その結果、DHC 処置により濃度依存的な細胞内アクチンフィラメント形成阻害が確認された。この細胞内アクチンフィラメントの形成を制御する低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現レベルについて、ウェスタンブロッティング法を用いて評価し、低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現は DHC 処置により低下することが明らかとなった。次に、低分子量 GTP 結合型タンパク質の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法により評価したが、DHC 処置により低分子量 GTP 結合型タンパク質の遺伝子発現の低下は認められなかった。また、RNA シークエンス解析では、低分子量 GTP 結合型タンパク質の遺伝子発現には変化を認めなかったが、ユビキチン・プロテアソーム系の中で低分子量 GTP 結合型タンパク質の分解に関与する F-box ファミリー遺伝子発現の上昇を認めた。

上述の結果を踏まえて、DHC 処置による低分子量 GTP 結合型タンパク質のタンパク質レベルのみでの発現低下は、細胞内タンパク質分解系の亢進によると仮説を立てた。そこでタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を用い、LM8 細胞の細胞内タンパク質分解系に対する DHC の影響を評価した。CHX 処置による低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現低下は DHC 前処置により劇的に早められた。以上のことから、DHC 処置による細胞内タンパク質分解系の亢進が、低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現低下を介した細胞内アクチンフィラメント形成を阻害し、浸潤・遊走が抑制されることが示唆された。

### 第2節 *In vivo* における DHC のがん転移抑制効果の検討

前節で述べた *in vitro* での浸潤・遊走抑制作用に加えて、*in vivo* における DHC のがん転移抑制効果を検討した。本検討では、LM8 細胞に *Luciferase* 遺伝子と *GFP* 遺伝子をレンチウイルスベクターにて導入し樹立した LM8-Luc/GFP 細胞、および LM8 細胞の由来となる C3H マウスを用いた。LM8-Luc/GFP 細胞を C3H マウスの左側腹部の皮下に移植し、移植後 12 日目に移植部位の腫瘍を摘出した自然転移マウスモデルを作製し評価した。このモデルは全例に肺や肝臓への転移を認め、移植後 50 日以内で死亡する。移植日同日から DHC を 20 mg/kg または 50 mg/kg、1 日 1 回、連日経口投与した。その結果、いずれの薬物投与群においても移植後 35 日目における生体発光が減少し、生存期間は有意に延長した。

### 総括

本研究により、細胞増殖抑制を示さず、daphnetin よりも強力に浸潤・遊走抑制作用を有するクマリン系化合物として DHC を見出した。DHC は細胞内タンパク質分解系の亢進を介した低分子量 GTP 結合型タンパク質発現の減少により、細胞内アクチンフィラメントの形成を阻害することで骨肉腫細胞の浸潤・遊走を抑制した。また自然転移マウスモデルにおいて、DHC はがん転移を抑制し、生存期間を有意に延長した。本研究の成果は、細胞運動を抑制する DHC が、これまで開発が困難であったがん転移抑制薬として有望であることを示した、新規の転移抑制薬創出につながる意義ある知見である。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

がん転移のある患者の生命予後は今もなお不良であるが、これまで開発された化合物では、臨床段階におけるがん転移抑制効果は認められず、様々な副作用も確認され治療薬にまでは至っていない。以上のことから、新たな作用機序を有するがん転移抑制薬の開発は、がん治療における重要課題の 1 つである。これまで、本学が所有する化合物ライブラリーから転移抑制化合物のスクリーニングが行われ、クマリン系化合物の 1 つである 7,8-dihydroxycoumarin (daphnetin) が、がん転移の重要なステップである浸潤・遊走を抑制することが報告されている。しかし、daphnetin の浸潤・遊走抑制作用の詳細な作用機序や *in vivo* におけるがん転移抑制薬としての有効性は明らかとされていない。

本論文では、初めに細胞増殖抑制を示さない濃度域で浸潤抑制作用を有するクマリン系化合物を見出し、その結果発見した 7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin (DHC) の作用機序の解明を進めるとともに、*in vivo* におけるがん転移抑制作用を検討した。

### 《審査結果》

第 1 章では、ベンズアルデヒド誘導体から合成した 3-phenylcoumarin 誘導体 (27 化合物) の浸潤抑制作用の評価を行った。その結果、27 化合物の中で 18 化合物が、細胞増殖に影響を及ぼさない濃度域で LM8 細胞の浸潤を有意に抑制することが明らかになった。さらに、DHC は daphnetin と比較して強力な浸潤抑制作用を示すだけでなく、遊走抑制作用も示し、高転移性ヒト骨肉腫細胞 (143B 細胞) に対しても浸潤・遊走抑制効果を示すことが明らかとなった。以上より、DHC は本論文で述べられた 3-phenylcoumarin 誘導体の中で、有望ながん転移抑制薬の候補となり、骨肉腫細胞に対して細胞増殖に影響を及ぼさない濃度域で浸潤・遊走抑制作用を示した。

第 2 章では、第 1 章で見出した DHC の薬理作用の検証と *in vivo* におけるがん転移抑制効果の検討を行った。DHC 処置により濃度依存的な細胞内アクチンフィラメント形成阻害が確認された。DHC 処置による細胞内タンパク質分解系の亢進が、低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現低下を介した細胞内アクチンフィラメント形成を阻害し、浸潤・遊走が抑制されることが示唆された。さらには、自然転移マウスモデルにおいてがん転移抑制効果と生存期間の延長を示した。以上より、DHC はタンパク質分解系の亢進を介した細胞運動を抑制して、がん転移抑制効果示すことが示唆された。

### 《審査の結論》

本論文では、細胞増殖抑制を示さず、daphnetin よりも強力に浸潤・遊走抑制作用を有するクマリン系化合物として DHC を見出した。また、DHC は *in vitro* において、これまで開発されたがん転移抑制薬とは異なる細胞運動を制御することで骨肉腫細胞の浸潤・遊走を抑制した。さらに DHC は、自然転移マウスモデルにおいて、がん転移を抑制し生存期間を有意に延長することを明らかとした。タンパク質分解系の亢進を介して細胞運動を抑制する DHC が、これまで開発が困難であったがん転移抑制薬として有望であることを示した、新規の転移抑制薬創出につながる意義ある知見である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。