

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

2022 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】病態生理学分野

杉山 雄輝

# 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程

氏名 (英字名) : 杉山雄輝 (Yuki Sugiyama)

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

## 序章 (はじめに)

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 qRT-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 日以内に死亡する。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。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また、本論文は、一部、不掲載のデータも含んでいる。

- 1) Yuki Sugiyama, Seikou Nakamura, Yuichi Tokuda, Masakazu Nakano, Yasunao Hattori, Hiroki Nishiguchi, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Masayuki Yamashita, Kei Tashiro, Eishi Ashihara. 7,8-Dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin inhibits invasion and migration of osteosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2023**, 638, 200-209 [第 1 章、第 2 章]. Copyright Elsevier

## 目次

### 略語一覧

序論 .....	1
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 .....	5
1. 緒言 .....	5
2. 実験方法 .....	6
3. 実験結果 .....	13
4. 考察 .....	21
5. 小括 .....	23
第 2 章 7,8-Dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin (DHC) の薬理評価 .....	24
第 1 節 浸潤・遊走抑制作用を有する DHC の作用機序解明 .....	24
1. 緒言 .....	24
2. 実験方法 .....	26
3. 実験結果 .....	31
4. 考察 .....	48
5. 小括 .....	51
第 2 節 <i>In vivo</i> における DHC のがん転移抑制効果の検討 .....	52
1. 緒言 .....	52
2. 実験方法 .....	53
3. 実験結果 .....	56
4. 考察 .....	60
5. 小括 .....	62
総括 .....	63
謝辞 .....	65
引用文献 .....	66
Supplementary information .....	75

## 略語一覧

CDC42	cell division control protein 42
cDNA	complementary DNA
CDX	cell line-derived xenograft
CHX	cycloheximide
daphnetin	7,8-dihydroxycoumarin
DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DHC	7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
eIF2 $\alpha$	eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$
FBS	fetal bovine serum
FBXL19	F-box/leucin-rich repeat protein 19
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDP	guanosine diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GO	gene ontology
GTP	guanosine triphosphate
H&E	hematoxylin and eosin
HIF1 $\alpha$	hypoxia inducible factor 1 $\alpha$
HIV	human immunodeficiency virus
IC <sub>50</sub>	median inhibition concentration
Irf7	interferon regulatory factor 7
IVIS	<i>in vivo</i> imaging system
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MAO	monoamine oxidase
MHC	major histocompatibility complex
MMP	matrix metalloproteinase
NGS	next generation sequencing
NMR	nuclear magnetic resonance
OS	overall survival
PBS	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> -free phosphate buffered saline
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PFA	paraformaldehyde
PFS	progression-free survival
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase

PIGF	placenta growth factor
PVDF	polyvinylidene difluoride
QC	quality control
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RHOA	ras homolog family member A
RIPA	radio immunoprecipitation assay
ROCK	Rho-associated protein kinase
SCF	SKP1-CUL1-F-box protein
SDS- PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sting1	stimulator of interferon response cGAMP interactor 1
TAZ	tafazzin
TLC	thin layer chromatography
Tlr3	Toll-like receptor 3
TPM	transcripts per million
VEGF	vascular endothelial growth factor receptor
VEGFR	vascular endothelial growth factor
YAP	YY1 associated protein
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

## 序論

がんは本邦で死因第1位の疾患であり2021年1年間における死亡数が38万人以上と増加しており(1)、治療薬の開発が求められるアンメット・メディカル・ニーズの対象となる疾患の1つである。がん治療は近年イマチニブ(グリベック®)(2)をはじめとした分子標的薬の登場や、免疫チェックポイント阻害薬ニボルマブ(オプジーボ®)(3)の登場により飛躍的な治療成績の向上を遂げている。

しかし、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不良のままである(4,5)。診断時にがん転移を認めないがん患者において、乳がんをはじめとした多くのがん種では5年生存率は80%以上と高い治療成績を示しており、膵がんや食道がんなど一部のがん種における5年生存率50%以下であるものの、2005年から2015年にかけて10%以上の改善が認められている。診断時に遠隔転移を有するがん患者の5年生存率はいずれのがん種において40%以下であり、2005年から2015年にかけて10%以上の改善が認められるがん種はない(5)。また、術後補助化学療法後に乳がんの遠隔再発を起こした患者の生存期間を評価した疫学調査では、がん患者の生存期間の延長は示されず(6)、転移性非噴門部胃がんに対する化学治療を受けた患者の生存期間を評価した疫学調査でも、化学療法の実施の増加は生存期間の延長につながらなかった(7)。以上のことから、多くの抗がん薬が開発され、がん化学療法が進歩しているにもかかわらず、がん転移を有するがん患者の生命予後は改善されていない。がんの根治を目指す上でがんの転移を阻止するがん転移抑制薬の開発は最重要課題である。

がん細胞の転移にはいくつかの段階がある。初めに原発巣から離れ、がん細胞が移動することを「遊走」という。がん細胞が遊走する際に障害となる細胞外基質タンパク質を分解する。このことを「浸潤」という。その後血管内に侵入し、血管内を移動して遠隔の血管内皮に接着し、再び浸潤および遊走することで原発巣とは異なる場所で転移巣を形成する(8)。がん転移に対する治療において、近年の研究ではがん細胞自身だけに焦点を当てるのではなく、がん細胞周囲の環境、腫瘍微小環境もがん転移を制御するうえで重要だと報告されている(9)。このように、がん転移を制御する標的としていくつもの候補が挙げられ、がん転移に重要となる段階、環境を標的としたがん転移抑制薬の開発が行われている。

今まで開発されてきた代表的ながん転移抑制薬として、matrix metalloproteinase (MMP) を標的とした治療薬が挙げられる(Table 1)。MMPは触媒部分に亜鉛イオンを有するタンパク質分解酵素である。ヒトには23種類のMMPsファミリーが存在し(10)、特にMMP-2やMMP-9は基底膜の主成分であるラミニンやIV型コラーゲンなどの細胞外基質タンパク質の分解に関与しており、がん細胞の浸潤に深く関与する因子となる(11)。Batimastatをはじめとした非選択的MMP阻害薬が開発されたが(12,13)、骨格筋系に対する毒性から、第III相試験で終了した(13)。以降、骨格筋系に対する毒性を弱めることに成功した非選択的MMP阻害薬(Rebimastat)が開発されたが、骨髄抑制に由来する毒性により、第III相試験で終了した(14)。近年では、抗MMP-9抗体であるAndecaliximabが開発されたが、有効性が示されず第III相試験で終了しており(15)、MMP阻害薬は医薬品として上市されるに至っていない。



**Table 1. MMP inhibitors developed to date.**

MMP inhibitors	MMPs targeted by inhibitors	Outcomes	Reference
batimastat	1, 2, 3, 7, 9, 14	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cancelled in phase III clinical trials by development of marimastat</li> </ul>	—
marimastat	1, 2, 3, 7, 9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cancelled in phase III clinical trials</li> <li>• musculoskeletal toxicity (+)</li> <li>• prolonged PFS (-)</li> </ul>	(13)
prinomastat	2, 3, 9, 13, 14	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cancelled in phase III clinical trials</li> <li>• musculoskeletal toxicity (+)</li> <li>• prolonged OS (-)</li> </ul>	(16)
rebimastat	1, 2, 3, 8, 9, 13, 14	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cancelled in phase III clinical trials</li> <li>• neutropenia (+)</li> <li>• prolonged OS (-)</li> </ul>	(14)
andecaliximab	9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prolonged OS (-)</li> </ul>	(15)

PFS, progression-free survival; OS, overall survival

次に、vascular endothelial growth factor (VEGF) とその受容体である vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) を標的とした治療薬の開発が挙げられる。VEGF は血管新生に関与する成長因子であり、血管新生はがん転移を促す (17)。臨床では、VEGF 阻害薬および VEGFR 阻害薬ががん細胞への酸素や栄養因子の供給を阻害する形で抗腫瘍効果を目的として使用されており (Table 2)、近年、免疫チェックポイント阻害薬との併用療法も行われている (18–23)。VEGF を標的の 1 つに組み込んだマルチキナーゼ阻害薬も開発されているが、いずれもがん転移抑制効果は認められていない。さらに、腫がんマウスモデルにおいて、*Vegf* 欠損により hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) 依存的に浸潤するがん細胞が存在することが報告されている (24)。また、ベバシズマブは VEGF 阻害作用とともに代償経路を刺激し、VEGFR の顕著な誘導と VEGFR の活性化を引き起こした結果、がん細胞の運動性と浸潤性を高めることが報告されている (25)。したがって、VEGF や VEGFR 阻害薬はがん転移抑制効果は期待できず、むしろがんの悪性化や転移を促進する可能性が指摘されている。

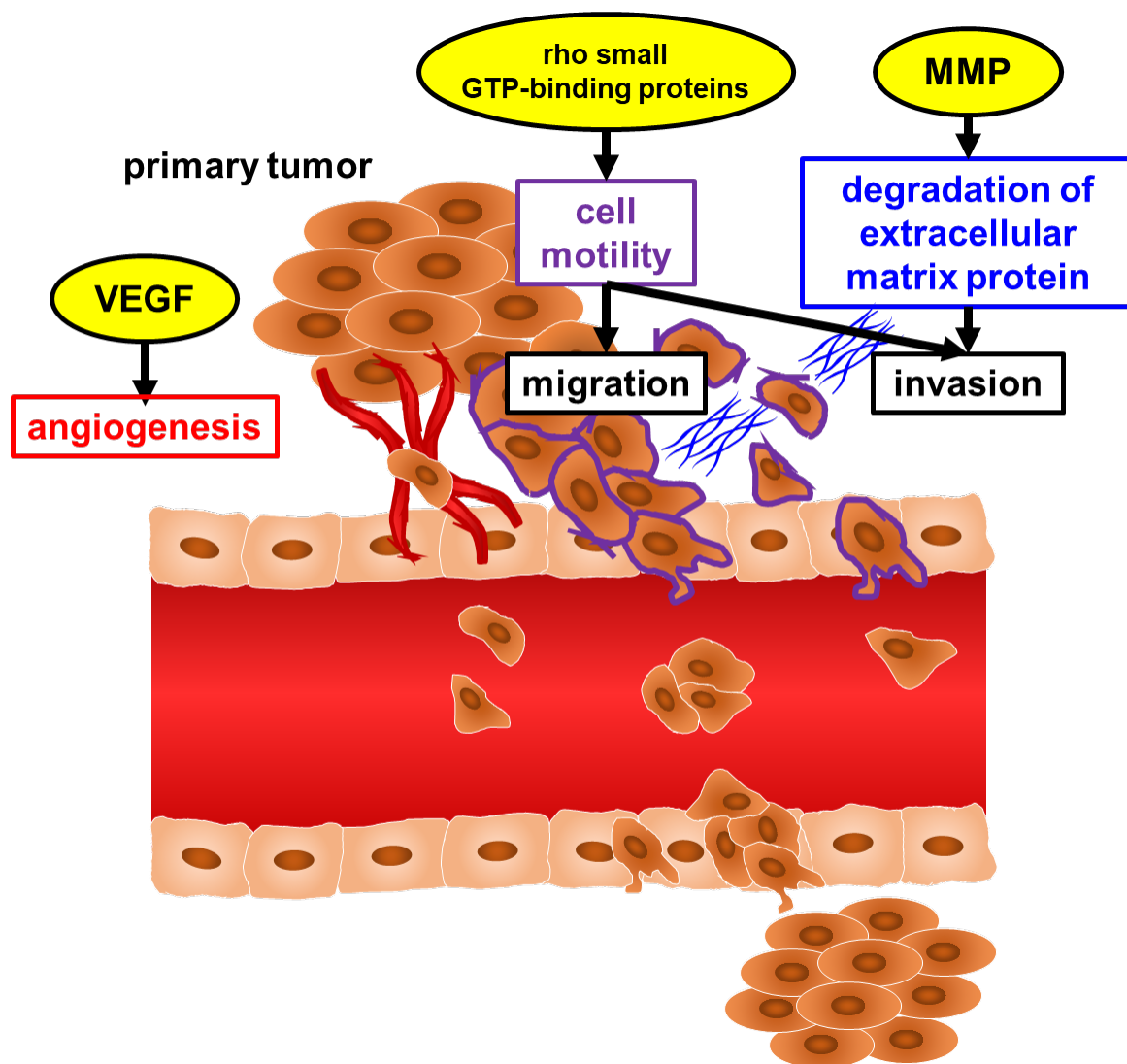
**Table 2. VEGF and VEGFR inhibitors used in clinical settings.**

VEGF/VEGFR inhibitor	VEGF/VEGFR targeted by inhibitors	Year approved
bevacizumab	VEGF-A	2007
regorafenib	VEGFR-2/3 (PDGFR-b, FGFR-1/2, c-Kit, RET, B-Raf)	2013
ramucirumab	VEGFR-2	2015
lenvatinib	VEGFR-1-3 (PDGFR $\alpha$ , FGFR-1-4, c-Kit, RET)	2015
aflibercept	VEGF-A, VEGF-B (PlGF)	2017

PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; PlGF, placenta growth factor

このように、がん転移に対する治療標的としていくつかの分子が着目されてきたが、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。従って、MMP や VEGF/VEGFR とは異なる標的を持つがん転移抑制薬の開発が求められる。浸潤だけでなく遊走にも関与するがん細胞の運動性は、がんの種類に関わらず、がん転移と強く関連している (26)。つまり、がんの細胞運動を制御することによるがん転移を抑制することは、転移性のがんを治療する有効な治療戦略となる可能性がある (26–28)。

細胞運動は細胞自身のアクチンフィラメントにより形成される細胞骨格の動的変化により引き起こされる (29,30)。また、腫瘍微小環境の変化で生じる力、応力、歪みだけでなく、基質の硬さ、接着性からなる機械的刺激を受け、細胞骨格の変化が引き起こされる。この腫瘍微小環境に引き起こされる機械的刺激は機械受容チャネルの発見された 1984 年から研究されてきた (31) が、間質細胞がどのように物理的刺激を生み出しているのか、またがん細胞がどのように物理的刺激を感知しているのか解明されていないことも多い。しかし近年、機械的刺激は低分子量 GTP 結合型タンパク質 (32) や YAP/TAZ 経路 (33)、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/AKT 経路 (34)などを介して細胞骨格の変化を引き起こすことが明らかとなり、細胞運動の制御ががん転移に対する治療戦略として注目されている。



**Figure 1. Factors associated with cancer metastasis.**

Cancer cells in primary tumors migrate from a primary lesion and invade the surrounding area before intravasation. Then, metastatic cells travel as circulating tumor cells through the vasculature and exit at a distant site by “extravasation” to form metastatic tumors. Cell motility, which is involved in migration and invasion, is one factor that regulates cancer metastasis.

本研究では、細胞運動を制御するがん転移抑制薬の開発を目指した。第 1 章では、本学が有するクマリン骨格を有する化合物群のスクリーニングを通して、がん細胞に対して浸潤および遊走抑制作用を示す化合物を探索した。第 2 章では、第 1 章で見出した化合物の *in vitro* における作用機序の解明、*in vivo* におけるがん転移抑制効果の検討を行った。

## 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

### 1. 緒言

1981年から2019年において、承認された全ての医薬品のうち天然物由来の化合物が49.2%を占めるのに対して、承認された抗がん薬のうち天然物由来の化合物は63.2%を占めており、抗がん薬開発において天然物由来の化合物は重要な化合物ライブラリーとなる(35)。天然由来化合物の中でも、クマリンやクマリン誘導体は平面構造を有することから複数の分子を標的とし、抗炎症作用(36)や抗human immunodeficiency virus (HIV)作用(37)、トリグリセリド低下作用(38,39)を有することが報告されている。クマリンの7位と8位に水酸基を有する7,8-dihydroxycoumarin (daphnetin) はジンチョウゲ(沈丁花、*Daphne odora* Thunb.)の主要な二次代謝産物であり(40,41)、アミロイド $\beta$ の蓄積抑制作用(42)や横紋筋の線維化抑制作用(43)、シスプラチン誘発性腎毒性に対する抑制作用(44)を有することが報告されている。

本学病態生理学分野においては、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細胞の浸潤能に対する評価系を立ち上げ、本学生薬学分野が構築した天然由来化合物ライブラリーからがん転移抑制薬を探索した。その結果、daphnetin ががん細胞の細胞運動を制御し、浸潤・遊走抑制作用を示したことを見出した(45)。しかし、細胞運動の制御におけるdaphnetinの詳細な作用機序が解明されておらず、また*in vivo*におけるがん転移抑制薬としての有効性も明らかにされていない。

クマリン系化合物は、抗炎症作用や抗酸化作用などの多様な生物活性を示すことから、その薬理作用に関して、様々な研究が行われている。また、構造的、立体的な観点から、3-phenylcoumarinは、クマリン骨格の3位をベンゼン環で置換することにより、ステロイドホルモン、特にエストロゲンとの関連性に注目されている(46)。3-Phenylcoumarinに対する置換基の導入を行った研究では、アセトキシ基の導入によりがん細胞に対する細胞毒性が増強される(47,48)。さらに、ブロモ基やメトキシ基を導入することでmonoamine oxidase (MAO) 阻害活性が上昇し、水酸基をメトキシ基に置換することでMAO-B 選択的阻害活性が上昇する(49,50)。

本研究では、3-phenylcoumarinを基本骨格として、様々な置換基を導入したクマリン化合物を合成し、細胞毒性を示さない濃度域で浸潤抑制作用を有するがん転移抑制薬のスクリーニングを行った(Figure 2)。また、スクリーニングを通して得られたがん転移抑制薬として有望な化合物について、浸潤だけでなく遊走を制御するがん転移抑制薬であるかについて遊走アッセイを併用して評価した。

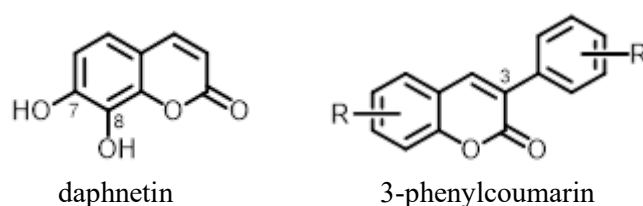


Figure 2. Structure of daphnetin and common structure of 3-phenylcoumarin derivatives.

## 2. 実験方法

### 2-1. 使用細胞

LM8 細胞は、野崎徳洲会病院附属研究所伊藤和幸先生から分与いただいた。LM8 細胞とは、マウス骨肉腫細胞株 Dunn をマウスに尾静脈注射し、肺転移した細胞のみを集める工程を 8 回繰り返すことで、肺転移しやすい細胞株のみを抽出した細胞である。LM8 細胞を正常なマウスの皮下に移植すると、数週間でほぼ 100% 肺に転移巣を形成する (51)。高転移性ヒト骨肉腫細胞 143B 細胞 (52,53) は、Public Health England (London, England) から購入した。

LM8 細胞および 143B 細胞は、37°C、5% CO<sub>2</sub>、95% 空気の環境に設定された CO<sub>2</sub> インキュベーター内で、10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS: Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)、1% penicillin-streptomycin (penicillin の終濃度: 100 units/mL、streptomycin の終濃度: 100 µg/mL、富士フィルム和光純薬、東京) を含んだ Dulbecco's modified Eagle medium {DMEM High Glucose (L-グルタミンおよびフェノールレッド含有、ナカライテスク、京都)} にて培養、維持した。

### 2-2. 7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin (DHC: 化合物 1) の合成

2,3,4-Trihydroxybenzaldehyde (A) を出発原料に用い、4-methoxyphenylacetic acid との縮合および閉環反応により 7,8-diacetoxy-3-(4'-methoxyphenyl)coumarin (化合物 8) を得た。次いで、脱メチル化および脱アセチル化により、7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin (DHC: 化合物 1) へと導いた (Figure 3)。化合物 1 は、化合物 A から 2 工程、収率 35% で合成することができた(54)。NMR のデータ (55–70) は、Table 3 と Table 4 に記載した。

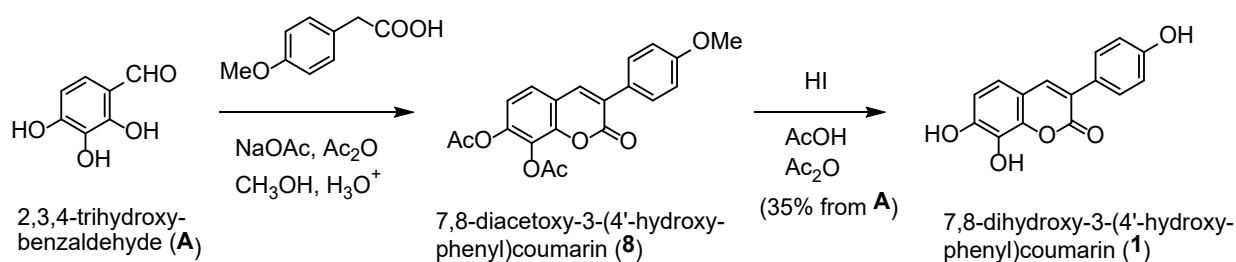


Figure 3. Synthesis of DHC (1).

Table 3. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of compound **1-13**

Compound #	name	<sup>1</sup> H-NMR and <sup>13</sup> C-NMR data	Reference
<b>1</b>	7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) d <sub>H</sub> 6.81 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H-6), 6.83 (2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-3',5'), 7.02 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz, H-5), 7.53 (2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz, H-2',6'), 7.85 (1H, s, H-4); <sup>13</sup> C-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) d <sub>C</sub> 113.8 (C-6), 114.9 (C-3', 5'), 116.1 (C-10), 120.0 (C-5), 124.3 (C-3), 127.8 (C-1'), 130.8 (C-2',6'), 133.1 (C-8), 141.5 (C-4), 144.2 (C-9), 150.4 (C-7), 158.9 (C-4') 163.1 (C-2).	(55)
<b>2</b>	7,8-dihydroxy-3-(3'-hydroxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) d <sub>H</sub> 6.73 (1H, ddd, <i>J</i> = 8.3, 2.4, 0.7 Hz), 6.79 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.04-7.07 (2H, m), 7.10 (1H, t like, <i>J</i> = 2.0 Hz), 7.18 (1H, t like, <i>J</i> = 7.8 Hz), 8.03 (1H, s), 9.20-9.50 (2H, brs), 10.00-10.20 (1H, brs).	(66)
<b>3</b>	7,8-dihydroxy-3-(3'-chlorophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) d <sub>H</sub> 6.81 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz), 7.08 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz), 7.40 (1H, dt like, <i>J</i> = 7.9, 2.0 Hz), 7.44 (1H, t like, <i>J</i> = 7.4 Hz), 7.65 (1H, dt like, <i>J</i> = 7.1, 1.7 Hz), 7.76 (1H, t like, <i>J</i> = 1.9 Hz), 8.20 (1H, s), 9.44 (1H, s), 10.21 (1H, s).	(55)
<b>4</b>	7,8-dihydroxy-3-(3',4'-dihydroxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) d <sub>H</sub> 6.79 (2H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 6.99 (1H, d, <i>J</i> = 9.2 Hz), 7.07 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz), 7.17 (1H, s), 7.95 (1H, s), 9.04 (1H, s), 9.14 (1H, s), 9.34 (1H, s), 10.06 (1H, s).	(63)
<b>5</b>	7,8-dihydroxy-3-(4'-methoxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) d <sub>H</sub> 3.78 (3H, s), 6.77 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz), 6.92 (2H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.00 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.59 (2H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.85 (1H, s).	(55)
<b>6</b>	7,8-dihydroxy-3-(4'-chlorophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) d <sub>H</sub> 6.84 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.11 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz), 7.51 (2H, dt like, <i>J</i> = 8.6, 2.1 Hz), 7.75 (2H, dt like, <i>J</i> = 8.6, 2.3 Hz), 8.18 (1H, s), 9.47 (1H, brs), 10.23 (1H, brs).	(55)
<b>7</b>	7,8-dihydroxy-3-(4'-bromophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) d <sub>H</sub> 6.84 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz), 7.11 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz), 7.62-7.70 (4H, m), 8.18 (1H, s), 9.47 (1H, s), 10.23 (1H, s).	(55)
<b>8</b>	7,8-diacethoxy-3-(4'-methoxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) d <sub>H</sub> 2.33 (3H, s), 2.40 (3H, s), 3.84 (3H, s), 7.00 (2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.22 (1H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.61 (1H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.69 (2H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz), 8.05 (1H, s).	(55)
<b>9</b>	5,7-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) d <sub>H</sub> 6.17 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz), 6.23 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz), 6.76 (2H, dd, <i>J</i> = 8.7, 1.6 Hz), 7.46 (2H, dd, <i>J</i> = 8.7, 2.0 Hz), 7.90 (1H, s), 9.57 (1H, s), 10.31 (1H, s), 10.64 (1H, s).	(64)
<b>10</b>	5,7-dimethoxy-3-(4'-methoxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) d <sub>H</sub> 3.84 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.90 (3H, s), 6.30 (1H, d, <i>J</i> = 2.2 Hz), 6.45 (1H, d, <i>J</i> = 2.2 Hz), 6.95 (2H, dd, <i>J</i> = 6.8, 2.1 Hz), 7.66 (2H, dd, <i>J</i> = 6.8, 2.1 Hz), 8.05 (1H, s).	(64)
<b>11</b>	5,7-dimethoxy-3-(4'-chlorophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) d <sub>H</sub> 3.88 (3H, s), 3.92 (3H, s), 6.32 (1H, d, <i>J</i> = 2.2 Hz), 6.47 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz), 7.39 (2H, dt like, <i>J</i> = 8.6, 2.7 Hz), 7.67 (2H, dt like, <i>J</i> = 8.6, 2.3 Hz), 8.12 (1H, s).	(65)
<b>12</b>	6-hydroxy-3-(3'-hydroxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz) d <sub>H</sub> 6.83 (1H, ddd, <i>J</i> = 8.0, 2.3, 0.9 Hz), 7.06 (1H, dd, <i>J</i> = 8.9, 2.9 Hz), 7.11-7.17 (3H, m), 7.25 (1H, t like, <i>J</i> = 7.9 Hz), 7.27 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz), 9.54 (1H, s).	(76)
<b>13</b>	6-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) d <sub>H</sub> 6.79 (2H, d like, <i>J</i> = 8.8 Hz), 6.96 (1H, dd, <i>J</i> = 8.8, 2.8 Hz), 7.03 (1H, d, <i>J</i> = 2.8 Hz), 7.21 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.55 (2H, d like, <i>J</i> = 8.8 Hz), 8.02 (1H, s), 9.68 (2H, br s like).	(67)

Table 4. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of compound **14-27**

Compound #	name	<sup>1</sup> H-NMR and <sup>13</sup> C-NMR data	Reference
<b>14</b>	6-methoxy-3-(4'-methoxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 3.86 (3H, s), 3.87 (3H, s), 6.97 (1H, d, <i>J</i> = 2.8 Hz), 6.98 (2H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.09 (1H, dd, <i>J</i> = 8.8, 2.8 Hz), 7.29 (1H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.68 (2H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.72 (1H, s).	(66)
<b>15</b>	6-hydroxy- 3-(4'-fluorophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 7.04-7.06 (2H, m), 7.16 (2H, t like, <i>J</i> = 9.0 Hz), 7.23 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz), 7.74 (2H, dd like, <i>J</i> = 9.0, 5.5 Hz), 7.98 (1H, s).	(69)
<b>16</b>	6-methoxy-3-(4'-fluorophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 3.87 (3H, s), 6.97 (1H, d, <i>J</i> = 3.0 Hz), 7.11-7.16 (3H, m), 7.30 (1H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz), 7.70 (2H, dd like, <i>J</i> = 9.0, 5.5 Hz), 7.75 (1H, s).	(70)
<b>17</b>	7-methoxy-3-(4'-chlorophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 3.88 (3H, s), 7.75 (1H, s), 7.63 (2H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz), 7.43 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz), 7.39 (2H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz), 7.84-7.88 (2H, m).	(57)
<b>18</b>	8-hydroxy-3-(3'-hydroxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 6.84 (1H, d, <i>J</i> = 7.7 Hz), 7.10-7.29 (6H, m), 8.16 (1H, s), 9.57 (1H, s), 10.24 (1H, s).	(56)
<b>19</b>	8-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 6.83 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.03 (1H, dd, <i>J</i> = 7.2, 2.4 Hz), 7.10-7.16 (2H, m), 7.58 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.92 (1H, s).	(58)
<b>20</b>	8-hydroxy-3-(4'-chlorophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 6.17 (1H, brs), 7.09-7.22 (2H, m), 7.44 (2H, dd, <i>J</i> = 6.8, 1.9 Hz), 7.65 (2H, dd, <i>J</i> = 6.7, 1.8 Hz), 7.83 (1H, s).	(59)
<b>21</b>	8-methoxy-3-(3'-methoxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 3.84 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.94 (1H, ddd, <i>J</i> = 8.5, 2.5, 0.7 Hz), 7.06-7.11 (2H, m), 7.21 (1H, t like, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.25-7.28 (2H, m), 7.34 (1H, t like, <i>J</i> = 7.9 Hz), 7.78 (1H, s).	(68)
<b>22</b>	8-methoxy-3-(4'-methoxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 3.84 (3H, s), 3.97 (3H, s), 6.96 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.04 (1H, br d, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.10 (1H, br d, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.19 (1H, t like, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.69 (2H, d, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.74 (1H, s).	(60)
<b>23</b>	8-methoxy-3-(4'-chlorophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 3.97 (3H, s), 7.07-7.20 (2H, m), 7.24 (1H, d, <i>J</i> = 9.6 Hz), 7.40 (2H, dd, <i>J</i> = 6.6, 1.9 Hz), 7.66 (2H, dd, <i>J</i> = 6.7, 2.0 Hz), 7.78 (1H, s).	(68)
<b>24</b>	3-(3'-hydroxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 6.78 (1H, dd, <i>J</i> = 8.1, 2.3 Hz), 7.08-7.13 (2H, m), 7.22 (1H, t like, <i>J</i> = 7.8 Hz), 7.34 (1H, t like, <i>J</i> = 7.5 Hz), 7.40 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz), 7.58 (1H, dt like, <i>J</i> = 8.4, 1.5 Hz), 7.75 (1H, dd, <i>J</i> = 7.7, 1.3 Hz), 8.19 (1H, s), 9.54 (1H, s).	(61)
<b>25</b>	3-(3'-methoxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 3.99 (3H, s), 7.09-7.17 (3H, m), 7.19-7.25 (3H, m), 7.35-7.42 (1H, m), 7.58 (1H, dt like, <i>J</i> = 7.5, 1.8 Hz), 7.83 (1H, d, <i>J</i> = 1.3 Hz).	(62)
<b>26</b>	3-(4'-methoxyphenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 3.84 (3H, s), 6.97 (2H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz), 7.28 (2H, t like, <i>J</i> = 7.5 Hz), 7.35 (2H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz), 7.48-7.53 (2H, m), 7.75 (1H, s).	(62)
<b>27</b>	3-(4'-chlorophenyl)coumarin	<sup>1</sup> H-NMR (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) <i>d</i> <sub>H</sub> 7.32 (1H, dt like, <i>J</i> = 7.9, 1.1 Hz), 7.42 (1H, d, <i>J</i> = 8.7 Hz), 7.36-7.45 (2H, m), 7.52-7.58 (2H, m), 7.66 (1H, d, <i>J</i> = 6.7 Hz), 7.64-7.68 (1H, m), 7.82 (1H, s).	(57)

### 2-2-1. 使用機器等に関して

薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography: TLC) は、Silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck、順相) および Silica gel RP-18 F254S (Merck、0.25 mm、逆相) を用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには Chromatorex ODS DM1020T (particle size, 100–200 mesh、富士シリシア化学、愛知) を用いて行った。分析薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography: TLC) は Silica gel RP-18 F254S (Merck、0.25 mm、逆相) を用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには Chromatorex ODS DM1020T (particle size, 100–200 mesh、富士シリシア化学) を用いて行った。水素核磁気共鳴スペクトル (<sup>1</sup>H NMR)、炭素核磁気共鳴スペクトル (<sup>13</sup>C NMR)、Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) スペクトル、Hetero-nuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) スペクトル、Hetero-nuclear Multiple-Bond Connectivity (HMBC)、Double Quantum Filtered-COSY (DQF-COSY) スペクトルは、重メタノール (CD<sub>3</sub>OD)、重クロロホルム (CDCl<sub>3</sub>)、重ジメチルスルホキシド (DMSO-*d*<sub>6</sub>、CD<sub>3</sub>SOD<sub>3</sub>) のいずれかを用い、JEOL JNM-ECA600 (600 MHz、日本電子株式会社、東京)、JNM-LA500 (500 MHz、日本電子株式会社)、JEOL JNM-ECS400 (400 MHz、日本電子株式会社)、Bruker Avance III (300 MHz、ブルカージャパン株式会社、神奈川) を用いて測定した。<sup>1</sup>H NMR および <sup>13</sup>C NMR スペクトルでは、テトラメチルシランのケミカルシフト値あるいは、溶媒に用いた CD<sub>3</sub>OD の中心線のケミカルシフト値を内部標準物質の基準値とした。また、カップリング定数には Hz を使用した。

### 2-2-2. 化合物 **1** と **5, 8** の合成法

窒素気流下 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde の無水酢酸 (Ac<sub>2</sub>O) 溶液に *p*-methoxyphenylacetic acid (1.0 eq.) および sodium acetate (7.5 eq.) を加え、140°C で 4 時間還流を行った。次に、H<sub>2</sub>O を少量ずつ加えて Ac<sub>2</sub>O の加水分解を行った後、得られた溶液を減圧下で留去した。その後、CH<sub>3</sub>OH と 1M HCl を加え、再び溶液を減圧下で留去した。得られた粗生成物に H<sub>2</sub>O およびエタノールを用いて吸引ろ過にて洗浄し、7,8-diacetoxy-3-(4'-methoxyphenyl)coumarin (化合物 **8**) を得た。化合物 **8** に CH<sub>3</sub>OH と 3M HCl を加え、65°C で 2 時間加熱を行った。得られた溶液を減圧下で留去後、逆相カラムクロマトグラフィー (H<sub>2</sub>O → CH<sub>3</sub>OH) を用い精製し、7,8-dihydroxy-3-(4'-methoxyphenyl)coumarin (化合物 **5**) を得た。一方で、化合物 **8** に氷冷下 hydriodic acid (HI, 57%) を加え、110°C で 3 時間加熱を行った。反応液に飽和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液を加え中和した後、2M HCl 加え酸性とした。得られた溶液を減圧下で留去後、逆相カラムクロマトグラフィー (H<sub>2</sub>O → CH<sub>3</sub>OH) を用い精製し、DHC (化合物 **1**) を得た (54)。

### 2-2-3. 化合物 **2-4, 6, 7** および化合物 **9-27** の合成法

窒素気流下 salicylaldehyde 誘導体の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液に、dicyclohexylcarbodiimide (1.5 eq.)、dimethylaminopyridine (0.5 eq.) および phenylacetic acid 誘導体 (1.4 eq.) を加え、室温にて 24 時間攪拌した。反応終了後、Celite®を用いてろ過し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> にて洗浄した。減圧下溶媒を留去後、CHCl<sub>3</sub> あるいは CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>O を用い分液した。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane : ethyl acetate) にて精製し、メトキシ基を有するクマリン誘導体へと導いた [Method A: 化合物



2-4, 6, 7, 9-12, 17, 18, 20, 21, 23-27]。一方で、窒素気流下 salicylaldehyde 誘導体の DMSO 溶液に、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.5 eq.)、および phenylacetic acid 誘導体 (1.25 eq.) を加え、110°C にて 20 時間加熱した。その後、H<sub>2</sub>O と acetic acid (AcOH) を反応溶液に加え 1 時間室温にて攪拌し、その反応液にジエチルエーテルを加え分液した。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane : ethyl acetate) にて精製し、メトキシ基を有するクマリン誘導体へと導いた [Method B: 化合物 13-16, 19, 22]。最後に、窒素雰囲気下氷冷にて、メトキシ基を有するクマリン誘導体の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液に boron tribromide (BBr<sub>3</sub>, 1.0M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10 eq.) を滴下し、2 時間攪拌を行った。その後、CH<sub>3</sub>OH を加え、15 分後に減圧下溶媒を留去した。反応終了後、反応物を ethyl acetate と H<sub>2</sub>O を用い分液した。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub> : MeOH) にて精製し、3-phenyl-7,8-hydroxycoumarin 誘導体へと導いた。

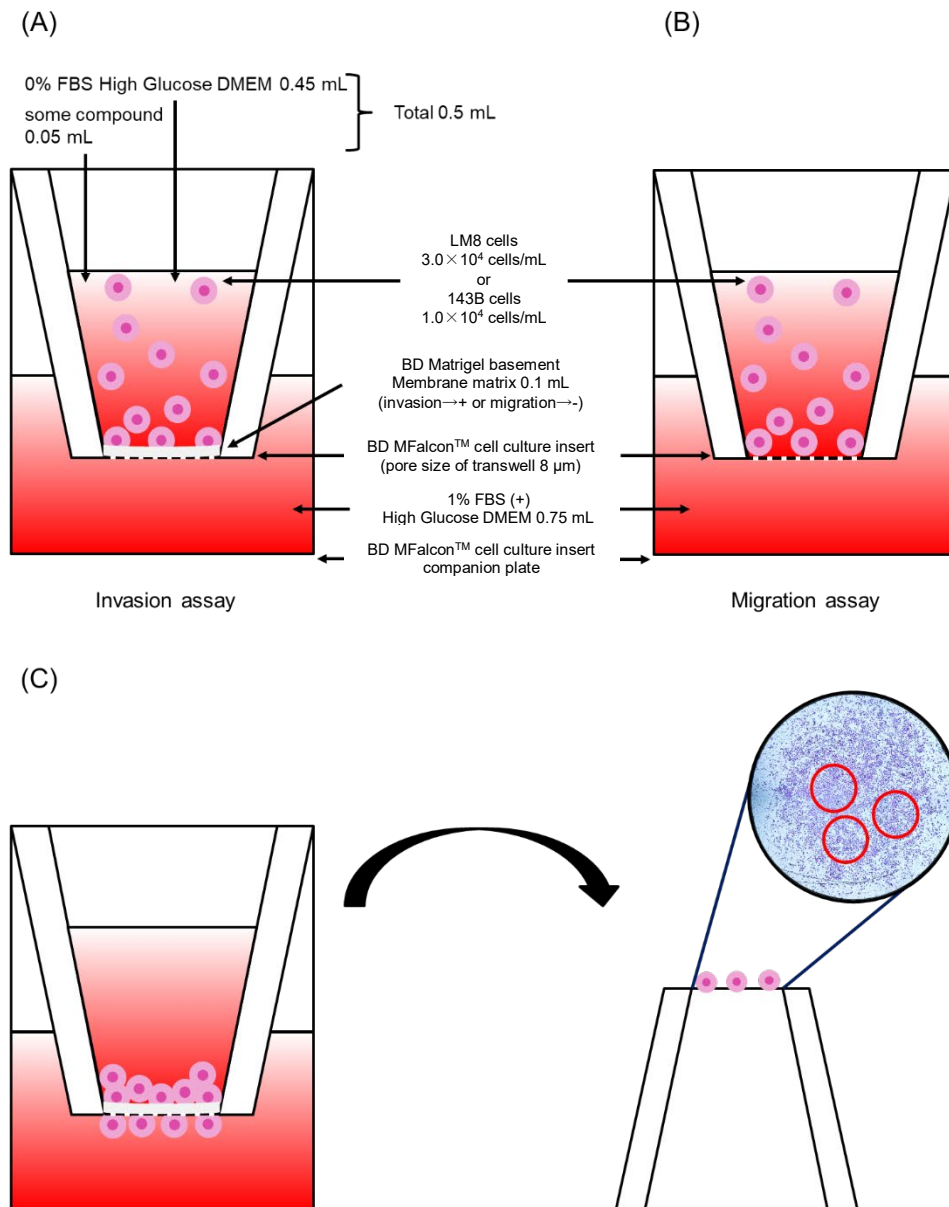
### 2-3. WST-8 assay

浸潤・遊走アッセイを行う際、浸潤もしくは遊走した細胞数を評価するが、化合物が細胞毒性を示す濃度の場合、化合物が浸潤および遊走抑制作用を有さなくとも、浸潤および遊走する細胞が減少する。本研究では、細胞傷害を示すことなく LM8 細胞の浸潤能を抑制する化合物を探索するため、WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) assay を用いて細胞毒性を示さない化合物の濃度を評価した。WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザンを生成する。このホルマザンの 450 nm の吸光度を直接測定し、薬物未処置群における吸光度を 100% として生細胞数を測定した。骨肉腫細胞を平底 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) の各ウェルに 3.0×10<sup>3</sup> cells で播種し、段階希釈された DHC 溶液で 72 時間処理し、cell Counting Kit-8 試薬 (DOJINDO Laboratories, 熊本) を 3 時間処置後、マイクロプレートリーダー (GloMax, Promega, Madison, WI, USA) で吸光度を測定した。

### 2-4. 浸潤および遊走アッセイ

直径 8 μm の孔を有する細胞培養インサート (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) に骨肉腫細胞を 1.5×10<sup>4</sup> cells で播種し、細胞毒性を示さない濃度域のクマリン系化合物を無血清培地中で処理した。Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences) でコーティングされたインサートを浸潤アッセイに用い、コーティングされていないインサートを遊走アッセイに使用した。インサートは、走化因子として 1%FBS を含む DMEM を入れた 24-well コンパニオンプレート (BD Biosciences) に設置した。24 時間培養後、上部のチャンバー内のマトリゲル、非浸潤細胞および遊走細胞を綿棒で除去した。チャンバー底部の細胞は 100%メタノールで固定し、ギムザ染色液 (富士フィルム和光純薬) で染色した。DP72 デジタルカメラ (Olympus, 東京) を搭載した光学顕微鏡 (BX50, Olympus) で 1 つのインサートに対して最も多いと思われる 3 視野を撮影し、インサートを通じた細胞数をカウントした (Figure 4)。化合物の浸潤抑制作用の指標には、薬物未処置群と比較した浸潤細胞数の百分率である浸潤率

を用いた。浸潤率の値が低いほど浸潤抑制作用が高いことを示す。



**Figure 4. Experimental methods for invasion and migration assays.**

(A, B) Osteosarcoma cells were seeded in cell culture inserts containing 8  $\mu\text{m}$  diameter pores and treated with coumarin compounds in serum-free DMEM. Inserts coated with matrigel were used for invasion assays (A), whereas non-coated inserts were used for migration assays (B). The inserts were placed in 24-well companion plates with DMEM containing 1% FBS as a chemoattractant. (C) After 24 h of incubation, the matrigel and non-invading and migrating cells in the upper chamber were removed with a cotton swab. Cells on the bottom of the chamber were fixed with 100% methanol and stained with Giemsa solution. The three fields of view seen most frequently per insert were selected and the number of cells counted.

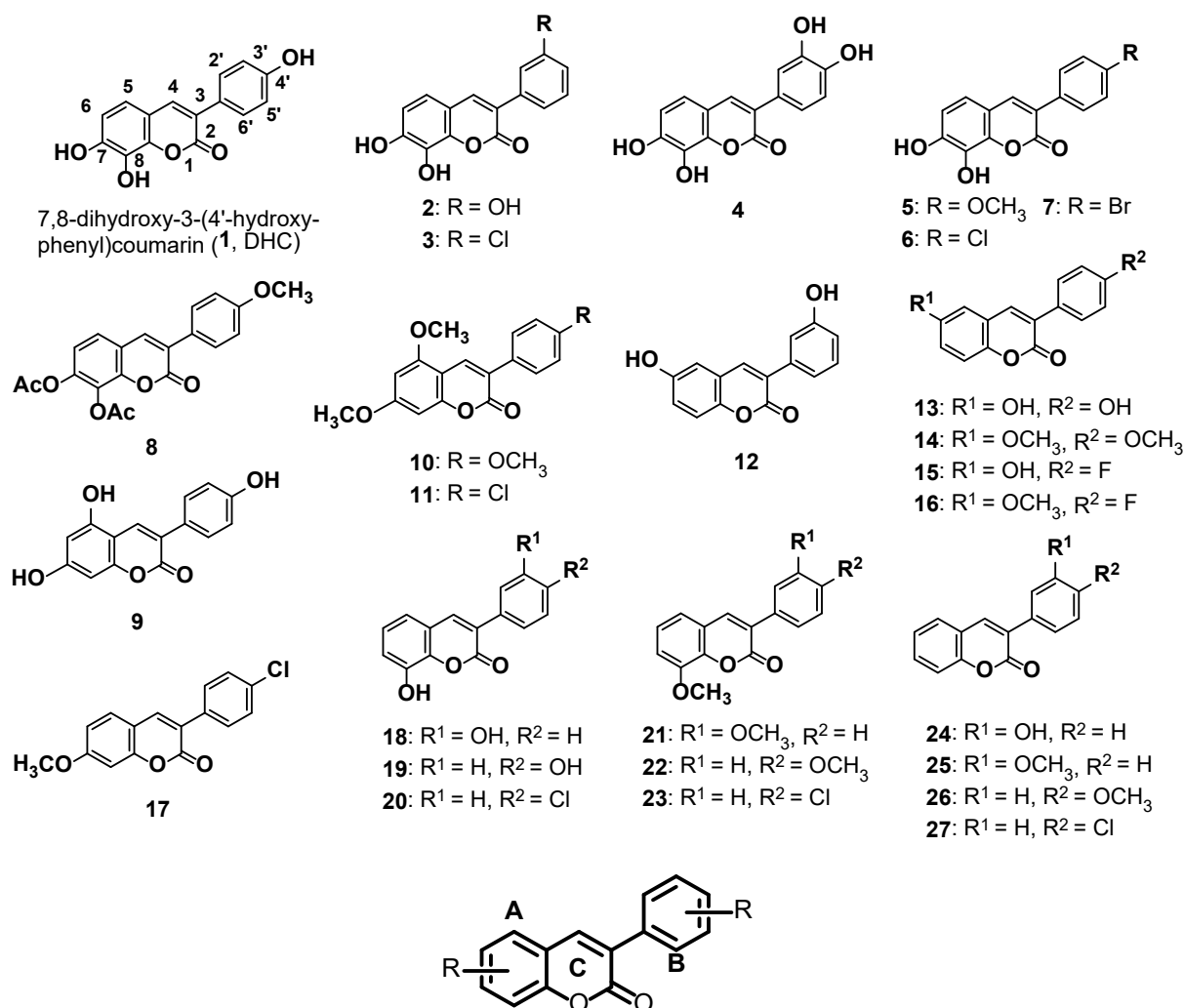
## 2-5. 統計処理

解析は GraphPad Prism 5 (Graphpad software、San Diego、CA、USA) を用いて行った。多重比較は一元配置分散分析 Bonferroni の多重比較検定を用いて行った。 $p < 0.05$  を統計的に有意とした。

### 3. 実験結果

#### 3-1. 3-Phenylcoumarin の合成

3-Phenylcoumarin 骨格の A 環および B 環に置換基を導入した 27 種類の 3-phenylcoumarin 誘導体を合成した (Figure 5)。まず、DHC (化合物 1) を 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde から 2 段階で合成した。この化合物 1 は 3-Phenylcoumarin 骨格の A 環上の 7、8 位に水酸基を 2 個、B 環上の 4' 位に水酸基を 1 個持つ。この化合物 1 の構造決定の詳細、および NMR スペクトルは Figure 6 と Supplementary Figure 1、Supplementary Figure 2 に示した。さらに、A 環上の 5、7、8 位に水酸基やメトキシ基、アセトキシ基を、B 環上の 3'、4' 位に水酸基やメトキシ基、ハロゲン基を持つ 26 種類の誘導体も同様に合成した (Figure 5)。



**Figure 5. Chemical structure of 3-phenylcoumarin and synthetic compounds 1-27.**

Modified from Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

7,8-dihydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)coumarin (**1**)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

DQF COSY, HMQC, HMBC

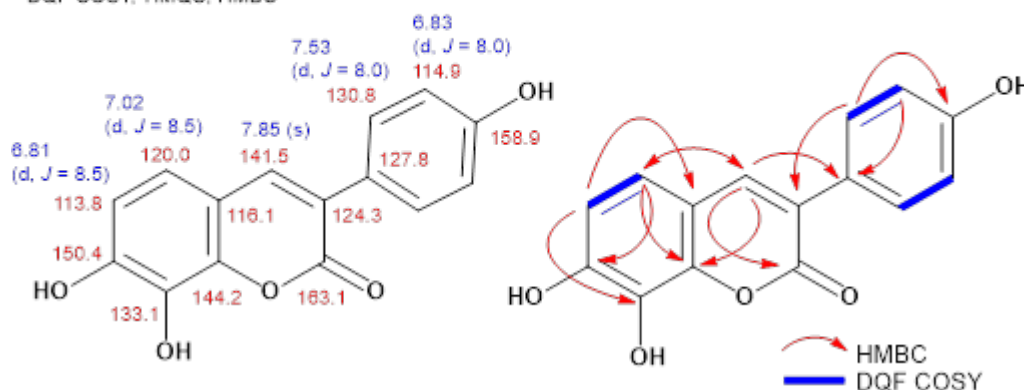


Figure 6. 1D and 2D-NMR data of compound **1**

### 3-2. LM8 細胞に対する 3-phenylcoumarin の浸潤抑制作用の評価

はじめに、WST-8 assay を用いて合成した 3-phenylcoumarin 誘導体が LM8 細胞に対して細胞毒性を示さない濃度を評価した (Table 5)。本研究では、化合物未処置群と比較して 90%までの細胞増殖を確認できた場合を、「化合物は細胞毒性を示さない」と定義した。化合物が細胞毒性を示す濃度の場合、化合物が浸潤・遊走抑制作用を有さなくとも、浸潤および遊走する細胞が減少するためである。次に、浸潤アッセイを用いて LM8 細胞に対する浸潤抑制作用を評価した。27 化合物中 18 化合物が LM8 細胞に対して浸潤抑制作用を示した (Table 6)。他の 9 化合物は LM8 細胞の浸潤に影響を及ぼさなかった (Table 7)。

構造活性相関として、3'位または 4'位に水酸基を有する化合物 **1** と化合物 **2** が 30  $\mu$ M 以下の濃度で強力な浸潤抑制作用を示すことがわかった。メトキシ基を 1 個から 3 個持つ 3-phenylcoumarin 誘導体の活性は、水酸基を 1 個から 3 個持つ化合物の浸潤抑制作用よりも弱かった (化合物 **1** vs **5**、**9** vs **10**、**13** vs **14** および **19** vs **22**)。

**Table 5. The effects of the synthesized compounds on cell proliferation**

Compound #	Proliferation (%)				
	3 (μM)	5 (μM)	10 (μM)	30 (μM)	100 (μM)
1			100.7	96.4	63.0
2		94.9		31.9	5.5
3	105.8			58.9	40.5
4	108.2			103.7	107.3
5			100.7	84.9	48.0
6		94.2		42.1	
7	99.8			103.4	63.7
8			102.8	79.1	51.0
9	101.7		102.3	111.1	
10		101.4	96.9		
11	109.8		114.1	115.1	
12				106.7	10.2
13			102.0	102.2	103.6
14			100.9	101.8	102.6
15			99.8	99.7	85.4
16			98.7	98.0	97.7
17			98.7	98.7	100.2
18			96.8	97.1	98.2
19			102.4	103.0	79.4
20	113.7		109.9	119.2	
21			98.6	98.6	89.6
22			102.1	99.4	97.5
23			97.9	99.9	100.5
24	99.1		96.8	57.6	
25			99.0	96.4	100.0
26	113		112.9	106.9	
27			101.2	99.5	98.1

Data show the percentages of live cells in response to the test compound compared with vehicle-treated cells (100%). Values represent the mean of four wells per experiment.

**Table 6. The effects of the synthesized compounds on invasion were evaluated at doses that did not affect the proliferation of LM8 cells.**

Compound #	Invasion (%)				
	1 (μM)	3 (μM)	5 (μM)	10 (μM)	30 (μM)
<b>1</b>	-	53±8***	-	-	14±4***
<b>2</b>	64±10**	48±33**	-	-	-
<b>3</b>	46±25**	-	18±18***	-	-
<b>4</b>	-	66±16***	-	-	8±2***
<b>5</b>	-	98±19	-	30±7***	-
<b>6</b>	40±10	-	10±3	-	-
<b>7</b>	47±6***	-	14±2***	-	-
<b>9</b>	-	50±9***	-	-	31±8***
<b>11</b>	-	93±51	-	-	39±14**
<b>13</b>	-	75±13	-	-	25±17***
<b>14</b>	-	89±15	-	-	17±4***
<b>15</b>	-	63±3***	-	-	24±3***
<b>18</b>	-	60±9***	-	-	42±1***
<b>19</b>	-	70±3***	-	-	37±1***
<b>24</b>	-	52±7***	-	38±3***	-
<b>25</b>	-	106±13	-	-	86±9*
<b>26</b>	-	90±13	-	-	75±12*
<b>27</b>	-	96±13	-	-	68±12***
Daphnetin <sup>b</sup>	-	76±7***	-	-	56±8***

Data show the percentages of invaded cells in response to the test compound compared with vehicle-treated cells (100%). Values represent the mean ± SDM of four inserts per experiment. Data were analyzed using one-way ANOVA and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction.  $p < 0.05$  was considered significant. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

aNo significant changes were observed in response to compounds 10, 12, 16, 17, and 20-23.

Modified from Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

**Table 7. The effects of the synthesized compounds on invasion were evaluated at doses that did not affect the proliferation of LM8 cells.**

Compound #	Invasion (%)			
	1 (μM)	3 (μM)	10 (μM)	30 (μM)
<b>8</b>	-	102±12	82±14	-
<b>10</b>	-	100±30	93±31	-
<b>12</b>	-	98±12	-	88±11
<b>16</b>	-	81±3	-	79±7
<b>17</b>	-	109±32	-	108±28
<b>20</b>	-	115±12	-	79±25
<b>21</b>	-	79±27	-	72±31
<b>22</b>	-	124±24	-	101±16
<b>23</b>	-	162±43**	-	124±30

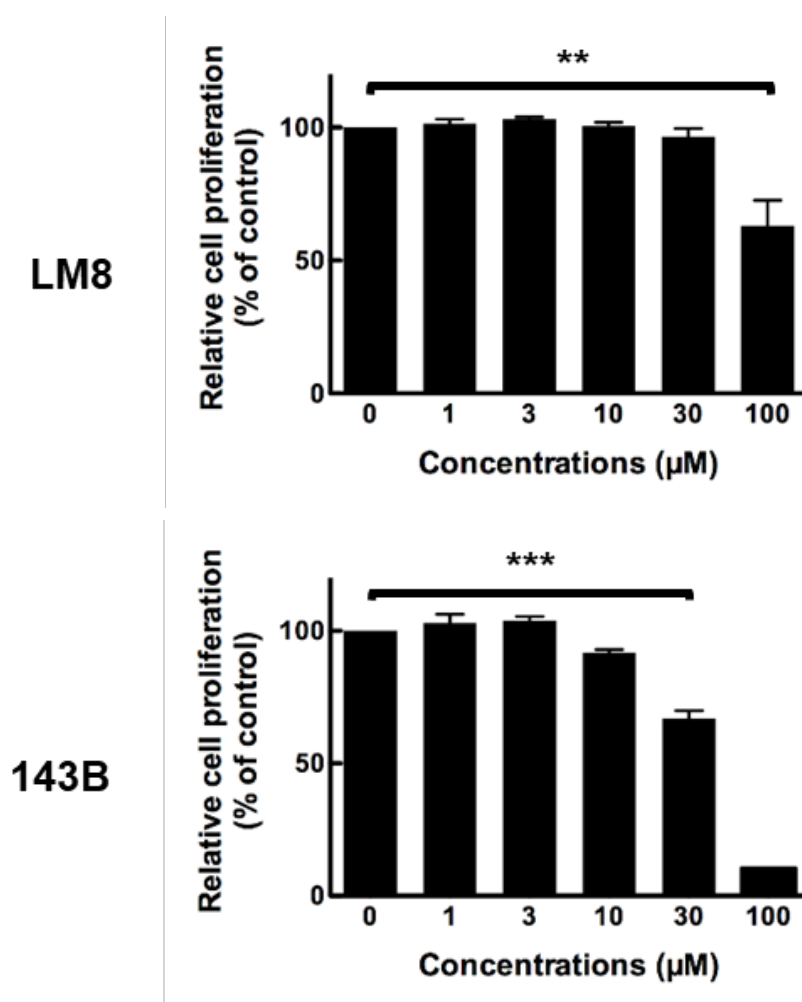
Data show the percentages of invaded cells in test compound-treated and vehicle-treated cells (100%). The listed compounds did not inhibit the invasion of LM8 cells. Values represent the mean ± SDM of four inserts per experiment. Data were analyzed using one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction.  $p < 0.05$  was considered significant. \*\*:  $p < 0.01$ .

Modified from Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.



### 3-3. 骨肉腫細胞に対する DHC の細胞毒性の評価

前述で、有望な浸潤抑制効果を有することが見出された DHC (化合物 **1**) の骨肉腫細胞の遊走および浸潤に対する直接的な影響を調べるために、WST-8 assay を用いて DHC が骨肉腫細胞に対して細胞毒性を示さない濃度域を調べた。薬物未処置群における吸光度を 100% とした。DHC の IC<sub>50</sub> 値は、LM8 細胞で 177.3  $\mu$ M、143B 細胞で 40.2  $\mu$ M であり、LM8 細胞では 100  $\mu$ M、143B 細胞では 30  $\mu$ M で、それぞれ 72 時間の処理により細胞増殖を有意に抑制した (Figure 7)。以降の実験では、LM8 細胞では 30  $\mu$ M 以下、143B 細胞では 10  $\mu$ M 以下の濃度を用いた。



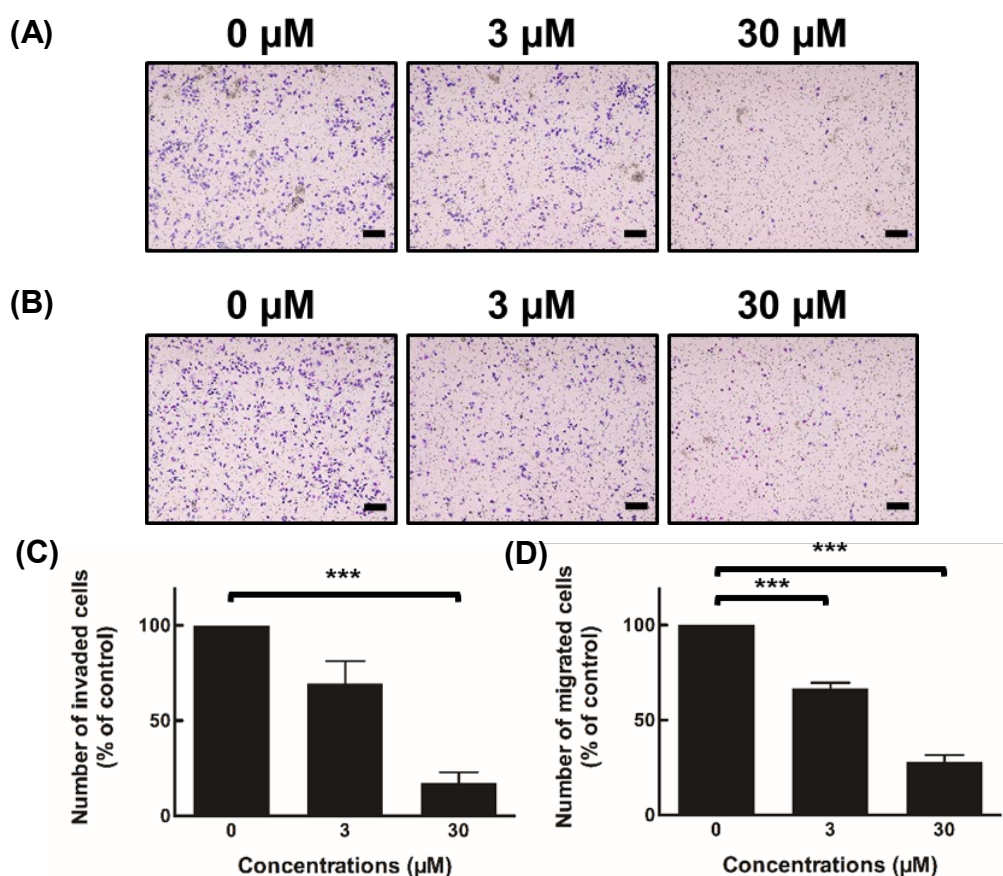
**Figure 7. Effect of DHC on cell proliferation.**

Osteosarcoma (OS) cells were treated with the indicated concentrations of DHC for 72 h and cell proliferation was assessed using the WST-8 assay. Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. Data were analyzed using one-way ANOVA and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction.  $p < 0.05$  was considered significant. \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

### 3-4. LM8 細胞に対する DHC の浸潤および遊走抑制作用の評価

浸潤アッセイと遊走アッセイを用いて、DHC の LM8 細胞に対する浸潤および遊走への影響を評価した。浸潤および遊走した細胞に対してギムザ染色液を用いて、LM8 細胞の細胞核を赤紫色、細胞質を淡紫色に染色した。その結果、浸潤および遊走した細胞数が濃度依存的に減少したことを顕微鏡下に確認できた (Figure 8A, B)。薬物未処置群と比較した浸潤または遊走細胞数の百分率である浸潤率または遊走率を用いて統計処理を行った。その結果、DHC は薬物未処置群と比較して 3  $\mu\text{M}$  で遊走抑制作用を、30  $\mu\text{M}$  では浸潤抑制作用と遊走抑制作用を示した (Figure 8C, D)。



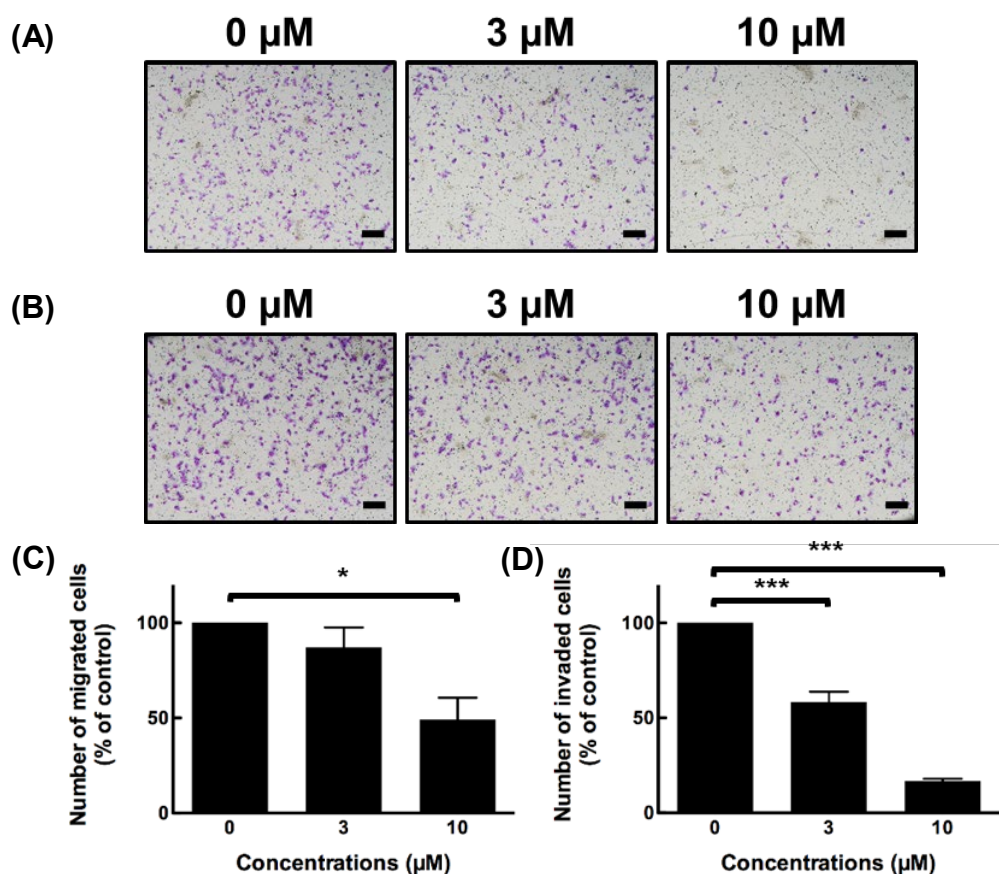
**Figure 8. Effects of DHC on invasion, and migration of LM8 cells.**

(A, B) Images showing invaded (A) and migrated (B) cells after 24 h of treatment with DHC. (C, D) LM8 cells were treated with the indicated concentrations of DHC for 24 h, and invaded (C) and migrated (D) cells were counted manually. Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. Data were analyzed using one-way ANOVA and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction.  $p < 0.05$  was considered significant. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ . Scale bars: 200  $\mu\text{m}$ .

Modified from Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

### 3-5. 143B 細胞に対する DHC の浸潤および遊走抑制作用の評価

LM8 細胞と同様に、浸潤アッセイと遊走アッセイを用いて、DHC の 143B 細胞に対する浸潤および遊走への影響を評価した。浸潤および遊走した細胞数が濃度依存的に減少したことを顕微鏡下で確認できた (Figure 9A, B)。DHC は薬物未処置群と比較して 3  $\mu$ M で有意な遊走抑制作用を、10  $\mu$ M で有意な浸潤抑制作用と遊走抑制作用を示した (Figure 9C, D)。



**Figure 9. Effects of DHC on invasion, and migration of 143B cells.**

(A, B) Images showing invaded (A) and migrated (B) cells after 24 h of treatment with DHC. (C, D) LM8 cells were treated with the indicated concentrations of DHC for 24 h, and invaded (C) and migrated (D) cells were counted manually. Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. Data were analyzed using one-way ANOVA and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction.  $p < 0.05$  was considered significant. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ . Scale bars: 200  $\mu$ m.

Modified from Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

#### 4. 考察

VEGF/VEGFR 阻害薬は、細胞毒性作用を発揮し、血管新生阻害作用により転移を抑制する抗がん薬であるが、今までの臨床試験では効果的にがん転移を抑制することはできなかった。また、がん細胞の浸潤抑制作用を有する MMP 阻害薬には、副作用などの問題から、未だ治療薬として使用されるに至っていない。これまで着目されてこなかったがん転移プロセスを制御する抗がん薬の開発とそれを担う標的分子の同定は重要である。

クマリンは平面構造であるため多くのタンパク質と結合し、その結果、クマリン系化合物は様々な薬理作用を有することが報告されている。3-Phenylcoumarin 誘導体もまた、抗がん作用をはじめとした、様々な薬理作用を有することが研究により明らかになっており(46)、著者はより強力な浸潤抑制作用を有するクマリン系化合物を見出すために、3-phenylcoumarin を創薬の基本骨格として用い、3-phenylcoumarin に化学修飾することで新規がん転移抑制薬が開発できると仮説を立てた。そこで本研究では、その仮説の検証として、がん転移抑制作用に関与する 3-phenylcoumarin の構造活性相関を評価するため、27 化合物を合成し、浸潤抑制作用を検討した。細胞毒性を示さない濃度域で浸潤抑制作用を持つクマリン系化合物を同定することが目的であったため、細胞毒性を示さない濃度域で評価した。その結果、3'位または 4'位に水酸基を有する化合物 **1** と化合物 **4** が 30  $\mu$ M 以下の濃度で強力な浸潤抑制作用を示すことが明らかになった。メトキシ基を 1 個から 3 個持つ 3-phenylcoumarin 誘導体の活性は、水酸基を 1 個から 3 個持つ化合物の浸潤抑制作用よりも弱かった (化合物 **1** vs **5**、**9** vs **10**、**13** vs **14** および **19** vs **22**)。これらの結果は、3'位または 4'位の水酸基が浸潤抑制作用に重要であることを示している。一方、ハロゲン基を有する 3-phenylcoumarin 誘導体は低濃度で浸潤抑制作用を示したものの、30  $\mu$ M で細胞毒性を示した。本研究は、細胞毒性を示さない濃度域で浸潤・遊走抑制作用を有する化合物の探索を行っており、細胞毒性が強く表れるハロゲン基を有するクマリン系化合物よりも、浸潤・遊走作用を抑制する水酸基を有するクマリン系化合物を目的にかなった化合物として研究を進めた。

本研究で合成されたいずれの 3-phenylcoumarin 誘導体も、クマリンと同様に平面構造を有することから、生体分子に対する選択性が乏しく、様々な作用が現れる可能性がある。しかし、クマリン環の平面に対して異なる角度の平面を持つフェニル基の導入により、特異的な活性を示すことも報告されている (71)。このことから、フェニル基の 2'位と 6'位に対して  $sp^3$  炭素を有する置換基を導入し、3-phenylcoumarin 誘導体に 3 次元方向への構造の広がりを持たせることは、より特異的な浸潤抑制作用を有するクマリン系化合物の探索に向けた重要な課題であると考えられる。DHC の標的分子を同定後、共結晶構造解析を通じて、標的分子選択的に結合し、浸潤および遊走を特異的に抑制するクマリン系化合物の創製を進め、立体性をもたせる有効性を検討していく必要がある。

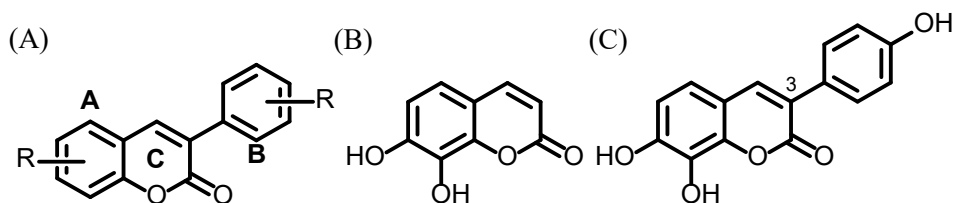
前述した DHC (**1**) は細胞毒性を示し難く、高い浸潤抑制作用を有していることから、DHC の浸潤・遊走抑制作用に焦点を当てることにした。また、本スクリーニングでは高肺転移性マウス骨肉腫細胞 LM8 細胞に対する浸潤抑制作用を検討したが、LM8 細胞だけでなく高転移性ヒト骨肉腫細胞 143B 細胞を加えて、DHC の浸潤および遊走抑制作用を評価した。DHC は細胞毒性を示さない濃度域で LM8 細胞と 143B 細胞に対して、濃度依存的に浸潤または遊

走を抑制し、骨肉腫細胞に対して浸潤および遊走抑制作用を有することが明らかとなった。本研究では、骨肉腫細胞に対してのみの浸潤抑制作用を検討したが、今後は上皮系がん細胞や正常細胞に対する浸潤・遊走抑制作用の検討を行う必要がある。

## 5. 小括

本章では、高配転移性マウス骨肉腫細胞とトランスウェルチャンバーを用いたスクリーニングを通して、浸潤・遊走抑制作用を有するクマリン系化合物の探索を行い、以下の知見を得た。

1. クマリン環の 3 位に結合したベンゼン環 (B 環) への水酸基の存在は、活性の発現に重要であることが判明した。
2. クマリン環の 3 位に結合したベンゼン環 (B 環) への水酸基をハロゲン基へ変換すると、浸潤抑制作用は増強するが、細胞毒性が認められた。
3. DHC は、daphnetin よりも強力に浸潤抑制作用を示した。
4. DHC は、マウス骨肉腫細胞だけでなく、ヒト骨肉腫細胞に対しても浸潤抑制作用と遊走抑制作用を示した。



**Figure 10. Structure of 3-phenylcoumarin (A) and daphnetin (B), DHC (C).**

以上のことから、今回評価した中で細胞毒性を示さずに有望な活性を示した DHC は、骨肉腫細胞に対して浸潤抑制作用と遊走抑制作用を有する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

#### 1. 緒言

遊走は、胚の形態形成、免疫監視、組織の修復や再生など、多くの生物学的過程において重要な細胞運動であり、異常な遊走はがんの浸潤や転移を含む多くの疾患の進行に関与する(72-74)。遊走と浸潤は、様々な走化因子によって引き起こされる。細胞表面の受容体に結合した走化因子は、細胞内のシグナル伝達経路を刺激し、細胞内にアクチンフィラメントが形成される。アクチンフィラメントの形成は可逆反応であり、フィラメントの末端でアクチン単量体が付加(重合)する一方、反対側の末端からアクチンが遊離(脱重合)する。アクチンを一方向に連ねることにより細胞の形を伸ばすことで、細胞が一方向に進む。特に、がん転移を制御するための細胞骨格に関連する因子として、低分子量 GTP 結合型タンパク質が挙げられる(26)。低分子量 GTP 結合型タンパク質は、細胞骨格の動的変化、方向感知、細胞・細胞間接着、細胞インテグリン・マトリックス間接着の基本的な制御因子である。低分子量 GTP 結合型タンパク質の遺伝子は、多くのがん種で発現上昇が確認されており、浸潤性または転移性のがん細胞の表現型として示されている(26,75)。

低分子量 GTP 結合型タンパク質は Ras スーパーファミリーの一部を構成し、ヒトでは 20 種類のファミリータンパク質が含まれ、主に、細胞骨格の再構成や細胞運動、細胞極性、軸索誘導などを司る(76)。多くの低分子量 GTP 結合型タンパク質は活性型の guanosine triphosphate (GTP) 結合型と不活性型の guanosine diphosphate (GDP) 結合型の間で GDP-GTP 交換反応が行われる(77)。この反応は GDP 結合型から GTP 結合型への変換を触媒する guanine nucleotide exchange factors (GEFs)(78) と GTP 結合型から GDP 結合型への変換を触媒する GTPase-activating proteins (GAPs)、GEF による活性化を阻害することで、低分子量 GTP 結合型タンパク質の膜への局在を阻害する Guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDI) に制御されている。さらに、直接的な活性化とは別に、低分子量 GTP 結合型タンパク質は脂質修飾を受けることで膜への局在を誘導され(77,79,80)、ユビキチン化を受けることで分解される。特に、RHOA や RAC1 のユビキチン化に関する研究は進んでおり、RHOA に対するユビキチン化には異なる E3 リガーゼ複合体、SKP1-CUL1-F-box (SCF)<sup>FBXL19</sup> 複合体(81)、SMAD-specific E3 ubiquitin protein ligase 1 (SMURF1) 複合体(82)、BTB/POZ domain-containing adaptor for CUL3-mediated RhoA degradation (BACURD)-CUL3-RING ユビキチンリガーゼ複合体(83) が関与しており、RAC1 に対するユビキチン化は including inhibitor of apoptosis (IAP) タンパク質(X-linked IAP (XIAP) と cellular IAP1 (cIAP1))(84)、HACE1(85)、SCF<sup>FBXL19</sup> 複合体(86) が関与する。

がん転移抑制作用の標的として示唆されている低分子量 GTP 結合型タンパク質には、RHOA、RAC1、CDC42 がある(75)。RHOA は収縮力を発生させるストレスファイバーを形成する。また、RAC1 は細胞の運動性を駆動する葉状仮足の形成を促進し、CDC42 は方向性のある運動に重要な糸状仮足を形成する(26)。

本章では、前章で示した DHC の浸潤・遊走抑制作用の作用機序を解明するために、DHC が及ぼすアクチンフィラメントの形成から低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現までの一連を

解析した。さらに、低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現制御に対する DHC の影響を解析した。



## 2. 実験方法

### 2-1. 試薬

DHC は dimethyl sulfoxide (DMSO: ナカライテスク) に 100 mM の濃度に溶解し、使用時まで-20℃で冷凍保存した。シクロヘキシミド (CHX: cycloheximide) は、富士フィルム和光純薬から購入し、精製した蒸留水を用いて 100 mg/mL の濃度に溶解し、使用時まで-20℃で冷凍保存した。

### 2-2. 使用細胞と細胞培養

本研究では、高転移性細胞株として第 1 章と同様に、マウス骨肉腫細胞株 LM8 細胞とヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞を使用した。

### 2-3. 蛍光染色法

LM8 細胞は  $3.0 \times 10^4$  cells/mL、143B 細胞は  $0.5 \times 10^4$  cells/mL でガラスボトムディッシュ (松波硝子、大阪、日本) に播種した。48 時間培養後、DHC を様々な濃度 (LM8: 3 および 30  $\mu$ M、143B: 3 および 10  $\mu$ M) で 24 時間培地に添加した。LM8 細胞と 143B 細胞を 4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で室温にて 30 分間固定し。次に、アクチンフィラメント特異的に染色する rhodamine 標識 phalloidin (Thermo Fisher Scientific) と、細胞核特異的に染色する Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) で 4℃にて一晩反応させた。染色されたアクチンフィラメントを LSM800 共焦点レーザースキャン顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて撮影した。

### 2-4. ウェスタンブロッティング法

DHC 処置によるタンパク質発現変化への解析においては、ウェスタンブロッティング法にて解析した。LM8 細胞、143B 細胞いずれにおいても  $9.0 \times 10^4$  cells、2.7 mL で播種してから 24 時間培養した後、培地で希釈した化合物 (終濃度 0、3、30  $\mu$ M)、0.3 mL を処置した。24 時間後に細胞を回収し、氷冷した  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -free phosphate buffered saline (PBS) (-) で洗浄後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma Aldrich) および 40 mM sodium fluoride (富士フィルム和光純薬)、2 mM sodium orthovanadate (Sigma Aldrich) を含む lysed in radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (富士フィルム和光純薬) を用いて溶解 (4℃、20 分) した。溶解後、20 分間遠心 (4℃、13000 $\times$ g) し、上清をサンプルとして回収した。回収したサンプルは、Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) および Quantus Fluorometer (Promega) を用いて定量し、2-メルカプトエタノール含有試料用緩衝液 (富士フィルム和光純薬) と混合し、5 分間煮沸してサンプルを調製した。

電気泳動には 20  $\mu$ g の調製したサンプルを用い、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にてタンパク質を分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) に転写 (100V、90 分) した。PVDF 膜への非特異的結合を防止するため、ブロッキング剤には 5% スキムミルク (雪印メグミルク、東京、日本) を使用し、室温にて 1 時間反応させた。1 次抗体は 4℃で一晩反応させ、2 次抗体は

horseradish peroxidase (HRP) 標識された 抗ウサギおよび抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA) を用いて 30 分、室温にて反応させた。これらのブロッキング剤および各種抗体は、Tween-20 含有 tris-buffered saline を用いて溶解または希釈した。タンパク質の検出は、ECL Western Blotting Detection Kits (GE Healthcare、Chicago、IL、USA) を用いて X 線フィルム (ケアストリームヘルス株式会社、東京、日本) に焼き付けた。なお、本検討に用いた 1 次抗体と 2 次抗体は Table 8 に示した。なお、anti-CDC42 抗体 (#2462: Cell Signaling Technology)、anti-RAC1 抗体 (66122-1-Ig: Proteintech、Deans-gate、Manchester、UK)、anti-RHOA 抗体 (sc-179: Santa Cruz Biotechnology、Dallas、TX、USA)、anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 抗体 (GAPDH; #2118: Cell Signaling)、anti-eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  抗体 (eIF2 $\alpha$ ; ab5369: abcam、Cambridge、UK)、anti-リン酸化 eIF2 $\alpha$  抗体 (p-eIF2 $\alpha$ ; #9721: Cell Signaling)、anti-mouse IgG 抗体 (GE Healthcare)、anti-rabbit IgG 抗体 (GE Healthcare) を使用した。

**Table 8. Antibodies used in Western blotting.**

Primery Ab	Primery Ab concentrations	Secondary Ab	Secondry Ab concentrations
anti-CDC42	1:1000	anti-rabbit IgG	1:1000
anti-RAC1	1:1000	anti-mouse IgG	1:5000
anti-RHOA	1:200	anti-rabbit IgG	1:1000
anti-eIF2 $\alpha$	1:1000	anti-mouse IgG	1:1000
anti-p-eIF2 $\alpha$	1:1000	anti-rabbit IgG	1:1000
anti-GAPDH	1:1000	anti-rabbit IgG	1:1000

## 2-5. qRT-PCR 法

DHC により誘導される mRNA の発現変化解析においては、quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) 法にて解析を行った。ウエスタンブロッティング法と同様に、骨肉腫細胞株 (LM8、143B) を播種し、DHC を処置した。24 時間後に細胞を回収し、氷冷した PBS (-) で洗浄後、Nucleo Spin RNA Kit (タカラバイオ、草津、日本) を用いて total RNA を抽出した。NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) にて RNA を測定し、High Capacity Transcription Kit (Applied Biosystems、Foster、CA、USA) と Takara PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ) を用いて逆転写し、complementary DNA (cDNA) を合成した。これらの cDNA を、FastStart Essential DNA Probes Master (Roche Diagnostics、Basel、Switzerland) と Universal Probe Library Probe (Roche)、各 primer (Thermo Fisher Scientific) を含む 20  $\mu$ L/well の反応系にて Thermal Cycler Dice system (タカラバイオ) を用いて qRT-PCR を行った。mRNA 発現量は LM8 細胞では *Gapdh* を 143B 細胞では *GAPDH* を内標準として、 $\Delta\Delta$ Ct 法により相対的に定量した。本検討に用いた primer および probe は、Table 9 に示した。

**Table 9. Information of probe and primer used in qRT-PCR.**

Target	Species	Probe	Length		Primer Sequence	Accession Number
				(bp)		
<i>GAPDH</i>	Human	#45	Fw	20	5'-GAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3'	NM_001256799.2
			Rv	20	5'-GTTACACACCCATGACGAACA-3'	
<i>Gapdh</i>	Mouse	#77	Fw	22	5'-CAATGAATACGGCTACAGCAAC-3'	NM_008084.2
			Rv	20	5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT-3'	
<i>RHOA</i>	Human	#8	Fw	20	5'-GGGAGCTAGCCAAGATGAAG-3'	NM_001313945.1
			Rv	19	5'-GTACCCAAAAGCGCCAATC-3'	
<i>RhoA</i>	Mouse	#46	Fw	21	5'-ACCTGTGTGTTTTCAGCACCT-3'	NM_001313961.1
			Rv	20	5'-CCATCACCAACAATCACCAG-3'	
<i>CDC42</i>	Human	#22	Fw	23	5'-CATCGGAATATGTACCGACTGTT-3'	NM_044472.2
			Rv	25	5'-TGCAGTATCAAAAAGTCCAAGAGTA-3'	
<i>Cdc42</i>	Mouse	#58	Fw	23	5'-ACCGCTAAGTTATCCACAGACAG-3'	NM_009861.3
			Rv	22	5'-GAGTTATCTCAGGCACCCACTT-3'	
<i>RAC1</i>	Human	#77	Fw	19	5'-CTGATGCAGGCCATCAAGT-3'	NM_006908.4
			Rv	20	5'-CAGGAAATGCATTGGTTGTG-3'	
<i>Rac1</i>	Mouse	#77	Fw	20	5'-AGATGCAGGCCATCAAGTGT-3'	NM_009007.2
			Rv	20	5'-GAGCAGGCAGGTTTACCAA-3'	

## 2-6. RNA-Seq (シーケンス) 解析

### 2-6-1. RNA-Seq ライブラリーの調製とシーケンス

DHC 処理 (30  $\mu$ M、n = 3) および未処理 (n = 3) 細胞からの全 RNA は、qRT-PCR 法と同様に回収した。6 つのサンプルから RNA-Seq ライブラリーを調製し、株式会社マクロジェン・ジャパン (東京、日本) の次世代シーケンサー (NGS: next generation sequencer)により配列決定した。RNA の量と質は、それぞれ RNA Ribogreen (Thermo Fisher Scientific) と TapeStation RNA Screen Tape (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)で確認した。NGS ライブラリーは、TruSeq Stranded mRNA Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) を用いてメーカーの説明書に従って作製し、TapeStation D1000 Screen Tape (Agilent Technologies) により確認した。NGS ライブラリーの定量は、LightCycler qPCR (Roche) により行った。RNA-Seq データ取得のためのシーケンスランは、NovaSeq 6000 (Illumina) を用いて 101 bp のペアエンド法で行い、生成されたベースコールは bcl2fastq2 Conversion Software (Illumina) により fastq ファイル形式に変換した。

### 2-6-2. RNA-Seq データ処理

「6-1. RNA-Seq ライブラリーの調製とシーケンス」で得られた fastq ファイルは、RNA-Seq データの品質管理 (QC: quality control) のために FastQC version 0.11.9 {<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (87)} で解析した。まず初めに、各

fastq ファイルの QC 解析と、低品質または、短い配列及びアダプター配列を除去するためのフィルタリングを同時に行うことができる fastp 0.23.1 プログラムを用いて、デフォルト設定により QC を行った (88)。次に Trimmomatic-0.39 を用いて、最初の QC ステップを経ても残存しているアダプター配列をトリミングした (89)。さらに、SortMeRNA v4.3.4 プログラムにより、リボソーム RNA 由来の配列をデフォルト設定により除去した (90)。QC でフィルタリングしたリードを、STAR version 2.7.9a プログラム (91) を用いて Ensembl Musculus GRCm39 release 104 reference genome にアライメントした。リードカウントと transcripts per million (TPM) 値は RSEM version 1.3.3 (92) によって算出した。DHC 処理 (30  $\mu$ M) と未処理細胞の differentially expressed genes (DEGs) を抽出するために、RSEM の出力であるリードカウントと TPM 値を Bioconductor の DESeq2 1.24.0 パッケージと R バージョン 3.6.3 で解析した。

### 2-6-3. パスウェイ解析

パスウェイ解析は、Bioconductor の Pathview version 1.24.0 パッケージを用い、R program version 3.6.3 で行った。Pathview に適用したパスウェイは、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes {(KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/> (93))} から取得した。各パスウェイ上にプロットしたデータは、上述の DESeq2 プログラムによって算出された fold-change 値を用いた。

### 2-6-4. 遺伝子オントロジー (GO: gene ontology) 解析

GO 解析には、Web ベースのプログラムである The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery {(DAVID; <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp> (94))} version 2021 の Functional Annotation Chart 機能を使用し、Gene\_Ontology カテゴリの GOTERM DIRECT データベースを参照して結果を抽出した。得られた GO タームは、Bonferroni 補正による  $p$  値でソートし、補正後の  $p$  値が  $p < 0.05$  を示した結果を表示した。

### 2-6-5. 遺伝子エンリッチメント解析

遺伝子エンリッチメント解析は、DESeq2 で正規化した RNA-Seq データを、Gene Set Enrichment Analysis {(GSEA; <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp> (95))} version 4.2.2 を用いて、デフォルト設定により行った。GO 解析には、c5.all.v7.5.1.symbols.gmt のデータベースから得られた遺伝子セットを使用した。GSEA の結果はパーミュテーション検定に基づいているため、3 回の GSEA 検定を繰り返し、上位にランクされた遺伝子セットを有意であるとみなした。具体的には、3 回の検定において誤発見率 (FDR) の  $q$  値が  $q < 0.05$ 、濃縮スコア (Enrichment Score; ES) が  $> 0.6$ 、正規化 ES が  $> 1.85$  であった場合に、上位にランクされた遺伝子セットとして抽出した。gmt ファイルに含まれていない特定の GO タームを解析するために、GSEA ウェブサイトの Molecular Signatures Database から各遺伝子セットを追加で検索し、ダウンロードした。

### 2-7. タンパク質分解の解析

mRNA の翻訳を阻害する条件下での RAC1 および RHOA のタンパク質量を調べるために、

ウェスタンブロット法を用いた。細胞溶解液の調製前に、細胞を 100 µg/mL の CHX (富士フイルム和光純薬) で 2、4、6、8、24 時間処理した。細胞溶解液の調製、タンパク質の回収と定量、電気泳動、抗原抗体反応、抗原抗体反応したタンパク質の検出は、「4. ウェスタンブロットティング法」と同様の方法で行った。

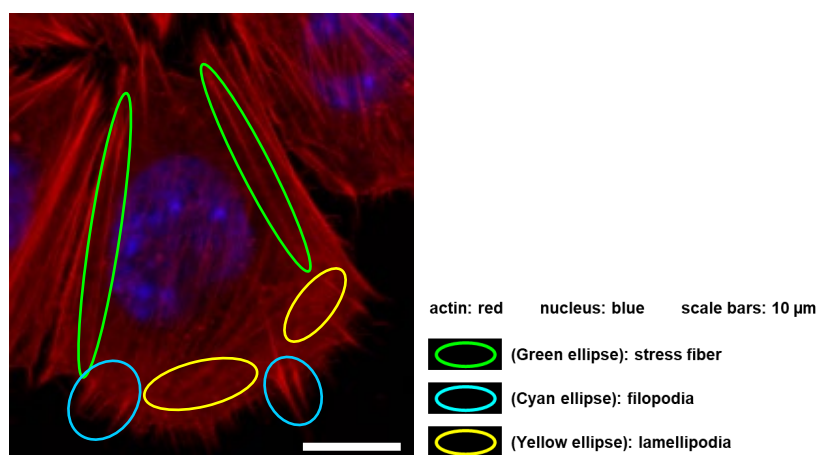
## 2-8. 統計解析

解析は GraphPad Prism 5 (Graphpad software、San Diego、CA、USA) を用いて行った。多重比較は一元配置分散分析 Bonferroni の多重比較検定を用いて行った。 $p < 0.05$  を統計的に有意とした。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて解析し、log-rank 検定を用いて比較した。上記と同様に  $p < 0.05$  を統計的に有意とした。

### 3. 実験結果

#### 3-1. 骨肉腫細胞に対する DHC の細胞内アクチンフィラメント形成への影響

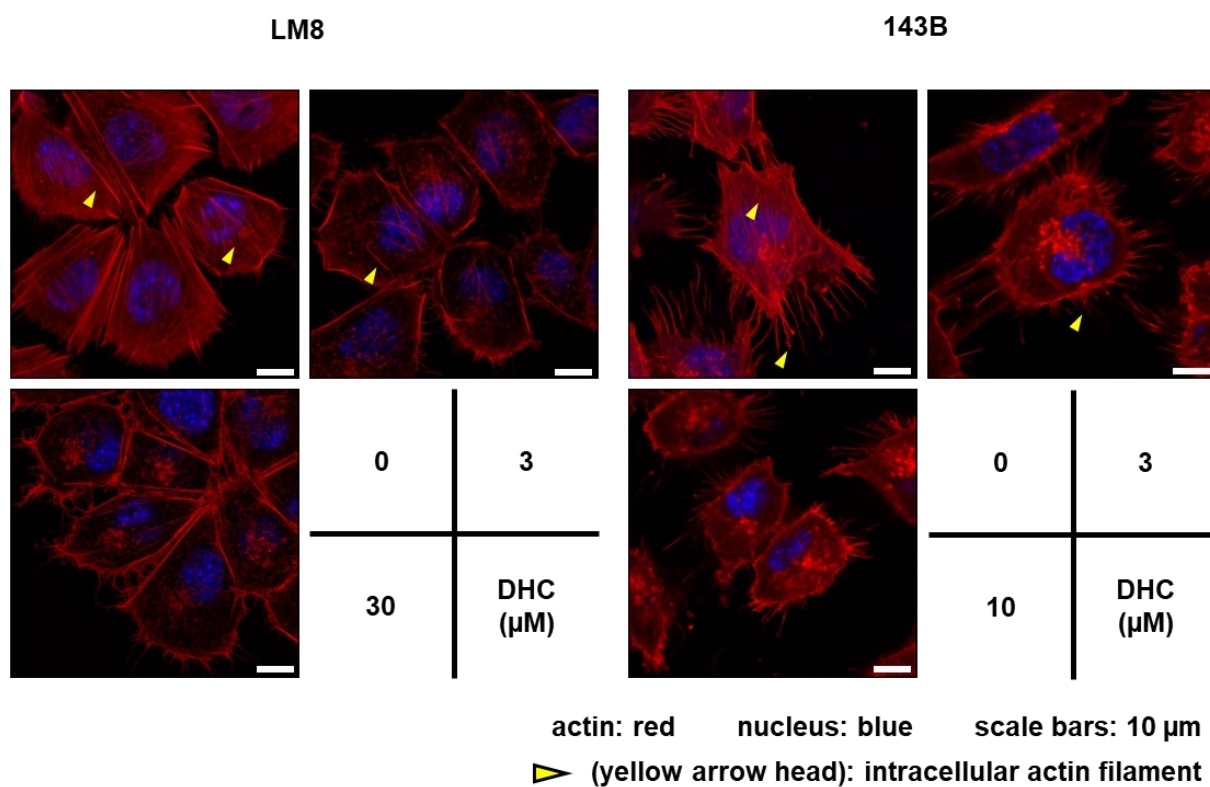
細胞の浸潤と遊走に關与する細胞運動には細胞内アクチンフィラメントの形成が重要となる。細胞内アクチンフィラメントには、細胞質全体に形成されるストレスファイバー (stress fiber) と細胞膜から糸状に突起が形成される糸状突起 (filopodia)、細胞膜の厚みを持たせる葉状仮足 (lamellipodia) が存在する (Figure 11)。



**Figure 11. Fluorescent image of Actin filament.**

Green, cyan and yellow ellipses indicate stress fiber, filopodia and lamellipodia, respectively.

細胞内アクチンフィラメントの形成に対する DHC の影響に關して、phalloidin を用いた蛍光染色法により評価した。薬物未処置群において、LM8 細胞および 143B 細胞いずれにおいても、ストレスファイバーや糸状仮足、葉状仮足が確認された。DHC は LM8 細胞のストレスファイバーと葉状仮足の形成を濃度依存的に減少させ、143B 細胞のストレスファイバーと糸状仮足の形成を濃度依存的に減少させた (Figure 12)。

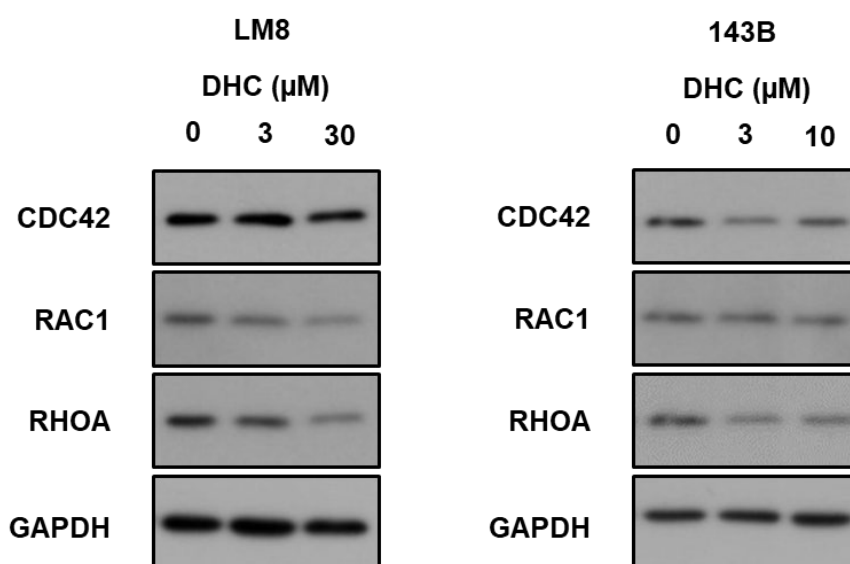


**Figure 12. Effect of DHC on actin filament formation in OS cells.**

OS cells were treated with DHC at the indicated concentrations for 24 h, and the actin filaments and nuclei were stained with phalloidin (red) and Hoechst 33258 (blue), respectively. Yellow arrowheads indicate intracellular actin filaments.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

3-2. 骨肉腫細胞に対する DHC の低分子量 GTP 結合型タンパク質のタンパク質発現への影響  
 低分子量 GTP 結合型タンパク質が細胞内アクチンフィラメントの形成に関与しており、RHOA がストレスファイバーの形成、RAC1 がラメラポディアの形成、CDC42 がフィロポディアの形成にそれぞれ関与している (96)。これらのタンパク質の発現について、ウェスタンブロッティング法を用いて検討した。LM8 細胞および 143B 細胞において、RHOA と RAC1、CDC42 のタンパク質発現が観察された。DHC は、LM8 細胞において、RAC1 および RHOA の発現を濃度依存的に減少させたが、CDC42 の発現には影響を及ぼさなかった。また、143B 細胞において DHC は CDC42 および RHOA の発現を濃度依存的に低下させ、RAC1 の発現をわずかに低下させた (Figure 13)。



**Figure 13. Expression levels of Rho small GTP-binding proteins in OS cells treated with DHC.**

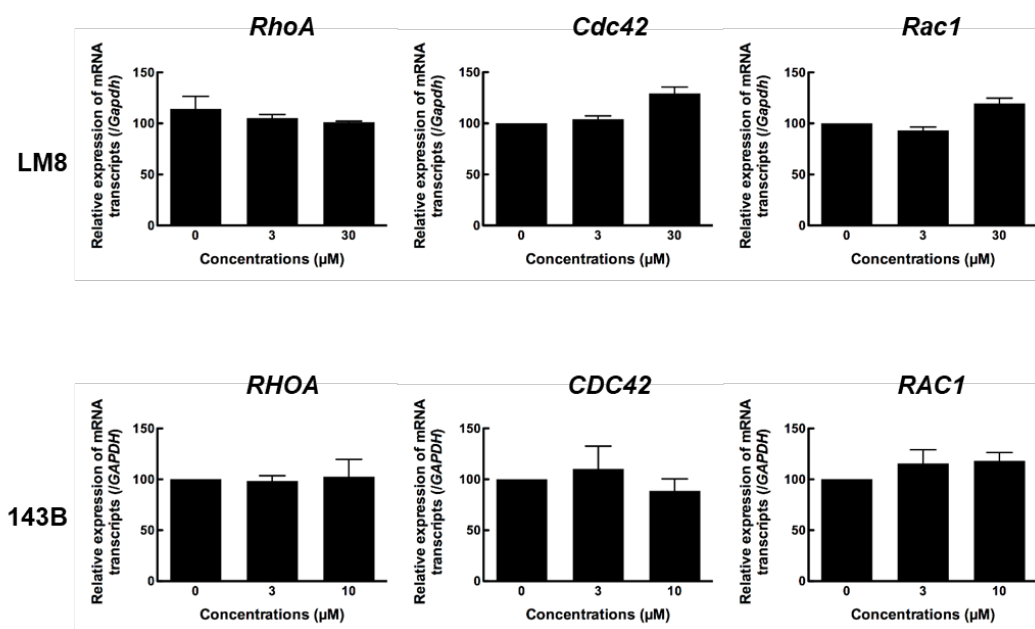
OS cells were treated with DHC at the indicated concentrations for 24 h, and the expression levels of Rho small GTP-binding proteins were detected by western blotting. GAPDH was used as a loading control.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.



### 3-3. 骨肉腫細胞に対する DHC の低分子量 GTP 結合型タンパク質の遺伝子発現への影響

前項で、DHC 処置により低分子量 GTP 結合タンパク質のタンパク質発現の低下が確認されたので、低分子量 GTP 結合タンパク質の mRNA 転写産物について qRT-PCR 法を用いて評価した。LM8 細胞において、*RhoA* と *Rac1*、*Cdc42* の遺伝子発現が、143B 細胞において *RHOA* と *RAC1*、*CDC42* の遺伝子発現が確認された。しかし、DHC は骨肉腫細胞において低分子量 GTP タンパク質の mRNA レベルには影響を及ぼさなかった (Figure 14)。



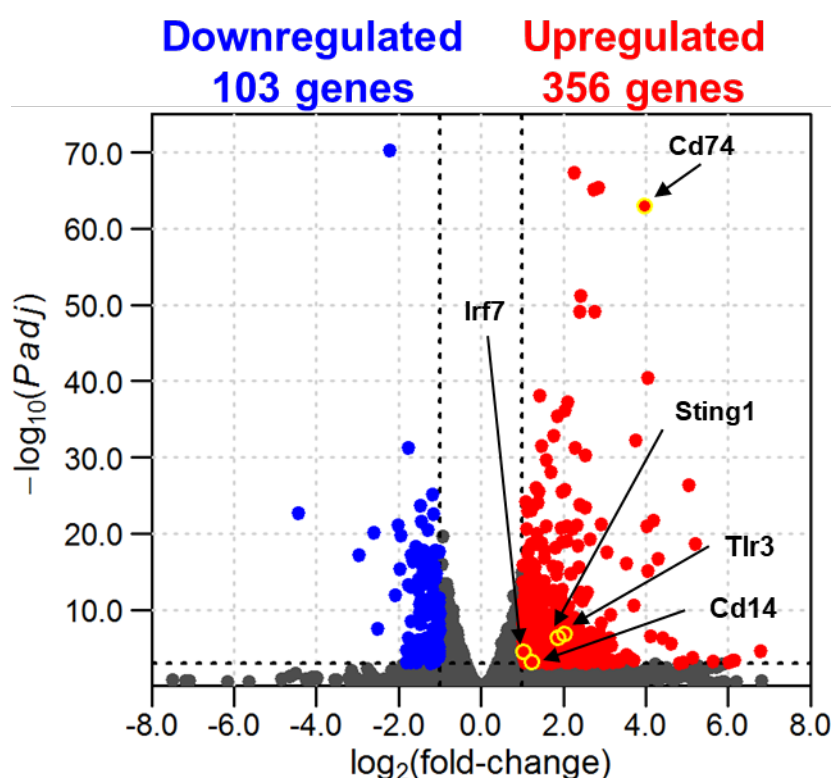
**Figure 14. Effect of DHC on mRNA transcripts of Rho small GTP-binding proteins in OS cells.**

LM8 cells were treated with DHC at the indicated concentrations for 24 h, and mRNA transcript levels of Rho small GTP-binding proteins were detected by qRT-PCR. *Gapdh* and *GAPDH* was used as a loading control.

Sugiyama, Y., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

### 3-4. LM8 細胞に対する DHC の全遺伝子発現への影響

DHC の浸潤・遊走抑制作用に関わる発現変動遺伝子を同定するため、RNA-Seq 解析を行った。その結果、459 遺伝子の発現に有意な変化が見られ、そのうち 356 遺伝子がアップレギュレーション、103 遺伝子がダウンレギュレーションしていた (Figure 15)。DHC 処理により発現が上昇した上位 50 遺伝子と低下した上位 50 遺伝子を Table 10 と Table 11 に示した。DHC は、前述した qRT-PCR の結果 (Figure 14) と一致して、低分子量 GTP 結合型タンパク質の mRNA レベルを減少させなかった (Figure 16)。また、浸潤・遊走とは別に免疫活性に関連する *Cd74* (97)、*stimulator of interferon response cGAMP interactor 1 (Sting1)* (98)、Toll-like receptor 3 (*Tlr3*) (99)、*interferon regulatory factor 7 (Irf7)* (100)、*Cd14* (101) の発現が DHC 処理により増加した。



**Figure 15 Differentially expressed genes (DEGs) between DHC-treated and untreated cells are shown as a volcano plot.**

X-axis,  $\log_2[\text{fold-change}]$ . Y-axis,  $-\log_{10}[\text{Padj}]$ , where *Padj* denotes the *p*-value from Wald test with the Benjamini-Hochberg method. Genes with *Padj* < 0.001 and  $|\log_2[\text{fold-change}]| \geq 1.0$  are defined as upregulated (red) or downregulated (blue) DEGs, respectively. Plots of the genes described in the main text are highlighted in yellow circles, and the gene names are indicated with arrows.

Sugiyama, Y., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

**Table 10. Top 50 upregulated genes in DHC-treated cells in comparison with untreated cells revealed by RNA-Seq analysis**

Ensembl Gene ID	Gene Name	log <sub>2</sub> Fold Change <sup>†</sup>	<i>p</i> <sub>adj</sub> <sup>‡</sup>
ENSMUSG00000009487	Otog	6.776	$2.36 \times 10^{-5}$
ENSMUSG00000073430	Gm10505	6.138	$4.72 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000049709	Nlrp10	6.094	$4.05 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000034796	Cpne7	6.003	$8.05 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000097254	C430042M11Rik	5.620	$5.57 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000033576	Apol6	5.188	$1.99 \times 10^{-19}$
ENSMUSG00000050014	Apol10b	5.133	$2.09 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000050578	Mmp13	5.041	$4.09 \times 10^{-27}$
ENSMUSG00000047180	Neurl3	4.895	$7.76 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000030088	Aldh1l1	4.820	$9.06 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000031506	Ptpn7	4.612	$2.83 \times 10^{-6}$
ENSMUSG00000044433	Camsap3	4.406	$4.39 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000021950	Anxa8	4.289	$1.83 \times 10^{-17}$
ENSMUSG00000040722	Scamp5	4.173	$1.90 \times 10^{-22}$
ENSMUSG00000031662	Snx20	4.108	$2.89 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000028972	Car6	4.045	$8.42 \times 10^{-16}$
ENSMUSG00000025432	Avil	4.039	$4.14 \times 10^{-41}$
ENSMUSG00000000308	Ckmt1	4.010	$1.01 \times 10^{-21}$
ENSMUSG00000024610	Cd74	3.979	$1.09 \times 10^{-63}$
ENSMUSG00000075602	Ly6a	3.745	$6.54 \times 10^{-33}$
ENSMUSG00000026831	1700007K13Rik	3.708	$4.86 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000035578	Iqcg	3.696	$2.38 \times 10^{-11}$
ENSMUSG00000028339	Col15a1	3.647	$2.46 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000075122	Cd80	3.531	$9.36 \times 10^{-17}$
ENSMUSG00000071203	Naip5	3.520	$8.43 \times 10^{-5}$
ENSMUSG00000028211	Trp53inp1	3.494	$6.38 \times 10^{-96}$
ENSMUSG00000031538	Plat	3.365	$5.43 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000030345	Dyrk4	3.360	$3.22 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000031165	Was	3.210	$7.00 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000044313	Mab21l3	3.157	$4.39 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000023064	Sncg	3.152	$4.88 \times 10^{-6}$
ENSMUSG00000025650	Col7a1	3.144	$4.15 \times 10^{-10}$
ENSMUSG000000103308	Gm37800	3.124	$4.42 \times 10^{-4}$

ENSMUSG00000024778	Fas	3.112	$5.24 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000068246	Apol9b	3.056	$3.11 \times 10^{-18}$
ENSMUSG00000050751	Pgbd5	3.037	$6.24 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000023918	Adgrf4	3.023	$1.28 \times 10^{-5}$
ENSMUSG00000053675	Tgm5	2.974	$9.01 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000003341	Atp8b3	2.963	$5.19 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000074896	Ifit3	2.962	$2.97 \times 10^{-5}$
ENSMUSG00000048572	Tmem252	2.925	$7.65 \times 10^{-5}$
ENSMUSG00000032661	Oas3	2.922	$5.11 \times 10^{-9}$
ENSMUSG00000039616	Mocos	2.915	$5.32 \times 10^{-22}$
ENSMUSG00000040907	Atp1a3	2.875	$1.42 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000001349	Cnn1	2.866	$1.40 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000038393	Txnip	2.835	$4.30 \times 10^{-66}$
ENSMUSG00000052131	Akr1b7	2.818	$8.10 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000056856	Jakmip3	2.777	$1.42 \times 10^{-6}$
ENSMUSG00000020423	Btg2	2.750	$7.48 \times 10^{-50}$
ENSMUSG00000038045	Sult6b1	2.746	$5.71 \times 10^{-4}$

<sup>†</sup>log2 Fold Change between the data derived from DHC-treated and untreated cells

<sup>‡</sup>p-value with adjustment was calculated by Wald test DESeq2

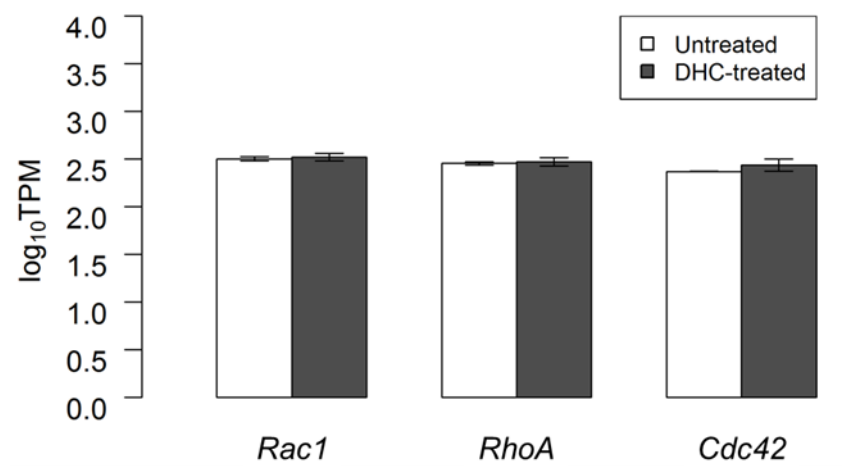
**Table 11. Top 50 downregulated genes in DHC-treated cells in comparison with untreated cells revealed by RNA-Seq analysis**

<b>Ensembl Gene ID</b>	<b>Gene Name</b>	<b>log<sub>2</sub> Fold Change <sup>†</sup></b>	<b><i>p</i><sub>adj</sub> <sup>‡</sup></b>
ENSMUSG00000025489	Ifitm5	-4.443	$1.98 \times 10^{-23}$
ENSMUSG00000050914	Ankrd37	-2.974	$6.04 \times 10^{-18}$
ENSMUSG00000024330	Col11a2	-2.619	$7.16 \times 10^{-21}$
ENSMUSG00000020218	Wif1	-2.545	$3.57 \times 10^{-85}$
ENSMUSG00000037188	Grhl3	-2.528	$2.75 \times 10^{-8}$
ENSMUSG00000029306	Ibsp	-2.227	$5.47 \times 10^{-71}$
ENSMUSG00000034353	Ramp1	-2.080	$1.06 \times 10^{-12}$
ENSMUSG00000025161	Slc16a3	-2.027	$8.26 \times 10^{-22}$
ENSMUSG00000054136	Adm2	-1.981	$4.38 \times 10^{-16}$
ENSMUSG00000079055	Slc8a3	-1.945	$1.70 \times 10^{-20}$
ENSMUSG00000058628	Olfr875	-1.817	$1.92 \times 10^{-5}$
ENSMUSG00000044737	Klk14	-1.814	$6.77 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000027559	Car3	-1.780	$6.41 \times 10^{-32}$
ENSMUSG00000033453	Adamts15	-1.780	$4.84 \times 10^{-14}$
ENSMUSG00000042671	Rgs8	-1.773	$5.14 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000021572	Cep72	-1.712	$2.96 \times 10^{-9}$
ENSMUSG00000039954	Stk32a	-1.709	$6.64 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000019301	Hsd17b1	-1.696	$8.40 \times 10^{-14}$
ENSMUSG00000029675	Eln	-1.696	$7.10 \times 10^{-18}$
ENSMUSG00000038415	Foxq1	-1.678	$1.04 \times 10^{-5}$
ENSMUSG00000045667	Smtnl2	-1.665	$3.10 \times 10^{-6}$
ENSMUSG00000031026	Trim66	-1.664	$4.86 \times 10^{-17}$
ENSMUSG00000019989	Enpp3	-1.590	$5.24 \times 10^{-19}$
ENSMUSG00000038086	Hspb2	-1.586	$2.89 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000071516	H2ac13	-1.565	$8.41 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000029385	Ccng2	-1.531	$1.14 \times 10^{-14}$
ENSMUSG00000074024	4632427E13Rik	-1.515	$2.22 \times 10^{-6}$
ENSMUSG00000031661	Nkd1	-1.515	$3.11 \times 10^{-13}$
ENSMUSG00000039345	Mettl22	-1.514	$7.75 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000021303	Gng4	-1.495	$1.78 \times 10^{-11}$
ENSMUSG00000027224	Duoxa1	-1.492	$2.76 \times 10^{-10}$
ENSMUSG00000053310	Nrgn	-1.488	$7.46 \times 10^{-9}$
ENSMUSG00000050860	Phospho1	-1.484	$7.49 \times 10^{-15}$

ENSMUSG00000026308	Klhl30	-1.483	$1.26 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000021186	Fbln5	-1.466	$1.93 \times 10^{-24}$
ENSMUSG00000030222	Rerg	-1.463	$3.33 \times 10^{-12}$
ENSMUSG00000048424	Ranbp3l	-1.461	$5.65 \times 10^{-14}$
ENSMUSG00000028179	Cth	-1.455	$2.74 \times 10^{-22}$
ENSMUSG00000005474	Myl10	-1.441	$5.29 \times 10^{-6}$
ENSMUSG00000015950	Ncf1	-1.437	$5.06 \times 10^{-18}$
ENSMUSG00000078566	Bnip3	-1.436	$2.58 \times 10^{-15}$
ENSMUSG00000027955	Gask1b	-1.422	$2.23 \times 10^{-16}$
ENSMUSG00000027894	Slc6a17	-1.414	$1.85 \times 10^{-4}$
ENSMUSG00000006494	Pdk1	-1.405	$1.84 \times 10^{-18}$
ENSMUSG00000032715	Trib3	-1.355	$3.97 \times 10^{-10}$
ENSMUSG00000048895	Cdk5r1	-1.336	$5.59 \times 10^{-7}$
ENSMUSG00000041132	N4bp2l1	-1.323	$1.25 \times 10^{-16}$
ENSMUSG00000086841	2410006H16Rik	-1.305	$4.83 \times 10^{-10}$
ENSMUSG00000059060	Rad51b	-1.304	$6.73 \times 10^{-5}$
ENSMUSG00000030717	Nupr1	-1.302	$2.94 \times 10^{-21}$

<sup>†</sup>log2 Fold Change between the data derived from DHC-treated and untreated cells

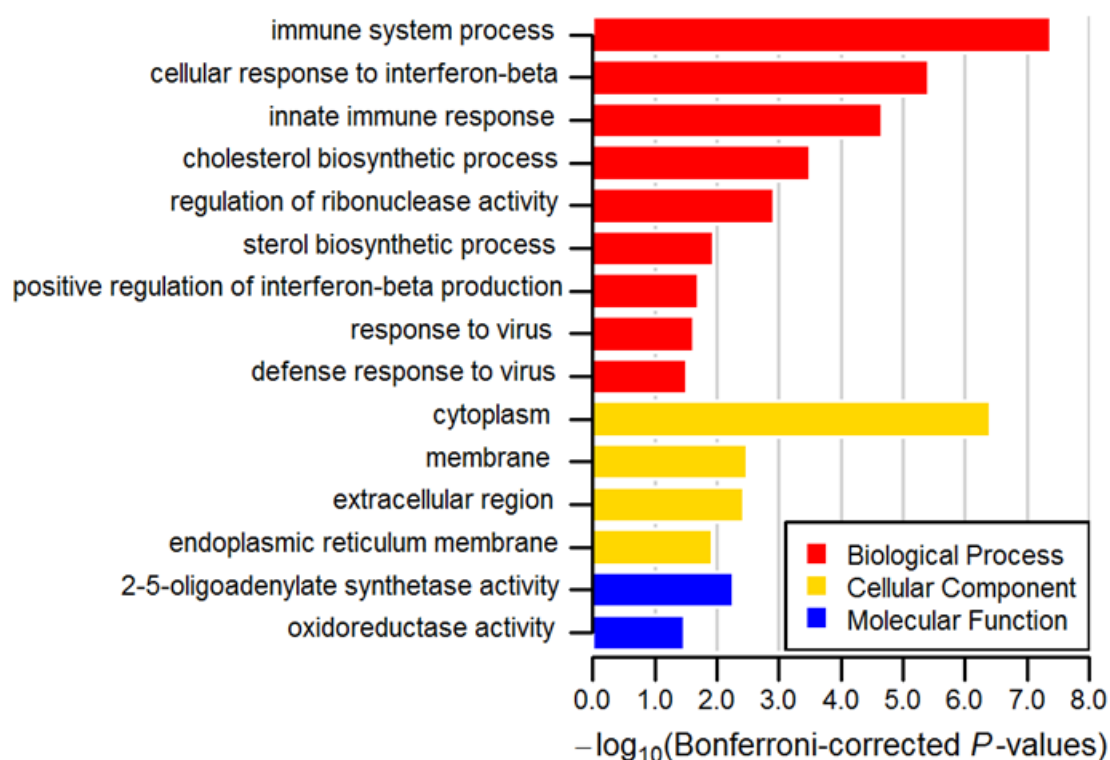
<sup>‡</sup>p-value with adjustment was calculated by Wald test DESeq2



**Figure 16. Effect of DHC on mRNA transcript levels of Rho small GTP-binding proteins in OS cells.**

Bar plots of gene expression levels for the three small GTP-binding proteins, Rac1, RhoA, and Cdc42, are shown. The values of gene expression are based on the transcripts per million (TPM) data calculated by RSEM derived from the RNA-Seq data (detailed procedure for the data processing is described in the main text). Y-axis represents the common logarithm value of TPM (log<sub>10</sub>TPM). Each bar displays the average of log<sub>10</sub>TPM with  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). The significances between DHC-treated and untreated cells in each gene are evaluated by Wald test from DESeq2 using RSEM results. The adjusted p-values by Wald test for Rac1, RhoA, and Cdc42 were 0.2589, 0.2587, and 0.9917, respectively. The bar plot was drawn by R version 3.6.3.

また、有意に発現が上昇した 356 遺伝子を発現変動遺伝子 (DEGs) と定義し、DAVID による GO 解析を行った。解析の結果、223 の GO タームが得られ、15 の GO タームが Bonferroni 補正により  $p < 0.05$  で有意であった (Figure 17)。その中でも、GO ターム「IMMUNE\_SYSTEM\_PROCESS」(GO:0002376) が最も関連性が高いことがわかった。しかし、浸潤・遊走に関わる遺伝子群の発現に関しては、DHC は影響を及ぼさなかった。



**Figure 17. Results of GO analysis by DAVID for upregulated DEGs.**

X-axis,  $-\log_{10}[p\text{-values after Bonferroni correction}]$ . GO terms are sorted in the order of significance in each GO category.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.



さらに GSEA による GO 解析では、DAVID による GO 解析と同様に、免疫系に関連する GO タームが検出された (Supplementary Figure 3 と Table 12)。GSEA に基づく GO ターム「IMMUNE\_SYSTEM\_PROCESS」は、DHC 処理と正の相関を示した (Figure 18)。これらの結果は、LM8 細胞を DHC 処理することによって IMMUNE\_SYSTEM\_PROCESS に関連する遺伝子 (*Cd74*, *Irf7*, *Sting1*, *Tlr3*, *Cd14*) の発現を増加させる可能性を示している。

以上のことから、DHC 処理で生じた、mRNA レベルでは発現が低下しない低分子量 GTP 結合型タンパク質におけるタンパク質レベルでの発現の低下は、DHC が遺伝子の転写を制御しているのではなく、mRNA からタンパク質に翻訳される段階を阻害する、またはタンパク質の分解を促進するとの仮説を立てた。

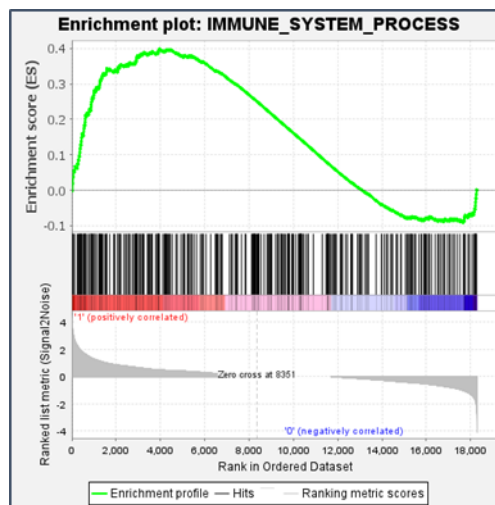
**Table 12. Significant gene sets from top-ranked results by GSEA**

Gene set name	Genes <sup>†</sup>	Enrichment Score	FDR <i>q</i> -val <sup>‡</sup>
GOMF_RECEPTOR_ANTAGONIST_ACTIVITY	20	0.8232230	0.0182186
HP_OBSTRUCTIVE_AZOOSPERMIA	19	0.8162578	0.0211655
GOBP_OVULATION	23	0.7872376	0.0312366
GOBP_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION OF_PEPTIDE_ANTIGEN_VIA_MHC_CLASS_I	23	0.7650562	0.0164822
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_ANION TRANSPORT	24	0.7572414	0.0192320
GOBP_MYD88_DEPENDENT_TOLL_LIKE RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	23	0.7561793	0.0163497
GOMF_SIGNALING_RECEPTOR_INHIBITOR ACTIVITY	30	0.7506412	0.0286670
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_AMINE TRANSPORT	27	0.7424440	0.0185964
GOMF_NADPLUS_NUCLEOSIDASE_ACTIVITY	26	0.7361867	0.0202937
GOMF_PHOSPHOLIPASE_A2_ACTIVITY	32	0.7238860	0.0211525
GOBP_SENSORY_PERCEPTION_OF_BITTER_TASTE	32	0.7176552	0.0164826
GOBP_DETECTION_OF_CHEMICAL_STIMULUS INVOLVED_IN_SENSORY_PERCEPTION_OF_TASTE	35	0.7093546	0.0175817
GOCC_IMMUNOGLOBULIN_COMPLEX	49	0.6823267	0.0166062
GOBP_ANTIGEN_PROCESSING_AND	51	0.6725287	0.0165676

PRESENTATION_OF_PEPTIDE_ANTIGEN			
GOMF_G_PROTEIN_COUPLED_AMINE_RECEPTOR_ACTIVITY	46	0.6708621	0.0176382
GOBP_STEROL_BIOSYNTHETIC_PROCESS	65	0.6507968	0.0192297
HP_ABNORMAL_NASAL_MUCOSA_MORPHOLOGY	62	0.6456252	0.0180320
GOBP_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	90	0.6413381	0.0208385
GOBP_MACROPHAGE_ACTIVATION	104	0.6110800	0.0170234
GOBP_INTERLEUKIN_1_PRODUCTION	117	0.6030853	0.0164803

† Number of genes evaluated in each gene set based on RNA-Seq data.

‡ The highest False Discovery Rate ( $q$ -value) in three repeated tests.



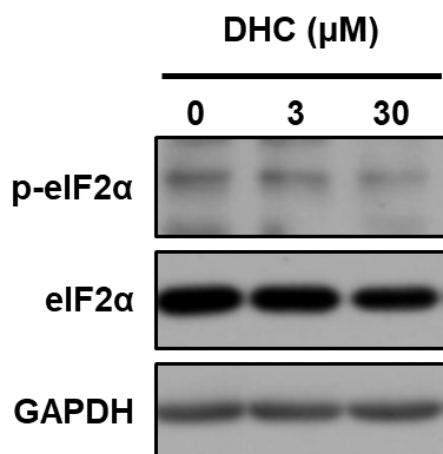
**Figure 18. Representative result of GSEA.**

The enrichment plot of the gene set corresponding to “IMMUNE\_SYSTEM\_PROCESS”, which was the most significant GO term by DAVID for upregulated DEG. The enrichment score of this gene set was 0.3987821.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

### 3-5. LM8 細胞に対する DHC のタンパク質翻訳系とタンパク質分解系への影響

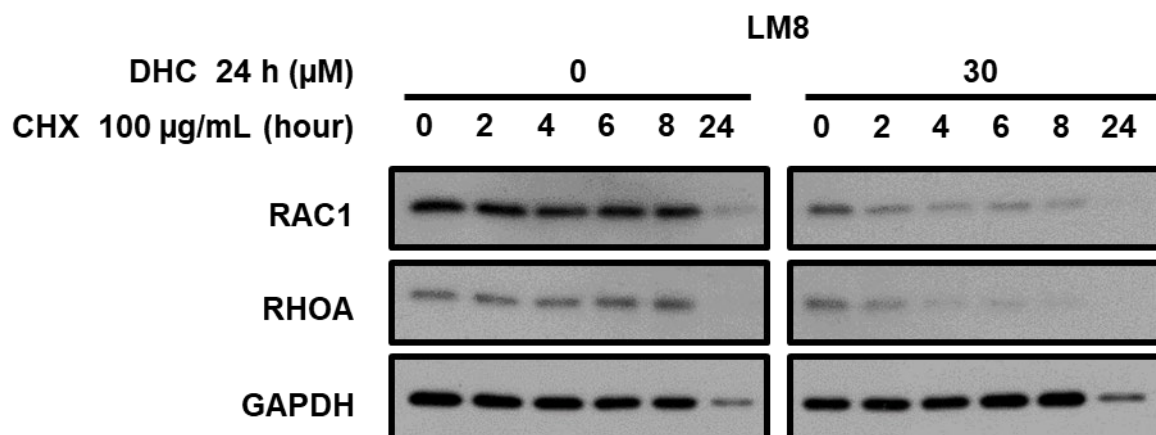
タンパク質翻訳系への影響を確認するために、タンパク質翻訳抑制因子であるリン酸化 eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) の発現についてウエスタンブロッティング法を用いて評価した。p-eIF2 $\alpha$  の発現が上昇すると、GDP 結合型 eIF2 $\alpha$  から、メチオニル-tRNA をリボソームに運搬する GTP 結合型 eIF2 $\alpha$  への交換反応が抑制されるのでタンパク質の翻訳が阻害される。LM8 細胞において p-eIF2 $\alpha$ 、eIF2 $\alpha$  の発現が確認されたが、DHC 処置による p-eIF2 $\alpha$  の発現上昇は認められなかった (Figure 19)。



**Figure 19. Expression levels of p-eIF2 $\alpha$  and eIF2 $\alpha$  in LM8 cells treated with DHC.**

OS cells were treated with DHC at the indicated concentrations for 24 h, and the expression levels of p-eIF2 $\alpha$  and eIF2 $\alpha$  were detected by western blotting. GAPDH was used as a loading control.

mRNA の翻訳に対する阻害薬である CHX (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 存在下で低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現を評価した。Figure 13 と同様に、LM8 細胞において、RHOA と RAC1 のタンパク質発現が観察された。RAC1 と RHOA は、DHC 非処置下で時間依存的にわずかに発現が低下した。一方、DHC 処置下で著明かつ経時的な発現減少を認めた (Figure 20)。

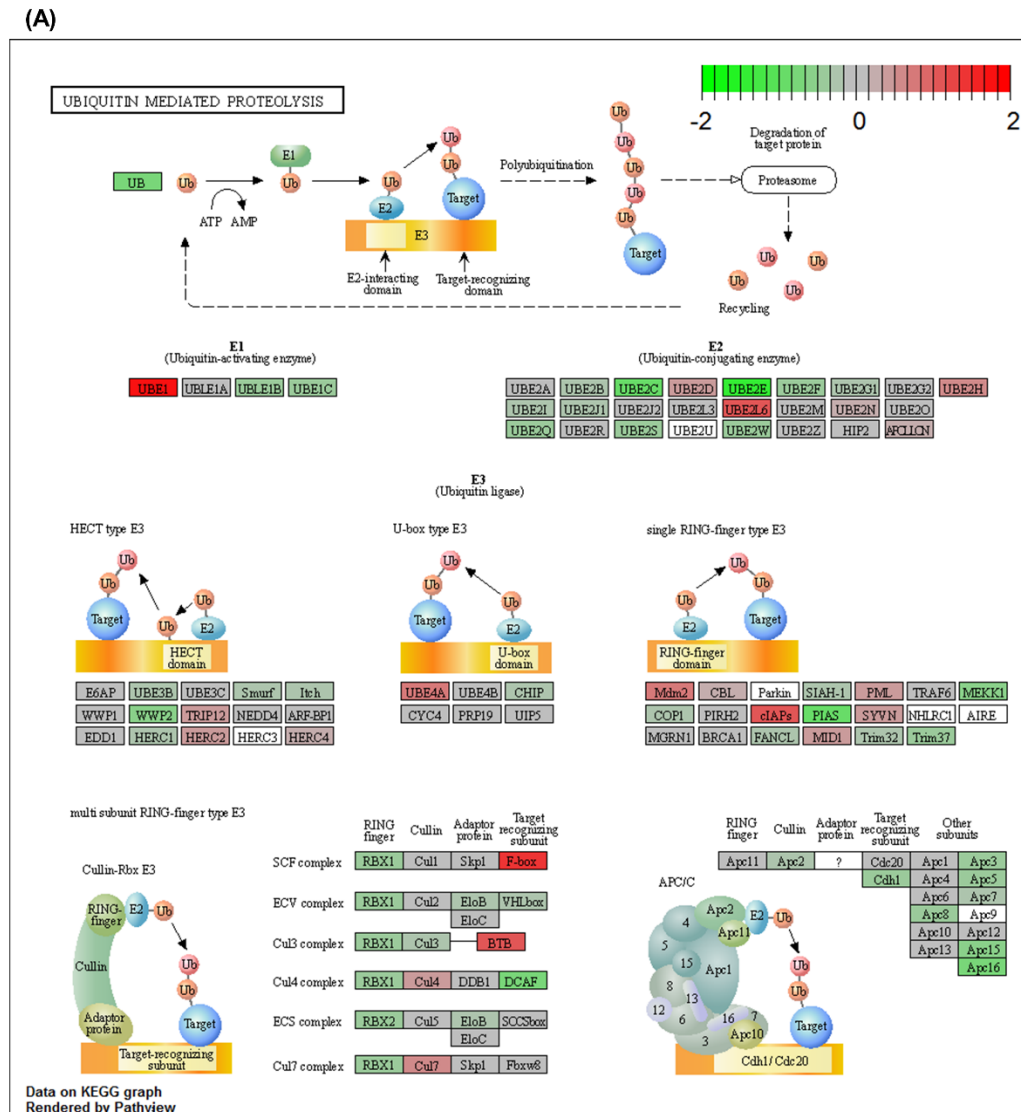


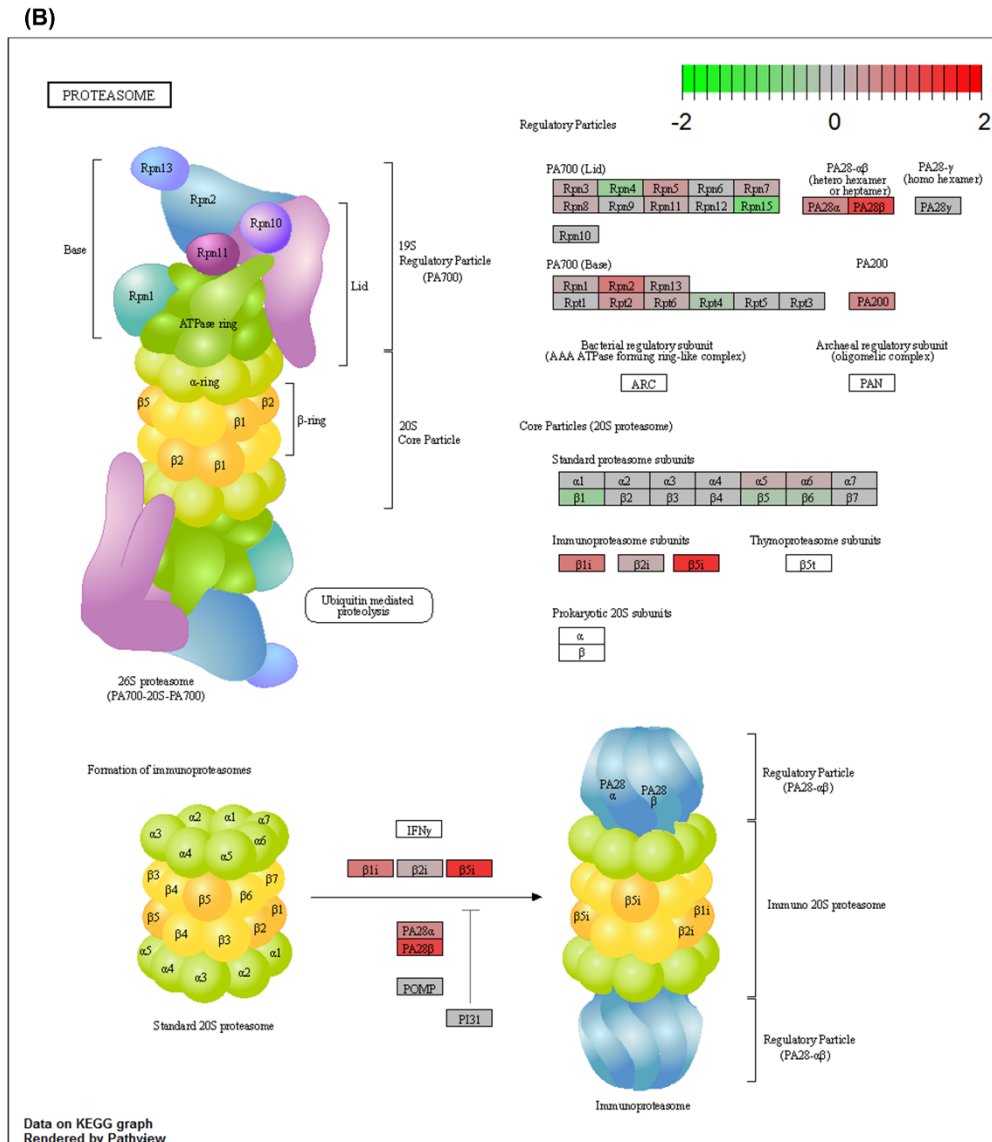
**Figure 20. Effect of DHC on the degradation of Rho small GTP-binding proteins.**

Effect of DHC on the degradation of Rho small GTP-binding proteins. LM8 cells were treated with DHC at 0 or 30  $\mu\text{M}$  for 24 h, and co-treated with cycloheximide (CHX) at 100  $\mu\text{g/mL}$  before collection of protein. The expression of Rho small GTP-binding proteins was detected by western blotting. GAPDH was used as a loading control.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

RNA-Seq 解析によりユビキチン・プロテアソーム系に着目してパスウェイ解析を行った。一部の遺伝子は有意に変動していたが、同じ傾向を示し遺伝子が少なかったため、ユビキチン・プロテアソーム系全体の変動を評価するエンリッチメント解析では、有意な遺伝子群として浮上しなかった (Figure 21)。しかし、RAC1 や RHOA の分解に関与する *F-box* 遺伝子の有意な発現上昇が確認された (Figure 22)。

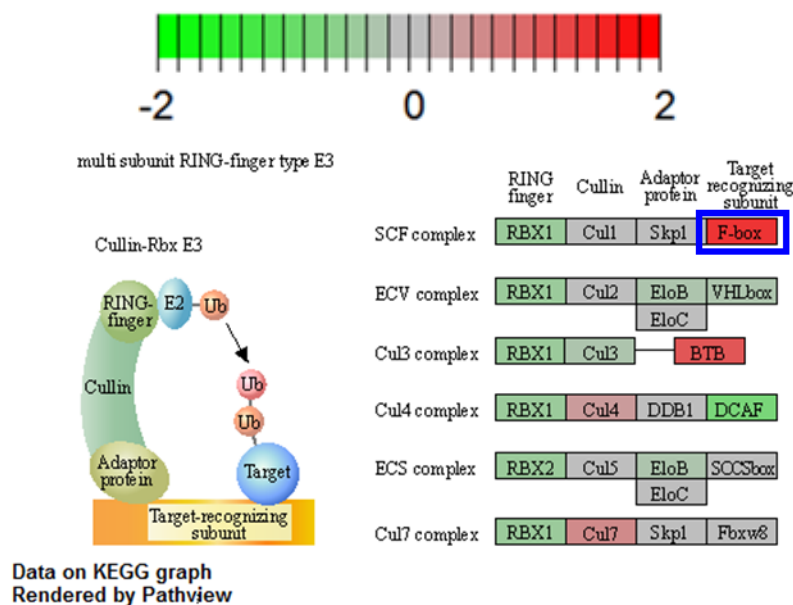




**Figure 21. Overview of the pathways related to ubiquitination.**

Pathway analyses related to (A) ubiquitin-mediated proteolysis (mmu04120) and (B) proteasome (mmu03050) were performed using KEGG pathways. The text boxes of the genes in each KEGG pathway were colored according to expression levels using the “Pathview” package of R. The gene expression colors were determined according to the  $\log_2[\text{fold-change}]$  values derived from the results of DESeq2. Deep red and green indicate upregulated and downregulated genes in DHC-treated cells, respectively. Genes with a “baseMean” expression value  $<10.0$  were considered to have low expression and excluded from the analysis. The  $\log_2[\text{fold-change}]$  value range in the color scale was set to  $-2.0$ – $2.0$ , and values higher or lower were smoothed to  $2.0$  or  $-2.0$ , respectively.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.



**Figure 22. Overview of the pathway related to multi subunit RING-finger type E3.**

Pathway analyses related to multi subunit RING-finger type E3 in ubiquitin-mediated proteolysis were performed using KEGG pathways. The text boxes of the genes in each KEGG pathway were colored according to expression levels using the “Pathview” package of R. The gene expression colors were determined according to the  $\log_2[\text{fold-change}]$  values derived from the results of DESeq2. Deep red and green indicate upregulated and downregulated genes in DHC-treated cells, respectively. Genes with a “baseMean” expression value  $<10.0$  were considered to have low expression and excluded from the analysis. The  $\log_2[\text{fold-change}]$  value range in the color scale was set to  $-2.0$ – $2.0$ , and values higher or lower were smoothed to  $2.0$  or  $-2.0$ , respectively.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

#### 4. 考察

細胞運動はアクチンフィラメントの重合と脱重合の繰り返すことにより制御され、細胞の浸潤や遊走を引き起こす (30)。細胞内のアクチンフィラメントには糸状仮足、葉状仮足、ストレスファイバーがあり、それぞれ低分子量 GTP 結合型タンパク質である CDC42、RAC1、RHOA により制御されている。本研究では、DHC がもたらす浸潤・遊走抑制作用は細胞運動に関与するタンパク質発現の低下に起因するものと仮説を立て、その検証実験を行った。

蛍光免疫染色法により可視化された細胞内アクチンフィラメントは、DHC 処置により消失、または短くなっていることが確認された。さらに、ウェスタンブロッティング法を用いて、アクチンフィラメントを制御する低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現も同様に低下することを確認した。アクチンは  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つのファミリーに分類され、特に  $\beta$ -アクチンは細胞の種類を問わず幅広く分布する。DHC 処置により  $\beta$ -アクチンの発現は低下しなかったことから (データ不掲載)、DHC のアクチンフィラメントの形成阻害はアクチンの発現低下によるものではなく、低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現低下による可能性が推察された。また、低分子量 GTP 結合型タンパク質は GEF を介して不活性型である GDP 結合型から活性型である GTP 結合型に変換されることにより、アクチンフィラメントを形成する。一般的に、低分子量 GTP 結合型タンパク質とアクチンフィラメントの関連性を評価する際は、全量に対する GTP 結合型の低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現を評価する。しかし、DHC は低分子量 GTP 結合型タンパク質の全量そのものを低下させたので、DHC 処置によるアクチンフィラメントの形成阻害は、低分子量 GTP 結合型タンパク質の活性低下ではなく、タンパク質発現低下によるものと推察された。

次に、低分子量 GTP 結合型タンパク質の mRNA 転写産物の発現を評価し、遺伝子発現制御とタンパク質の発現低下の関連性を評価した。しかし、qRT-PCR と RNA-Seq 解析の両方を用いて、DHC は低分子量 GTP 結合型タンパク質の mRNA レベルを減少させないことが明らかとなった。また、RNA-Seq 解析で抽出された発現変動遺伝子で GO 解析を行った結果、浸潤・遊走に関わる遺伝子群の変化は確認されなかった。一方で、発現変動遺伝子の中でも免疫関連遺伝子の発現が高くなることが明らかとなった。特に、*Cd74*、*Sting1*、*Tlr3* は抗腫瘍免疫関連遺伝子としても報告されており (97–99)、がん転移抑制効果以外に抗腫瘍免疫賦活作用を有する可能性が見出された。これらのことから、DHC による低分子量 GTP 結合型タンパク質のタンパク質発現低下は、DNA から mRNA への転写段階に対する阻害ではなく、mRNA からタンパク質への翻訳阻害または、タンパク質の分解促進により生じたと仮説を立てた。

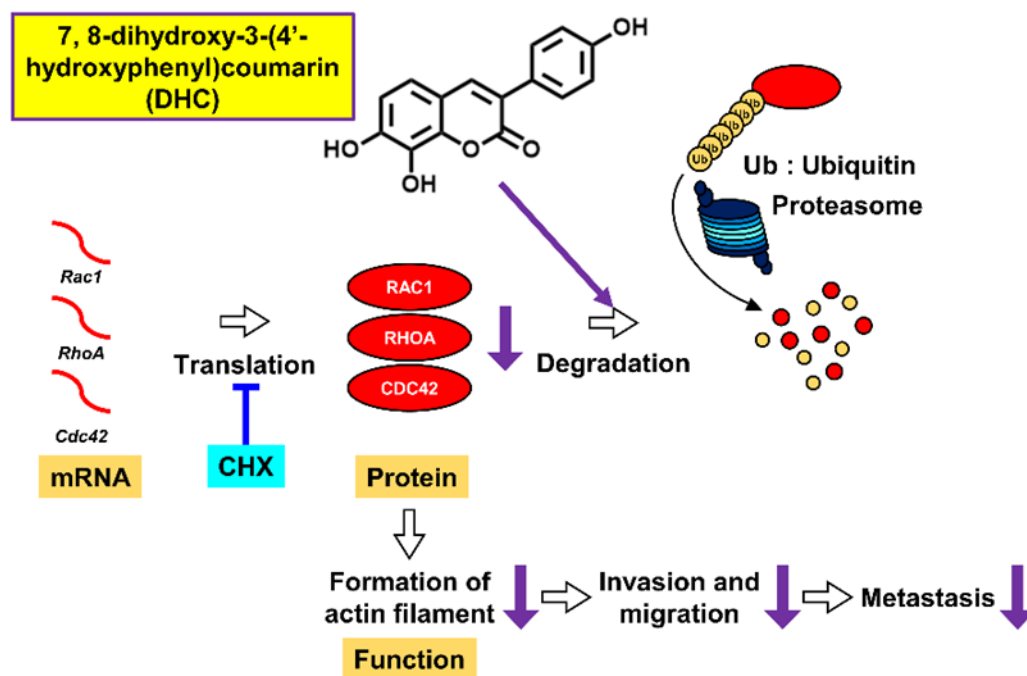
タンパク質翻訳に重要な因子として、リボソームや tRNA、翻訳開始因子、翻訳伸長因子などが挙げられる。GTP 結合型 eIF2 $\alpha$  はメチオニル tRNA をリボソームに運搬する翻訳開始因子として知られている一方で、p-eIF2 $\alpha$  は GDP 結合型 eIF2 $\alpha$  から GTP 結合型 eIF2 $\alpha$  に変換する eIF2B を阻害する翻訳開始抑制因子として知られている。そこで、DHC のタンパク質翻訳系への影響を評価するため、ウェスタンブロッティング法を用いて p-eIF2 $\alpha$  の発現を評価した。しかし、DHC 処置により p-eIF2 $\alpha$  の発現は上昇しなかったため、次にタンパク質の分解系について検討した。



CHX は真核細胞リボソームの 60S サブユニットに作用し、ペプチド鎖伸長における転移反応を阻害することによりタンパク質の翻訳を阻害する。従って、CHX の処置時間が長くなるにつれて、細胞内のタンパク質はユビキチン・プロテアソーム系またはオートファジーが含まれる細胞内タンパク質分解系により分解され、経時的なタンパク質発現の低下が確認できる。低分子量 GTP 結合型タンパク質においては、オートファジーによる分解の報告はなく、ユビキチン・プロテアソーム系の寄与が大きいと考えられる。本研究では CHX を 2、4、6、8 時間と 24 時間処置しており、8 時間までに RAC1 や RHOA の発現低下は認められなかったが、CHX を 24 時間処置した際は、LM8 細胞における RAC1 と RHOA のタンパク質発現は低下した。このタンパク質合成阻害下で DHC を処置すると、RAC1 と RHOA の発現は、CHX 単独処置では減少しなかった 8 時間以内で、著明かつ経時的な発現低下を認めた。このことから、DHC による低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現低下は、細胞内タンパク質分解系が亢進によるものと推察された。しかし、ユビキチン・プロテアソーム系に DHC が作用する場合、RAC1 や RHOA に対するユビキチン修飾の亢進を評価する必要がある。また、タンパク質翻訳系において翻訳開始因子以外にも多くの要素が含まれており、リボソームや翻訳伸長因子などの DHC のタンパク質翻訳系への影響を評価する必要もあるが、本研究ではいずれも検討できておらず、今後の検討課題である。

さらに、RNA-Seq 解析の結果、DHC 処理により *F-box* ファミリー遺伝子の発現が上昇することを確認した。RAC1 と RHOA は細胞内分解系であるユビキチン・プロテアソーム系を介して *F-box* ファミリーの一つである SCF<sup>FBXL19</sup> を含む E3 リガーゼ複合体によってユビキチン化され分解される (86,102)。ゆえに、タンパク質分解系の亢進は *F-box* ファミリー遺伝子発現の上昇によるものと推察した。臨床では、ボルテゾミブをはじめとしたプロテアソーム阻害薬が多発性骨髄腫の治療薬として使用されており、I $\kappa$ B の分解を抑制し NF- $\kappa$ B 経路を抑制すること、misfolded protein の分解を抑制し小胞体内に蓄積させ小胞体ストレスをもたらし、その結果、オートファジーを誘導することにより、がん細胞の増殖を抑制し細胞死を誘導するとされている (103)。この知見を踏まえると、DHC の薬理作用である細胞内タンパク質分解系の亢進はプロテアソーム阻害薬と相反する薬理作用となり、「DHC はがん細胞にとって有利な状況を引き起こすのか？」という疑問が生じる。しかし、がん病態形成に関わる鍵となるタンパク質やシグナルは、個々のがん種で異なっており、プロテアソーム阻害薬と相反する薬理作用について一概に悪影響を及ぼすとも言えない。また RNA-Seq 解析により、DHC はプロテアソーム系に関わる遺伝子群の発現変化には影響を及ぼさず、*F-box* をはじめとしたユビキチン・プロテアソーム系に関連する遺伝子の発現を亢進している。このことから、DHC は 26S プロテアソーム自体の活性を高めるのではなく、一部の E3 リガーゼの活性を高めることで、選択的にタンパク質の分解を促しているとも推察される。E3 リガーゼの発現亢進を介した RAC1 の発現減少が細胞の遊走低下につながることは報告されており (84,86,104)、このことは DHC が E3 リガーゼの制御を介するがん転移抑制薬としての可能性を有することを裏付ける。しかし詳細な *F-box* ファミリー遺伝子発現までの評価はできておらず、推測の域を出ない。今後、DHC の標的分子の同定とともに DHC の作用点を明らかにし、低分子量 GTP 結合型タンパク質・ユビキチン間の相互作用に対する DHC の評価を行い、さらに多く

のがん種での自然転移モデルで検証することで、この疑問を解決する必要がある。以上の結果を踏まえて、DHC が RAC1 や RHOA などの低分子量 GTP 結合型タンパク質の分解亢進によるアクチンフィラメントの形成阻害と細胞運動制御との関連について、今後明らかにしていきたい (Figure 23)。



**Figure 23. Predicted mechanism of DHC.**

DHC enhanced the degradation of rho small GTP-binding proteins by activating the intracellular degradation system. As a result, the degradation inhibited the formation of intracellular actin filaments and subsequently inhibited OS cell invasion and migration.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

## 5. 小括

本節では、浸潤・遊走抑制作用を有する DHC の作用機序解明を行い、以下の知見を得た。

1. DHC は細胞内アクチンフィラメントの形成を阻害した。
2. DHC は低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現を低下させた。
3. タンパク質合成が阻害された環境下において、DHC は低分子量 GTP 結合型タンパク質の経時的な発現低下を早めた。

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・遊走を抑制することが明らかとなった。

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

### 1. 緒言

昨今の分子生物学や細胞生物学の発展により、医薬品開発は目覚ましい発展を遂げた。臨床研究につなげるためには、細胞株を用いた *in vitro* の研究で抗腫瘍効果を示す化合物が同定されたのち、*in vivo* 個体レベルでの研究において抗腫瘍効果および動態や毒性の評価が求められる。様々ながん種のモデルマウスが作製され、候補化合物の抗腫瘍効果が検討されているが、これらのマウスモデルの多くは細胞株を用いた cell line-derived xenograft (CDX) モデルである。この CDX モデルは、医薬品開発において最も一般的な *in vivo* における抗腫瘍効果の検討手法であり、固形腫瘍においては皮下腫瘤モデルのみならず、同所性移植による正所性担がんモデルマウスも用いられる。また細胞株に *Luciferase* 遺伝子や *GFP* 遺伝子を導入することにより、*in vivo* imaging system (IVIS) やフローサイトメトリー法を用いて腫瘍量の変化や体内分布を比較的簡便に確認できるなど、利便性にも優れている。

がん転移とは、序章でも述べたように、がん細胞の浸潤・遊走、原発巣形成後の血管内侵入の過程、および血流移行後の血管外侵出から転移巣形成までの複数の過程である。浸潤・遊走抑制効果を有する DHC の *in vivo* におけるがん転移抑制効果を評価するにあたって、腫瘍細胞を移植して原発巣を形成し、その後転移巣を形成する自然転移マウスモデルを使用することが最も標準的なモデルと考えられる。自然転移マウスモデルとは、原発腫瘍の形成から血流移行することで異なる臓器に転移巣を形成する、がん転移の一連を模倣したマウスモデルのことである。本研究では原発腫瘍を摘出し、原発腫瘍が肉眼的に確認できずに残存した腫瘍細胞の遠隔転移を評価する。

免疫不全マウスの普及により、ヒトがん細胞を異種動物であるマウスに移植する異種移植モデルを用いた研究が盛んに行われている。しかし、異種移植モデルにおいて抗原抗体反応による免疫拒絶により、腫瘍生着ができてもがん転移が確認できない場合もあり、ヒトがん細胞を用いた自然転移マウスモデルはふさわしくないと考える。一方で、マウスがん細胞は同系マウスを用いた自然転移モデルに用いられており、マウス骨肉腫細胞 LM8 細胞 (51) やマウス悪性黒色腫細胞 B16 細胞 (105)、マウス乳がん細胞 4T1 細胞 (106) などが挙げられる。

本節では、臨床応用を念頭においてクマリン系化合物 DHC のがん転移抑制作用を評価するために、*in vitro* の評価に加え、*in vivo* の評価として LM8 細胞を用いた同系移植による自然転移マウスモデルを用いて検討した。

## 2. 実験方法

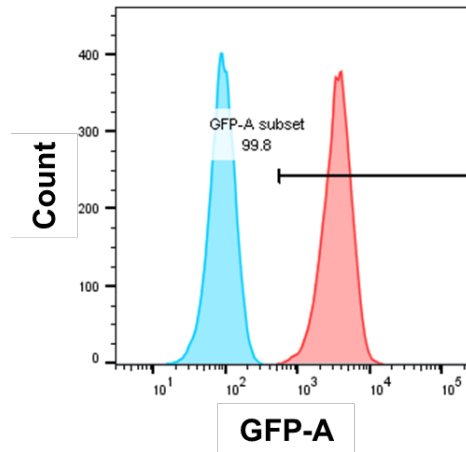
### 2-1. 試薬

マウスへの投与には、精製した蒸留水を用いて調整した 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウムに懸濁した DHC を用事調整して使用した。

レンチウイルスのパッケージングベクター {pRSV-Rev (#12253)、pMD2.G (#12259)、pMDLg/pRRE (#12251)} は、Addgene (Watertown, MA, USA) より購入した。Luciferase 遺伝子および Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子の導入には、BLIV-MSCV-Luciferase-EF1a-copGFP-T2A-Puro (#BLIV713PA-1; System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) のプラスミドを用いた。これらのプラスミドは、XL10-Glod Ultracompetent Cells (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて増幅し精製した後、-80°C にて保管した。

### 2-2. 使用細胞

LM8-Luc/GFP 細胞は、第 1 章で用いた LM8 細胞にレンチウイルスベクターを用いて *Luciferase* 遺伝子および *GFP* 遺伝子を導入し、2.5 µg/mL ピューロマイシン (富士フィルム和光純薬) で選択後、LSR Fortessa X-20 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いたフローサイトメトリー法により GFP の蛍光強度の幅が狭いことを確認した後、単一細胞から培養することで、クローニングされた LM8-Luc/GFP 細胞株を樹立した (Figure 24)。レンチウイルスベクターの作製には、HEK293T 細胞 (American Type Culture Collection; ATCC: Manassas, VA, USA) に FuGENE®HD (Promega) を使用して HEK293T 細胞にパッケージングベクター (Addgene) と BLIV-MSCV-Luciferase-EF1a-copGFP-T2A-Puro (System Biosciences) を co-transfection し、48 時間後に上清中に産生されたウイルス粒子を回収し、Vivaspin Turbo 15 (Sartorius, Goettingen, Germany) を用いてウイルス粒子を濃縮した。作製したウイルス粒子を LM8 細胞に感染する際には、8 µg/mL ポリブレン (ナカライテスク) を加えた。すべての細胞培養においては、10%FBS (Sigma Aldrich)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン (富士フィルム和光純薬) 含有 DMEM High Glucose (L-グルタミンおよびフェノールレッド含有、ナカライテスク) 培地を使用し、37°C、20%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、75%N<sub>2</sub>における加湿条件下にて培養を行った。なお、一連の遺伝子組み換え実験においては、本学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認 (#422) の承認を得て実施している。

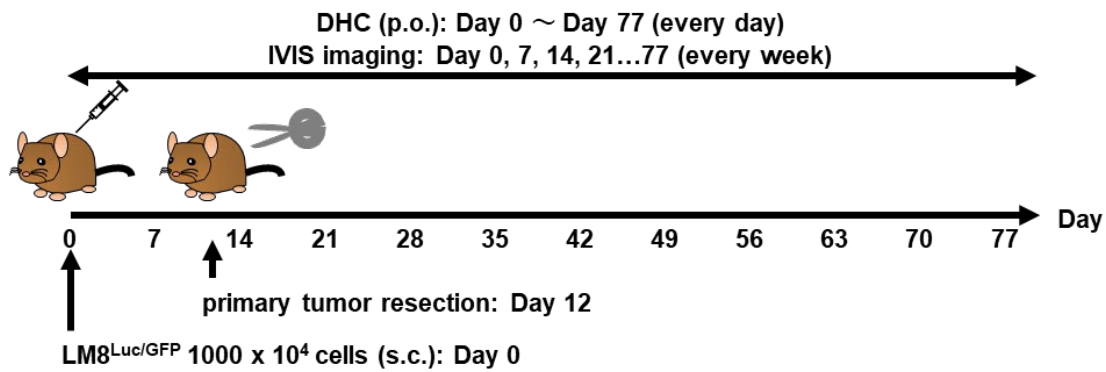


**Figure 24. Expression of GFP on LM8 cells and LM8-Luc/GFP cells.**

LM8 cells (blue) and LM8-Luc/GFP cells (red) were detected expression of GFP using flow cytometer.

### 2-3. *In vivo* 評価

マウス骨肉腫の自然転移マウスモデルを作製するために、 $1.0 \times 10^7$  cells の LM8-Luc/GFP 細胞を PBS (-) 100  $\mu$ L に懸濁し、マウスの左腰部外側に皮下注射した。LM8-Luc/GFP 細胞を皮下移植したマウスを、DHC 未処置群 (vehicle 群)、20 mg/kg の DHC を 11 週間毎日投与、50 mg/kg の DHC を 11 週間毎日投与、の 3 群に分けた。0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウムに懸濁された DHC は、移植同日から経口投与した (Figure 25)。LM8-Luc/GFP 細胞からの転移を評価するために、接種後 12 日目に三種混合麻酔下 {ドミトール® (日本全薬、福島)、ドルミカム® (丸石製薬、大阪)、ベトルファール® (Meiji Seika ファルマ、東京)} で原発腫瘍を切除した。マウスに麻酔下で D-ルシフェリン (3 mg/マウス: 富士フィルム和光純薬) を腹腔内投与し、Lumina IIIXR *in vivo* imaging system (IVIS: PerkinElmer, Waltham, MA, USA) で週 1 回 LM8-Luc/GFP 細胞の増殖と転移の評価を行った。当初、原発巣からの生物発光のフィルタリングを防ぐために、原発巣を黒いシートで覆った (107,108)。しかし、原発巣は完全に切除されていたため、再発巣の生物発光が現れることはなかった。以降の実験ではブラックシートは使用しなかった。なお、これらの検討においては、本学動物実験委員会の承認 (CTPH-20-003) を得て実施している。



**Figure 25. Effect of DHC on a spontaneous metastasis mouse model.**

Schedule of the in vivo study evaluating the effect of DHC.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

## 2-4. 腫瘍体積測定

移植後 12 日目に摘出された原発腫瘍の体積は以下の式を用いて推定した (109)。

$$V = L \times W^2 \times 1/2 \quad \{V: \text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)}, L: \text{長径 (mm)}, W: \text{短径 (mm)}\}$$

## 2-5. 組織染色

### 2-5-1. 組織切片作製

解剖されたマウスの臓器は、死亡時または DHC による治療終了時 (Day 77) に摘出した。肺および肝臓を 4% paraformaldehyde (PFA) を含む 100 mM phosphate buffer 固定液中にて 4 日間浸潤固定を行い、15-30% sucrose (ナカライテスク) にて脱水した。脱水後、肺および肝臓組織塊を optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek、東京) で凍結包埋し、クライオスタット (Leica Instruments、Nussloch、Germany) を用いて 10  $\mu$ m の凍結切片を作製した。

### 2-5-2. Hematoxylin and eosin (H&E) 染色による組織学的検討

組織切片が Mayer's Hematoxylin Solution (富士フイルム和光純薬) に十分に浸るようによくくりと滴下し、5 分間静置後、10 分間水洗した。十分に乾燥させたあと 1% Eosin (和光純薬工業) を滴下し 8 分間静置し、水洗した。その後、エタノールで脱水、キシレンで透徹し、エンテラン (Merck、Darmstadt、Germany) を用いて封入した。組織切片を生物顕微鏡 (BX50、Olympus) 倍率 40 倍 (DP72、Olympus) とイメージソフトウェア (cellSens Standard、Olympus、東京) を用いて撮影した。

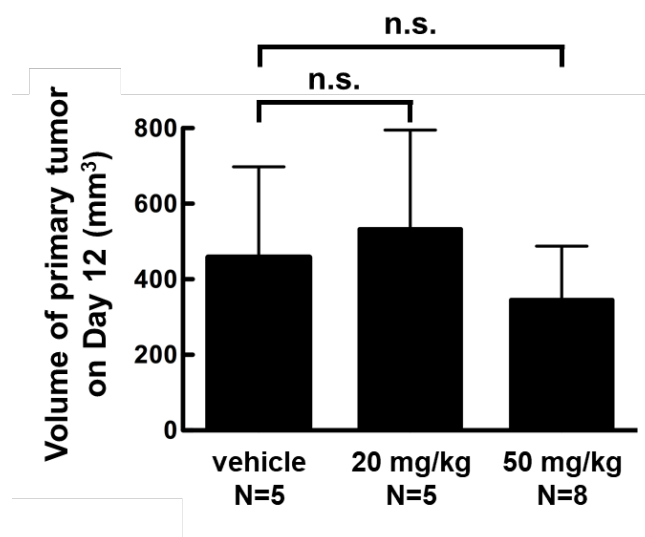
## 2-6. 統計処理

解析は GraphPad Prism 5 (Graphpad software、San Diego、CA、USA) を用いて行った。多重比較は一元配置分散分析 Bonferroni の多重比較検定を用いて行った。 $p < 0.05$  を統計的に有意とした。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて解析し、log-rank 検定を用いて比較した。上記と同様に  $p < 0.05$  を統計的に有意とした。

### 3. 実験結果

#### 3-1. DHC 投与による自然転移マウスモデルにおける原発巣への影響

自然転移マウスモデルを用いて、DHC のがん転移に対する効果を検討した。マウスは、 $1.0 \times 10^7$  個の LM8-Luc/GFP 細胞を腰部側面の皮下に移植した日から DHC を経口投与した。まず、移植後 12 日目における DHC の原発腫瘍の増殖への影響を評価するために、切除された原発腫瘍の体積を推定した。低用量 DHC (20 mg/kg)、高用量 DHC (50 mg/kg) いずれの群において、vehicle 群と比較して原発腫瘍の体積は有意な低下を認めなかった (Figure 26)。



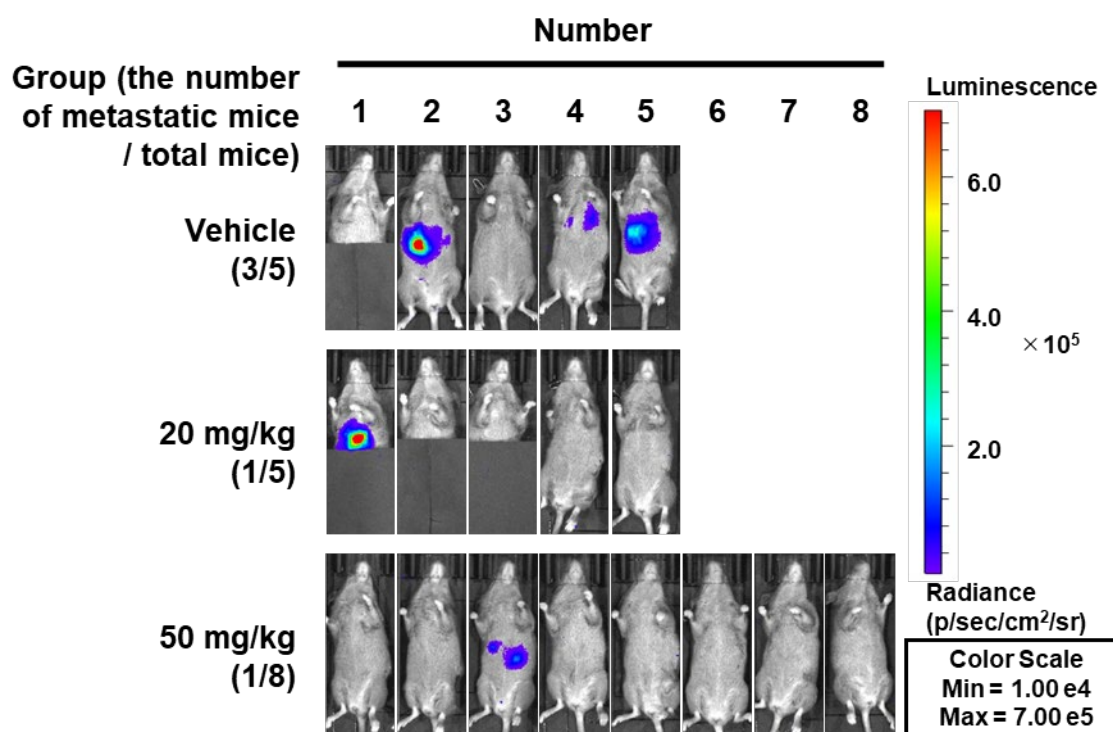
**Figure 26. Effect of DHC on the volume of primary tumor on Day 12**

The volume of the primary tumour removed Day 12 was measured by using vernier calipers. Data were analyzed using one-way ANOVA and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction.  $p < 0.05$  was considered significant.



### 3-2. DHC 投与による自然転移マウスモデルにおけるがん転移への影響

LuminaIII XR を用いて、DHC の抗腫瘍効果を週に一度の頻度で検討した。Vehicle 群では、移植後 35 日目に 5 匹中 3 匹のマウスにがん転移が確認された。一方、DHC 投与群では、低用量 DHC (20 mg/kg) 群では 5 匹中 1 匹、高用量 DHC (50 mg/kg) 群では 8 匹中 1 匹でがん転移が確認された (Figure 27)。

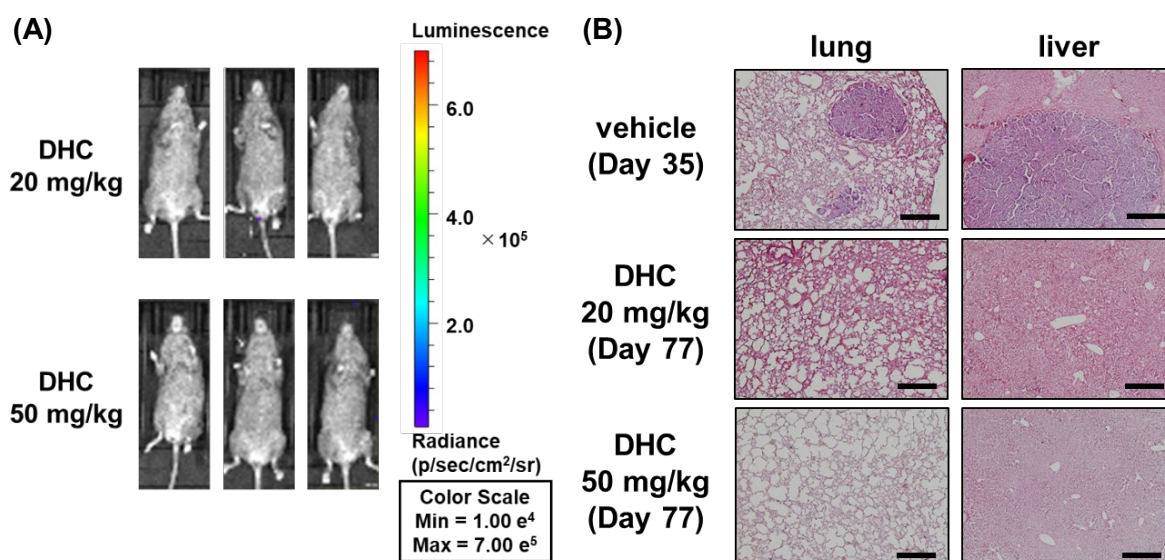


**Figure 27. Bioluminescent images of LM8-Luc/GFP cells.**

Lung and liver metastases were detected on Day 35 using the LUMINAIII XR *in vivo* imaging system. A black sheet covering the subcutaneous soft tissue of the lateral lumbar region was used, just in case primary tumor recurrences.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

前述したように LM8 細胞は肺および肝臓に転移し、転移巣は、vehicle 群、低用量 DHC (20 mg/kg) 群、高用量 DHC (50 mg/kg) 群で死亡したマウスで確認された。しかし、DHC を投与して 77 日目まで生存したマウスの肺と肝臓には転移巣が LuminaIII XR を用いても観察できなかった (Figure 28A)。さらに、摘出した肺と肝臓の H&E 染色による組織学的検討を行った。移植後 35 日目に死亡した vehicle 群のマウスにおいて、肺や肝臓にがん転移が確認されたが、移植後 77 日目まで生存した低用量 DHC (20 mg/kg) 群、高用量 DHC (50 mg/kg) 群のマウスでは、がん転移巣は認められず、DHC による肝障害を疑う所見も確認されなかった (Figure 28B)。



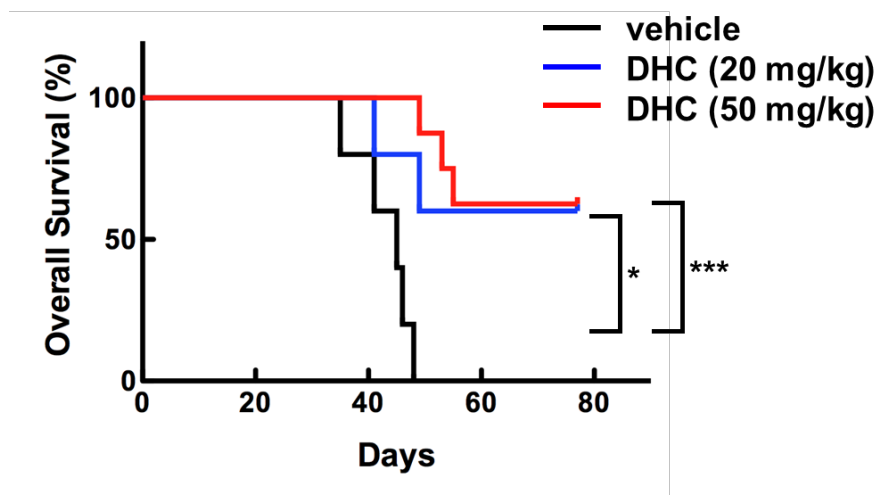
**Figure 28. Detection of cancer metastases**

(A) Cancer metastases were not detected on Day 77 using the LUMINAIII XR *in vivo* imaging system in DHC treatment group. (B) Histological findings of the lung and liver stained by hematoxylin and eosin (vehicle: at Day 35, the day of death, DHC 20 and 50 mg/kg: at Day 77). Scale bar: 400  $\mu$ m.

Modified from Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

### 3-3. DHC 投与による自然転移マウスモデルにおける生存期間への影響

本研究で使用した自然転移マウスモデルは移植後 5 週目から 7 週目の期間で死亡することが確認できた。低用量 DHC (20 mg/kg) 群、高用量 DHC (50 mg/kg) 群のいずれ群においても、vehicle 群と比較して生存期間が有意に延長された。また、低用量 DHC (20 mg/kg) 群、高用量 DHC (50 mg/kg) 群の一部のマウスは移植後 77 日目まで生存した (Figure 29)。



**Figure 29. Effect of DHC on a spontaneous metastasis mouse model.**

Overall survival curves of mice treated with DHC (vehicle: black, 20 mg/kg: blue, 50 mg/kg: red) were analyzed using the Kaplan-Meier method and the log-rank test.  $p < 0.05$  was considered significant. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , n: number of mice.

Sugiyama, Y., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2023**, 638, 200-209.

#### 4. 考察

本節では、第1節での *in vitro* の結果を踏まえて、DHC の *in vivo* におけるがん転移抑制効果を検討した。自然転移マウスモデルには高肺転移性マウス骨肉腫細胞 LM8 細胞に *Luciferase* 遺伝子および *GFP* 遺伝子を導入した LM8-Luc/GFP 細胞を用いて自然転移マウスモデルを作製した。LM8 細胞を用いた皮下移植マウスモデルでは、移植後 2 週間程度で血中循環がん細胞が確認され、がん転移が始まっていることが報告されている (110)。また、予備検討において、移植後 3 週間で DHC 処置の有無にもかかわらず原発腫瘍の壊死が確認されたことから、本検討で用いた自然転移モデルでは移植後 12 日目に原発腫瘍の摘出を行っており (110)、人道的エンドポイントを迎えることなくがん転移を評価できる。

DHC の浸潤・遊走抑制作用を反映させるためには、*in vivo* の評価系においても浸潤・遊走を含む転移マウスモデルであることが重要となる。近年、低分子量 GTP 結合型タンパク質に対する阻害薬の *in vivo* におけるがん転移抑制効果は、自然転移マウスモデルを用いて評価されている。RHOA の下流因子 Rho-associated protein kinase (ROCK) に対する阻害薬 Y27632 が悪性黒色腫に対してミオシン II の活性を低下させることで細胞骨格を変化させ、さらに悪性黒色腫を用いた自然転移マウスモデルにおいて、原発腫瘍の増殖に影響することなく肺や肝臓へのがん転移を抑制することが報告されている (111)。今回作製した自然転移マウスモデルも同様に原発腫瘍の形成から浸潤・遊走を含む転移巣の形成まで含まれており、DHC の浸潤・遊走抑制作用を反映させる適切なモデルだと考えられる。今回の検討では LuminaIII XR にて切除部位における腫瘍の再発を認められなかったもので、肉眼的な確認よりも、さらに精度高く原発巣の残存がなかったことが確認されており、自然転移マウスモデルとして十分成立しているものと考えられた。

さらに、DHC の *in vitro* における浸潤および遊走抑制作用を反映させるため、もう一点重要なこととして、DHC が細胞毒性を示さない投与量で本モデルに処置されることである。移植後 12 日目に摘出した原発腫瘍の体積の変化に対して、12 日間の DHC の連日経口投与は、影響 (細胞毒性) を及ぼさなかった。さらに、77 日間 DHC を経口投与したマウスにおいて、組織学的な肝障害や肺障害、またマウスの全身状態や体重変化、活動性の低下は認めず、今回の投与量は細胞毒性を示さない投与量であったと推測される。

以上のことから、DHC は浸潤および遊走抑制作用を介したがん転移抑制効果により、35 日目におけるがん細胞の転移を抑制し、全生存期間を延長させた。さらには、DHC 投与群の半数以上において腫瘍の再発を認めず生存し、観察した 77 日間生存したマウスには、転移病巣は検出されなかった。生存マウスに組織学的にも観察できない微小転移が発生している可能性は否定できないが、DHC はがん転移を抑制することが示唆された。

近年開発されている免疫チェックポイント阻害薬による治療を受けたがん患者では、その生存率は下降し続けることなく、途中からほぼ水平になり“tail plateau”となる。今回、DHC の連日経口投与により自然転移マウスモデルの生存曲線には免疫チェックポイント阻害薬と同様に“tail plateau”が確認された。また、メバロン酸経路の遮断によって誘導されるがん細胞の RAC1 に対するプレニル化の減少は、がん細胞からアクチンフィラメントの放出を促し、MHC クラス I 分子を介して樹状細胞に認識され、抗腫瘍 T 細胞活性を活性化する (112)。前節の

RNA-Seq の検討では、DHC が抗腫瘍免疫関連遺伝子の発現を変化させることが示された。これらの結果は、DHC は浸潤および遊走抑制作用に加えて、低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現低下を介してアクチンフィラメントの形成を阻害し、アクチンフィラメントの細胞外への放出を促し、がん細胞に対する免疫系細胞 {または免疫 (担当) 細胞} の活性を高めた可能性が推察される。この可能性を証明するには、免疫細胞に対する DHC の免疫賦活作用を検討する必要がある。また、前節における *in vitro* の評価系で確認された LM8 細胞の低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現の低下、アクチンフィラメントの形成阻害は、本節における *in vivo* の評価系では確認できていない。今後の課題として、*in vivo* で観察されたがん転移抑制が *in vitro* で示された DHC によるアクチンフィラメントの形成阻害に基づく現象であることを確認するため、原発腫瘍におけるタンパク質発現解析や遺伝子発現解析を行うことが必要である。

## 5. 小括

本章では、自然転移マウスモデルに対する DHC 連日経口投与することにより、以下の知見を得た。

1. DHC 処置により、自然転移マウスモデルにおけるがん転移が減少した。
2. DHC 処置により、自然転移マウスモデルの生存期間が延長された。

以上のことから、DHC のがん転移抑制作用により、がん転移が減少し、生存期間を延長させたことと、がん転移が確認されない例も存在したことが明らかとなった。

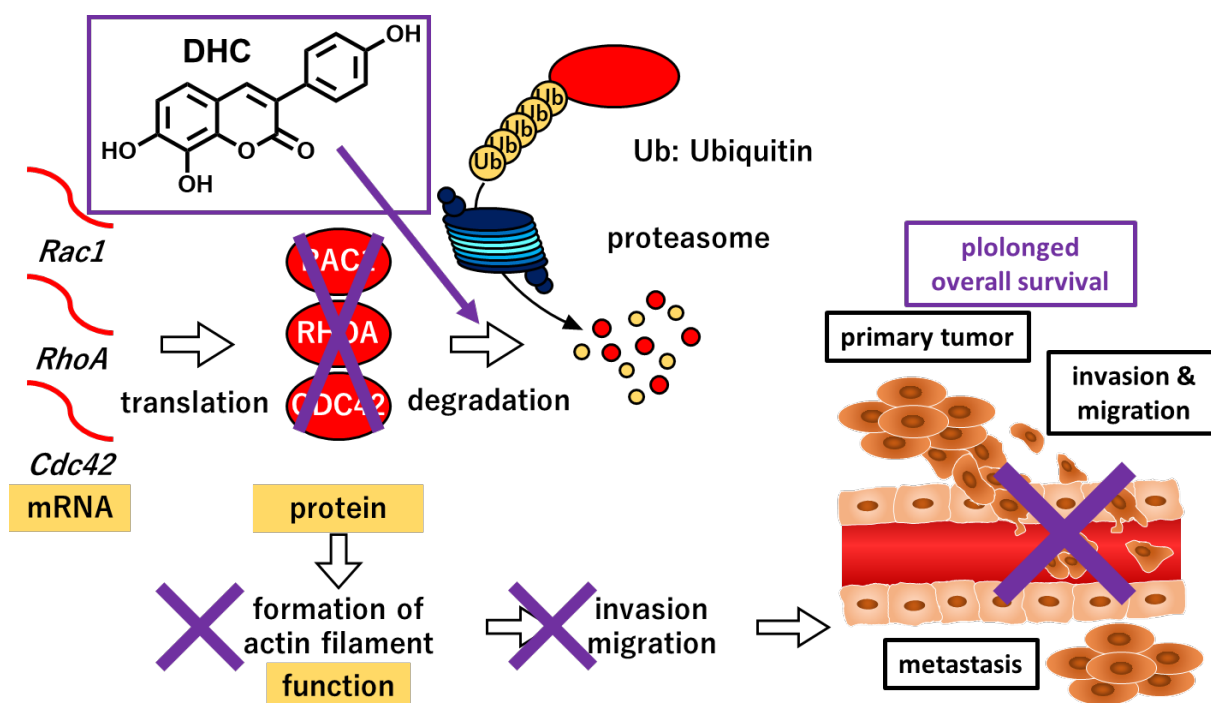
## 総括

薬学・医学の進歩に伴い、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬などの抗がん薬が開発され、飛躍的な治療成績の向上を遂げている。しかし、多くの抗がん薬が開発されがん化学療法が発達しているにもかかわらず、がん転移を有するがん患者の生命予後は未だに改善されていない。がんの根治を目指す上でがんの転移を阻止するがん転移抑制薬の開発は最重要課題である。

がん細胞の転移にはいくつかの重要な段階を歩むことから、がん転移を制御する標的としていくつもの候補が挙げられる。これまで、VEGF/VEGFR や MMP 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。浸潤だけでなく遊走にも関与するがん細胞の運動性は、がん転移と強く関連しており、がんの細胞運動を制御することによるがん転移抑制は、転移性のがんに対する有効な治療戦略だと考えられる。また、クマリン系化合物の一つである daphnetin が細胞運動を制御することにより、浸潤・遊走抑制作用を示すことが明らかとなり、クマリン系化合物を基礎としたがん転移抑制薬の創製が期待される。

第 1 章では、クマリン骨格の 3 位にフェニル基を導入した 3-phenylcoumarin を基本骨格とし、水酸基やハロゲン基、メトキシ基などの置換基を導入して浸潤抑制作用を有する化合物のスクリーニングを行った。その結果、水酸基は浸潤抑制作用の増強、メトキシ基は浸潤抑制作用の減弱、ハロゲン基は細胞毒性を示す傾向が見られた。特に DHC は細胞毒性を示さずに daphnetin よりも強い浸潤・遊走抑制作用を有することが明らかとなった。第 2 章では、DHC の浸潤・遊走抑制作用はアクチンフィラメントの形成阻害に起因することが明らかとなり、アクチンフィラメントの形成に関与する低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現変化に着目した。DHC は低分子量 GTP 結合型タンパク質において、遺伝子発現の低下を伴わない、タンパク質発現の低下が示された。また、タンパク質合成が阻害された環境下における低分子量 GTP 結合型タンパク質の発現は、DHC 処置により劇的かつ経時的に低下した。さらに低分子量 GTP 結合型タンパク質に対するユビキチン化に関わる *F-box* 遺伝子の発現を高めたことから、DHC は低分子量 GTP 結合型タンパク質に対する細胞内タンパク質分解系を促進するものと推察された。最後に、がん転移抑制効果の検討として、自然転移マウスモデルを用いた *in vivo* 評価を行った。DHC 連日経口投与により、自然転移マウスモデルにおけるがん転移は抑制され、生存期間が延長された。

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 (Figure 30)。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と考える。



**Figure 30. Grphical summary**

DHC enhanced the degradation of rho small GTP-binding proteins by activating the intracellular degradation system. As a result, the degradation inhibited the formation of intracellular actin filaments and subsequently inhibited osteosarcoma cell invasion and migration. Moreover, DHC treatment inhibited metastasis and prolonged overall survival in a spontaneous metastasis mouse model. These results indicate that DHC has the potential to suppress metastasis of osteosarcoma cells by downregulating Rho small GTP-binding proteins.



## 謝辞

はじめに、本研究を終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学病態生理学分野 芦原英司 教授、細木誠之 准教授、戸田侑紀 助教に深甚なる謝意を表します。

また、本論文の査読およびご指導を賜りました京都薬科大学薬化学分野 古田巧 教授、同大学薬物治療学分野 加藤伸一 教授に篤く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、数多くのクマリン系化合物を合成していただいた京都薬科大学生薬学分野 中村誠宏 准教授、同大学共同利用機器センター 服部恭尚 講師、同大学薬品製造学分野 山下正行 名誉教授 学部生の皆様、ジンチョウゲの写真をご提供いただいた同大学薬用植物園 月岡淳子 助教、RNA-Seq 解析にご尽力いただいた京都府立医科大学ゲノム医科学部門 田代啓 教授、中野正和 准教授、徳田雄市 助教に心より感謝申し上げます。

博士課程の山あり谷ありの4年間の研究生生活において、温かい応援をいただき、どんな時も支えてくださった河西翔平 博士、黒田絵莉子 博士、若林亮介 博士、宮下雅亜 博士、黒田絵莉子 博士、角陽子 博士、甘利圭悟 博士、友金眞光 博士、今吉菜月 博士、清水大器 学士、松井透磨 学士、吉澤正人 学士、藤堂暢久 学士、西口大生 学士、羽立祐貴 学士、同じ研究グループのメンバーとして共に頑張った玉井志保里 学士、笠原愛美 学士、加藤優佳 氏、寺澤美琴 氏、山口公佳 氏、川島レナ 氏、石木日奈子 氏、河島圭吾 氏、酒井七海 氏、そして、研究室の学生にいつも気を配っていただきながら物品の発注をしていただいた河崎由華 様を含めた京都薬科大学病態生理学分野のメンバー一同に深謝申し上げます。

また、がんプロ研修期間において、基礎研究ばかりの私を臨床の現場で薬剤師としての視野を広げてくださった京都第二赤十字病院 友金幹視 先生、野口裕介 先生 大坪達弥 先生、同病院のスタッフの方々、がんプロ研修をサポートしていただいた京都薬科大学 臨床薬理学分野 中田徹男 教授、同臨床薬学教育研究センター 中村暢彦 講師、同臨床薬剤疫学分野 冢瀬諒 助教、村上由理 様、坂口由美子 様に心より感謝申し上げます。

そして、唯一の研究室の同期として、7年間昼夜を問わず研究室生活を共に過ごし、励ました京都薬科大学病態生理学分野 佐野友亮 学士に心から感謝を申し上げます。

最後に、この4年間誰よりも大学院生活を支えて応援してくれた家族・親族一同に心から深く感謝いたします。

## 引用文献

1. 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」(厚生労働省人口動態統計). Cancer\_mortality(1958-2021).
2. Claudiani, S.; Apperley, J. F. The Argument for Using Imatinib in CML. *Hematol. (United States)* **2018**, *2018* (1), 161–167.
3. Hamanishi, J.; Mandai, M.; Ikeda, T.; Minami, M.; Kawaguchi, A.; Murayama, T.; Kanai, M.; Mori, Y.; Matsumoto, S.; Chikuma, S.; Matsumura, N.; Abiko, K.; Baba, T.; Yamaguchi, K.; Ueda, A.; Hosoe, Y.; Morita, S.; Yokode, M.; Shimizu, A.; Honjo, T.; Konishi, I. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients with Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33* (34), 4015–4022.
4. Vasquez, L.; Tarrillo, F.; Oscanoa, M.; Maza, I.; Geronimo, J.; Paredes, G.; Silva, J. M.; Sialer, L. Analysis of Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities in Children: A 15-Year Single-Institution Experience. *Front. Oncol.* **2016**, *6* (FEB), 6–11.
5. Steeg, P. S. Targeting Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16* (4), 201–218.
6. Tevaarwerk, A. J.; Gray, R. J.; Schneider, B. P.; Smith, M. Lou; Wagner, L. I.; Fetting, J. H.; Davidson, N.; Goldstein, L. J.; Miller, K. D.; Sparano, J. A. Survival in Patients with Metastatic Recurrent Breast Cancer after Adjuvant Chemotherapy: Little Evidence of Improvement over the Past 30 Years. *Cancer* **2013**, *119* (6), 1140–1148.
7. Bernards, N.; Creemers, G. J.; Nieuwenhuijzen, G. A. P.; Bosscha, K.; Pruijt, J. F. M.; Lemmens, V. E. P. P. No Improvement in Median Survival for Patients with Metastatic Gastric Cancer despite Increased Use of Chemotherapy. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2013**, *24* (12), 3056–3060.
8. Y, S.; MP, C.; K, V.; PA, K.; A, L.; R, K.; None, K. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst.* **2019**, *9* (2), 109–127.
9. Binnewies, M.; Roberts, E. W.; Kersten, K.; Chan, V.; Fearon, D. F.; Merad, M.; Coussens, L. M.; Gabrilovich, D. I.; Ostrand-Rosenberg, S.; Hedrick, C. C.; Vonderheide, R. H.; Pittet, M. J.; Jain, R. K.; Zou, W.; Howcroft, T. K.; Woodhouse, E. C.; Weinberg, R. A.; Krummel, M. F. Understanding the Tumor Immune Microenvironment (TIME) for Effective Therapy. *Nat. Med.* **2018**, *24* (5), 541–550.
10. Hisamatsu, Y.; Murata, H.; Tsubokura, H.; Hashimoto, Y.; Kitada, M.; Tanaka, S.; Okada, H. Matrix Metalloproteinases in Human Decidualized Endometrial Stromal Cells. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2021**, *43* (3), 2111–2123.
11. Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* **2010**, *141* (1), 52–67.
12. Botos, I.; Scapozza, L.; Zhang, D.; Liotrat, L. a; Meyer, E. F. Batimastat, Metalloproteinase Binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (7), 2749–2754.
13. Sparano, J. A.; Bernardo, P.; Stephenson, P.; Gradishar, W. J.; Ingle, J. N.; Zucker, S.; Davidson, N. E. Randomized Phase III Trial of Marimastat versus Placebo in Patients with Metastatic

- Breast Cancer Who Have Responding or Stable Disease after First-Line Chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2196. *J. Clin. Oncol.* **2004**, 22 (23), 4631–4638.
14. Leighl, N. B.; Paz-Ares, L.; Douillard, J. Y.; Peschel, C.; Arnold, A.; Depierre, A.; Santoro, A.; Betticher, D. C.; Gatzemeier, U.; Jassem, J.; Crawford, J.; Tu, D.; Bezjak, A.; Humphrey, J. S.; Voi, M.; Galbraith, S.; Hann, K.; Seymour, L.; Shepherd, F. A. Randomized Phase III Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitor BMS-275291 in Combination with Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group Study BR. 18. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23 (12), 2831–2839.
  15. Shah, M. A.; Bodoky, G.; Starodub, A.; Cunningham, D.; Yip, D.; Wainberg, Z. A.; Bendell, J.; Thai, D.; He, J.; Bhargava, P.; Ajani, J. A. Phase III Study to Evaluate Efficacy and Safety of Andecaliximab With MFOLFOX6 as First-Line Treatment in Patients With Advanced Gastric or GEJ Adenocarcinoma (GAMMA-1). *J. Clin. Oncol.* **2021**, 39 (9), 990–1000.
  16. Bissett, D.; O’Byrne, K. J.; Von Pawel, J.; Gatzemeier, U.; Price, A.; Nicolson, M.; Mercier, R.; Mazabel, E.; Penning, C.; Zhang, M. H.; Collier, M. A.; Shepherd, F. A. Phase III Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitor Prinomastat in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23 (4), 842–849.
  17. Yao, C.; Wu, S.; Kong, J.; Sun, Y.; Bai, Y.; Zhu, R.; Li, Z.; Sun, W.; Zheng, L. Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma: Mechanisms and Anti-Angiogenic Therapies. *Cancer Biol. Med.* **2023**, 20 (1).
  18. Socinski, M. A.; Jotte, R. M.; Cappuzzo, F.; Orlandi, F.; Stroyakovskiy, D.; Nogami, N.; Rodríguez-Abreu, D.; Moro-Sibilot, D.; Thomas, C. A.; Barlesi, F.; Finley, G.; Kelsch, C.; Lee, A.; Coleman, S.; Deng, Y.; Shen, Y.; Kowanetz, M.; Lopez-Chavez, A.; Sandler, A.; Reck, M. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 378 (24), 2288–2301.
  19. Rini, B. I.; Plimack, E. R.; Stus, V.; Gafanov, R.; Hawkins, R.; Nosov, D.; Pouliot, F.; Alekseev, B.; Soulières, D.; Melichar, B.; Vynnychenko, I.; Kryzhanivska, A.; Bondarenko, I.; Azevedo, S. J.; Borchiellini, D.; Szczylik, C.; Markus, M.; McDermott, R. S.; Bedke, J.; Tartas, S.; Chang, Y.-H.; Tamada, S.; Shou, Q.; Perini, R. F.; Chen, M.; Atkins, M. B.; Powles, T. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, 380 (12), 1116–1127.
  20. Motzer, R. J.; Penkov, K.; Haanen, J.; Rini, B.; Albiges, L.; Campbell, M. T.; Venugopal, B.; Kollmannsberger, C.; Negrier, S.; Uemura, M.; Lee, J. L.; Vasiliev, A.; Miller, W. H.; Gurney, H.; Schmidinger, M.; Larkin, J.; Atkins, M. B.; Bedke, J.; Alekseev, B.; Wang, J.; Mariani, M.; Robbins, P. B.; Chudnovsky, A.; Fowst, C.; Hariharan, S.; Huang, B.; di Pietro, A.; Choueiri, T. K. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, 380 (12), 1103–1115.
  21. Finn, R. S.; Qin, S.; Ikeda, M.; Galle, P. R.; Ducreux, M.; Kim, T.-Y.; Kudo, M.; Breder, V.; Merle, P.; Kaseb, A. O.; Li, D.; Verret, W.; Xu, D.-Z.; Hernandez, S.; Liu, J.; Huang, C.; Mulla,

- S.; Wang, Y.; Lim, H. Y.; Zhu, A. X.; Cheng, A.-L. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382* (20), 1894–1905.
22. Motzer, R. J.; Powles, T.; Burotto, M.; Escudier, B.; Bournalon, M. T.; Shah, A. Y.; Suárez, C.; Hamzaj, A.; Porta, C.; Hocking, C. M.; Kessler, E. R.; Gurney, H.; Tomita, Y.; Bedke, J.; Zhang, J.; Simsek, B.; Scheffold, C.; Apolo, A. B.; Choueiri, T. K. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib in First-Line Treatment for Advanced Renal Cell Carcinoma (CheckMate 9ER): Long-Term Follow-up Results from an Open-Label, Randomised, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2022**, *23* (7), 888–898.
  23. Yonemori, K.; Yunokawa, M.; Ushijima, K.; Sakata, J.; Shikama, A.; Minobe, S.; Usami, T.; Enomoto, T.; Takehara, K.; Hasegawa, K.; Yamagami, W.; Yamamoto, K.; Han, S.; Dutta, L.; Orlowski, R.; Miura, T.; Makker, V.; Fujiwara, K. Lenvatinib plus Pembrolizumab in Japanese Patients with Endometrial Cancer: Results from Study 309/KEYNOTE-775. *Cancer Sci.* **2022**, *113* (10), 3489–3497.
  24. Takeda, T.; Okuyama, H.; Nishizawa, Y.; Tomita, S.; Inoue, M. Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Is Necessary for Invasive Phenotype in Vegf-Deleted Islet Cell Tumors. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 1–7.
  25. Fan, F.; Samuel, S.; Gaur, P.; Lu, J.; Dallas, N. A.; Xia, L.; Bose, D.; Ramachandran, V.; Ellis, L. M. Chronic Exposure of Colorectal Cancer Cells to Bevacizumab Promotes Compensatory Pathways That Mediate Tumour Cell Migration. *Br. J. Cancer* **2011**, *104* (8), 1270–1277.
  26. Stoletov, K.; Beatty, P. H.; Lewis, J. D. Novel Therapeutic Targets for Cancer Metastasis. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2020**, *20* (2), 97–109.
  27. Obenauf, A. C.; Massagué, J. Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis. *Trends in Cancer* **2015**, *1* (1), 76–91.
  28. Palmer, T. D.; Martínez, C. H.; Vasquez, C.; Hebron, K. E.; Jones-Paris, C.; Arnold, S. A.; Chan, S. M.; Chalasani, V.; Gomez-Lemus, J. A.; Williams, A. K.; Chin, J. L.; Giannico, G. A.; Ketova, T.; Lewis, J. D.; Zijlstra, A. Integrin-Free Tetraspanin CD151 Can Inhibit Tumor Cell Motility upon Clustering and Is a Clinical Indicator of Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* **2014**, *74* (1), 173–187.
  29. Lauffenburger, D. A.; Horwitz, A. F. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* **1996**, *84* (3), 359–369.
  30. Yamaguchi, H.; Condeelis, J. Regulation of the Actin Cytoskeleton in Cancer Cell Migration and Invasion. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2007**, *1773* (5), 642–652.
  31. Guharay, F.; Sachs, F. Stretch-Activated Single Ion Channel Currents in Tissue-Cultured Embryonic Chick Skeletal Muscle. *J. Physiol.* **1984**, *352* (1), 685–701.
  32. Hodge, R. G.; Ridley, A. J. Regulating Rho GTPases and Their Regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17* (8), 496–510.
  33. Dupont, S. Role of YAP/TAZ in Cell-Matrix Adhesion-Mediated Signalling and Mechanotransduction. *Exp. Cell Res.* **2016**, *343* (1), 42–53.
  34. Diz-Muñoz, A.; Thurley, K.; Chintamen, S.; Altschuler, S. J.; Wu, L. F.; Fletcher, D. A.; Weiner,

- O. D. Membrane Tension Acts Through PLD2 and MTORC2 to Limit Actin Network Assembly During Neutrophil Migration. *PLoS Biol.* **2016**, *14* (6), 118167.
35. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83* (3), 770–803.
  36. Tosun, A.; Akkol, E. K.; Yeşilada, E. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity of Coumarins from *Seseli Gummiferum* Subsp. *Corymbosum* (Apiaceae). *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2009**, *64* (1–2), 56–62.
  37. Kostova, I.; Momekov, G.; Tzanova, T.; Karaivanova, M. Synthesis, Characterization, and Cytotoxic Activity of New Lanthanum(III) Complexes of Bis-Coumarins. *Bioinorg. Chem. Appl.* **2006**, *2006*, 1–9.
  38. Madhavan, G. R.; Balraju, V.; Mallesham, B.; Chakrabarti, R.; Lohray, V. B. Novel Coumarin Derivatives of Heterocyclic Compounds as Lipid-Lowering Agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (15), 2547–2551.
  39. Akkol, E. K.; Genç, Y.; Karpuz, B.; Sobarzo-Sánchez, E.; Capasso, R. Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12* (7), 1–25.
  40. Javed, M.; Saleem, A.; Xaveria, A.; Akhtar, M. F. Daphnetin: A Bioactive Natural Coumarin with Diverse Therapeutic Potentials. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13* (September).
  41. Baba, K.; Takeuchi, K.; Hamasaki, F.; Kozawa, M. Chemical Studies on the Constituents of the Thymelaeaceous Plants. I. Structures of Two New Flavans from *Daphne Odora* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34* (2), 595–602.
  42. Gao, P.; Wang, Z.; Lei, M.; Che, J.; Zhang, S.; Zhang, T.; Hu, Y.; Shi, L.; Cui, L.; Liu, J.; Noda, M.; Peng, Y.; Long, J. Daphnetin Ameliorates A $\beta$  Pathogenesis via STAT3/GFAP Signaling in an APP/PS1 Double-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Pharmacol. Res.* **2022**, *180* (March), 106227.
  43. Syed, A. M.; Kundu, S.; Ram, C.; Kulhari, U.; Kumar, A.; Mugale, M. N.; Mohapatra, P.; Murty, U. S.; Sahu, B. D. Up-Regulation of Nrf2/HO-1 and Inhibition of TGF-B1/Smad2/3 Signaling Axis by Daphnetin Alleviates Transverse Aortic Constriction-Induced Cardiac Remodeling in Mice. *Free Radic. Biol. Med.* **2022**, *186* (May), 17–30.
  44. Zhang, L.; Gu, Y.; Li, H.; Cao, H.; Liu, B.; Zhang, H.; Shao, F. Daphnetin Protects against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Inhibiting Inflammatory and Oxidative Response. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *65* (October), 402–407.
  45. Fukuda, H.; Nakamura, S.; Chisaki, Y.; Takada, T.; Toda, Y.; Murata, H.; Itoh, K.; Yano, Y.; Takata, K.; Ashihara, E. Daphnetin Inhibits Invasion and Migration of LM8 Murine Osteosarcoma Cells by Decreasing RhoA and Cdc42 Expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *471* (1), 63–67.
  46. Matos, M. J.; Uriarte, E.; Santana, L. 3-Phenylcoumarins as a Privileged Scaffold in Medicinal Chemistry: The Landmarks of the Past Decade. *Molecules* **2021**, *26* (21), 1–33.
  47. Xiao, C. F.; Tao, L. Y.; Sun, H. Y.; Wei, W.; Chen, Y.; Fu, L. W.; Zou, Y. Design, Synthesis

- and Antitumor Activity of a Series of Novel Coumarin–Stilbenes Hybrids, the 3-Arylcoumarins. *Chinese Chem. Lett.* **2010**, *21* (11), 1295–1298.
48. Musa, M. A.; Badisa, V. L. D.; Latinwo, L. M.; Cooperwood, J.; Sinclair, A.; Abdullah, A. Cytotoxic Activity of New Acetoxycoumarin Derivatives in Cancer Cell Lines. *Anticancer Res.* **2011**, *31* (6), 2017.
  49. Matos, M. J.; Vazquez-Rodriguez, S.; Uriarte, E.; Santana, L.; Viña, D. MAO Inhibitory Activity Modulation: 3-Phenylcoumarins versus 3-Benzoylcoumarins. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (14), 4224–4227.
  50. Matos, M. J.; Viña, D.; Janeiro, P.; Borges, F.; Santana, L.; Uriarte, E. New Halogenated 3-Phenylcoumarins as Potent and Selective MAO-B Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (17), 5157–5160.
  51. Asai, T.; Ueda, T.; Itoh, K.; Yoshioka, K.; Aoki, Y.; Mori, S.; Yoshikawa, H. Establishment and Characterization of a Murine Osteosarcoma Cell Line (LM8) with High Metastatic Potential to the Lung. *Int. J. Cancer* **1998**, *76* (3), 418–422.
  52. Hong, E. S.; Burkett, S. S.; Morrow, J.; Lizardo, M. M.; Osborne, T.; Li, S. Q.; Luu, H. H.; Meltzer, P.; Khanna, C. Characterization of the Metastatic Phenotype of a Panel of Established Osteosarcoma Cells. *Oncotarget* **2015**, *6* (30), 29469–29481.
  53. Hensler, P. J.; Annab, L. A.; Barrett, J. C.; Pereira-Smith, O. M. A Gene Involved in Control of Human Cellular Senescence on Human Chromosome 1q. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14* (4), 2291–2297.
  54. Salan, Ü.; Bulut, M. Synthesis of Some Benzo-14-Crown-4 Ethers Substituted to 7,8-Dihydroxy-3-Phenylcoumarin Derivatives. *Heterocycles* **2006**, *68* (2).
  55. Hashimoto, K.; Yamada, A.; Hamano, H.; Mori, S.; Moriuchi, H. World Intellectual Property Organization, WO9424119 A1 1994-10-27.
  56. Robledo-O’Ryan, N.; Moncada-Basualto, M.; Mura, F.; Olea-Azar, C.; Matos, M. J.; Vazquez-Rodriguez, S.; Santana, L.; Uriarte, E.; Moncada-Basualto, M.; Lapier, M.; Maya, J. D. Synthesis, Antioxidant and Antichagasic Properties of a Selected Series of Hydroxy-3-Arylcoumarins. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (2), 621–632.
  57. Y. Chen, C.; E. Gompf, T. The Absorption and the Emission Spectra of Some Substituted 3-Phenylcoumarins. *Heterocycles* **1977**, *7* (2), 933.
  58. Matos, M. J.; Santana, L.; Uriarte, E.; Delogu, G.; Corda, M.; Fadda, M. B.; Era, B.; Fais, A. New Halogenated Phenylcoumarins as Tyrosinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (11), 3342–3345.
  59. Buu-Hoï, N. P.; Ekert, B.; Royer, R. Bz-Hydroxylated-3-Aryl- and 3,4-Diaryl-Coumarins. *J. Org. Chem.* **1954**, *19* (9), 1548–1552.
  60. Huneck, S. Moosinhaltsstoffe—XVIII: Synthese von Pellepiphyllin Und Lunularin. *Tetrahedron* **1976**, *32* (1), 109–113.
  61. Leitão, A.; Andricopulo, A. D.; Oliva, G.; Pupo, M. T.; De Marchi, A. A.; Vieira, P. C.; Da Silva,

- M. F. G. F.; Ferreira, V. F.; De Souza, M. C. B. V.; Sá, M. M.; Moraes, V. R. S.; Montanari, C. A. Structure-Activity Relationships of Novel Inhibitors of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (9), 2199–2204.
62. Archer, J. F.; Grimshaw, J. Electrochemical Reactions. Part VI. Application of the Hammett Relationship to the Polarographic Reduction of Substituted 9-Benzylidenefluorenes and 3-Phenylcoumarins. *J. Chem. Soc. B Phys. Org.* **1969**, 266–270.
  63. Gündüz, C.; Bulut, M. Synthesis of 7,8-Dihydroxy-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2H-Chromen-2-One Derivatives of Crown Ethers. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *46* (1), 105–107.
  64. Parmar, V. S.; Singh, S.; Vardhan, A.; Sharma, R. Synthesis of Some New Phenyl 2H-1-Benzopyran-2-Ones: Novel Structure for Nivegin. *Tetrahedron* **1989**, *45* (6), 1839–1844.
  65. Mhiri, C.; Ladhar, F.; El Gharbi, R.; Le Bigot, Y. A Convenient Synthesis of 3-Arylcoumarins from Arylacetonitriles. *Synth. Commun.* **1999**, *29* (9), 1451–1461.
  66. Kabeya, L. M.; de Marchi, A. A.; Kanashiro, A.; Lopes, N. P.; da Silva, C. H. T. P.; Pupo, M. T.; Lucisano-Valim, Y. M. Inhibition of Horseradish Peroxidase Catalytic Activity by New 3-Phenylcoumarin Derivatives: Synthesis and Structure-Activity Relationships. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (3), 1516–1524.
  67. Vilar, S.; Quezada, E.; Alcaide, C.; Orallo, F.; Santana, L.; Uriarte, E. Quantitative Structure Vasodilatory Activity Relationship - Synthesis and “in Silico” and “in Vitro” Evaluation of Resveratrol-Coumarin Hybrids. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26* (3), 317–332.
  68. Pu, W.; Lin, Y.; Zhang, J.; Wang, F.; Wang, C.; Zhang, G. 3-Arylcoumarins: Synthesis and Potent Anti-Inflammatory Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (23), 5432–5434.
  69. Rauhamäki, S.; Postila, P. A.; Niinivehmas, S.; Kortet, S.; Schildt, E.; Pasanen, M.; Manivannan, E.; Ahinko, M.; Koskimies, P.; Nyberg, N.; Huuskonen, P.; Multamäki, E.; Pasanen, M.; Juvonen, R. O.; Raunio, H.; Huuskonen, J.; Pentikäinen, O. T. Structure-Activity Relationship Analysis of 3-Phenylcoumarin-Based Monoamine Oxidase B Inhibitors. *Front. Chem.* **2018**, *6* (MAR).
  70. Ragupathi, A.; Sagadevan, A.; Charpe, V. P.; Lin, C. C.; Hwu, J. R.; Hwang, K. C. Visible-Light-Driven Copper-Catalyzed Aerobic Oxidative Cascade Cyclization of N-Tosylhydrazones and Terminal Alkynes: Regioselective Synthesis of 3-Arylcoumarins. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (35), 5151–5154.
  71. Combes, S.; Barbier, P.; Douillard, S.; McLeer-Florin, A.; Bourgarel-Rey, V.; Pierson, J. T.; Fedorov, A. Y.; Finet, J. P.; Boutonnat, J.; Peyrot, V. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Arylcoumarin Analogues of Combretastatins. Part 2. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (9), 3153–3162.
  72. Condeelis, J.; Singer, R. H.; Segall, J. E. The Great Escape: When Cancer Cells Hijack the Genes for Chemotaxis and Motility. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 695–718.
  73. Sahai, E. Mechanisms of Cancer Cell Invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15* (1), 87–96.
  74. Yamaguchi, H.; Wyckoff, J.; Condeelis, J. Cell Migration in Tumors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17* (5), 559–564.
  75. Karlsson, R.; Pedersen, E. D.; Wang, Z.; Brakebusch, C. Rho GTPase Function in Tumorigenesis.

- Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1796 (2), 91–98.
76. Heasman, S. J.; Ridley, A. J. Mammalian Rho GTPases: New Insights into Their Functions from in Vivo Studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9 (9), 690–701.
  77. Ridley, A. J. Life at the Leading Edge. *Cell* **2011**, 145 (7), 1012–1022.
  78. Rossman, K. L.; Der, C. J.; Sondek, J. GEF Means Go: Turning on RHO GTPases with Guanine Nucleotide-Exchange Factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, 6 (2), 167–180.
  79. Michaelson, D.; Silletti, J.; Murphy, G.; D'Eustachio, P.; Rush, M.; Philips, M. R. Differential Localization of Rho GTPases in Live Cells: Regulation by Hypervariable Regions and RhoGDI Binding. *J. Cell Biol.* **2001**, 152 (1), 111–126.
  80. Linder, M. E.; Deschenes, R. J. Palmitoylation: Policing Protein Stability and Traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8 (1), 74–84.
  81. Wei, J.; Mialki, R. K.; Dong, S.; Khoo, A.; Mallampalli, R. K.; Zhao, Y.; Zhao, J. A New Mechanism of RhoA Ubiquitination and Degradation: Roles of SCF(FBXL19) E3 Ligase and Erk2. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1833 (12), 2757–2764.
  82. Wang, H. R.; Zhang, Y.; Ozdamar, B.; Ogunjimi, A. A.; Alexandrova, E.; Thomsen, G. H.; Wrana, J. L. Regulation of Cell Polarity and Protrusion Formation by Targeting RhoA for Degradation. *Science* **2003**, 302 (5651), 1775–1779.
  83. Chen, Y.; Yang, Z.; Meng, M.; Zhao, Y.; Dong, N.; Yan, H.; Liu, L.; Ding, M.; Peng, H. B.; Shao, F. Cullin Mediates Degradation of RhoA through Evolutionarily Conserved BTB Adaptors to Control Actin Cytoskeleton Structure and Cell Movement. *Mol. Cell* **2009**, 35 (6), 841–855.
  84. Oberoi, T. K.; Dogan, T.; Hocking, J. C.; Scholz, R. P.; Mooz, J.; Anderson, C. L.; Karreman, C.; Heringdorf, D. M. Z.; Schmidt, G.; Ruonala, M.; Namikawa, K.; Harms, G. S.; Carpy, A.; MacEk, B.; Köster, R. W.; Rajalingam, K. IAPs Regulate the Plasticity of Cell Migration by Directly Targeting Rac1 for Degradation. *EMBO J.* **2012**, 31 (1), 14–28.
  85. Torino, S.; Visvikis, O.; Doye, A.; Boyer, L.; Stefani, C.; Munro, P.; Bertoglio, J.; Gacon, G.; Mettouchi, A.; Lemichez, E. The E3 Ubiquitin-Ligase HACE1 Catalyzes the Ubiquitylation of Active Rac1. *Dev. Cell* **2011**, 21 (5), 959–965.
  86. Zhao, J.; Mialki, R. K.; Wei, J.; Coon, T. A.; Zou, C.; Chen, B. B.; Mallampalli, R. K.; Zhao, Y. SCF E3 Ligase F-Box Protein Complex SCFFBXL19 Regulates Cell Migration by Mediating Rac1 Ubiquitination and Degradation. *FASEB J.* **2013**, 27 (7), 2611–2619.
  87. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed Feb 4, 2023).
  88. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, 34 (17), i884–i890.
  89. Bolger, A. M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **2014**, 30 (15), 2114–2120.
  90. Kopylova, E.; Noé, L.; Touzet, H. SortMeRNA: Fast and Accurate Filtering of Ribosomal RNAs in Metatranscriptomic Data. *Bioinformatics* **2012**, 28 (24), 3211–3217.



91. Dobin, A.; Davis, C. A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T. R. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29* (1), 15–21.
92. Li, B.; Dewey, C. N. RSEM: Accurate Transcript Quantification from RNA-Seq Data with or without a Reference Genome. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*.
93. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <https://www.genome.jp/kegg/> (accessed Feb 4, 2023).
94. DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp> (accessed Feb 4, 2023).
95. GSEA <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp> (accessed Feb 4, 2023).
96. Hall, A. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* (80-. ). **1998**, *279* (5350), 509–514.
97. Su, H.; Na, N.; Zhang, X.; Zhao, Y. The Biological Function and Significance of CD74 in Immune Diseases. *Inflamm. Res.* **2017**, *66* (3), 209–216.
98. Ou, L.; Zhang, A.; Cheng, Y.; Chen, Y. The CGAS-STING Pathway: A Promising Immunotherapy Target. *Front. Immunol.* **2021**, *12* (December), 1–15.
99. Zheng, X.; Li, S.; Yang, H. Roles of Toll-Like Receptor 3 in Human Tumors. *Front. Immunol.* **2021**, *12* (April), 1–9.
100. Ning, S.; Pagano, J. S.; Barber, G. N. IRF7: Activation, Regulation, Modification and Function. *Genes Immun.* **2011**, *12* (6), 399–414.
101. Wu, Z.; Zhang, Z.; Lei, Z.; Lei, P. CD14: Biology and Role in the Pathogenesis of Disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2019**, *48*, 24–31.
102. Wei, J.; Mialki, R. K.; Dong, S.; Khoo, A.; Mallampalli, R. K.; Zhao, Y.; Zhao, J. A New Mechanism of RhoA Ubiquitination and Degradation: Roles of SCFFBXL19 E3 Ligase and Erk2. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2013**, *1833* (12), 2757–2764.
103. Ri, M. Endoplasmic-Reticulum Stress Pathway-Associated Mechanisms of Action of Proteasome Inhibitors in Multiple Myeloma. *Int. J. Hematol.* **2016**, *104* (3), 273–280.
104. Castillo-Lluva, S.; Tan, C. T.; Daugaard, M.; Sorensen, P. H. B.; Malliri, A. The Tumour Suppressor HACE1 Controls Cell Migration by Regulating Rac1 Degradation. *Oncogene* **2013**, *32* (13), 1735–1742.
105. Overwijk, W. W.; Restifo, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Curr. Protoc. Immunol.* **2001**, *CHAPTER* (1), Unit.
106. Liu, P.; Sun, Y.; Liu, S.; Niu, J.; Liu, X.; Chu, Q. SY-707, an ALK/FAK/IGF1R Inhibitor, Suppresses Growth and Metastasis of Breast Cancer Cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2021**, *54* (2), 252–260.
107. Koto, K.; Horie, N.; Kimura, S.; Murata, H.; Sakabe, T.; Matsui, T.; Watanabe, M.; Adachi, S.; Maekawa, T.; Fushiki, S.; Kubo, T. Clinically Relevant Dose of Zoledronic Acid Inhibits Spontaneous Lung Metastasis in a Murine Osteosarcoma Model. *Cancer Lett.* **2009**, *274* (2), 271–278.

108. Fujiwara, T.; Yakoub, M. A.; Chandler, A.; Christ, A. B.; Yang, G.; Ouerfelli, O.; Rajasekhar, V. K.; Yoshida, A.; Kondo, H.; Hata, T.; Tazawa, H.; Dogan, Y.; Moore, M. A. S.; Fujiwara, T.; Ozaki, T.; Purdue, E.; Healey, J. H. CSF1/CSF1R Signaling Inhibitor Pexidartinib (PLX3397) Reprograms Tumor-Associated Macrophages and Stimulates T-Cell Infiltration in the Sarcoma Microenvironment. *Mol. Cancer Ther.* **2021**, *20* (8), 1388–1399.
109. Giavazzi, R.; Campbell, D. E.; Fidler, I. J.; Jessup, J. M.; Cleary, K. Metastatic Behavior of Tumor Cells Isolated from Primary and Metastatic Human Colorectal Carcinomas Implanted into Different Sites in Nude Mice. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 1928–1933.
110. Tanaka, T.; Yui, Y.; Naka, N. Dynamic Analysis of Lung Metastasis by Mouse Osteosarcoma LM8 : VEGF Is a Candidate for Anti-Metastasis Therapy. **2013**, 369–379.
111. Maiques, O.; Fanshawe, B.; Crosas-Molist, E.; Rodriguez-Hernandez, I.; Volpe, A.; Cantelli, G.; Boehme, L.; Orgaz, J. L.; Mardakheh, F. K.; Sanz-Moreno, V.; Fruhwirth, G. O. A Preclinical Pipeline to Evaluate Migrastatics as Therapeutic Agents in Metastatic Melanoma. *Br. J. Cancer* **2021**, *125*, 699–713.
112. Xu, F.; Wang, Z.; Zhang, H.; Chen, J.; Wang, X.; Cui, L.; Xie, C.; Li, M.; Wang, F.; Zhou, P.; Liu, J.; Huang, P.; Xia, X.; Xia, X. Mevalonate Blockade in Cancer Cells Triggers Clec9a Dendritic Cell-Mediated Antitumor Immunity. *Cancer Res.* **2021**, *81* (17), 4514–4528.

Supplementary information

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

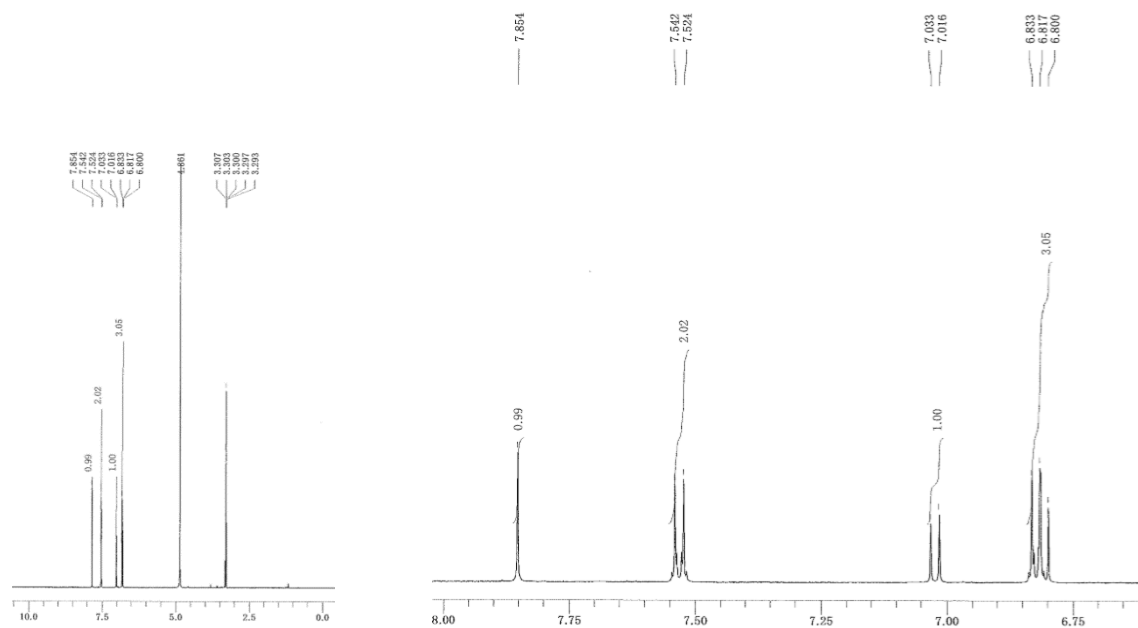
2022 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】病態生理学分野

杉山 雄輝

# Supplementary Figure



Supplementary Figure 1. <sup>1</sup>H-NMR data (CD<sub>3</sub>OD) of compound 1

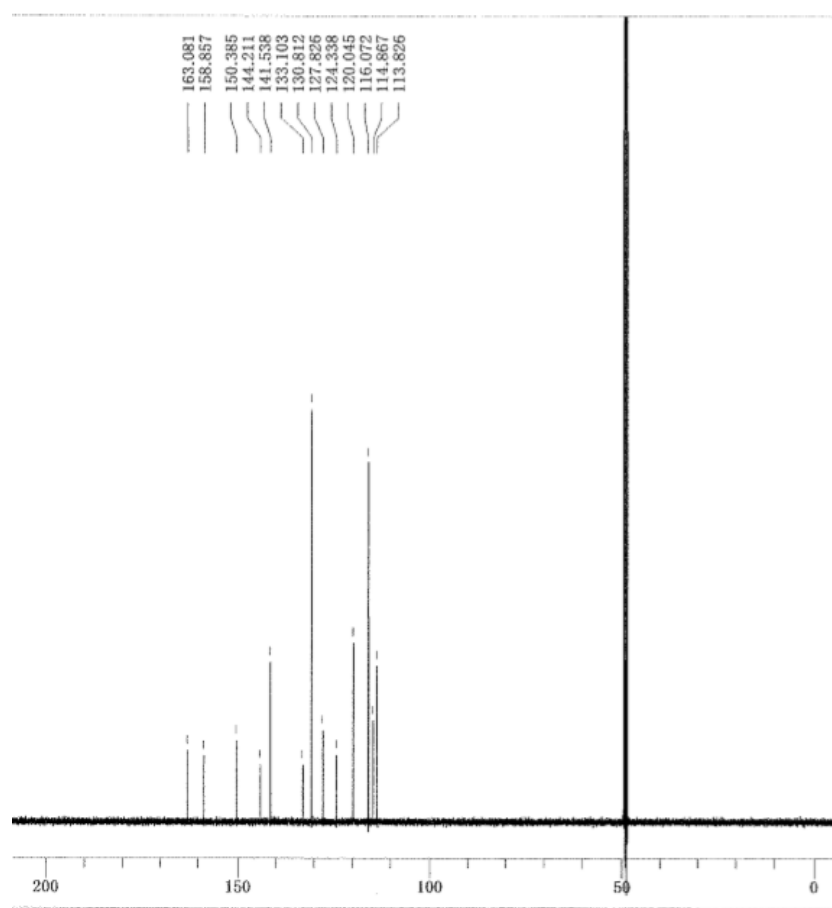
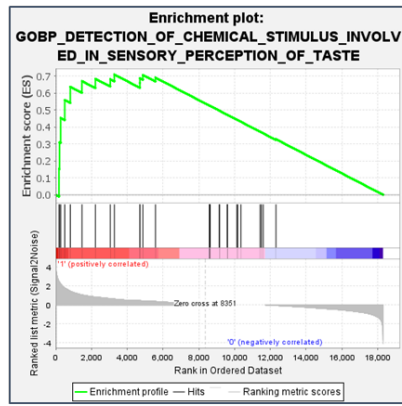
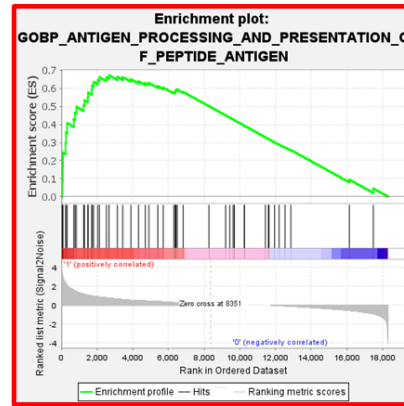


Chart S2

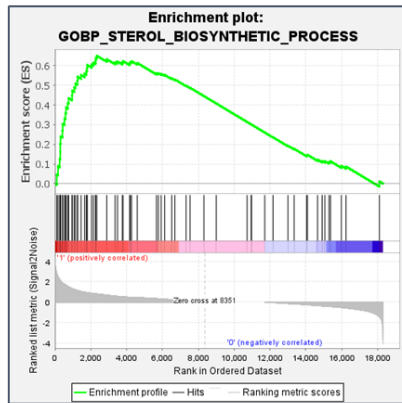
Supplementary Figure 2. <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD) data of compound 1



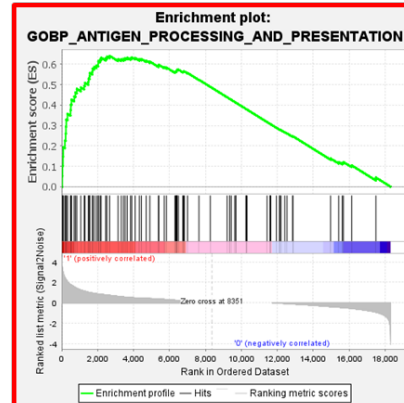
ES : 0.70935464



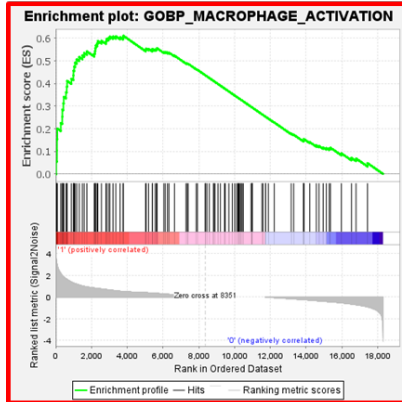
ES : 0.67252874



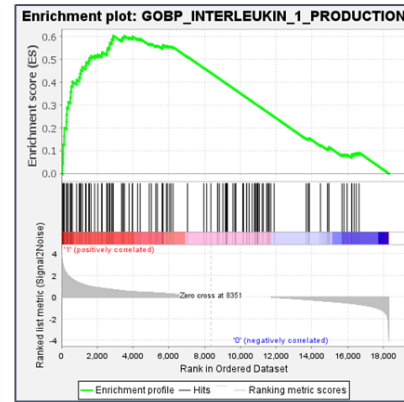
ES : 0.65079683



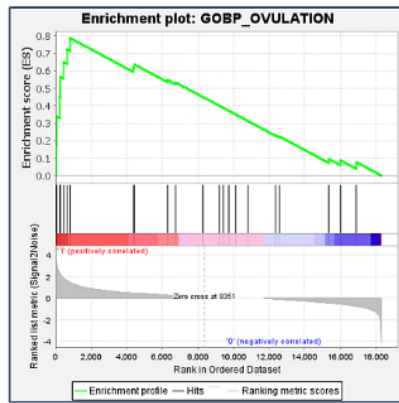
ES : 0.64133810



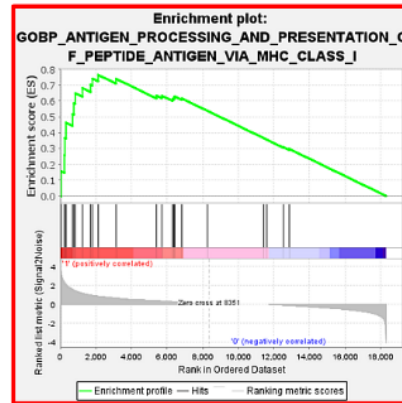
ES : 0.61108000



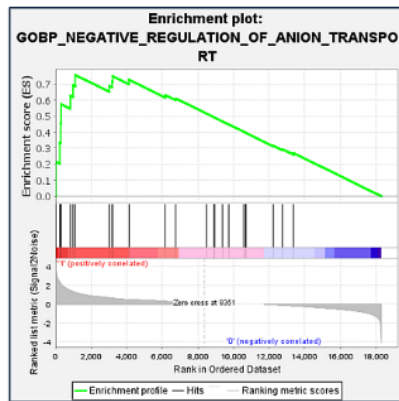
ES : 0.60308530



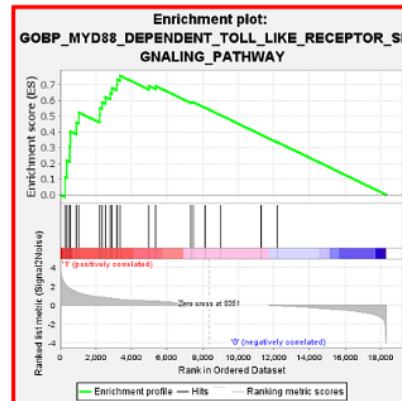
ES : 0.78723760



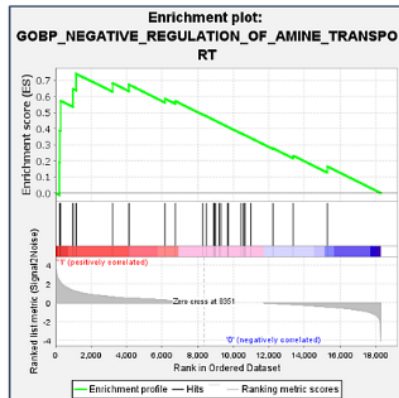
ES : 0.76505620



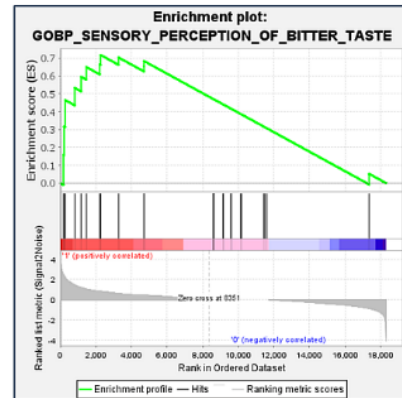
ES : 0.75724140



ES : 0.75617930



ES : 0.74244404



ES : 0.71765524

### Supplementary Figure 3. Top-ranked enrichment plots by GSEA

Top significant enrichment plots of the gene sets related to the GO term “biological process (BP)” by GSEA are shown. Enrichment Score (ES) of each plot is indicated under the panel. The significant gene sets are summarized in Supplementary Table 3. The panels highlighted in red are those linked directly or located downstream of the GO term “IMMUNE\_SYSTEM\_PROCESS” shown in Fig. 5C.