

2023 年度課程博士学位論文

Linderapyrone およびその関連化合物の importin7 を介した

Wnt/ β -catenin 経路阻害作用

【薬学】公衆衛生学分野 北川 翔大

本論文は以下の論文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、未発表データも含んでいる。

1) Takahiro Matsumoto, Takahiro Kitagawa, Daisuke Imahori, Atsushi Matsuzaki, Youhei Saito, Tomoe Ohta, Tatsusada Yoshida, Yuji Nakayama, Eishi Ashihara, Tetsushi Watanabe. Linderapyrone: A Wnt signal inhibitor isolated from *Lindera umbellata*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2021**, 45, 128161.

[第1章, 第2章]

2) Takahiro Kitagawa, Takahiro Matsumoto, Tomoe Ohta, Tatsusada Yoshida, Youhei Saito, Yuji Nakayama, Yuki Hadate, Eishi Ashihara, Tetsushi Watanabe. Lindrapyrone analogue LPD-01 as a cancer treatment agent by targeting importin7. *J. Nat. Med.*, **2023**, in press.

[第2章, 第3章]

目次

序論.....	1
本論.....	6
第1章 クロモジ (<i>Lindera umbellata</i>) から単離した新規化合物 linderapyrone (1) およびその合成類縁体は Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を示す	6
緒言	6
結果	8
第1節 クロモジ (<i>L. umbellata</i>) 地上部から2種の化合物を単離した.....	8
第2節 Linderapyrone (1) および <i>epi</i> -(-)-linderol A (2) の化学構造を決定した.....	8
第3節 Linderapyrone (1) は TCF/ β -catenin 転写活性を阻害する.....	13
第4節 Linderapyrone (1) および類縁体を合成した	14
第5節 Linderapyrone (1) およびその類縁体 (<i>ent</i> -1, 1a, 5, および 6) は TCF/ β -catenin 転写活性を阻害する	15
考察	17
小括	19
第2章 LPD-01 (1a) はヒト大腸がん細胞株 HT-29 の増殖を抑制し、その標的分子は exportin5 および importin7 の可能性がある.....	
緒言	20
結果	21
第1節 Linderapyrone (1) および LPD-01 (1a) は HT-29 細胞の増殖を抑制する	21
第2節 LPD-01 (1a) は HT-29 細胞に対して SW480 細胞よりも強い増殖抑制作用を示す	21
第3節 HT-29 細胞において、LPD-01 (1a) が Wnt/ β -catenin 経路の標的因子である c-Myc および Survivin の発現量を減少させる	23
第4節 LPD-01 (1a) と同程度の HT-29 細胞増殖抑制作用を示す活性化合物 1a-a および作用を示さない非活性化合物 1a-b を合成した	25
第5節 HT-29 細胞において LPD-01 (1a) は exportin5 および importin7 に結合する ..	27
考察	29
小括	31
第3章 LPD-01 (1a) は importin7 の機能抑制を介して Wnt/ β -catenin 経路を阻害している可能性がある.....	32
緒言	32
結果	34
第1節 HT-29 細胞における importin7 のノックダウンは Wnt/ β -catenin 経路の標的因子である c-Myc および Survivin の mRNA 発現量を減少させる	34
第2節 LPD-01 (1a) は β -catenin および TCF4 の核内輸送を抑制しない.....	35
第3節 LPD-01 (1a) は Smad2/3 の核内移行を抑制する	36
考察	39

小括	41
結論	42
謝辞	43
実験の部	44
第 1 章の実験	44
第 2 章の実験	49
第 3 章の実験	53
引用文献	56
Supplemental data	62

略語表

APC	: Adenomatous polyposis coli
ATP	: Adenosine triphosphate
BSA	: Bovine serum albumin
CaCl ₂	: Calcium chloride
CCK-8	: Cell Counting Kit-8
cDNA	: Complementary deoxyribonucleic acid
CH ₃ COOH	: Acetic acid
CSC	: Cancer stem cell
CyDTA	: <i>trans</i> -1,2-Diaminocyclohexane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
DBU	: Diazabicycloundecene
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	: <i>N,N</i> -Dimethylformamide
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DQF-COSY	: Double quantum filtered correlation spectroscopy
DTT	: Dithiothreitol
Dvl	: Dishevelled
ECD	: Electronic circular dichroism
ECL	: Enhanced chemiluminescence
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>ent</i>	: Enantiomer
EtOAc	: Ethyl acetate
FBS	: Fetal bovine serum
Glc	: β -D-Glucopyranosyl
GSK-3 β	: Glycogen synthase kinase-3 β
HCl	: Hydrogen chloride
HEPES	: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine etanesulfonic acid
HLB	: Hypotonic lysis buffer
HMBC	: Heteronuclear multiple bond coherence
HMPA	: Hexamethylphosphoric triamide
HMQC	: Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	: High-performance liquid chromatography
HREIMS	: High-resolution electron-impact ionization mass spectrometry
HRP	: Horseradish peroxidase
IC ₅₀	: 50% Inhibition concentration
KCl	: Potassium chloride
K ₂ CO ₃	: Potassium carbonate

LEF	: Lymphocyte enhancing factor
LRP	: Low-density lipoprotein receptor-related protein
MeCN	: Acetonitrile
MeOH	: Methanol
MgCl ₂	: Magnesium chloride
MgCO ₃	: Magnesium carbonate
Mg(OH) ₂	: Magnesium hydroxide
MgSO ₄	: Magnesium sulfate
mRNA	: Messenger ribonucleic acid
MS	: Mass spectrometry
NaBH ₄	: Sodium tetrahydroborate
NaCl	: Sodium chloride
NaF	: Sodium fluoride
NaHCO ₃	: Sodium hydrogen carbonate
NaOH	: Sodium hydroxide
Na ₃ VO ₄	: Sodium orthovanadate
<i>n</i> -BuLi	: Normal-butyllithium
NLB	: Nuclear lysis buffer
NMR	: Nuclear magnetic resonance
NOESY	: Nuclear overhauser effect spectroscopy
NP-40	: Nonidet P-40
ODS	: Octadecylsilyl
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
Ran	: Ras-related nuclear protein
RNA	: Ribonucleic acid
RT-qPCR	: Reverse transcriptional quantitative polymerase chain reaction
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	: Tris-buffered saline
TCF	: T-cell factor
TGF- β	: Transforming growth factor- β
THF	: Tetrahydrofuran
TMSOTf	: Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
TrCP	: Transductin-repeat-containing-protein
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tween 20	: Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
UV	: Ultraviolet
WST-8	: 2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4disulfophenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium, monosodium salt

序論

がんは本邦で死因第一位の疾患であり、2021年には38万人以上ががんで亡くなっている¹。がん治療では、従来用いられてきた細胞障害性抗がん剤に加え、免疫チェックポイント阻害薬等の臨床応用が進み、がんの治療成績向上に寄与している。しかしながら、がん組織は発現遺伝子の異なる多様な細胞から構成されているため、既存の抗がん剤を用いた治療で死に至らない細胞が存在する^{2,3}。

がん組織が不均一な細胞集団で構成される原因として、がん幹細胞 (CSC) の存在が挙げられる。CSC はがん組織中に少数存在する、自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞であり、高い腫瘍形成能を有する^{4,5}。1997年に、急性骨髄性白血病の患者から調製されたCD34陽性CD38陰性の細胞分画を免疫不全マウスに移植すると高い腫瘍形成能を示すのに対し、他の細胞分画では腫瘍形成が認められないことが明らかになった。このことから、CD34陽性CD38陰性の細胞分画中に腫瘍形成能を持つCSCが存在することが示唆された⁶。それ以降、これまでに乳がん^{7,8}や大腸がん⁹等、様々ながん種でCSCの探索が行われてきた。CSCは種々の異なる遺伝子を発現する非がん幹細胞 (non-CSC) に分化する能力を有しており、細胞分裂停止期であることが多いため、細胞増殖依存的に細胞死を引き起こす抗がん剤に抵抗性を示す²。そのため、CSCはがん治療後も、抗がん剤抵抗性を示す一部のnon-CSCとともに残存することで、がんの再発を引き起こすことがある(図1)。また、CSCはnon-CSCからも発生しうることから、抗がん剤治療後のがん再発を予防するためには、non-CSCおよびCSCを駆逐するとともに、CSCの発生を予防することが重要であると考えられる。

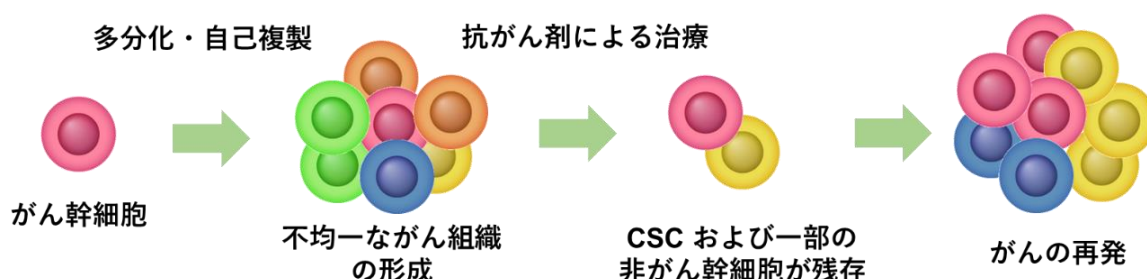


図1 がん組織の不均一性およびがん再発の概念図

がん組織中には、抗がん剤抵抗性を示すがん細胞およびがん幹細胞が存在し、治療後も残存する。これらの細胞が再び増殖することで、がんの再発を引き起こすと考えられている。

Wnt/ β -catenin 経路は胚発生や組織恒常性の維持、細胞の増殖や細胞死等に関わる経路である^{10,11}。Wnt/ β -catenin 経路において、Wnt タンパク質非存在下 (Wnt OFF) では、細胞質の β -catenin は APC¹², GSK-3 β ¹³, および AXIN 等と複合体を形成する。本複合体を形成した β -catenin はリン酸化され、ユビキチンリガーゼである β -TrCP によるユビキチン化を受けてプロテアソーム系で分解される¹⁴。これにより、Wnt/ β -catenin 経路は負の制御を受け、本経路における下流遺伝子の転写は抑制される。一方、Wnt タンパク質存在下 (Wnt ON) では、Wnt タンパク質は細胞膜上に存在する Frizzled 受容体および LRP5/6 受容体と結合する¹⁵。これ

により Dvl のリン酸化が誘導され、GSK-3 β を介した β -catenin のリン酸化が阻害される^{15, 16}。その結果、 β -catenin は安定化し、細胞質に蓄積する。その後、蓄積した β -catenin は核内に移行し、転写因子である TCF/LEF と複合体を形成することで、がん幹細胞の機能維持に関わる c-Myc や細胞死に対する抵抗性に関わる Survivin 等の遺伝子の転写を促進する¹⁷⁻¹⁹ (図 2)。

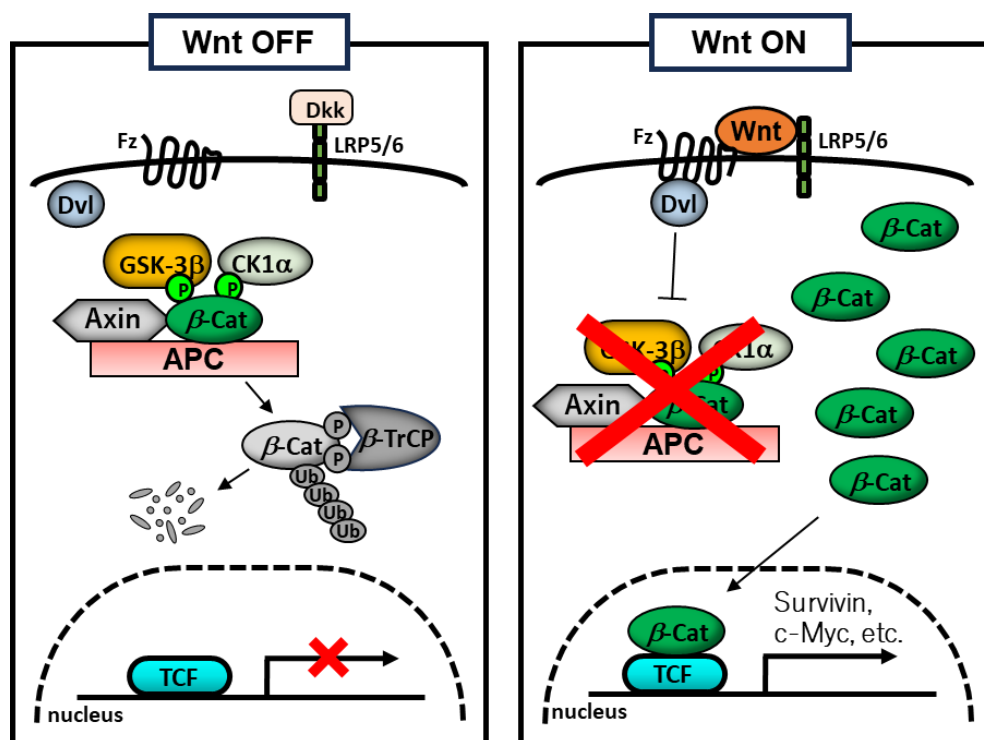
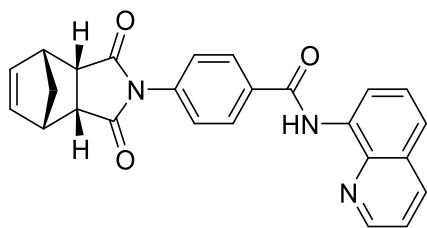


図 2 Wnt/ β -catenin 経路

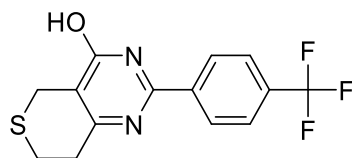
Wnt タンパク質非存在下では β -catenin は APC や AXIN 等と複合体を形成することでリン酸化を受け、分解される。しかし、Wnt タンパク質の存在や関連遺伝子の変異等で β -catenin が安定化されると、本経路は活性化され、各種遺伝子の転写が亢進する。

β -cat: β -catenin, P: phosphate, Ub: ubiquitin

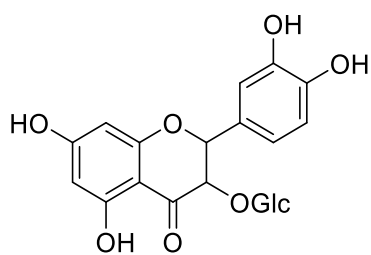
Wnt/ β -catenin 経路は様々ながん種で異常亢進が見られ、細胞増殖、がん幹細胞の幹細胞性の維持、および抗がん剤への耐性化等に関与することが報告されている^{11,20}。そのため、本経路はがんの治療標的として期待され、様々な阻害物質の探索が行われてきた。その結果、AXIN を安定化させることで β -catenin の分解を促進する化合物 (IWR-1-endo²¹, XAV-939²² 等), β -catenin の核内移行を抑制する化合物 (isoquercitrin²³, tegavivint^{24,25} 等), TCF/ β -catenin 複合体形成に関わる因子を阻害する化合物 (ICG-001²⁶, NCB-0846²⁷ 等) 等、様々な機序を持つ Wnt/ β -catenin 経路阻害物質が見出されている (図 3)。現在、tegavivint および ICG-001 の類縁体である PRI-724 を始めとした様々な Wnt/ β -catenin 経路阻害物質の臨床試験が行われているが²⁸、未だ臨床で実用化されている阻害剤は存在しない。

A

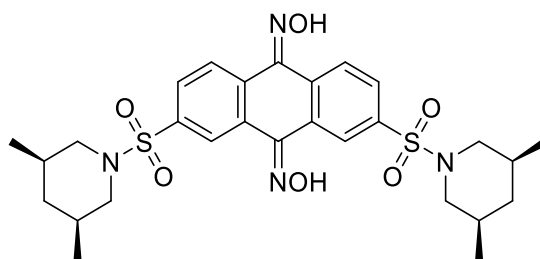
IWR-1-endo



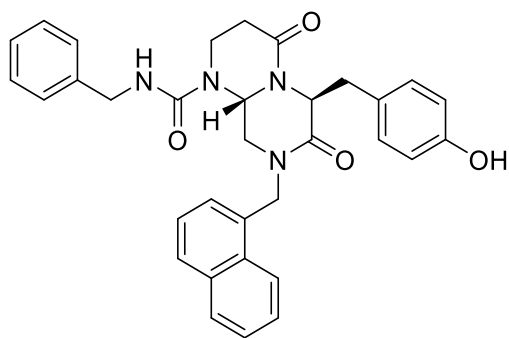
XAV939



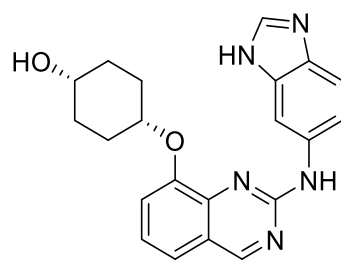
isoquercitrin



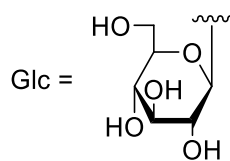
tegavivint



ICG-001



NCB-0846



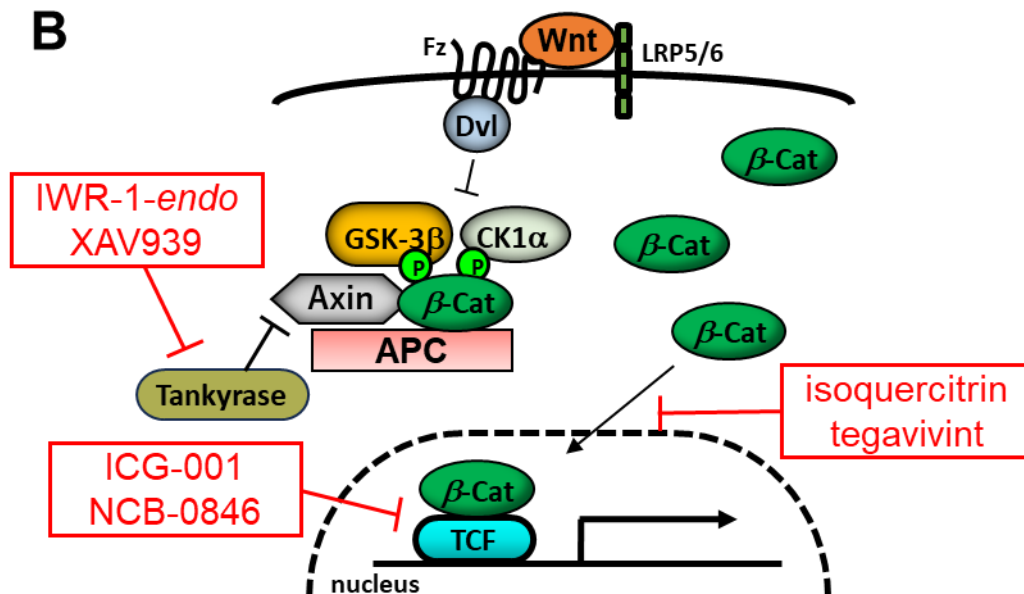


図3 これまでに報告されている Wnt/ β -catenin 経路阻害物質の構造式およびそれらの作用機序

(A および B) IWR-1-endo および XAV939 は Tankyrase の機能を抑制することで AXIN を安定化し、 β -catenin の分解を促進する。Isoquercitrin および tegavivint は β -catenin の核内移行を抑制する。ICG-001 および NCB-0846 はそれぞれ TCF/ β -catenin 複合体形成に参与する CBP および TNF- α の働きを阻害する。現在、tegavivint および ICG-001 の類縁体である PRI-724 等、様々な Wnt/ β -catenin 経路阻害物質の臨床試験が行われている。

クロモジ (*Lindera umbellata*) は日本の山岳地帯に分布している落葉低木である²⁹。その含有成分として、リグナン、カルコン、およびカヴァラクトンに加え、カルコンとモノテルペンの複合体等、多様な化合物が報告されている²⁹⁻³³ (図4)。また、カルコンとモノテルペンの複合体は多様な平面、立体構造を持ち、マウス白血病細胞に対する細胞毒性作用や抗原虫作用等、様々な作用を示すことが報告されている³⁴⁻³⁶。そのため、リグナンもしくはカヴァラクトンについても、モノテルペンと複合体を形成することで多様な生体機能性を示すことが期待される。

上述したように、Wnt/ β -catenin 経路はがん細胞の増殖だけでなく、がん幹細胞の生存・維持にも関与していることから、本経路阻害作用を持つ薬剤はがんの治療および再発予防への貢献が期待できる。そこで、本研究ではクロモジ (*L. umbellata*) から含有成分の探索を行うとともに、得られた化合物が Wnt/ β -catenin 経路に与える影響を評価した。また、Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を示した化合物については、その作用機序を解明するため、標的分子を探索した。

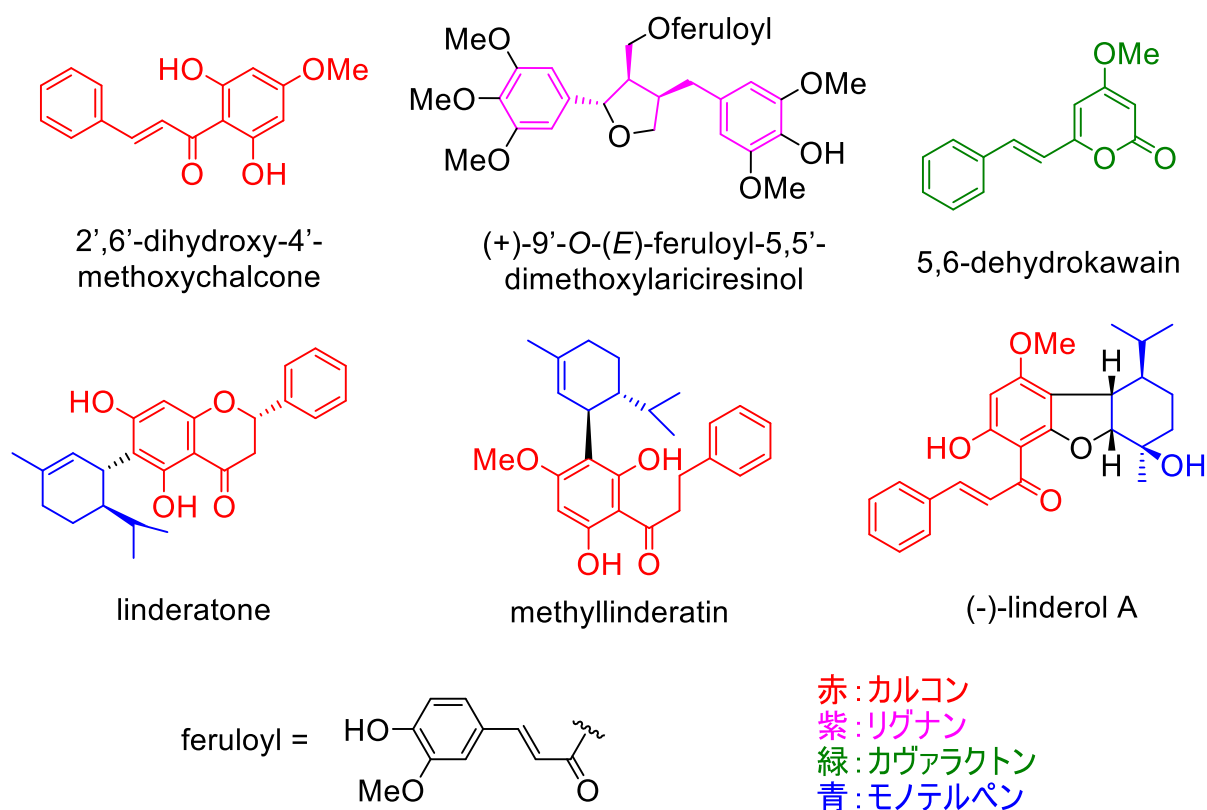


図 4 クロモジ (*Lindera umbellata*) から単離報告のある化合物

これまでにクロモジ (*Lindera umbellata*) から、カルコンである 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone, リグナンである (+)-9'-O-(*E*)-feruloyl-5,5'-dimethoxylariciresinol, カヴァラクトンである 5,6-dehydrokawain, およびカルコンとモノテルペンの複合体である linderatone, methyllinderatin, (-)-linderol A 等が単離されている。赤はカルコン, 紫はリグナン, 緑はカヴァラクトン, 青はモノテルペンの構造をそれぞれ示す。Me: methyl

本論

第 1 章 クロモジ (*Lindera umbellata*) から単離した新規化合物 linderapyrone (1) およびその合成類縁体は Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を示す

緒言

クロモジ (*L. umbellata*) からは前述した化合物に加え, pinocembrin, linderatone, および neolinderatin 等, 様々な化合物が単離されている (図 5)^{29, 30, 34}. このうち, linderatone は pinocembrin よりもマウス白血病細胞株 (P388) に対して強い細胞毒性作用を示すことが明らかにされている³⁴. Linderatone は pinocembrin にモノテルペンが結合した化合物であることから, モノテルペンの存在が作用増強に寄与していると考えられる. また, 同様にクロモジ (*L. umbellata*) からの単離が報告されている hostmanin C, adunctin E, および methyllinderatin はそれぞれモノテルペンの立体もしくはモノテルペンとカルコンの結合様式が異なる化合物である (図 5). これら 3 種の化合物は抗マラリア作用を示し, その作用は methyllinderatine が最も強く, hostminin C が最も弱い. さらに, hostmanin C および adunctin E はヒト乳がん細胞株 (MCF-7) に対して同程度の細胞毒性作用を示すことが明らかにされている³⁵. 以上のことから, 構造中におけるモノテルペンの結合様式および立体の違いにより, 化合物が異なる作用を示すことが期待されると考えた.

そこで, リグナンもしくはカヴァラクトンとモノテルペンの複合体についても, 多様な立体・結合様式をとることで様々な生体機能性を持つことが期待できると考え, クロモジ (*L. umbellata*) の含有成分を探索した.

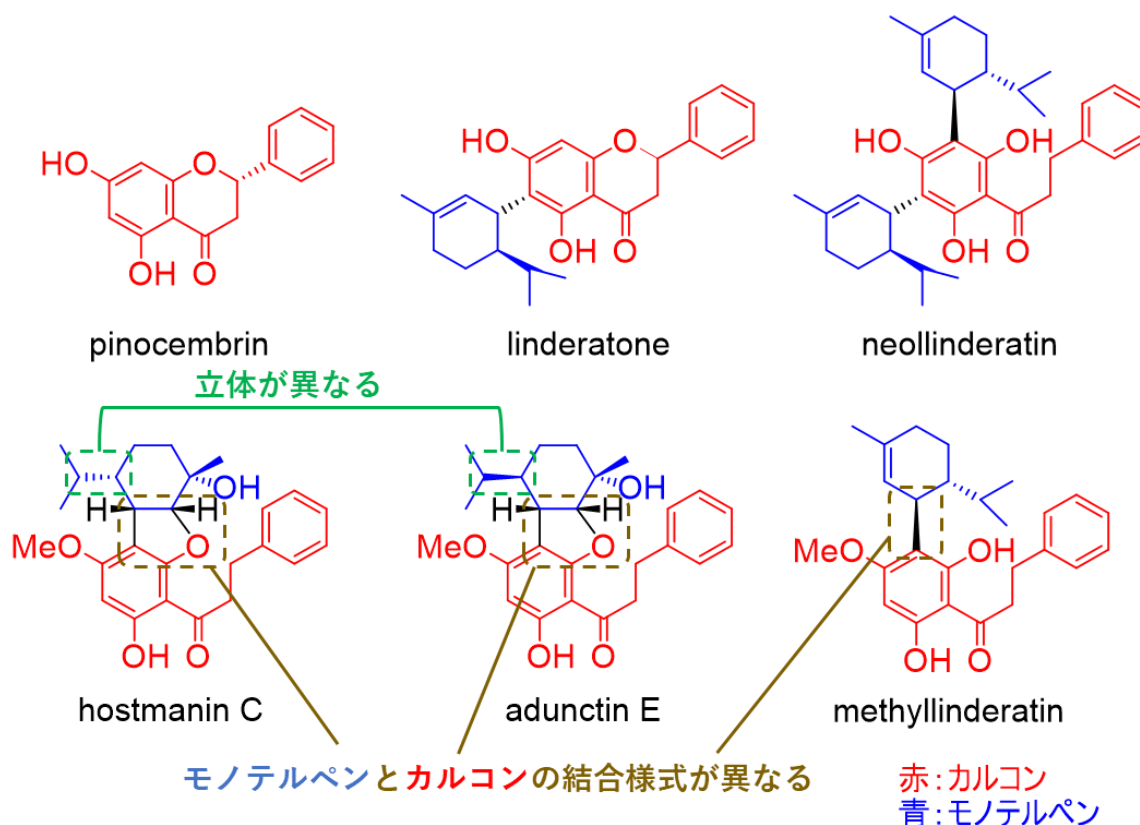


図5 クロモジ (*Lindera umbellata*) から単離報告のあるカルコンおよびカルコンとモノテルペンの複合体

pinocembrin はカルコンであり, linderatone, neollinderatin, hostmanin C, adunctin E, および methyllinderatin はモノテルペンとカルコンの複合体である. Hostmanin C および adunctin E は緑枠で示したように, 一部の立体が異なるジアステレオマーであり, methyllinderatin とはモノテルペンと異なる様式で結合している. 赤はカルコン, 青はモノテルペンの構造をそれぞれ示す. Me: methyl

結果

第1節 クロモジ (*L. umbellata*) 地上部から2種の化合物を単離した

栃本天海堂から購入した徳島県産クロモジ茎および枝 (6.5 kg) より得られた MeOH 抽出エキス (355.0 g, 5.5%) を EtOAc と H₂O で分液し, EtOAc 可溶画分および H₂O 可溶画分を得た. EtOAc 可溶画分を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー, 逆相オクタデシルシリル基結合シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーおよび HPLC により繰り返し分離精製し, 1 種の新規化合物 linderapyrone (**1**, 0.00034%) を単離・構造決定するとともに, 1 種の既知化合物 *epi*-(-)-linderol A (**2**, 0.000035%) を単離・同定した (図 6). このうち, **2** は既にそのラセミ体が合成中間体として報告されていた³⁶が, 天然物より単離したのは本研究が初めてである.

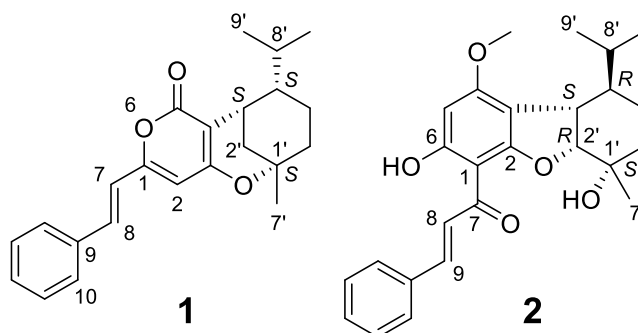


図 6 クロモジ (*Lindera umbellata*) より得られた化合物 (**1** および **2**) の化学構造

クロモジ茎および枝 (6.5 kg) から得られた MeOH 抽出エキス (355.0 g, 5.5%) を各種カラムクロマトグラフィーにより分離精製し, 各種化合物を単離した. 得られた化合物 (**1** および **2**) の化学構造は NMR などの各種スペクトルデータを解析することで決定した. (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2021**, 45, 128161, Fig. 1 より一部改変して引用)

第2節 Linderapyrone (**1**) および *epi*-(-)-linderol A (**2**) の化学構造を決定した

Linderapyrone (**1**) は負の旋光性 ($[\alpha]^{25}_D$ -18.3 in MeOH) を示す黄色の粘性物質として得られ, 高分解能電子イオン化質量分析法 (HREIMS) および炭素核磁気共鳴 (¹³C-NMR) スペクトルを解析することで, 分子式が C₂₃H₂₆O₃ であることを明らかにした. また, EIMS において, 分子イオンピークが m/z 350 [M]⁺ に観察された. さらに, **1** について水素核磁気共鳴 (¹H-NMR) および ¹³C-NMR スペクトル (表 1) の解析を行った結果, 3 置換ピロンに由来するプロトン [δ_H 6.12 (s, H-2)], オレフィンプロトン [δ_H 6.63 (d, J = 15.8, H-7), 7.38 (d, J = 15.8, H-8)], フェニル基, およびモノテルペン {3 か所のメチル基由来のプロトン [δ_H 1.49 (s, H-7'), 0.78 (d, J = 6.2, H-9'), 1.20 (d, J = 6.2, H-10')], 3 か所のメチレンプロトン [δ_H 1.77 (m, H-2' α), 1.82 (m, H-2' β), 1.74 (m, H-5' α), 1.11 (m, H-5' β), 1.62 (m, H-6' α), 2.10 (m, H-6' β)], 3 か所のメチンプロトン [δ_H 3.54 (br-s, H-3'), 1.26 (m, H-4'), 1.25 (m, H-8')], および 1 か所の 4 級炭素 [δ_C 82.7 (C-1')]} の存在が示唆された. ピロン, オレフィン, モノテルペン, フェニル基, およびメチル基の結合位置は HMBC 相関をもとに決定した (図 7). すなわち, H-2 と C-1,

4, および 7; H-8 と C-9 および 10; H-3' と C-4, 5, 1', および 5'; H-7' と C-1', 2', および 6'; H-9' と C-4' および 8'; そして H-10' と C-4' および 8' の間に HMBC 相関が認められたことから, その結合位置を決定した. C-8 位の幾何異性に関しては, H-7 と H-8 間の ^1H -NMR スペクトルのスピン結合定数 ($J = 15.8$) から, *E* 配置であると決定した. 次に, **1** の H-3' と H-4' における相対立体配置については, H-3' と H-4' の間に NOESY 相関が認められたことから決定した. なお, H-7' に関しては, 他の立体だと構造にひずみが生じることから H-3' と同様の結合方向しか存在できないと考え, その相対立体配置を決定した. また, **1** の絶対立体配置に関しては, ECD スペクトルの実測値と理論計算値を比較することで決定した. すなわち, **1** の ECD スペクトル実測値を, **1** およびそのエナンチオマー体の ECD 理論計算値と比較し, 解析することで, 絶対立体配置が 1'S, 3'S, 4'S であると決定した (図 8). 以上の結果から, linderapyrone (**1**) の化学構造は, 図 6 に示したものであると決定した.

Epi-(-)-linderol A (**2**, 0.000035%) は負の旋光性 ($[\alpha]^{25}_{\text{D}} -19.6$ in MeOH) を示す黄色の油状物質として得られ, HREIMS および ^{13}C -NMR スペクトルを解析することで, 分子式が $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_5$ であることを明らかにした. また, EIMS において, 分子イオンピークが m/z 422 $[\text{M}]^+$ に観察された. さらに, **2** の ^1H -NMR および ^{13}C -NMR スペクトルは, 過去に報告されている (-)-linderol A³⁴ と一致していたことから, その平面構造は同一であると決定した. 次に, **2** の相対立体配置は NOESY スペクトルを解析することで決定した. すなわち, H-2' と H-3'; H-3' と H-8'; そして H-7' と H-2' の間に NOESY 相関が観測されたことから, **2** の相対立体配置を決定した (図 7). さらに, その絶対立体配置は ECD スペクトルの実測値と理論計算値を比較することで決定した. すなわち, **2** の ECD スペクトル実測値を, **2** およびそのエナンチオマー体の ECD 理論計算値と比較し, 解析することで, 絶対立体配置が 1*S*, 2*R*, 3*S*, 4*R* であると決定した. 以上の結果から, *epi*-(-)-linderol A (**2**) の化学構造は, 図 6 に示したものであると決定した.

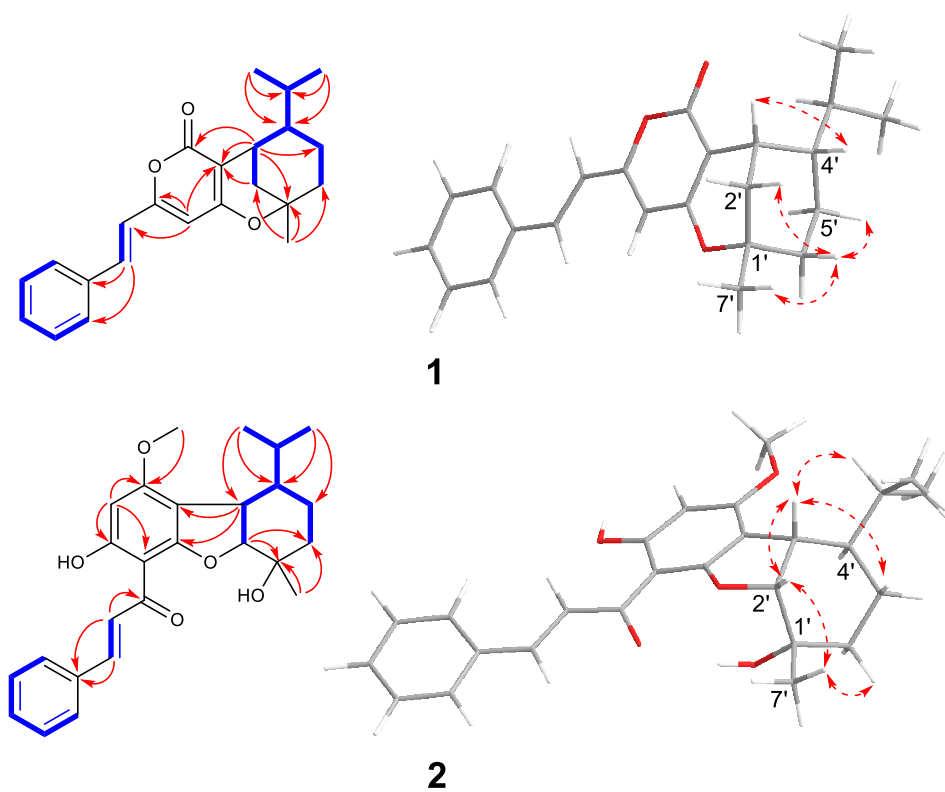


図7 1 および 2 の2D-NMRの相関図

1 および 2 について，HMBC および DQF-COSY 相関を解析した．また，その幾何異性については ^1H -NMR スペクトルの結合定数をもとに決定した．(*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2021**, 45, 128161, **Fig. 2** より一部改変して引用)

表 1. Linderapyrone (1) および *epi*-(-)-linderol A (2) の ^{13}C NMR (150 MHz) および ^1H NMR (600 MHz) スペクトル

Position	1		2	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	156.6		103.4	
2	112.3	6.12 (s)	161.0	
3	179.8		113.6	
4	100.4		161.7	
5	165.1		93.2	6.10 (m)
7	119.1	6.63 (d, 15.8)	166.6	
8	135.2	7.38 (d, 15.8)	191.2	
9	134.6		143.5	7.84 (d, 15.8)
10 and 14	127.3	7.50 (d, 7.6)	125.7	7.06 (d, 15.8)
11 and 13	128.9	7.39 (d, 7.6)	135.2	
12	129.4	7.38 (d, 7.6)	129.1	7.61 (d, 6.8)
13			12.84	7.42 (d, 6.8)
14			130.4	7.40 (d, 6.8)
15			128.4	7.42 (d, 6.8)
1'	82.7		129.1	7.61 (d, 6.8)
2'	37.2	α 1.77 (m) β 1.82 (m)	70.7	
3'	27.4	3.54 (br-s)	92.8	4.37 (d, 5.5)
4'	49.2	1.26 (m)	41.0	3.02 (dd, 5.5, 11.0)
5'	22.3	α 1.74 (m) β 1.11 (m)	46.5	1.17 (m)
6'	39.1	α 1.62 (m) β 2.10 (m)	20.4	α 1.62 (m) β 1.16 (m)
7'	27.8	1.49 (s)	36.1	α 1.79 (m) β 1.85 (m)
8'	30.0	1.25 (m)	25.1	1.35 (s)
9'	20.6	0.78 (d, 6.2)	27.0	1.87 (m)
10'	22.5	1.20 (d, 6.2)	15.3	0.88 (d, 6.8)

スペクトルは CDCl_3 を用いて測定.

(*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 45, 128161, Table 1 より引用)

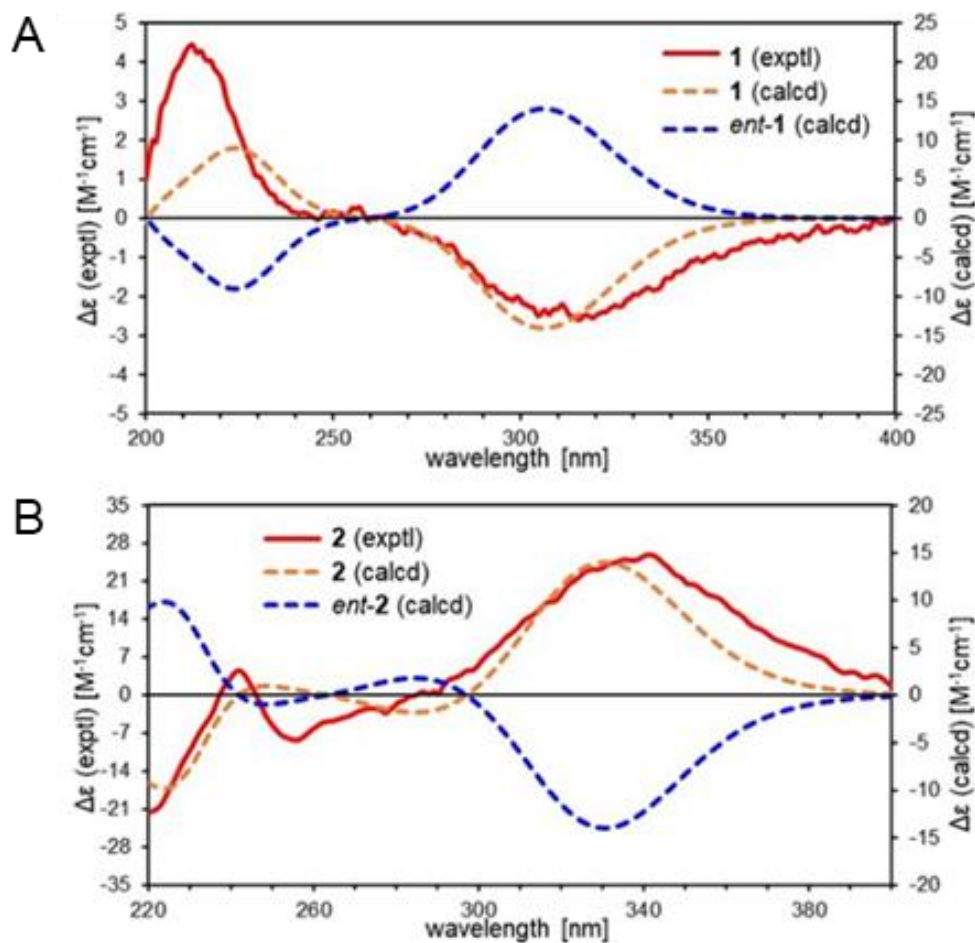


図8 1 および 2 の実験 ECD スペクトルと理論計算 ECD スペクトルの比較
(A および B) 1 および 2 の ECD スペクトルを測定した. 次に, 1, 2, およびそれらのエナンチオマー体の理論計算 ECD スペクトルを算出し, 実測値と比較した. 1 の理論計算 ECD スペクトルは, 320 nm 付近に負の Cotton 効果を示した 1 の ECD スペクトル実測値をよく再現した. 2 の理論計算 ECD スペクトルは, 340 nm 付近に正の Cotton 効果を示した 2 の ECD スペクトル実測値をよく再現した. exptl: experimental, calcd: calculated (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 45, 128161, **Fig. 2** より一部改変して引用)

第3節 Linderapyrone (1) は TCF/ β -catenin 転写活性を阻害する

化合物の Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を評価するため、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に TCF/LEF 結合部位を含む TOP flash レポータープラスミドをヒト胎児腎細胞株 HEK293 に安定導入した細胞株 STF/293 を使用した。この細胞を被験化合物で処理することで、Wnt/ β -catenin 経路の最下流における TCF/ β -catenin 転写活性に与える影響をルシフェラーゼ遺伝子の発現量をもとに評価した。本実験では、既存の Wnt/ β -catenin 経路阻害物質である ICG-001 をポジティブコントロールとして用いた。得られた化合物 (1 および 2) で STF/293 細胞を 24 時間処理した際のルシフェラーゼ遺伝子の発現量を、ルシフェリンを添加した際の発光量をもとに評価し、同時に WST-8 アッセイで細胞生存率を測定した。その結果、1 は細胞生存率をほとんど減少させずに、30, 60 μ M の濃度でルシフェラーゼ遺伝子の発現をそれぞれ約 40% と約 65% 抑制した。一方で、2 は 60 μ M で約 13% の抑制であり、ほとんど作用が認められなかった (図 9)。

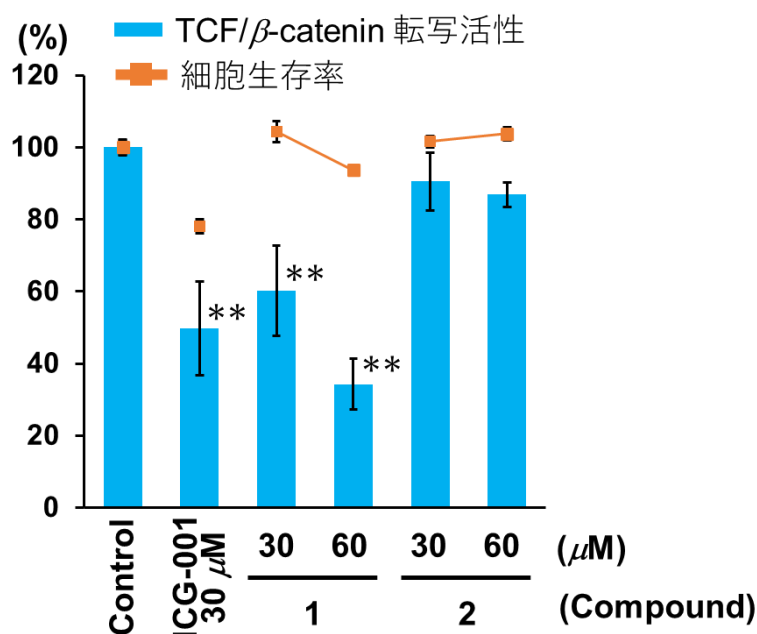


図9 1 および 2 の TCF/ β -catenin 転写活性阻害作用

3x10³ 個/well の STF/293 細胞を 96 穴プレートに播種し、24 時間培養した。STF/293 細胞を各種化合物 (ICG-001, 1, および 2) で 24 時間処理し、TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用を、ルシフェリンを加えた際の発光量をもとに算出した。また、WST-8 試薬を加え、生成したホルマザンの吸光度を 450 nm で測定した。グラフ中には、それぞれ DMSO 処理群を 100% として算出された割合を平均値 \pm 標準偏差で示した ($n=6$)。アスタリスクは Dunnet 検定で Control 群と比較した際の有意差を示す。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

第4節 Linderapyrone (1) および類縁体を合成した

TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用が認められた **1** について作用機序および構造活性相関を検討するため、その類縁体を含めた全合成を行った。Piperitone (**3**) を MeOH に溶解し、塩化セリウム存在下、NaBH₄ で還元し、piperitol (**4**) を得た。次に、**4** と 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone を混合し、酸触媒存在下で S_N1 反応および分子間エーテル化を行うことで **5** および **6** を得た。本反応では **5** と比較し、そのジアステレオマーである **6** が主生成物として得られた。その後、**5** および **6** を -78 °C で *n*-BuLi および benzaldehyde と反応させ、合成中間体を得た。本合成中間体を無水酢酸およびトリエチルアミンでアセチル化した後、DBU 存在下で脱離反応を進行させ、**1**、そのエナンチオマー (*ent*-**1**) およびジアステレオマーである LPD-01 (**1a**) を得た。加えて、より詳細な構造活性相関について検討するため、**7** および **8** を合成した (図 10)。

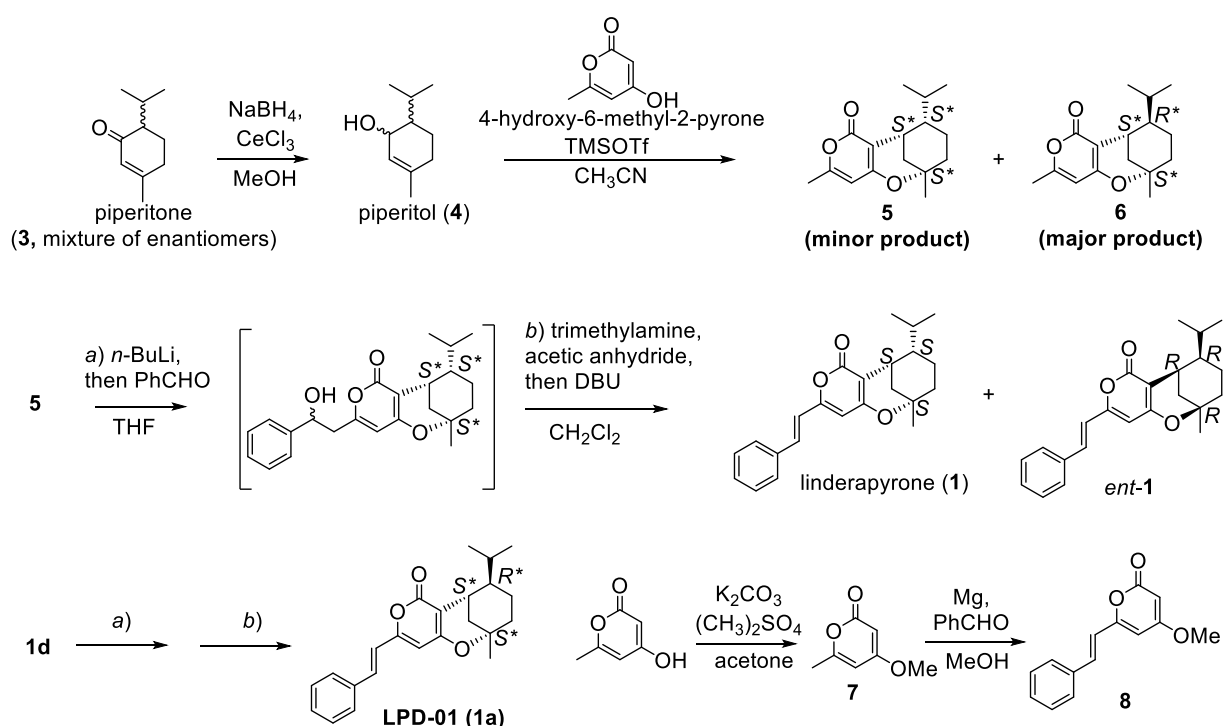


図 10 Linderapyrone (1) およびその類縁体の合成

Piperitone (**3**) を出発原料として、**1** および **1a** を含めた **1** の類縁体を合成した。合成した化合物の化学構造は NMR スペクトルおよび MS データをもとに決定した。
(*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 45, 128161, **Scheme 1** より一部改変して引用)

第5節 Linderapyrone (1) およびその類縁体 (*ent*-1, 1a, 5, および 6) は TCF/ β -catenin 転写活性を阻害する

前節で合成した **1**, *ent*-1, **3**, **5**–**8**, および **1a** について TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用を評価した. その結果, **1**, *ent*-1 および **1a** は 60 μ M で TCF/ β -catenin 転写活性をそれぞれ約 35%, 約 45%, 約 62% 抑制した (図 11A). また, **5** および **6** は同濃度でそれぞれ TCF/ β -catenin 転写活性を約 35% と約 34% 阻害し, STF/293 細胞の増殖をそれぞれ約 26% と約 22% 抑制した. さらに, **3**, **7** および **8** は TCF/ β -catenin 転写活性をほとんど抑制しなかった (図 11B).

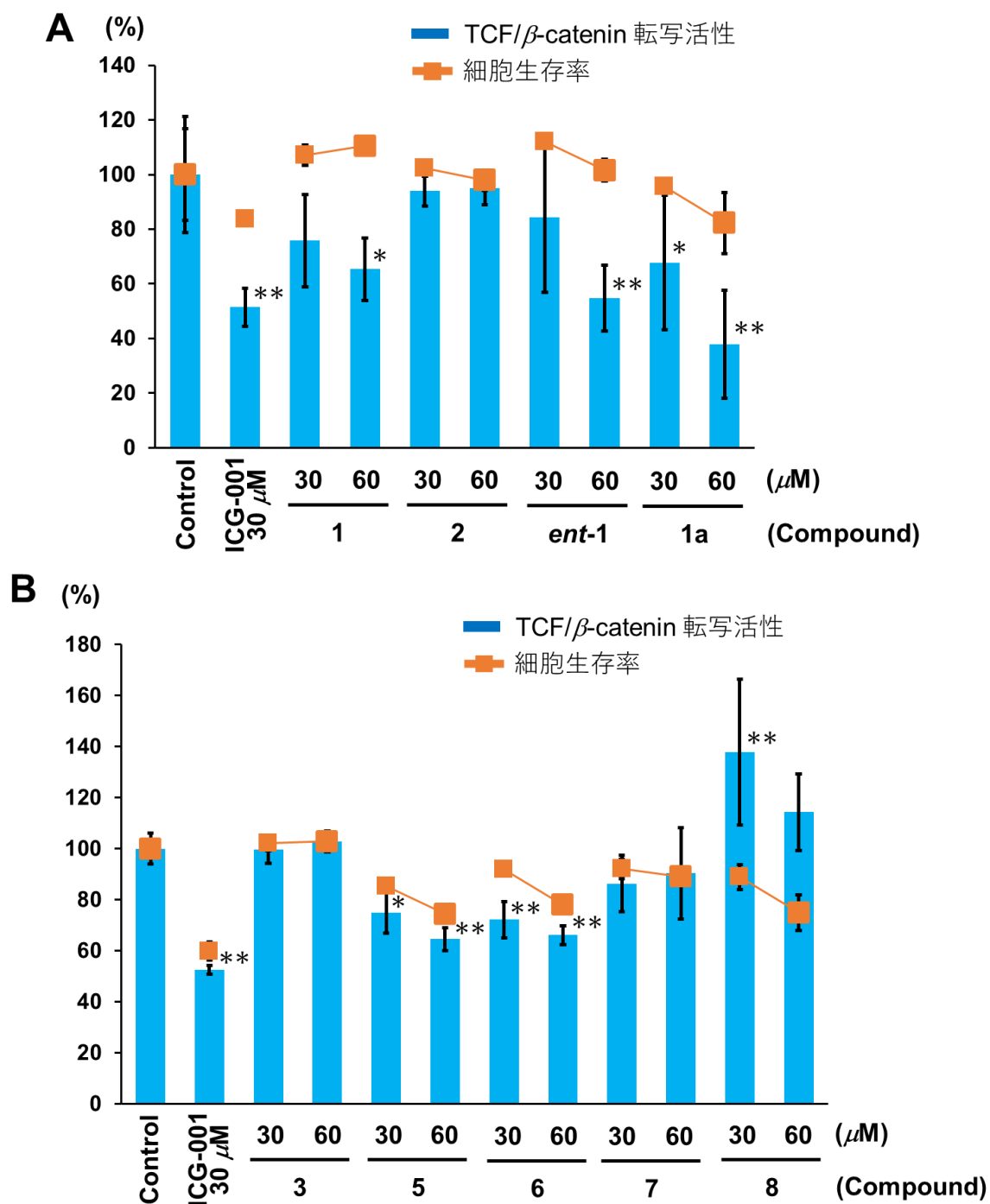


図 11 得られた化合物 (**1**, *ent*-**1**, **3**, **5-8**, および **1a**) の TCF/ β -catenin 転写活性
に対する阻害作用

(A および B) 3×10^3 個/well の STF/293 細胞を 96 穴プレートに播種し、24 時間培養した。STF/293 細胞を各種化合物 (**1**, *ent*-**1**, **3**, **5-8**, および **1a**) で 24 時間処理し、TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用を、ルシフェリンを加えた際の発光量をもとに算出した。また、WST-8 試薬を加え、生成したホルマザンの吸光度を 450 nm で測定した。グラフ中には、それぞれ DMSO 処理群を 100% として算出された割合を平均値 \pm 標準偏差で示した ($n = 6$)。アスタリスクは Dunnet 検定で Control 群と比較した際の有意差を示す。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) (Bioorg. Med. Chem. Lett. **2021**, 45, 128161, Fig 3 より一部改変して引用)

考察

図 10 に示す手法で **1** の全合成を行ったところ、**1** の中間体である **5** と比較し、4'位の立体が異なる **6** が高収率で得られた。この要因として、**4** が持つ 4'位のイソプロピル基が水素原子よりもかさ高いことが考えられる。すなわち、**4** と 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone が反応する際に、**4** の 4'位において、より立体障害が小さい水素原子側で反応した結果、**6** が高収率で得られたと考える。

5 および **6** は 60 μ M で TCF/ β -catenin 転写活性をそれぞれ約 35% と約 34% 阻害したが、同時に STF/293 細胞の増殖をそれぞれ約 26% と約 22% 抑制した。このことから、**5** および **6** の TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用のほとんどが STF/293 細胞の増殖抑制に起因するものであり、**5** および **6** の実際の転写阻害作用は **1**, *ent-1*, および **1a** と比較すると弱いと考える。また、図 11 に示した TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用の結果から、種々の構造活性相関に関する情報が得られた。図 12 に青枠で示したモノテルペンもしくは赤枠で示したピロンの一方を持つ **3**, **7**, および **8** に加え、モノテルペンと緑枠で示したカルコンの複合体である **2** は阻害作用を示さなかった。一方で、モノテルペンおよびピロンの両方を持つ **5** および **6** は阻害作用を示した。このことから、モノテルペンとピロンの部分骨格の両方が活性発現に必要であることが示唆された。また、モノテルペンおよびピロンに加え、紫枠で示したフェニル基を持つ **1** および **1a** はより強い阻害作用を示したことから、C-8 位に存在するフェニル基が活性増強に寄与していると考えられる。

これまでも Wnt/ β -catenin 経路阻害物質の探索は行われており、本研究で使用した ICG-001 に加え、IWR-1-endo や NCB-0846 等、様々な阻害物質が報告されている。しかし、今回得た化合物 **1** および **1a** はカヴァラクトンとモノテルペンの複合体であり、これまでに報告されている阻害物質とは異なる化学構造を有している (図 13)。このことから、**1** および **1a** は新規骨格を有する Wnt/ β -catenin 経路阻害物質として有用であると考え、その作用機序を明らかにすることとした。

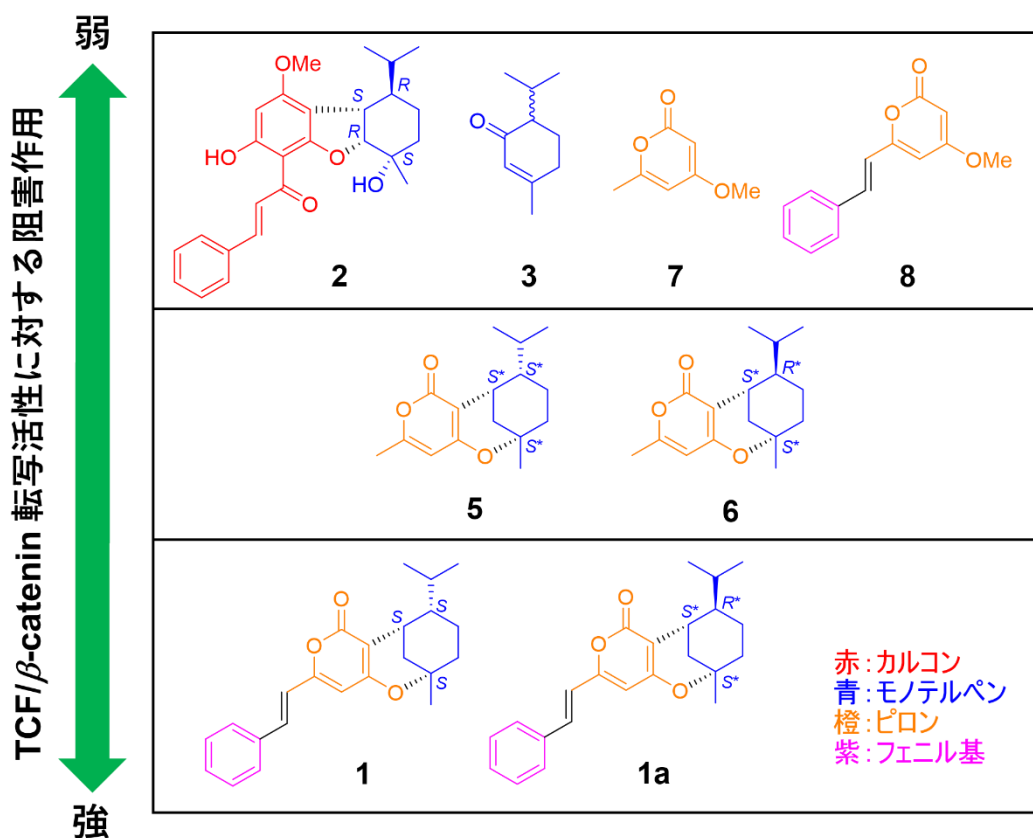


図12 得られた化合物 (1-3, 5-8, および 1a) の TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用の比較

クロモジより単離した化合物 (1 および 2) および 1 の類縁体 (1a, 3, 5-8, および 1a) を TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用の強さで区分した. 構造中の赤枠はピロン, 青枠はモノテルペン, 緑枠はカルコン, 紫枠はフェニル基をそれぞれ示す.

今回単離した Wnt/ β -catenin 経路阻害物質

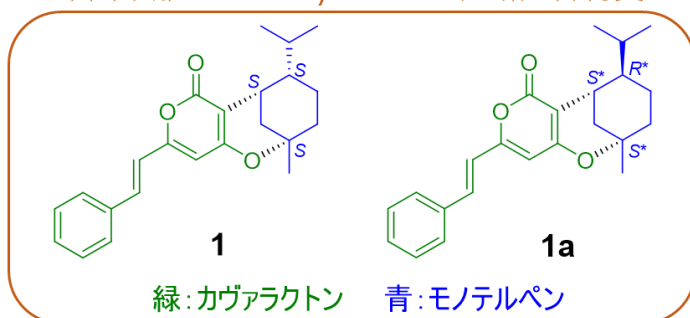
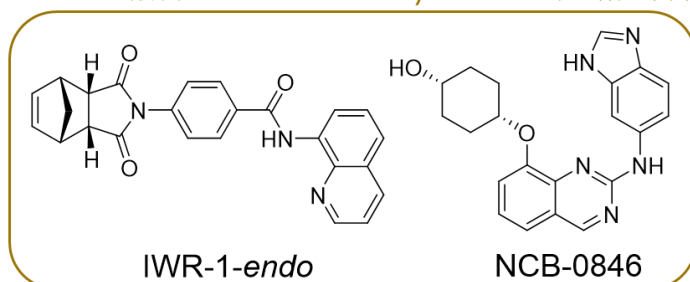


図13 1 および 1a とこれまでに報告されている Wnt/ β -catenin 経路阻害物質の一例

本研究で見出した 1 および 1a はカヴァラクトンとモノテルペンの複合体であり, これまでに報告されている Wnt/ β -catenin 経路阻害物質とは異なる骨格を持つ. 緑はカヴァラクトン, 青はモノテルペンをそれぞれ示す.

これまでに報告されている Wnt/ β -catenin 経路阻害物質



小括

クロモジ (*Lindera umbellata*) 地上部より, 1 種の新規化合物 linderapyrone (**1**) および *epi*-(-)-linderol A (**2**) を単離し, 構造決定した.

1 は TCF/ β -catenin 転写活性を有意に阻害したのに対し, **2** はほとんど阻害作用を示さなかった.

1 およびその類縁体 7 種 (**4-8**, *ent*-**1**, および **1a**) を合成した.

合成した 8 種の化合物に pipeitone (**3**) を加えた 9 種の化合物のうち, **1**, *ent*-**1**, LPD-01 (**1a**), **5**, および **6** は TCF/ β -catenin 転写活性を阻害したが, その他の化合物 (**3**, **4**, **7**, および **8**) はほとんど阻害作用が認められなかった.

第 2 章 LPD-01 (1a) はヒト大腸がん細胞株 HT-29 の増殖を抑制し、その標的分子は exportin5 および importin7 の可能性がある。

緒言

大腸がんは我が国において罹患数、死亡数がともに増加傾向にあり、2021 年における死亡数は約 5 万人で、部位別がん死亡率で 2 位となっている¹。大腸がん患者において、がん抑制遺伝子である APC 遺伝子の変異が約 85% の症例で見られ^{37,38}、Wnt/ β -catenin 経路の異常亢進が認められている。APC 遺伝子は通常、 β -catenin の分解に重要な役割を果たしているが、変異した APC 遺伝子は Axin との結合部位が欠損したものが多く、 β -catenin との結合能を損失したものが存在する³⁹。そのため、 β -catenin をリン酸化するための複合体を形成できず、それに続く β -catenin の分解が起こらなくなる⁴⁰。その結果、安定化された β -catenin が核内に移行し、TCF/LEF と結合することで各種遺伝子の発現を亢進する³⁸。

前章で得られた linderapyrone (**1**) はこれまで報告されている Wnt/ β -catenin 経路阻害物質とは異なる骨格を有した化合物であることから、新規骨格を有する阻害物質として有用であると考えた。そこで、本章ではまず、前章で得られた化合物について、大腸がん細胞の増殖に与える影響を評価した。その結果、最も強い増殖抑制作用を示した LPD-01 (**1a**) について、作用機序を検討した。具体的には、 β -catenin の存在量に加え、Wnt/ β -catenin 経路で発現が亢進する遺伝子である c-Myc および Survivin の発現量に与える影響を評価した。さらに、**1a** の標的分子を同定するため、第 1 章で明らかにした構造活性相関をもとに活性化合物および非活性化合物を合成し、活性化合物のみと親和性を示すタンパク質を分離・同定した。

結果

第1節 Linderapryrone (1) および LPD-01 (1a) は HT-29 細胞の増殖を抑制する

次に合成した化合物について、Wnt/ β -catenin 経路の異常亢進が報告されているヒト大腸がん細胞に対する増殖抑制作用を評価した。本試験ではポジティブコントロールとして ICG-001 を使用した。HT-29 細胞を被験化合物で 72 時間処理し、WST-8 アッセイで細胞生存率を測定した。その結果、構造中にピロン、モノテルペン、およびフェニル基を有する **1** および **1a** は有意に増殖を抑制したのに対し、その一部の部分構造しか有さない **3**, **5**, **6**, および **7** は作用が認められなかった。また、**1a** は天然由来化合物である **1** よりも強い増殖抑制作用を示した (図 14)。

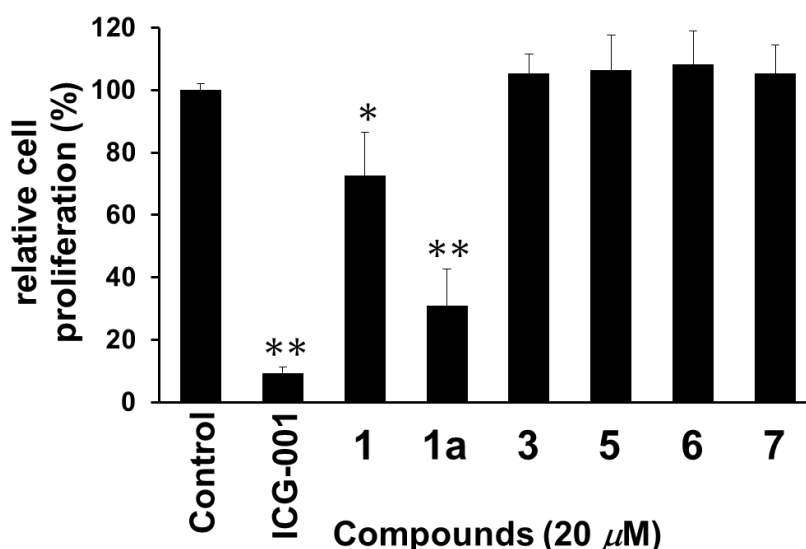


図 14 Linderapryrone (1) および類縁体の HT-29 細胞増殖抑制作用

3×10^3 個/well の HT-29 細胞を 96 穴プレートに播種し、24 時間後に ICG-001, **1**, **1a**, **3**, **5**–**7** を 20 μ M でそれぞれ 72 時間処理した。その後、各 well に CCK-8 試薬を 10 μ L ずつ添加し、生成したホルマザンを 450 nm の吸光度で測定した。グラフには、DMSO 処理群における値を 100% として算出した割合を平均値 \pm 標準偏差で示した ($n=3$)。アスタリスクは Dunnett 検定で control 群と比較した際の有意差を示す。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

第2節 LPD-01 (1a) は HT-29 細胞に対して SW480 細胞よりも強い増殖抑制作用を示す

得られた化合物の中で最も強い HT-29 細胞増殖抑制作用を示した **1a** について、2 種のヒト大腸がん細胞株 HT-29 および SW480 に対する増殖抑制作用を WST-8 アッセイで評価し、比較した。その結果、**1a** は HT-29 細胞に対して SW480 よりも強い増殖抑制作用を示した (IC_{50} 値; HT-29: $10.30 \pm 2.03 \mu$ M, SW480: $27.24 \pm 0.60 \mu$ M) (図 15A, B)。また、HT-29 細胞に対する **1a** の細胞死誘導作用を検討した。HT-29 細胞を **1a** で 24, 48, および 72 時間処理した時の細胞をトリパンブルーで染色し、生細胞および死細胞の数をカウントした。その結果、**1a** は時間依存的かつ濃度依存的に、HT-29 細胞に対して細胞死誘導作用を示した (図 15C)。

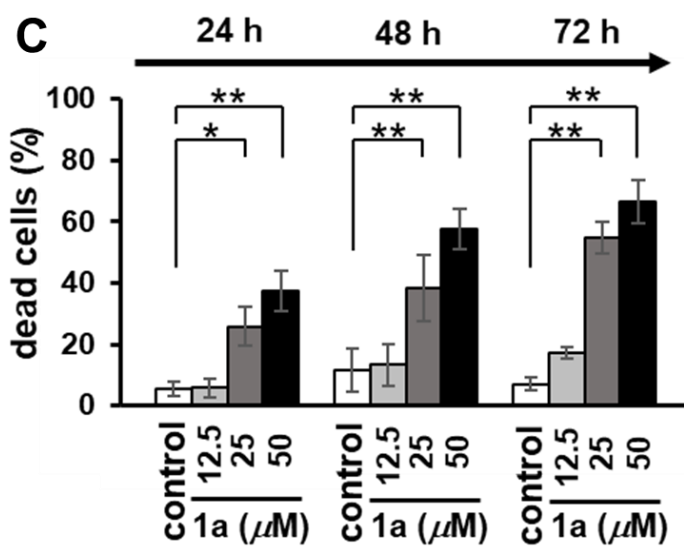
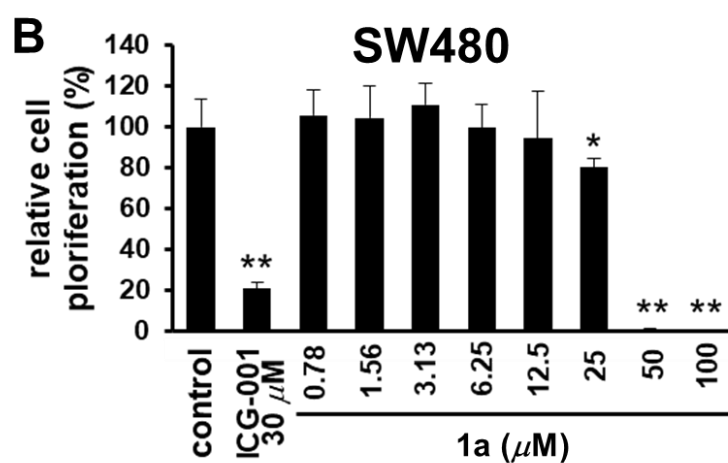
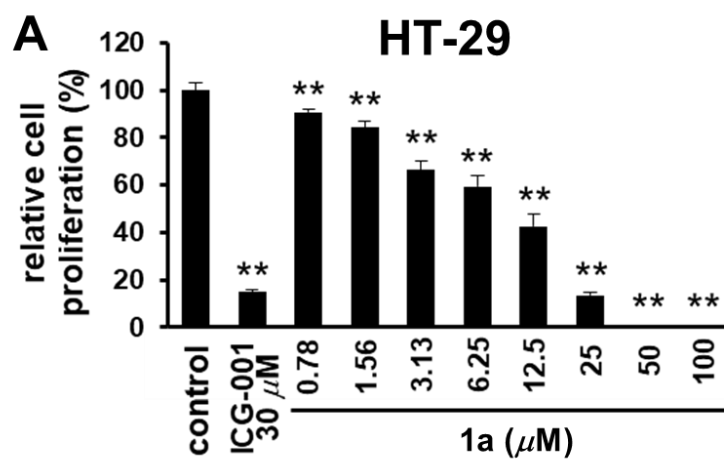


図 15 LPD-01 (1a) の HT-29 細胞および SW480 細胞に対する増殖抑制作用
(A および B) 3×10^3 個/well の HT-29 細胞もしくは SW480 細胞を 96 穴プレートに播種し、24 時間後に ICG-001 および **1a** でそれぞれ 72 時間処理した。その後、各 well に CCK-8 試薬を $10 \mu\text{L}$ ずつ添加し、生成したホルマザンを 450 nm の吸光度で測定した。グラフには、DMSO 処理群の値を 100% として算出した割合を平均値 \pm 標準偏差で示した ($n = 6$)。 (C) 3×10^3 個/well の HT-29 細胞を 96 穴プレートに播種し、24 時間後に **1a** で処理した。24 時間後、48 時間後、72 時間後における細胞をトリパンブルーで染色し、生細胞数と死細胞数をカウントし、それぞれの時間および処理濃度における死細胞の割合を算出した。同様の実験を 3 回繰り返し、3 回分の実験の平均値 \pm 標準偏差をグラフに示した。死細胞の割合は (死細胞数)/(生細胞数 + 死細胞数) $\times 100$ で算出した。(A–C) アスタリスクは Dunnet 検定で control 群と比較した際の有意差を示す。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) (*J. Nat. Med.*, 2023, in press, Fig. 1 より一部改変して引用)

第 3 節 HT-29 細胞において、LPD-01 (1a) は Wnt/ β -catenin 経路の標的因子である c-Myc および Survivin の発現量を減少させる

最も強い HT-29 細胞増殖抑制作用を示した **1a** について、ウエスタンブロット法で Wnt/ β -catenin 経路関連因子の存在量に与える影響を評価した。その結果、HT-29 細胞において、**1a** は β -catenin の量を減少させずに、c-Myc および Survivin の量を減少させた (図 16A)。

また、RT-qPCR 法で mRNA 発現量について評価したところ、**1a** は c-Myc および Survivin の mRNA 発現量も減少させることが明らかになった (図 16B)。

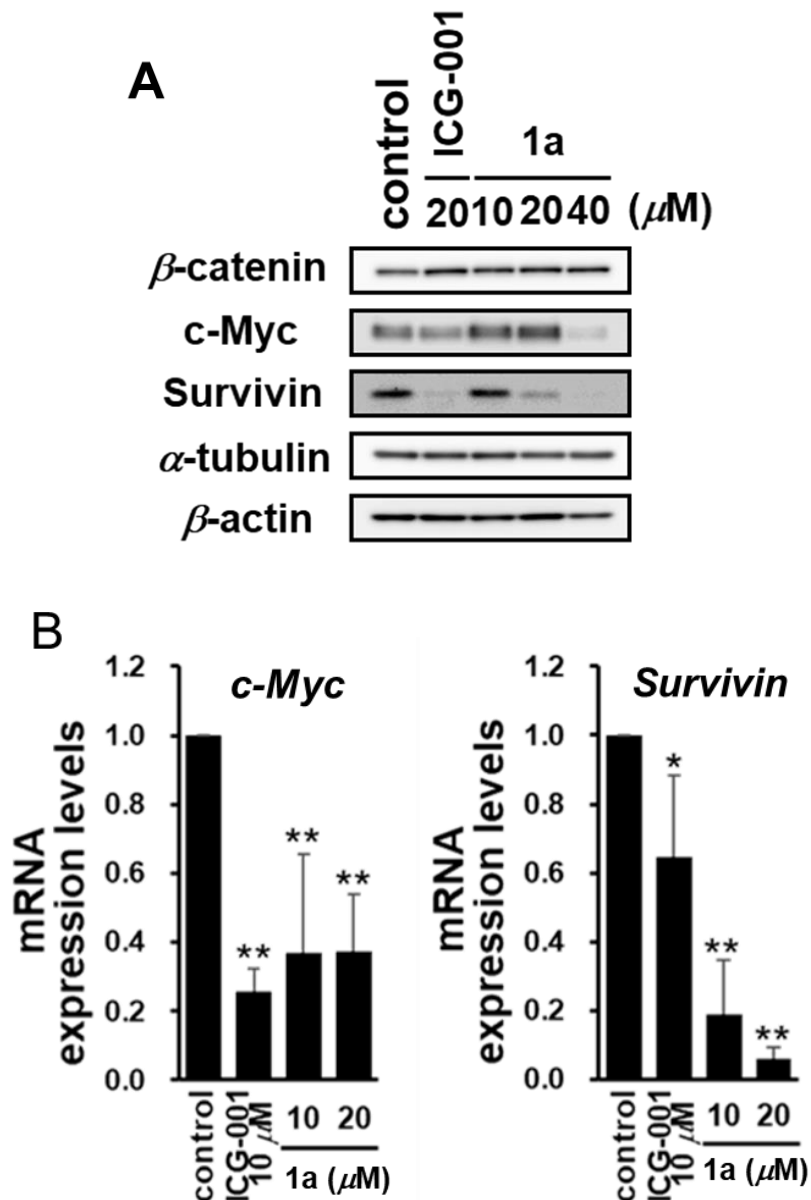


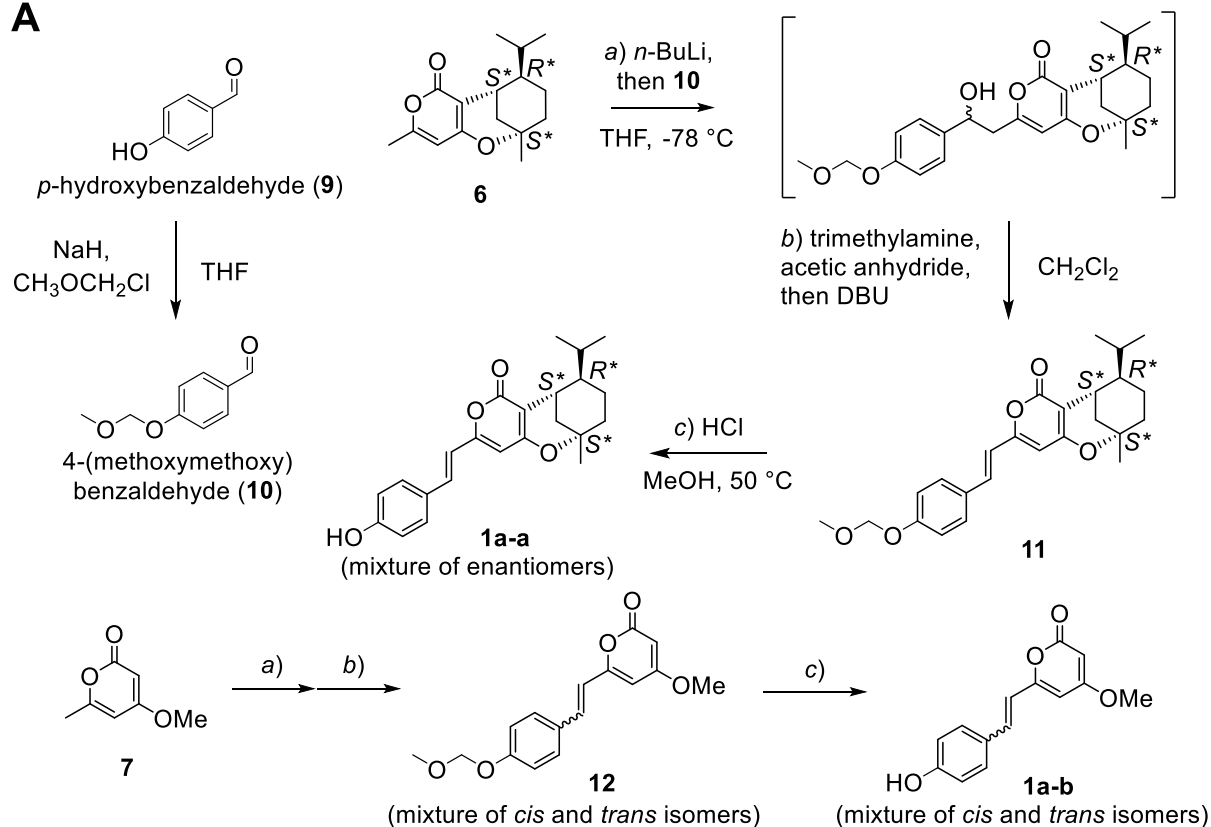
図 16 HT-29 細胞における LPD-01 (1a) の Wnt/ β -catenin 経路関連因子へ与える影響

(A) 24 well プレートで 70–80% コンフルエントまで培養した HT-29 細胞を、ICG-001 および LPD-01 (1a) で 24 時間処理した。その後、各化合物が β -catenin, c-Myc, および Survivin のタンパク量に与える影響をウェスタンブロットで評価した。(B) 35 mm dish で 70–80% コンフルエントになるまで培養した細胞を ICG-001 または LPD-01 で 24 時間処理した。その後、細胞中の RNA を精製し、RT-qPCR 法で c-Myc および Survivin の mRNA 量を定量した。グラフには、DMSO 処理群の mRNA 量を 1.0 として算出した割合を独立した 3 実験の平均値 \pm 標準偏差で示した。アスタリスクは Dunnet 検定で control 群と比較した際の有意差を示す。(* P < 0.05, ** P < 0.01) (*J. Nat. Med.*, 2023, in press, Fig. 2 より一部改変して引用)

第 4 節 LPD-01 (1a) と同程度の HT-29 細胞増殖抑制作用を示す活性化合物 1a-a および作用を示さない非活性化合物 1a-b を合成した

HT-29 細胞における **1a** の標的分子を明らかにするため、活性化合物である **1a** および非活性化合物である **8** に、磁気ビーズを固定化するためのフェノール性水酸基を導入した化合物を合成した。まず、*p*-hydroxybenzaldehyde (**9**) を水素化ナトリウムで還元し、クロロメチルメチルエーテルを反応させることで 4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (**10**) を得た。その後、第一章第四節と同様の方法で合成した **5** および **6** をそれぞれ -78 °C で *n*-BuLi および **10** と反応させ、合成中間体を得た。得られた 2 種の合成中間体を無水酢酸およびトリエチルアミンでアセチル化した後、DBU 存在下で脱離反応を進行させ、**11** および **12** を得た。**11** および **12** を塩酸存在下で加水分解することで、**1a-a** および **1a-b** を得た (図 17A)。このうち、**1a-a** は **1a** と同程度の HT-29 細胞増殖抑制作用を示し (IC₅₀: **1a-a**, 9.32±1.48 μM; **1a**, 10.30±2.03 μM), **1a-b** は作用が認められなかった (IC₅₀ > 100 μM) (図 17B)。

A



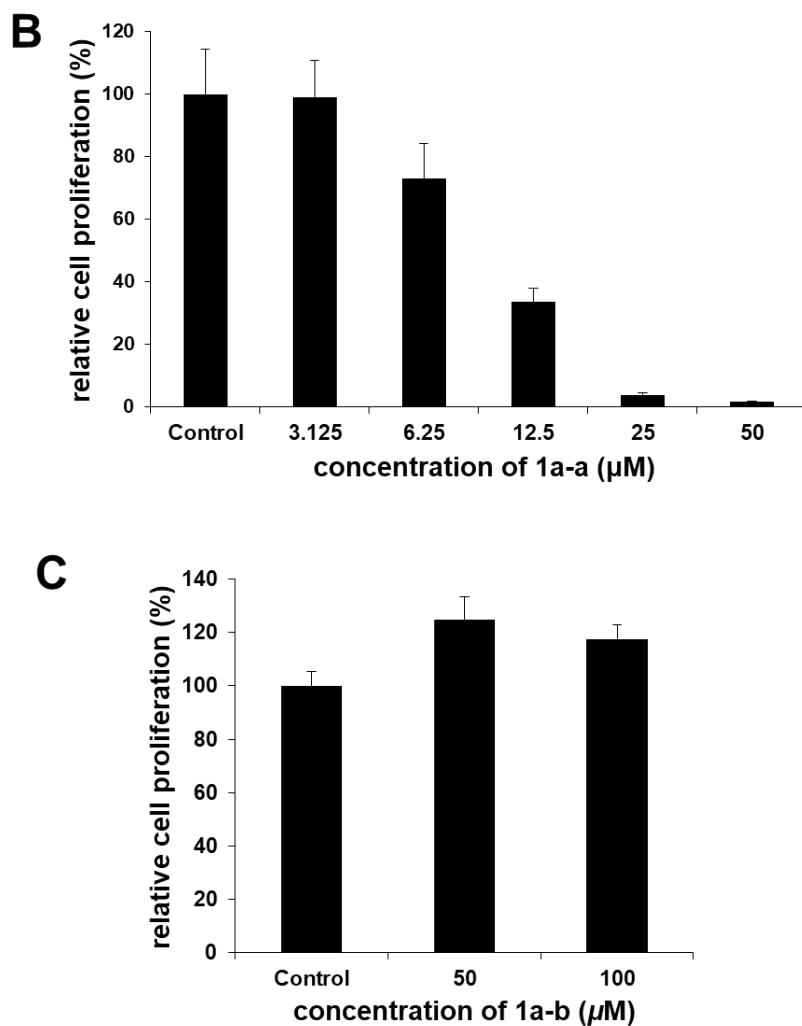


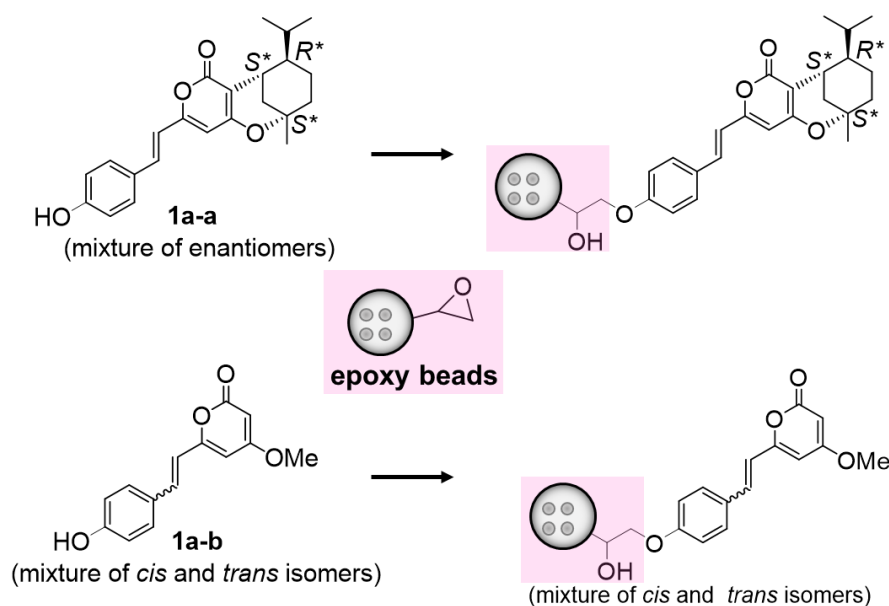
図 17 1a-a と 1a-b の合成およびそれらの HT-29 細胞増殖抑制作用

(A) 第 1 章と同様の手法で合成した **6** を用いて, **1a-a** および **1a-b** を合成した. 合成した化合物の化学構造は NMR スペクトルおよび MS データをもとに決定した. (B および C) 3×10^3 個/well の HT-29 細胞を 96 穴プレートに播種し, 24 時間後に **1a-a** もしくは **1a-b** で 72 時間処理した. その後, 各 well に CCK-8 試薬を $10 \mu\text{L}$ ずつ添加し, 生成したホルマザンを 450 nm の吸光度で測定した. グラフには, DMSO 処理群の値を 100% とし算出した割合を平均値 \pm 標準偏差で示した ($n = 6$). (*J. Nat. Med.*, 2023, in press, Fig. 3, Fig. S4 より一部改変して引用)

第5節 HT-29 細胞において LPD-01 (1a) は exportin5 および importin7 に結合する

1a-a および **1a-b** に epoxy リンカー結合磁気ビーズを固定化した (図 18A). Epoxy リンカー結合磁気ビーズを固定化した **1a-a** および **1a-b** を HT-29 細胞のタンパク質溶液とインキュベートし, **1a-a** および **1a-b** に対してそれぞれ親和性を示すタンパク質を分離した. 分離したタンパク質は SDS Sample buffer に懸濁させ, SDS-PAGE および銀染色を行った. 銀染色の結果をもとに, **1a-a** のみと親和性を示したタンパク質を LC-MS/MS および MASCOT で解析した. その結果, 細胞内において, 種々の因子の細胞質核間輸送に関わる importin7 および exportin5 を同定した (図 18B). また, **1a-a** が importin7 に対して, **1a-b** よりも親和性を示すことをウエスタンブロットによっても確認した (図 18C).

A



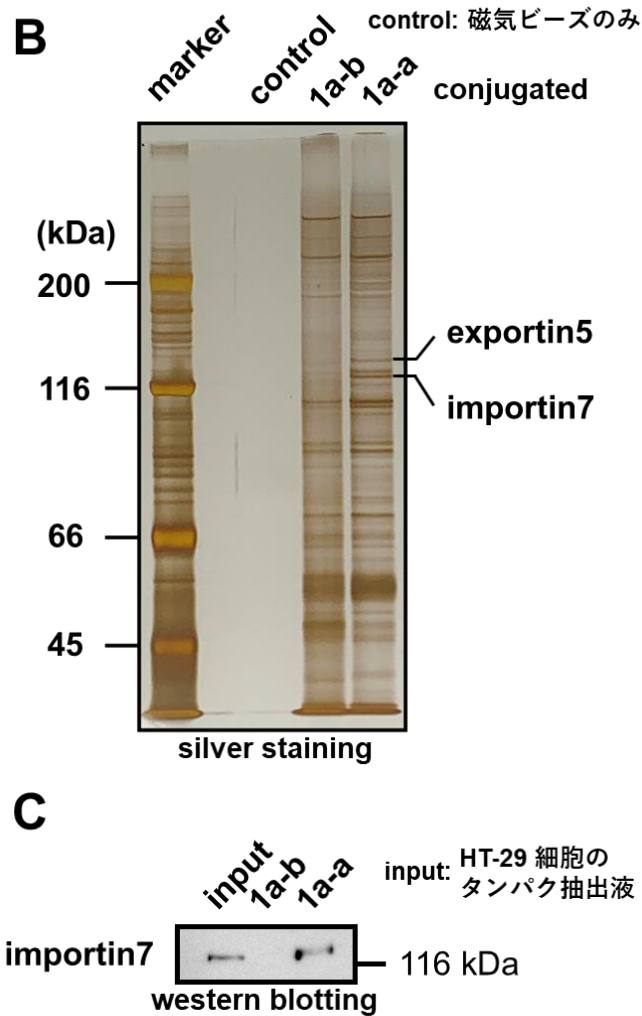


図18 1a-a と 1a-b に対する epoxy リンカー結合磁気ビーズの固定化および親和性を示すタンパク質の精製と同定

(A) 1a-a および 1a-b に対して epoxy リンカー結合磁気ビーズを固定化した．(B) epoxy beads を固定化した 1a-a および 1a-b を HT-29 細胞のタンパク溶液に懸濁させ、それぞれと親和性を示すタンパク質を、磁気を利用して精製した．その後、精製したタンパク質を SDS-PAGE で分離し、銀染色した．染色結果をもとに、1a-a のみと親和性を示したタンパク質のバンドを LC-MS/MS および MASCOT で解析した結果、exportin5 および importin7 を同定した．(C) (B) の実験に使用した HT-29 細胞のタンパク質溶液を SDS Sample buffer で 20 倍希釈し、(B) で精製したタンパク質とともにウエスタンブロットを行い、importin7 を検出した．(*J. Nat. Med.*, 2023, in press, Fig. 4 より一部改変して引用)

考察

第1章で得た6種の化合物に本章で合成した2種の化合物を加えた計8種の化合物 (**1**, **1a**, **3**, **5-7**, **1a-a** および **1a-b**) のうち, HT-29 細胞の増殖を抑制した3種の化合物 (**1**, **1a**, および **1a-a**) はピロンとモノテルペンに加え, フェニル基を構造中に有している. 一方で, そのうち一部の部分構造しか有していない他の化合物 (**3**, **5-7**, および **1a-b**) はほとんど増殖抑制作用を示さなかった (図19). この結果は, 第1章で明らかにした TCF/ β -catenin 転写阻害作用における構造活性相関の結果と類似している. このことから, **1**, **1a**, および **1a-a** は Wnt/ β -catenin 経路を阻害することで HT-29 細胞の増殖を抑制していると考えられる.

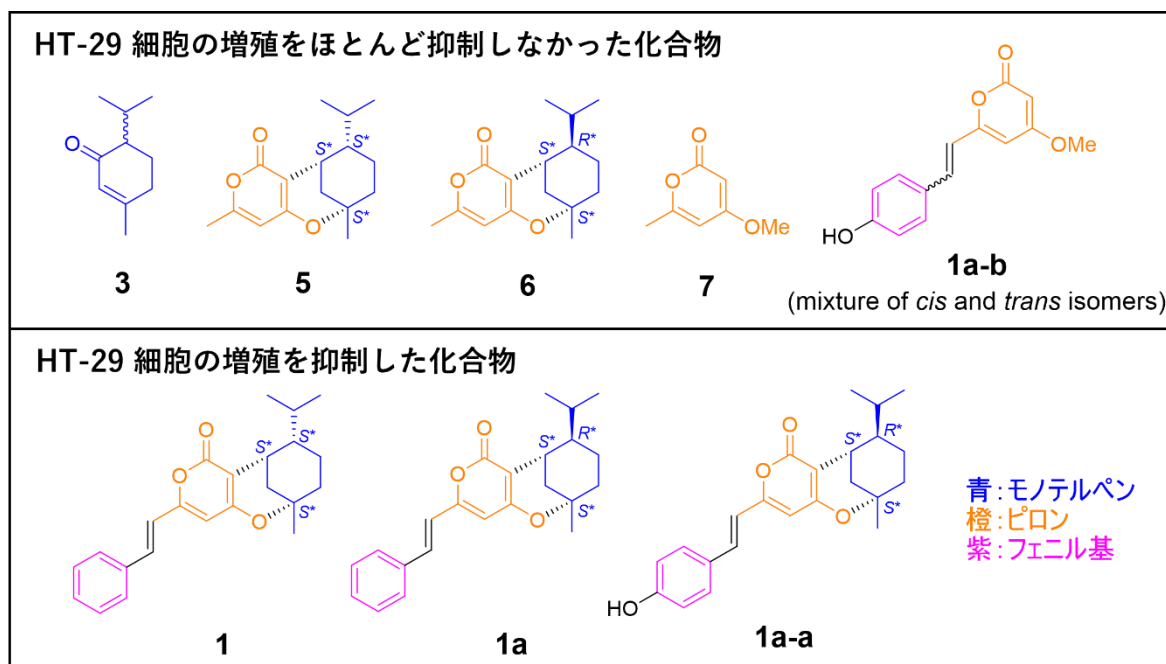


図19 各種化合物 (**1**, **1a**, **1a-a**, **1a-b**, **3**, および **5-7**) の構造と HT-29 細胞に対する増殖抑制作用

青で示したモノテルペン, 橙で示したピロン, および紫で示したフェニル基を構造中に有する3種の化合物 (**1**, **1a**, および **1a-a**) は HT-29 細胞の増殖を抑制した. 一方で, そのうち一部の構造しか有していない5種の化合物 (**1a-b**, **3**, および **5-7**) は HT-29 細胞の増殖をほとんど抑制しなかった.

β -catenin は AXIN や APC 等と複合体を形成することでリン酸化され, プロテアソーム系による分解を受ける. HT-29 細胞では, AXIN 結合領域のみ, もしくは AXIN 結合領域と β -catenin 結合領域の両方が欠損した2種類の APC 遺伝子が発現していることが明らかになっている³⁹. 一方で, SW480 細胞においては, AXIN 結合領域に加え, 一部の β -catenin 結合領域が欠損した APC 遺伝子が発現している³⁹. そのため, これらの細胞では AXIN や APC 等との複合体形成に伴う β -catenin の分解が阻害されており, Wnt/ β -catenin 経路が恒常的に活性化している (図20). このことから, これら2種の細胞種では, 化合物処理による AXIN の安定化や GSK-3 β の作用亢進等に伴う β -catenin 分解促進作用は期待できないと考えられる. また, **1a** は β -catenin の量を減少させなかったことから, **1a** は β -catenin の合成も阻害しないと考える. 一方で, **1a** 処理による c-Myc および Survivin の存在量および mRNA 発

現量の減少が認められたことから、**1a** の作用機序が β -catenin の核内移行阻害もしくは TCF/ β -catenin 複合体形成の抑制であることが示唆された。さらに、**1a** の標的候補分子として見出した exportin5 および importin7 は、細胞内で各種因子を核外輸送もしくは核内輸送するタンパク質である。そのため、**1a** は exportin5 および importin7 に作用することで核内の TCF/ β -catenin 転写活性に寄与する因子の核内濃度を減少させ、Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を示している可能性があると考える。また、exportin5 および importin7 はいずれも大腸がんにおいて高発現が認められている^{41, 42}。さらに、exportin5 もしくは importin7 をノックダウンすることでヒト膀胱がん細胞⁴³、ヒトすい臓がん細胞⁴²、およびヒト乳がん細胞⁴⁴等の増殖が抑制されることが明らかになっている。このことから、exportin5 および importin7 の機能を抑制する化合物は大腸がんのみならず、様々ながん種の治療において有用であると考える。

HT-29 細胞において、**1a** は c-Myc および Survivin の mRNA 発現量をタンパク質よりも顕著に減少させた。一般的に mRNA はタンパク質よりも半減期が短いことから、**1a** による c-Myc および Survivin の発現抑制作用が、mRNA においてタンパク質よりも顕著に認められたのではないかと考える。そのため、c-Myc および Survivin に対する **1a** の発現抑制作用を詳細に評価するためには、**1a** の処理時間を 24 時間より長くした時の影響を評価する必要があると考える。

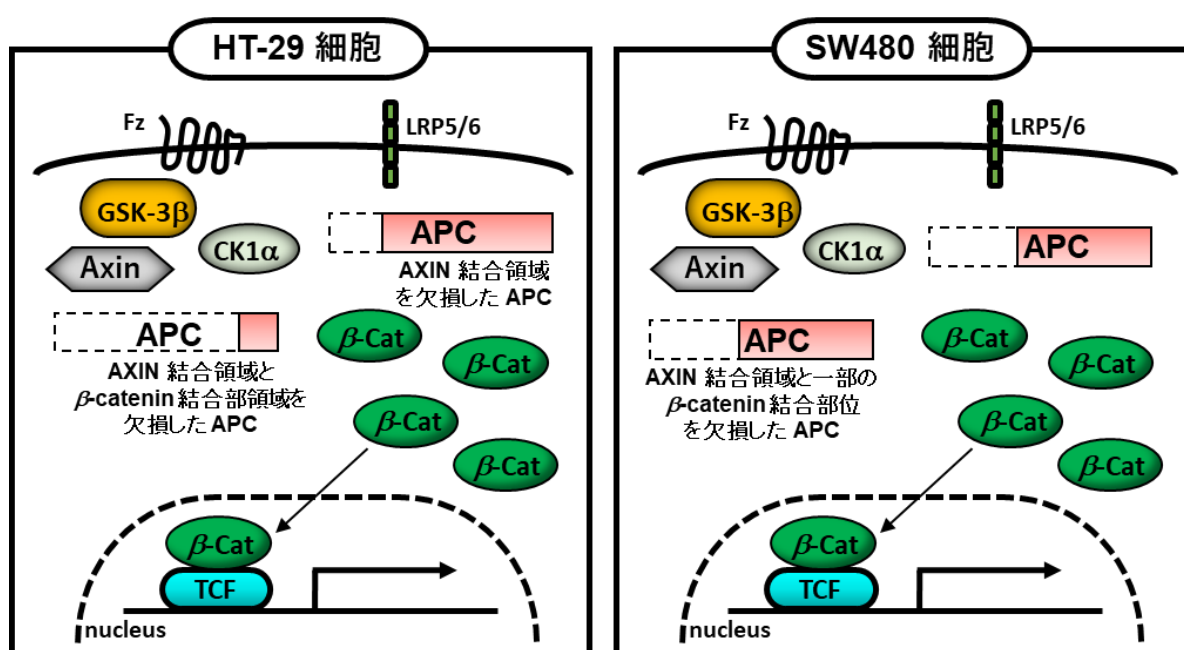


図 20 HT-29 細胞および SW480 細胞の APC 遺伝子における変異領域の違い
HT-29 細胞では AXIN 結合領域と β -catenin 結合領域を欠損した APC と AXIN 結合領域を欠損した APC の 2 種が発現している。一方で、SW480 細胞では AXIN 結合領域と一部の β -catenin 結合領域が欠損した APC が発現している。

小括

6種の化合物 (**1**, **1a**, **3**, および **5-7**) のうち, linderapyrone (**1**) および LPD-01 (**1a**) は HT-29 細胞の増殖を抑制した. また, **1a** は HT-29 細胞に対して SW480 細胞よりも強い増殖抑制作用を示した.

1a は β -catenin の量を減少させず, Wnt/ β -catenin 経路によって発現が亢進する c-Myc および Survivin の存在量および mRNA 発現量を減少させた.

1a の標的候補分子として, importin7 と exportin5 を見出した.

第 3 章 LPD-01 (1a) は importin7 の機能抑制を介して Wnt/ β -catenin 経路を阻害している可能性がある

緒言

Importin7 と exportin5 はともに karyopherin- β (importin- β)ファミリー (表 2) に属する細胞質核間輸送タンパク質である⁴⁵⁻⁴⁷. exportin5 は乳がん⁴⁸や尿路上皮がん⁴³等で高発現が見られ、大腸がん患者では exportin5 の高発現が無病生存期間および全生存期間の低下と関連している⁴¹. Importin7 はすい臓がん、大腸がん、子宮頸がん、および乳がん等で過剰発現が認められ、その予後不良と関連している^{42, 44, 49, 50}. また、importin7 のノックダウンによって、すい臓がんや子宮頸がんの増殖が抑制されることが明らかになっている^{42, 49}.

表 2 karyopherin- β ファミリーおよびその基質の一例

karyopherin- β ファミリーおよびその基質	
importins (nuclear import)	基質の一例
karyopherin- β 1 (importin β 1)	c-Jun ⁵¹ , CREB ^{52, 53}
karyopherin- β 2 (transportin1, importin β 2)	H2A, H2B, H3, H4 ^{54, 55}
karyopherin- β 2b (transportin2)	hnRNP A1, FUS ⁵⁶
transportin3 (transportinSR)	ASF/SF2, SC35 ⁵⁷
importin4	HIF-1 α ⁵⁸ , rPS3a ⁵⁹
importin5	c-Jun ⁵¹ , Apolipoprotein A-1 ⁶⁰
importin7	Erk ⁶¹ , YAP ⁶²
importin8	Smad1, Smad4 ⁶³
importin9	c-Jun ⁵¹ , HSP27 ⁵⁹
importin11	rPL12 ⁶⁴ , UBE2E2 ⁶⁵
exportins (nuclear export)	基質の一例
exportin1	snRNAs ⁶⁶ , sequestosome-1 ⁶⁷
exportin2	importin α ⁶⁸
exportin t	tRNAs ⁶⁶
exportin5	pre-miRNAs ⁶⁹ , tRNAs ⁶⁶
exportin6	actin-profilin ⁷⁰
biportins (nuclear import and export)	基質の一例
importin13	PAX6 ⁷¹ , NF-YB/NF-YC ⁷²
exportin4	Sox-2, SRY ⁷³
exportin7	p65 ⁷⁴
unknown function	
Ran-binding protein 6	
Ran-binding protein 17	

Wnt/ β -catenin 経路が活性化すると、安定化された β -catenin が核内移行後、TCF/LEF と結合することで各種遺伝子の発現を亢進する³⁸。このうち、 β -catenin の核内移行には karyopherin- β ファミリーの importin β 2 や importin11 が寄与することが報告されている^{75, 76}。一方で、importin7 が核内輸送を担うタンパク質として、TGF- β 刺激下における Smad2 と Smad3 が報告されている⁷⁷。Smad タンパク質はヒトでは Smad1-8 の 8 種類の分子が同定されており、特異型 Smad (receptor regulated Smad), 共有型 Smad (common mediator Smad), および抑制型 Smad (inhibitory Smad) に分類される^{78, 79}。Smad2/3 はこのうち特異型 Smad に属し、TGF- β によるシグナルを伝達する役割を担う⁸⁰。TGF- β の刺激を受けた細胞では、I 型受容体および II 型受容体の相互作用を介して Smad2/3 がリン酸化される⁷⁸。リン酸化された Smad2/3 は共有型 Smad である Smad4 と複合体を形成した後、核内に移行し、各種遺伝子の転写を制御する⁸¹。また、Smad2 は TCF/ β -catenin 転写活性に寄与することが明らかになっていることから (図 21)⁸², LPD-01 (1a) の Wnt/ β -catenin 経路阻害作用には importin7 の機能阻害に関わっているのではないかと考えた。そこで、本章ではまず、importin7 の発現抑制が c-Myc および Survivin の発現量に与える影響を評価した。次に、TCF/ β -catenin 転写活性に関わる β -catenin および TCF4 の核内輸送に対する LPD-01 (1a) の阻害作用を評価した。さらに、1a が importin7 の機能に与える影響を検討するため、TGF- β 1 刺激下での細胞質と核内それぞれにおける Smad2/3 の存在量を確認した。

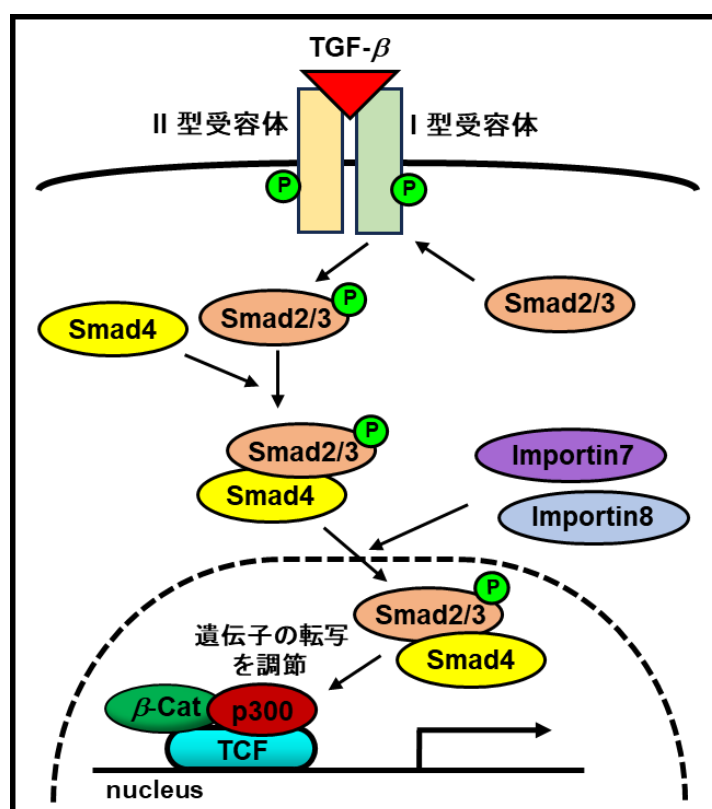


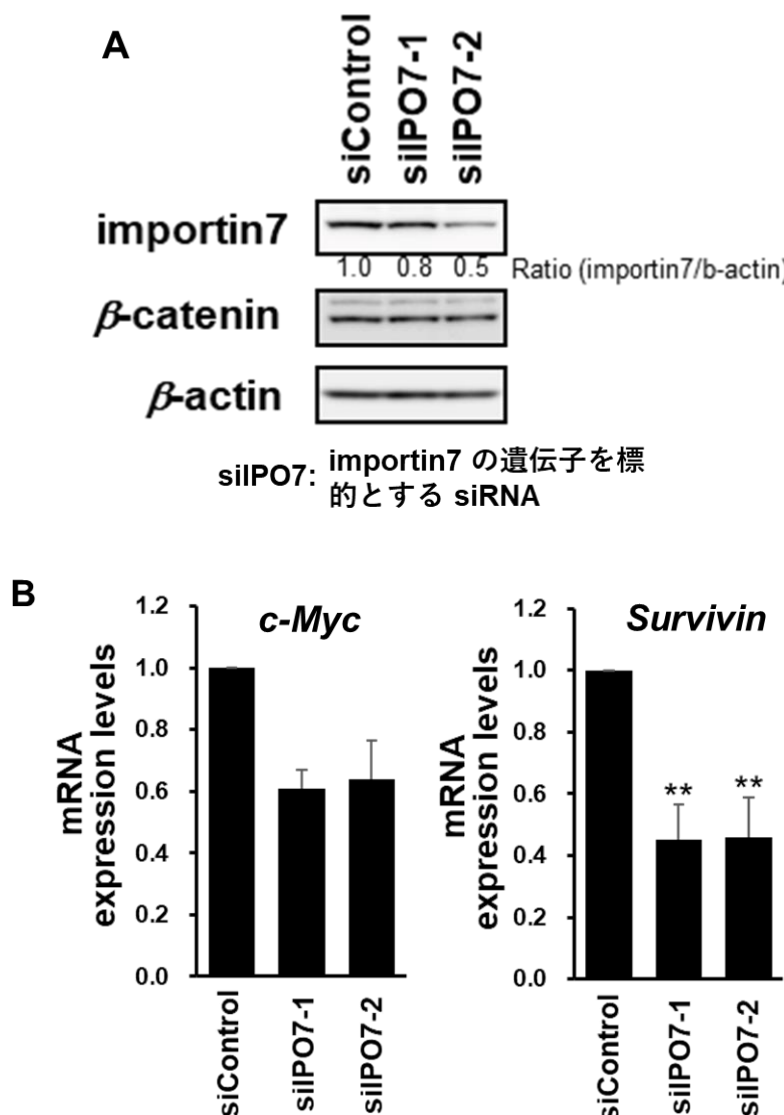
図 21 TGF- β /Smad 経路および importin7/8

Smad2/3 は TGF- β 刺激によりリン酸化され、Smad4 と複合体を形成したのち核内へ移行し、各種遺伝子の発現を調節する。Smad2/3 の核内移行には importin7 と importin8 が寄与することが報告されている。

結果

第1節 HT-29 細胞における importin7 のノックダウンは Wnt/ β -catenin 経路の標的因子である c-Myc および Survivin の mRNA 発現量を減少させる

TGF- β 刺激下において, importin7 が Smad2/3 の核内輸送に寄与することに加え, Smad2 が核内で TCF/ β -catenin 転写活性の亢進に関与することが報告されている. このことから, importin7 は Wnt/ β -catenin 経路の活性化に寄与しているのではないかと考えた. そこで, HT-29 細胞における importin7 の発現抑制が c-Myc および Survivin の mRNA 発現量に与える影響を RT-qPCR 法で評価した. その結果, importin7 を siRNA でノックダウンした HT-29 細胞において, c-Myc および Survivin の mRNA 発現量が減少することが明らかになった (図 22A,B). 一方で, importin7 のノックダウンによる β -catenin の減少および核内輸送の抑制は認められなかった (図 22C).



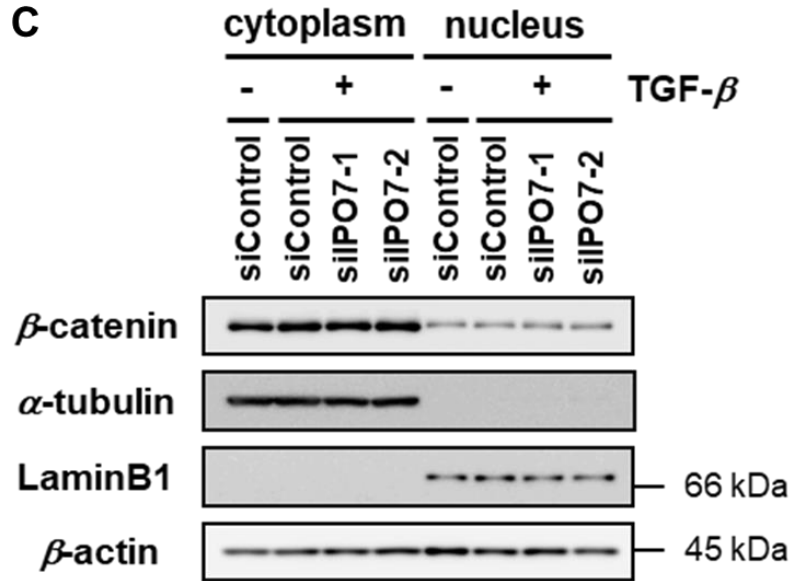


図 22 HT-29 細胞において、importin7 のノックダウンが c-Myc と Survivin の mRNA 発現量および β -catenin の局在に与える影響

(A) HT-29 細胞の importin7 を 2 種の siRNA でノックダウンし、ウエスタンブロットで importin7 と β -catenin の量を評価した. (B) Importin7 をノックダウンした HT-29 細胞において、c-Myc および Survivin の mRNA 発現量を RT-qPCR 法で評価した. アスタリスクは Dunnet 検定で control 群と比較した際の有意差を示す. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) (*J. Nat. Med.*, 2023, in press, Fig. 5 より一部改変して引用) (C) HT-29 細胞の importin7 を 2 種の siRNA でノックダウンし、細胞質画分と核画分を分画した. それぞれの画分における β -catenin の量をウエスタンブロットで評価した.

第 2 節 LPD-01 (1a) は β -catenin および TCF4 の核内輸送を抑制しない

1a が β -catenin および TCF4 の核内輸送に与える影響をウエスタンブロット法で評価した. その結果, 1a は細胞質核内いずれの β -catenin も減少させなかった (図 23). 同様に, 1a が TCF4 の核内輸送に与える影響も評価したが, 細胞質核内いずれにおいても TCF4 の減少は認められなかった (data not shown). このことから, 1a は β -catenin および TCF4 の核内輸送を阻害しないことが示唆された.

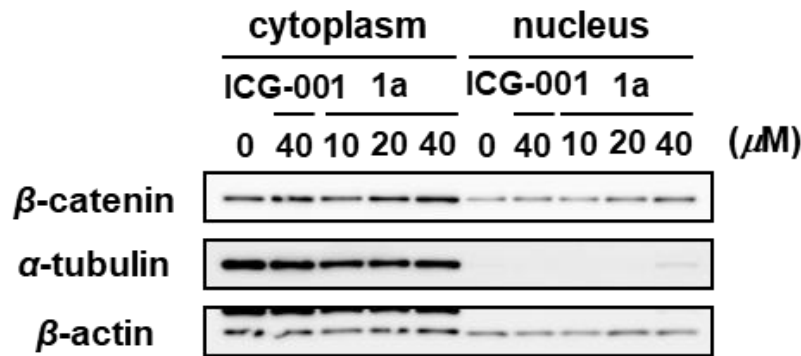
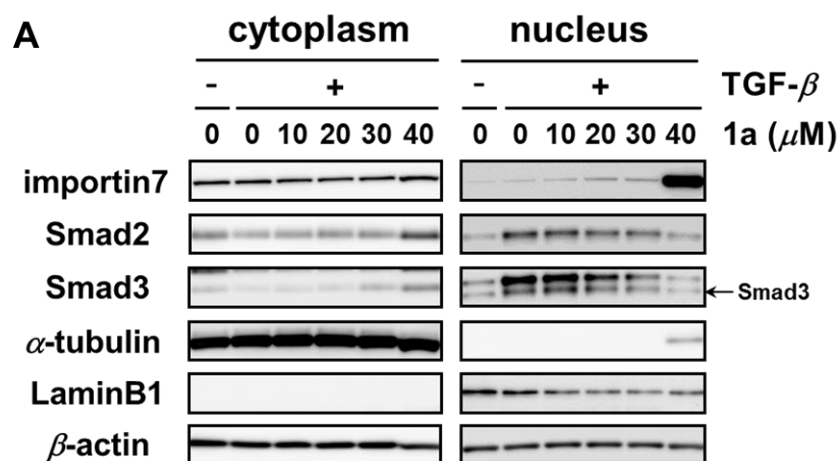


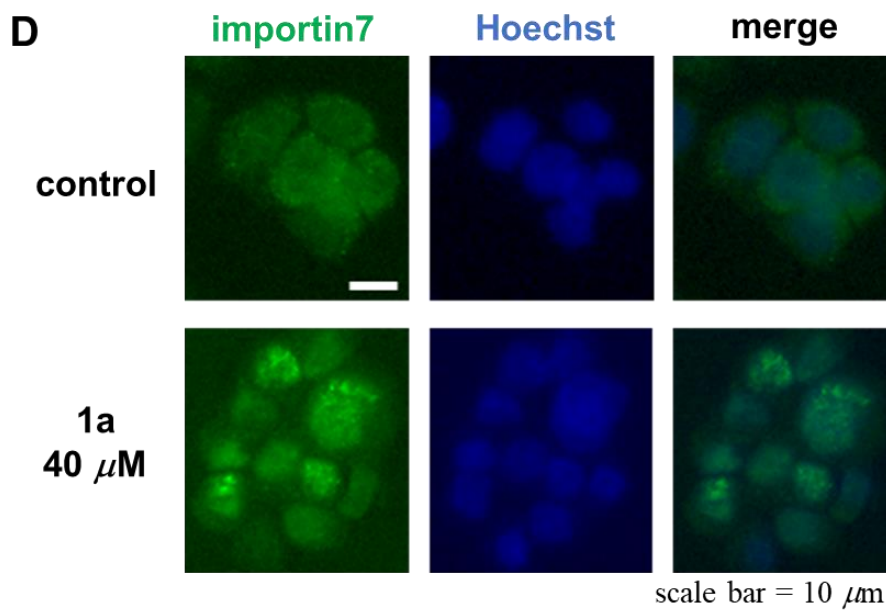
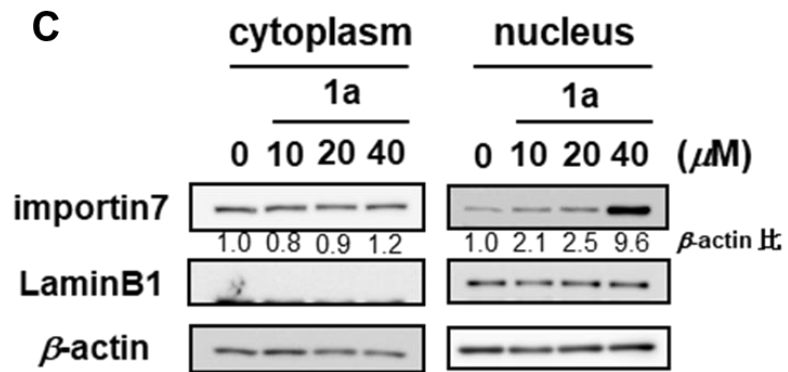
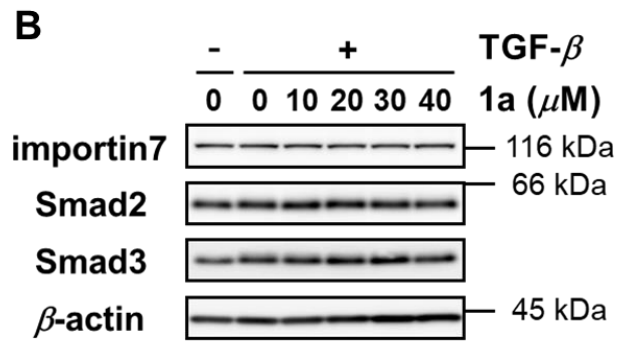
図 23 HT-29 細胞において、1a が β -catenin の局在に与える影響

60 mm ディッシュで 70–80% コンフルエントまで培養した HT-29 細胞を LPD-01 (1a) で 24 時間処理し、細胞質画分と核画分を分画した。それぞれの画分における β -catenin の量をウエスタンブロットで評価した。

第 3 節 LPD-01 (1a) は Smad2/3 の核内移行を抑制する

TGF- β 刺激下において、importin7 は Smad2/3 の核内輸送に寄与することが報告されていることから、TGF- β 1 で刺激した HT-29 細胞中で 1a が importin7 および Smad2/3 の核内輸送に与える影響をウエスタンブロット法で評価した。その結果、1a は細胞質の Smad2/3 の量を増加させ、それらの核内量は減少させた。また、1a は importin7 の核内量を増加させることが明らかになった (図 24A)。一方で、1a は細胞全体の importin7、Smad2/3 の量にはほとんど影響を与えなかった (図 24B)。そこで、TGF- β 1 非処理下の HT-29 細胞において、1a が importin7 の局在に与える影響をウエスタンブロットおよび蛍光免疫染色法で評価したところ、TGF- β 1 非処理下でも importin7 の核内局在が認められた (図 24C, D)。一方で、1a は exportin5 の局在にはほとんど影響を与えなかった (図 24E)。





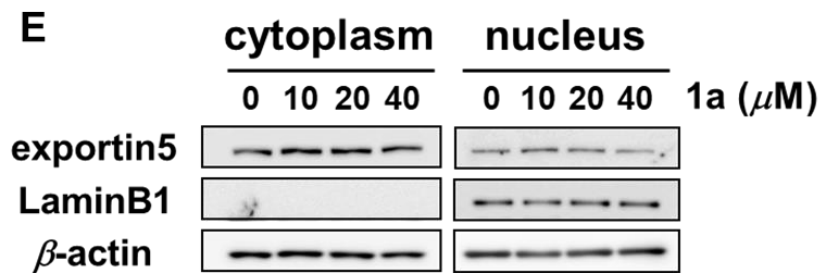


図 24 TGF- β 1 刺激・非刺激下の HT-29 細胞における, LPD-01 (1a) が importin7, Smad2, Smad3, および exportin5 の局在に与える影響

(A) 60 mm ディッシュで 70–80% コンフルエントまで培養した HT-29 細胞を LPD-01 (1a) で 23 時間処理し, TGF- β 1 を添加後, さらに 1 時間培養した. 細胞質画分と核画分を分画した. 得られた細胞質画分および核画分における importin7, Smad2, および Smad3 の量に対する LPD-01 (1a) の影響をウエスタンブロットで評価した. (B) 24 well プレートで 70–80% コンフルエントまで培養した HT-29 細胞を LPD-01 (1a) で 23 時間処理し, TGF- β 1 を添加後, さらに 1 時間培養した. その後, LPD-01 (1a) が importin7, Smad2, および Smad3 の量に与える影響をウエスタンブロットで評価した. (C および E) 60 mm ディッシュで 70–80% コンフルエントまで培養した HT-29 細胞を LPD-01 (1a) で 24 時間処理し, 細胞質画分と核画分を分画した. それぞれの画分における importin7 と exportin5 の量をウエスタンブロットで評価した. (D) 24 well プレートで 70–80% コンフルエントまで培養した HT-29 細胞を LPD-01 (1a) で 24 時間処理し, importin7 抗体および Alexa Flour 488 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った. 核は Hoechst33342 を使用して染色した. 図内の白線は 10 μ m の長さを表している. (*J. Nat. Med.*, 2023, in press, Fig. 5 より一部改変して引用)

考察

LPD-01 (**1a**) の標的候補分子として, importin7 を見出したことから, importin7 が核内輸送を担っている Smad2/3 の局在に与える影響を検討した. **1a** 処理による, 細胞質および核における Smad2/3 の存在量への影響を評価したところ, 細胞質では Smad2/3 が増加していたのに対し, 核内では減少が認められた. これらの結果から, **1a** は importin7 の核内輸送機能を抑制することで Smad2/3 の核内輸送を阻害することが示唆された. 一方で, **1a** 処理による β -catenin の核内移行阻害は認められなかった. β -catenin の核内輸送には importin11 や importin β 2 が関与することが知られている^{75,76}. Importin11 と importin β 2 は importin7 や exportin5 等と同様に karyopherin- β ファミリーに属する細胞質核間輸送タンパク質である⁴³. また, **1a** は importin7 を核内へ局在させた一方で, exportin5 の局在にはほとんど影響していなかった. このことから, **1a** は karyopherin- β ファミリーの中でも importin7 に対して選択的に作用している可能性は高いと考えられる.

Importins による核内輸送は, importin- α が基質上に存在する核局在配列を認識し, importin- β と複合体を形成することで行われる. その後, importin- α /importin- β と基質の複合体は核内へ移動し, 核内で RanGTP および nuclear pore complex protein (Nup) と相互作用することで基質を放出する⁸³. 基質を放出した importin- α および importin- β はそれぞれ CAS/RanGTP 複合体および RanGTP 複合体として細胞質へ戻り, RanGTP は RanGAP や RanBP1 による加水分解を受け, RanGDP となり, importins と解離する^{43,83,84}. 細胞質へ輸送された importin- α および importin- β は再び基質の輸送を担う (図 25). 今回, **1a** で処理した HT-29 細胞において, karyopherin- β ファミリーの 1 種である importin7 の核内局在が認められた. このことから, **1a** は importin7 に結合することで RanGTP との相互作用を阻害し, importin7 の細胞質への移行を抑制している可能性があると考えられる. しかしながら, **1a** による importin7 阻害作用の機序を明らかにするためには, importin7 と importin- α の相互作用に加え, importin7 と RanGTP 相互作用等に対する **1a** の影響を評価する必要がある.

Importin7 をノックダウンすることで, c-Myc および Survivin の mRNA 発現量が減少することが明らかになった. しかしながら, siIPO7-2 による importin7 の発現抑制率は siIPO7-1 のそれよりも強かったにも関わらず, c-Myc および Survivin の mRNA 発現量に与える影響はほとんど差が認められなかった. 本研究では, siRNA による importin7 の発現抑制率が最大で control の 5 割程度であったことから, importin7 による Smad2/3 等の核内輸送を完全に抑制できず, 部分的な阻害作用しか認められなかったのではないかと考える. そのため, importin7 の機能抑制が Wnt/ β -catenin 経路に与える影響をより詳細に評価するためには, importin7 の遺伝子コードを変更するノックアウト実験等を行うことで importin7 の発現をより強く抑制し, その影響を確認する必要があると考える.

本研究により, **1a** は Smad2/3 の核内輸送を阻害するとともに, β -catenin の核内移行にはほとんど影響しないことが明らかになった. また, importin7 は Smad2/3 に加え, Erk⁶¹ や YAP⁶² 等の核内輸送を担うことが明らかになっているが, その基質は未だ十分に明らかにされていない. そのため, **1a** の Wnt/ β -catenin 経路阻害作用についてより詳細に検討するためには, importin7 と **1a** が CBP や p300 等, TCF/ β -catenin 転写活性に寄与する他の転写調節因子の核内輸送に与える影響について評価する必要があると考える.

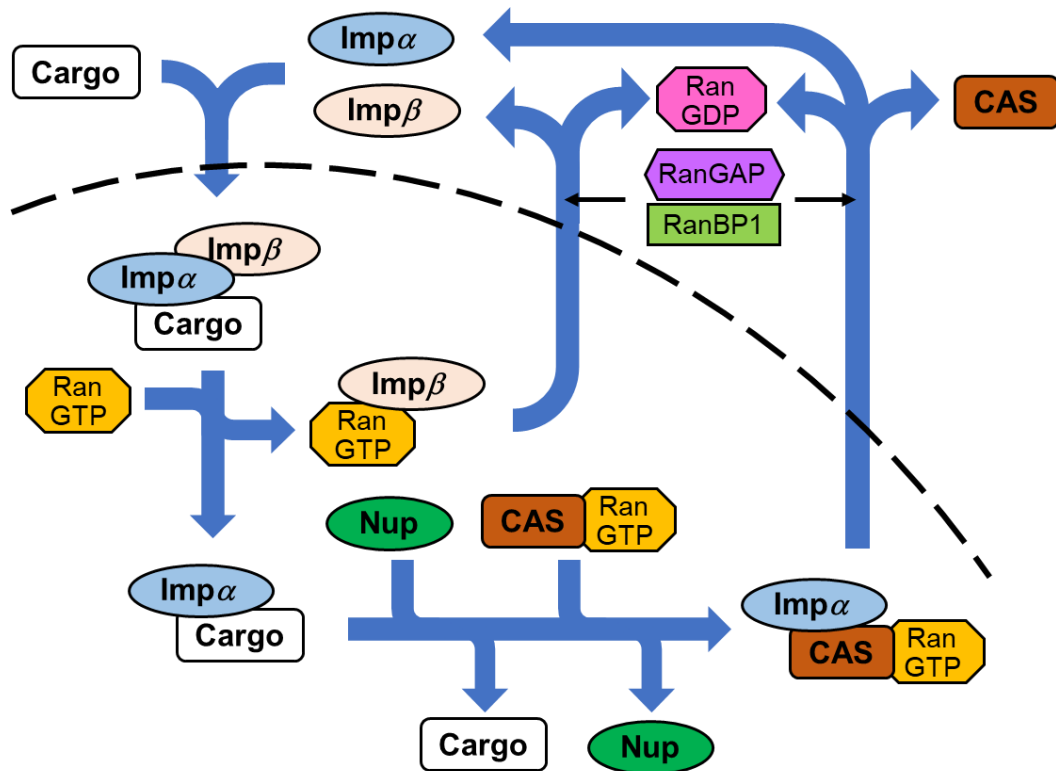


図 25 Importin- α および importin- β による核内輸送機構

Importin- α が基質上の核局在シグナルを認識し, importin- β と複合体を形成することで, 基質を核内へ輸送した後, 核内で RanGTP 等と相互作用することで基質は複合体から解離する. その後, importin- α および importin- β は細胞質へ移行し, 再利用される.

小括

TGF- β 1 刺激下の HT-29 細胞において, **1a** は Smad2/3 の核内輸送を阻害し, importin7 の核内量を増加させた. また, TGF- β 1 非処理下においても, **1a** 処理による importin7 の核内蓄積が認められた.

HT-29 細胞における importin7 のノックダウンは, Wnt/ β -catenin 経路の標的因子である c-Myc および Survivin の mRNA 発現量を減少させた.

結論

本研究は、Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を持つ化合物の探索および作用機序解明を目的として行った。

第 1 章において、クロモジ (*Lindera umbellata*) から 1 種の新規化合物 linderapyrone (**1**) および *epi*-(-)-linderol A (**2**) を単離し、構造決定した。このうち、**1** が Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を示したことから、**1** および LPD-01 (**1a**) を含む 8 種の化合物を合成し、同様に Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を評価したところ、ピロン環およびモノテルペンの部分骨格の両方が作用発現に必要であり、フェニル基の存在が作用増強に寄与することが明らかになった。

第 2 章において、**1**, *ent*-**1**, および **1a** が HT-29 細胞の増殖を有意に抑制することを明らかにした。最も強い HT-29 細胞増殖抑制作用を示した **1a** は大腸がん細胞 SW480 の増殖も抑制した。また、**1a** は β -catenin を減少させずに、c-Myc および Survivin のタンパク質および mRNA 発現量を減少させた。そこで、**1a** の標的分子を明らかにするため、活性化合物である **1a-a** に加え、非活性化合物である **1a-b** を合成し、**1a-a** とより強い親和性を示すタンパク質を探索した結果、exportin5 および importin7 を見出した。

第 3 章において、importin7 のノックダウンが HT-29 細胞における c-Myc および Survivin の mRNA 発現量を減少させることを明らかにした。また、TGF- β 1 刺激下での HT-29 細胞において、**1a** は細胞質の Smad2/3 を増加させ、核内の Smad2/3 を減少させた。

以上の結果から、**1a** は importin7 の機能抑制を介して Wnt/ β -catenin 経路を阻害することが示唆された。Importin7 阻害作用を示す化合物はこれまで報告されておらず、**1a** は importin7 阻害物質として、がん治療への貢献が期待される。

謝辞

本研究に際し、終始懇切なご指導、ご鞭撻を戴いた京都薬科大学 公衆衛生学分野 渡辺徹志教授および松本崇宏助教に心より感謝申し上げます。

また、本研究に際しご指導いただいた京都薬科大学 生化学分野 中山祐治教授、同 齊藤洋平助教、京都薬科大学 病態生理学分野 芦原英司教授に感謝申し上げます。

質量分析を行っていただいた京都薬科大学 共同利用機器センター 長谷川功紀准教授（当時）、服部恭尚講師、安東友繁助教（当時）に感謝申し上げます。

ECD スペクトルシミュレーションを行っていただいた長崎国際大学 薬品資源学研究室 太田智絵講師（当時）、長崎国際大学 計算創薬学研究室 吉田達貞講師に感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、副査としてご助言戴くとともに、ご指導戴いた京都薬科大学 細胞生物学分野 藤室雅弘教授、ならびに臨床薬学分野 西口工司教授に心より感謝申し上げます。

本研究にご協力いただいた学生諸氏の皆様に深く感謝いたします。

また、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費（23KJ2068）の助成を受けたものです。最後に、学生生活を支えてくれた家族に感謝の意を表します。

実験の部

第1章の実験

実験材料および機器

徳島県産クロモジ (*Lindera umbellata*) の茎および枝は栃本天海堂 (Osaka, Japan) より入手した。

カラムクロマトグラフィーの吸着剤は、順相系はシリカゲル 60N (Kanto Chemical, Tokyo, Japan: 63–210 μm), 逆相系は C₁₈-OPN (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan: 140 μm) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) には, silica gel 60F_{254S} (Merck, Darmstadt, Germany: 順相), RP-18 60F_{254S} (Merck: 逆相) を使用し, スポットの検出は, UV (254nm) および 1% Ce(SO₄)₂/10% H₂SO₄ 水溶液を噴霧し, 加熱時の呈色により行った。

旋光度は, P-2200 digital polarimeter (JASCO, Tokyo, Japan) ($l = 5 \text{ cm}$) を用いて測定した。

ECDスペクトルは, J-1500 spectrometer (JASCO) を用いて測定した。

質量分析 (EIMS) および高分解能質量分析 (HREIMS) は, JMS-GCMATE II (JEOL) を用いて測定した。

プロトン核磁気共鳴スペクトル (¹H-NMR) は, JNM-ECA 400 K (400 MHz) spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) もしくは JNM-ECA 600 K (600 MHz) spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて測定した。分裂様式の記載は, singlet, doublet, multiplet, broad singlet をそれぞれ s, d, m, br-s と略す。

炭素核磁気共鳴スペクトル (¹³C-NMR) は, JNM-ECA 600 K (150 MHz) spectrometer (JEOL) を用いて測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) において, フォトダイオードアレイ検出器は SPD-M10Avp (Shimadzu) を用いた。

各種有機溶媒 (MeOH, EtOAc, CHCl₃, *n*-Hexane, MeCN) は一級溶媒 (Nacalai Tesque) を使用した。

クロモジ含有成分の抽出・単離

乾燥させた徳島県産クロモジ茎および枝 (6.5 kg) を MeOH で熱時抽出後, 抽出液を濾取した。残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を計 3 回行った。MeOH 抽出液をまとめ, 減圧下で溶媒留去し, MeOH 抽出エキス (355.0 g, 5.5%) を得た。得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc と H₂O で分液し (1:1, v/v), EtOAc 可溶画分 (61.0 g, 0.94%) および H₂O 可溶画分を得た。

得られた EtOAc 可溶画分 (61.0 g) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [2.0 kg, *n*-Hexane-CHCl₃ (2:1 \rightarrow 1:1 \rightarrow 1:4, v/v) \rightarrow CHCl₃ \rightarrow CHCl₃-MeOH (50:1 \rightarrow 20:1 \rightarrow 10:1 \rightarrow 5:1 \rightarrow 2:1 \rightarrow 1:2, v/v) \rightarrow MeOH] にて分画し, 8 つのフラクション [Fr. 1 (4.5 g), Fr. 2 (1.3 g), Fr. 3 (13.1 g), Fr. 4 (6.6 g), Fr. 5 (2.0 g), Fr. 6 (2.6 g), Fr. 7 (1.5 g), Fr. 8 (1.5 g)] を得た。

Fr. 3 (13.1 g) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [300 g, H₂O \rightarrow MeOH-H₂O (3:7 \rightarrow 4:6 \rightarrow 5:5 \rightarrow 6:4 \rightarrow 7:3 \rightarrow 8:2 \rightarrow 9:1, v/v), \rightarrow MeOH] で分画し, 10 種の画分を

得た (Fr. 3-1-3-10). Fr. 3-7 (533.4 mg) を HPLC [カラム: COSMOSIL 5C18-MS-II (Nacalai Tesque, 250x20 mm i.d) mobile phase: MeCN-H₂O (80:20, v/v)] で精製し, **1** (22.1 mg) および **2** (2.3 mg) を得た.

新規化合物の構造解析

Linderapyrone (**1**)

Yellowish gum; [α]_D²⁵ -18.3 (*c* 0.25, MeOH); ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) and ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz), see Table 1; EIMS *m/z* 350 [M]⁺; HREIMS *m/z* 350.1880 (calcd for C₂₃H₂₆O₃ [M]⁺, 350.1882).

Epi-(-)-linderol A (**2**)

Yellowish gum; [α]_D²⁵ -19.6 (*c* 0.23, MeOH); ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) and ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz), see Table 1; EIMS *m/z* 422 [M]⁺; HREIMS *m/z* 422.2095 (calcd for C₂₆H₃₀O₅ [M]⁺, 422.2093).

化合物 **1** および **2** の理論 ECD スペクトルの計算

1 (1'S, 3'S, 4'S) およびそのエナンチオマー (*ent*-**1**: 1'R, 3'R, 4'R) の初期配座について, Spartan' 10 プログラムで実装されている Merck 分子力場を用いて真空中で幾何学的に最適化を行った. 次に長距離補正密度汎関数理論 (計算条件: CAM-B3LYP/def2-TZVP) により各エナンチオマーにおける 6 種の異性体を最適化した. 同様の計算条件で通常分析を行い, 各異性体が虚数周波数を示さないことを確認し, ギブスの自由エネルギーを算出した. 最後に時間依存密度汎関数理論により, 異性体の ECD 計算を行った. 密度汎関数理論での計算は全て Gaussian 16 プログラムを用いて, MeOH 中における積分方程式表式化の分極連続体モデルで実施した. 理論 ECD スペクトルの曲線は SpecDis v1.71 を用いて生成した. また, **2** (1'S, 2'R, 3'S, 4'R) およびそのエナンチオマー (1'R, 2'S, 3'R, 4'S) の理論 ECD スペクトルの曲線についても同様の方法で作製した.

STF/293 細胞の作製

pGL4.32 [luc2P/NF- κ B-RE/Hygr (Hygromycin)] Vector (Promega, Madison, WI, U. S. A) から, 制限酵素 (BamHI および SalI) (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて Hygromycin 耐性遺伝子コード領域を切断した. 切断した Hygromycin 耐性遺伝子コード領域を M50 Super 8xTopflash (Addgene, MA, USA) のプラスミドに挿入し, 作製したプラスミドを FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) を用いてヒト胎児腎細胞株 HEK293 にトランスフェクションした. その後, 0.15 mg/mL Hygromycin (Wako Pure Chemical Industries) を含む培地を用いて, トランスフェクションした細胞を 96 穴細胞培養プレート (Coster 3596; Corning, NY, USA) に 1 cell/well で播種し, クローニング後, 安定発現細胞を採取することで STF/293 細胞を樹立した.

STF/293 細胞および L-Wnt-3A 細胞の培養

STF/293 細胞は, 10% FBS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (100 units ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン), および 0.15 mg/mL

Hygromycin (Wako Pure Chemical Industries) を含む DMEM Low-Glucose (Wako Pure Chemical Industries) を用いて 37°C, 5% CO₂ の環境下で培養した. L-Wnt-3A 細胞 (American Type Culture Collection) は, 10% FBS (Sigma-Aldrich), 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (100 units ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン), および 0.4 mg/mL G418 (Wako Pure Chemical Industries) を含む DMEM low-glucose (Wako Pure Chemical Industries) を用いて 37°C, 5% CO₂ の環境下で培養した

TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用の評価

150 mm dish に L-Wnt-3A 細胞を 1.25×10^6 cells/dish で播種し, 3 日間培養した. その後, 培養上清を 0.22 μ m シリンジフィルター (Merck) でろ過して回収し, 使用するまで -80°C で保存した (Wnt 上清). STF/293 細胞を 96 穴細胞培養プレート (Coster 3596; Corning, NY, USA) に Wnt 上清で 5.0×10^4 cells/90 μ L の密度で播種した. 24 時間培養後に各化合物を添加し, さらに 24 時間培養した. 各ウェルに細胞溶解液 (25 mM Tris-HCl pH7.8, 2 mM DTT, 2 mM CyDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100) 100 μ L を添加し, プレートを 30 分間振盪することで細胞を溶解した. 細胞溶解物 100 μ L をポリスチレン 96 穴プレート (Thermo Fisher Scientific) に移し, 発光試薬 (20 mM Tricine-NaOH pH7.8, 1.07 mM (MgCO₃)₄ · Mg(OH)₂, 2.67 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 0.27 mM acetyl CoA, 0.47 mM D-luciferin K, 0.53 mM ATP) 100 μ L を加えた後, マイクロプレートリーダー (GloMax[®], Promega) で発光量を測定し, コントロール群に対する発光量の割合を算出した.

WST-8 アッセイ

細胞増殖阻害作用は, CCK-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて評価した. STF/293 細胞を 96 穴細胞培養プレート (Coster 3596; Corning, NY, USA) に 1 穴あたり 3.0×10^3 cells /90 μ L の密度で播種し, 約 24 時間培養した後, 各化合物で 24 時間処理した. その後, WST-8 を含む CCK-8 溶液 (10 μ L) を添加し, 37 °C, 5% CO₂ の条件下で 3 時間培養した後, WST-8 から生成したホルマザンの 450 nm の波長における吸光度をマイクロプレートリーダー (Sunrise Thermo RC-R) で測定した.

Piperitol (**4**) の合成

MeOH に懸濁させた piperitone (**3**, mixture of enantiomer, 8.0g, 52.6 mmol) に塩化セリウム七水和物 (20.0 g, 53.6 mmol) を加え, 0 °C で攪拌した. 10 分後, NaBH₄ (2.0 g, 52.9 mmol) を 5 分かけて少しずつ加えた. 1 時間後 H₂O を加え, 減圧下で MeOH を留去し, ジエチルエーテルを用いて抽出した. 有機層を減圧下で溶媒留去し, **4** (7.94 g, 51.5 mmol) をエナンチオマーおよびジアステレオマーの混合物として得た. 得られた化合物の NMR スペクトルは文献値⁸⁵と完全に一致した.

5 および 6 の合成

MeCN 中に懸濁させた **4** (8.0 g, 52.0 mmol) および 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone (8.0 g, 63.4

mmol) に室温で TMSOTf (12.4 g, 55.8 mmol) を加え、1 時間攪拌した。室温で飽和 NaHCO₃ 水溶液を加え、EtOAc を用いて抽出した。有機層を減圧下で溶媒留去し、残渣を HPLC [カラム : COSMOSIL 5C18-MS-II (Nacalai Tesque, 250x20 mm i.d) mobile phase: MeCN-H₂O (70:30, v/v)] で精製し、**5** (84.0 mg, 0.32 mmol) および **6** (761.2 mg, 2.9 mmol) を得た。

5: amorphous oil; ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ 5.93 (s), 3.49 (br-s), 2.20 (s), 2.06–0.80 (6H), 1.77 (d-like, *J* = 2.8), 1.43 (s), 1.26 (m), 0.76 (d, *J* = 5.6), 0.76 (d, *J* = 5.6); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ 179.7, 165.3, 159.5, 112.3, 99.5, 82.2, 49.2, 39.1, 37.2, 30.0, 27.8, 27.2, 22.5, 22.3, 20.6; EIMS: *m/z* 262 [M]⁺; HREIMS: *m/z* 262.1572 (Calcd for C₁₆H₂₂O₃ [M]⁺: *m/z* 262.1569).

6: amorphous oil; ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ 5.96 (s), 3.36 (br-s), 2.21 (s), 1.87 (dd, *J* = 2.1, 15.8), 1.85–1.35 (6H), 1.42 (s), 1.35 (m), 1.08 (d, *J* = 6.9), 0.94 (d, *J* = 6.9); ¹³C-NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ 178.6, 165.3, 159.7, 112.3, 102.4, 82.5, 42.3, 34.5, 30.6, 28.2, 26.6, 26.2, 22.1, 20.7, 20.2; EIMS: *m/z* 262 [M]⁺; HREIMS: *m/z* 262.1571 (Calcd for C₁₆H₂₂O₃ [M]⁺: *m/z* 262.1569).

Linderapyrone (**1**) およびそのエナンチオマー (*ent*-**1**) の合成

5 (40 mg, 0.15 mmol) を乾燥させた THF に溶解させ、窒素雰囲気下、-78 °C で HMPA (0.25 mL) および *n*-BuLi (1.6 M in hexanes, 0.4 mL, 0.64 mmol) を加え、1 時間攪拌した。benzaldehyde (80 mg, 0.75 mmol) を加え、室温で一晩攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、EtOAc で抽出した。有機層を減圧下で溶媒留去し、残渣をジクロロメタンに溶解させた。トリエチルアミン (0.1 mL, 1.1 mmol) および無水酢酸 (0.3 mL, 3.2 mmol) を 0 °C で加え、1 時間攪拌後、室温でさらに一晩攪拌した。DBU (0.1 mL, 0.67 mmol) を 0 °C で加え、室温で 5 時間攪拌後、MeOH (0.5 mL) を加え、さらに 3 時間攪拌した。1M HCl を 0 °C で加え、クロロホルムで抽出した。有機層を減圧下で溶媒留去し、残渣を HPLC [カラム : COSMOSIL 5C18-MS-II (Nacalai Tesque, 250x20 mm i.d) mobile phase: MeCN-H₂O (70:30, v/v)] で精製し、**±1** (2.0 mg) を得た。**±1** を更に HPLC [カラム : COSMOSIL YMC CHIRAL ART Amylise-C (250x2.6 mm i.d) mobile phase: *n*-hexane-isopropanol (20:1, v/v)] で分離し、**1** (0.4 mg) およびそのエナンチオマー (*ent*-**1**: 0.7 mg) を得た。

±1 : ¹H-NMR および ¹³C-NMR は天然物由来の **1** と完全に一致した; EIMS: *m/z* 350 [M]⁺; HREIMS: *m/z* 350.1880 (Calcd for C₂₃H₂₆O₃ [M]⁺: *m/z* 350.1882).

Synthesized **1**: ¹H-NMR は天然物由来の **1** と完全に一致した; EIMS: *m/z* 350 [M]⁺; HREIMS: *m/z* 350.1881 (Calcd for C₂₃H₂₆O₃ [M]⁺: *m/z* 350.1882).

ent-**1**: ¹H-NMR は天然物由来の **1** と完全に一致した; EIMS: *m/z* 350 [M]⁺; HREIMS: *m/z* 350.1882 (Calcd for C₂₃H₂₆O₃ [M]⁺: *m/z* 350.1882).

LPD-01 (**1a**) の合成

5 の代わりに **6** (80 mg, 0.3 mmol) を用いて、**1** および *ent*-**1** の合成と同様の手順で使用する試薬の量を倍にして反応を行い、HPLC [カラム : COSMOSIL 5C18-MS-II (Nacalai Tesque, 250x20 mm i.d) mobile phase: MeCN-H₂O (70:30, v/v)] で精製することで、**1a** (62.2 mg, 0.18 mmol) を得た。

7 の合成

4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone (5.0 g, 39.6 mmol) をアセトンに懸濁させ、炭酸カリウム(6.58 g, 47.6 mmol) および硫酸ジメチル (6.0 g, 47.6 mmol) を加えた。12 時間攪拌後、減圧下で溶媒留去し、EtOAc で抽出した。有機層を減圧下で溶媒留去し、残渣を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [*n*-Hexane-EtOAc (2:1)] で精製することで **7** (4.9 g, 35.0 mmol) を得た。得られた化合物の NMR スペクトルは文献値⁸⁶と完全に一致した。

8 の合成

乾燥させた MeOH (10 mL) にマグネシウム (500 mg, 20.6 mmol) を加え、30 分攪拌した。MeOH に溶解した benzaldehyde (1 mL, 9.8 mmol) および **7** (377.3 mg, 2.7 mmol) を加え、80 °C で 3 時間還流しながら攪拌した。減圧下で溶媒を留去し、残渣を EtOAc に溶解させ、酢酸水 [CH₃COOH-H₂O (1:4)] で分液した。有機層を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [*n*-Hexane-EtOAc (3:1)] で精製し、**8** (122.0 mg, 0.53 mmol) を得た。得られた化合物の NMR スペクトルは文献値⁸⁷と完全に一致した。

統計処理

多群比較検定を行う時には、一元配置分散分析 (ANOVA) で等分散であることを検定し、Dunnett 検定で有意差を検定した。* $P < 0.05$ または ** $P < 0.01$ の場合、差は有意であるとみなした。統計解析は、GraphPad Prism8.43 を使用した。

第2章の実験

実験材料および機器

電気泳動槽は、AE 6530M 型 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (AE 6530M, ATTO, Tokyo, Japan) を使用し、転写装置はミニ転写装置 (NA 1510, NIHON EIDO, Tokyo, Japan) を使用した。

RT-qPCR において、RNA から DNA への逆転写にはサーマルサイクラー Wako (WK-0232, Wako Pure Chemical Industries) を使用し、得られた cDNA の増幅および定量には MiniOpticon™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使用した。

ウエスタンブロットにおける各種タンパク質の化学発光シグナルは、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

ヒト大腸がん細胞の培養

ヒト大腸がん細胞株 HT-29 および SW480 (American Type Culture Collection) は、5% FBS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を添加した DMEM low-glucose (Wako Pure Chemical Industries) を用いて 37°C, 5% CO₂ の環境下で培養した。

WST-8 アッセイ

細胞増殖阻害作用は、実験の部における第1章の実験と同様に CCK-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて評価した。細胞を 96 穴細胞培養プレート (Coster 3596; Corning, NY, USA) に 1 穴あたり 3.0×10^3 cells / 90 μ L の密度で播種し、約 24 時間培養した後、ICG-001 または LPD-01 (1a) で 72 時間処理した。その後、WST-8 を含む CCK-8 溶液 (10 μ L) を添加し、37 °C, 5% CO₂ の条件下で 3 時間培養した後、WST-8 から生成したホルマザンの 450 nm の波長における吸光度をマイクロプレートリーダー (Sunrise Thermo RC-R) で測定した。IC₅₀ 値は、GraphPad Prism 8.21 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて算出した。

ウエスタンブロッティング解析

24 穴細胞培養プレートで 70–80% コンフルエントになるまで培養した細胞を ICG-001 および LPD-01 (1a) で 24 時間処理し、SDS sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.0125% bromophenol blue, 50 mM NaF, 20 mM β -glycerophosphate, 100 mM PMSF, 10 mM Na₃VO₄, Halt protease inhibitor cocktail) に溶解した後、100 °C で 5 分間煮沸した。タンパク質は SDS-PAGE で分離し、polyvinylidene difluoride membrane (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA) に転写した。次に、転写膜を Blocking One (Nacalai Tesque) で 40 分ブロッキングし、0.1% Tween 20 および 5% Blocking One を含む Tris buffered saline (TBS) で希釈した適切な一次抗体と HRP 標識二次抗体をそれぞれ順次反応させた。タンパク質の検出は Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を使用し、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) で検出および画像の撮影を行った。一次抗体は抗 α -tubulin 抗体 (1:2000; clone DM1A, Sigma-Aldrich), ウサギモノクローナル抗 non-phospho (Active) β -catenin 抗体 (1:1000; clone S45, Cell Signaling pathway Technology, Danvers, MA, USA), 抗 c-Myc 抗体

(1:1000; clone E5Q6W, Cell Signaling Technology), 抗 Survivin 抗体 (1:1000; clone 71G4B7, Cell Signaling Technology), および抗 β -actin 抗体 (1:2000; clone 13E5, Cell Signaling Technology) を使用した. 二次抗体は, HRP 標識ロバ抗マウス抗体 (1:4000; 715-035-150, Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) および HRP 標識ロバ抗ウサギ抗体 (1:2000–4000; 711-035-152, Jackson Immuno Research Laboratories) を使用した.

RT-qPCR 解析

35 mm ディッシュで 70–80% コンフルエントになるまで培養した細胞を ICG-001 または LPD-01 (**1a**) で 24 時間処理した後, PBS(-) に懸濁して 1.5 mL チューブに回収した. 回収した細胞を x500 g で 5 分遠心し, 細胞ペレットを PBS(-) 100 μ L に懸濁した. そのうち 20 μ L を新たな 1.5 mL チューブに移し, x500 g で 5 分遠心し, 細胞ペレットから RNA を抽出した. RNA の精製, cDNA への逆転写, cDNA の増幅反応は TaqmanTM Fast Advanced Cells-to-CT Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて手順書に従い実験を行い, *c-Myc*, *Survivin*, および *β -actin* の発現量を RT-qPCR で測定した.

死細胞率の解析

LPD-01 (**1a**) による細胞死誘導作用はトリパンブルー染色後のセルカウントの結果をもとに解析した. HT-29 細胞を 96 穴細胞培養プレート (Coster 3596; Corning, NY, USA) に 1 穴あたり 3.0×10^3 細胞/90 μ L の密度で播種し, 約 24 時間培養した後, **2** を処理した. 24, 48, および 72 時間後, それぞれ細胞を回収し, x500 g で 5 分遠心した. 細胞ペレットを PBS(-) に懸濁させ, トリパンブルー染色した. トリパンブルーで染色されない細胞を生細胞, トリパンブルーで染色される細胞を死細胞としてカウントし, 死細胞率を以下の式で算出した.

$$\text{死細胞率} = (\text{死細胞数}) / (\text{死細胞数} + \text{生細胞数}) \times 100$$

10 の合成

p-Hydroxybenzaldehyde (**9**, 1.0 g, 8.2 mmol) を THF に懸濁させ, 0 °C で水素化ナトリウム (400 mg, 16.7 mmol) を加えた. 5 分攪拌し, クロロメチルメチルエーテル (1 mL) を加え, 室温に戻した後, さらに 2 時間攪拌した. ジエチルエーテルで抽出し, 有機層を減圧下で溶媒留去した. 残渣を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [*n*-Hexane-CHCl₃ (1:9)] で精製し, 4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (**10**, 0.8 g, 4.8 mmol) を得た. 得られた化合物の NMR スペクトルは文献値⁸⁸と完全に一致した.

11 の合成

Benzaldehyde の代わりに **10** を用いて, **1** および **1a** の合成と同様の操作を行い, HPLC [カラム: COSMOSIL 5C18-MS-II (Nacalai Tesque, 250x20 mm i.d) mobile phase: MeCN-H₂O (70:30, v/v)] で精製することで, **11** (3.3 mg, 0.0080 mmol) を得た.

11: Yellowish gum; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.45 (d, *J* = 8.8, 2H), 7.32 (d, *J* = 16.0, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.8, 2H), 6.52 (d, *J* = 16.0, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.40 (d, *J* = 2.8, 1H),

1.91 (dd, $J = 4.2, 20.1$, 2H), 1.87 (m, 1H), 1.64–1.50 (4H), 1.47 (s, 3H), 1.38 (m, 1H), 1.10 (d, $J = 6.8$, 3H), 0.96 (d, $J = 6.8$, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ 178.7, 165.0, 158.1, 157.2, 133.9, 129.0, 128.7, 117.4, 116.5, 111.9, 103.2, 94.2, 82.8, 56.1, 42.3, 34.6, 30.7, 28.3, 26.6, 26.5, 22.1, 20.7, 20.2; EIMS: m/z 410 $[\text{M}]^+$; HREIMS: m/z 410.2092 (Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_5$ $[\text{M}]^+$: m/z 410.2093).

12 の合成

5 および benzaldehyde の代わりに **7** および **10** をそれぞれ用いて, **1** および **1a** の合成と同様の操作を行い, HPLC [カラム: COSMOSIL 5C18-MS-II (Nacalai Tesque, 250x20 mm i.d) mobile phase: MeCN- H_2O (50:50, v/v)] で精製することで, **12** (4.3 mg, 0.018 mmol) を得た.

12 (mixture of *cis* and *trans* isomer): Yellowish gum; ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz), δ 7.35 (d, $J = 8.8$, 2H), 7.16 (d, $J = 8.8$, 2H), 7.05–6.98 (6H), 6.88 (d, $J = 16.0$, 1H), 6.45 (d, $J = 16.0$, 1H), 5.90 (d, $J = 2.4$, 1H), 5.34 (d, $J = 2.4$, 1H), 5.31 (s, 1H), 5.18–5.16 (5H), 3.72 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.34 (s, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ 170.5, 170.0, 164.7, 163.9, 158.7, 157.2, 156.8, 130.7, 129.9, 129.7, 129.0, 128.6, 128.0, 122.5, 116.4, 116.1, 102.6, 94.3, 94.2, 91.7, 88.6, 79.3, 56.0, 55.9, 55.5, 54.9, 45.7, 38.6; EIMS: m/z 288 $[\text{M}]^+$; HREIMS: m/z 288.0996 (Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ $[\text{M}]^+$: m/z 288.0998).

1a-a の合成

11 (11.7 mg, 0.028 mmol) を MeOH に溶解した後, 50 °C で 6 M HCl を 10 滴加えた. 2 時間攪拌した後, 室温まで冷やし, EtOAc で抽出した. 有機層を減圧下で溶媒留去し, 残渣を HPLC [カラム: COSMOSIL 5C18-MS-II (Nacalai Tesque, 250x20 mm i.d) mobile phase: MeCN- H_2O (60:40, v/v)] で精製することで **1a-a** (1.7 mg, 0.0046 mmol) を得た.

1a-a: Yellowish gum; ^1H -NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ 7.38 (d, $J = 7.8$, 2H), 7.30 (d, $J = 16.2$, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 9.0$, 2H), 6.44 (d, $J = 16.2$, 1H), 6.11 (s, 1H), 3.42 (d, $J = 2.4$, 1H), 1.93 (dd, $J = 2.4, 13.5$, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.67–1.51 (5H), 1.48 (s, 3H), 1.37 (m, 1H), 1.09 (d, $J = 6.6$, 3H), 0.95 (d, $J = 7.2$, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ 179.2, 165.4, 158.2, 157.9, 135.0, 129.1, 127.2, 116.1, 116.0, 111.0, 103.2, 83.2, 42.4, 34.5, 30.7, 28.3, 26.7, 26.6, 22.1, 20.7, 20.3; EIMS: m/z 366 $[\text{M}]^+$; HREIMS: m/z 366.1830 (Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$: m/z 366.1831).

1a-b の合成

11 の代わりに **12** を用いて **1a-a** の合成と同様の操作を行い, HPLC [カラム: COSMOSIL 5PFP (Nacalai Tesque, 250x20 mm i.d) mobile phase: MeCN- H_2O (45:55, v/v)] で精製することで **1a-b** (1.0 mg, 0.0041 mmol) を得た.

1a-b (mixture of *cis* and *trans* isomer): Yellowish gum; ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 7.27 (d, $J = 8.4$, 2H), 7.16 (d, $J = 8.8$, 2H), 6.82 (d, $J = 16.0$, 1H), 6.76–6.71 (6H), 6.39 (d, $J = 16.0$, 1H), 6.09 (d, $J = 2.0$, 1H), 5.49 (d, $J = 2.0$, 1H), 5.37 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.39 (s, 3H); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ 173.2, 173.1, 167.6, 167.0, 161.9, 159.0, 158.3, 132.2, 130.0, 129.2, 129.0, 128.0, 122.9, 116.5, 116.2, 103.4, 92.1, 89.0, 57.0, 56.4; EIMS: m/z 244 $[\text{M}]^+$; HREIMS: m/z 244.0739 (Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$: m/z 244.0736)

HT-29 細胞からのタンパク質抽出

100 mm dish で約 90%コンフルエントまで培養した HT-29 細胞をタンパク質抽出液 (25 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM DTT, Halt protease inhibitor cocktail) に溶解し、氷上に 30 分静置した。その後、x5000 rpm で 5 分遠心し、上清を HT-29 細胞の全タンパク質抽出液とした。得られた抽出液のタンパク質濃度は Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific) で測定し、1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように結合・洗浄バッファー (20 mM HEPES-NaOH pH7.9, 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF) で希釈した。

Epoxy beads へのリガンドの固定化

Epoxy beads (Tamagawa Seiki, Nagano, Japan) へのリガンドの固定化は手順書に従い行った。Epoxy beads, リガンド, および K_2CO_3 を DMF に懸濁させ、ローテーターで攪拌しながら 60 °C で 24 時間反応させることでリガンドをビーズに固定した。反応終了後、ビーズを DMF および超純水でそれぞれ洗浄した後、50% メタノール中に分散させ、4 °C で保管した。

リガンド結合タンパク質のアフィニティ精製および同定

リガンド結合タンパク質のアフィニティ精製は手順書に従い行った。1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整した HT-29 細胞の全タンパク抽出液 200 μL 中にリガンドを固定化したビーズ 0.5 mg を分散させ、ローテーターで攪拌しながら 4 °C で 4 時間反応させた。反応終了後、ビーズを結合・洗浄バッファーで 3 回洗浄し、塩溶出バッファー (20 mM HEPES-NaOH pH 7.9, 1 M KCl, 1 mM MgCl_2 , 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF) 30 μL に分散させて氷上に 5 分静置した。その後、上清を塩溶出サンプルとして回収し、4xdye (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 0.02% bromophenol blue, 8% SDS, 40% glycerol, 20% 2-mercaptoethanol) 10 μL を添加した。ビーズは 4 倍希釈した 4xdye 40 μL に分散させ、塩溶出サンプルおよびビーズ分散液とともに 100 °C で 5 分間煮沸した。ビーズ分散液については上清を回収し、塩溶出サンプルとともに SDS-PAGE でタンパク質を分離した後、銀染色 MS キット (Wako Pure Chemical Industries) で手順書通りに銀染色を行った。検出されたタンパク質の同定は、島津テクノロジーのタンパク質同定 (MS/MS イオンサーチ) に依頼した。

統計処理

多群比較検定を行う時には、一元配置分散分析 (ANOVA) で等分散であることを検定し、Dunnnett 検定で有意差を検定した。* $P < 0.05$ または ** $P < 0.01$ の場合、差は有意であるとみなした。統計解析は、GraphPad Prism8.43 を使用した。

第3章の実験

実験材料および機器

電気泳動槽は、AE 6530M 型 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (AE 6530M, ATTO) を使用し、転写装置はミニ転写装置 (NA 1510, NIHON EIDO) を使用した。

RT-qPCR において、RNA から DNA への逆転写にはサーマルサイクラー Wako (WK-0232, Wako Pure Chemical Industries) を使用し、得られた cDNA の増幅および定量には MiniOpticon™ (Bio-Rad) を使用した。

ウェスタンブロットにおける各種タンパク質の化学発光シグナルは、LAS-4000 mini (Fujifilm) を用いて検出した。

細胞質タンパク質および核タンパク質の抽出

60 mm ディッシュで 70–80% コンフルエントになるまで培養した細胞を ICG-001 または LPD-01 (1a) で 24 時間処理した後、PBS(-) に懸濁して 1.5 mL チューブに回収した。回収した細胞を x500 g で 5 分遠心し、細胞ペレットを HLB (10 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.3% NP-40, 10% glycerol, 50 mM NaF, 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM PMSF, 10 mM Na₃VO₄, Halt protease inhibitor cocktail) に懸濁した後、氷上に静置した。10 分後、細胞を x800 g で 8 分遠心した後、上清を回収し、NaCl を終 150 mM となるように添加した (A 液)。細胞ペレットを HLB で 4 回洗浄した後、NLB (20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.3% NP-40, 10% glycerol, 50 mM NaF, 20 mM β -glycerophosphate, 20 mM PMSF, 10 mM Na₃VO₄, and Halt protease inhibitor cocktail) に懸濁した (B 液)。その後、A 液および B 液を x18000 g で 15 分遠心し、上清をそれぞれ細胞質画分、核画分とした。

蛍光免疫染色

24 穴細胞培養プレートで 70–80% コンフルエントになるまで培養した HT-29 細胞を LPD-01 (1a) で 24 時間処理した後、PBS(-) に溶解した 4%ホルムアルデヒドで 30 分処理し細胞を固定した。固定した細胞は 5% BSA と 0.3% Triron X-100 を添加した PBS(-) で 60 分インキュベートした後、2% BSA と 0.3% Triton X-100 を添加した PBS(-) に希釈した一次抗体と室温で 2 時間反応させた。反応終了後、細胞を PBS(-) で 3 回洗浄し、2% BSA と 0.3% Triton X-100 を添加した PBS(-) に希釈した二次抗体および 0.25 μ M Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific) と室温で 1 時間反応させた。反応終了後、細胞を PBS(-) で 3 回洗浄し、Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) で封入した後、Fluoid™ Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific) で蛍光を観察・撮影した。一次抗体はマウスモノクローナル抗 importin7 抗体 (1:200; clone E-2, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) を使用し、二次抗体は Alexa Flour 488 標識ロバ抗マウス抗体 (Life Technology, Waltham, MA, USA) を使用した。

ノックダウン

DMEM 115 μL に Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を 10 μL , DMEM 112.5 μL に 5 μM siRNA 溶液を 12.5 μL それぞれ添加した後, 2 液を混合し, 室温で 5 分静置することで siRNA とリポソームの複合体を形成させた. HT-29 細胞を 35 mm dish に 5.0×10^5 細胞/1000 μL の密度で播種し, その培地に Lipofectamine RNAiMAX と siRNA の混合液 (250 μL) を添加した. 6 時間培養後, 培地を 5% FBS を含む DMEM low-glucose 1250 μL に交換し, 18 時間培養した. その後, 培地を上記と同様の手順により作製した Lipofectamine RNAiMAX と siRNA の混合液 (250 μL) を添加した DMEM (1000 μL) に交換し, 再びトランスフェクションした. 48 時間培養後, 培地を 5% FBS を含む DMEM low-glucose 1250 μL に交換し, 更に 48 時間培養した後, 細胞をウエスタンブロッティングおよび RT-qPCR に使用した.

ウエスタンブロッティング解析

ウエスタンブロッティングは実験の部における第 2 章の実験と同様の手法で行った. 24 穴細胞培養プレートで 70–80% コンフルエントになるまで培養した細胞を LPD-01 (1a) で 24 時間処理し, SDS sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.0125% bromophenol blue, 50 mM NaF, 20 mM β -glycerophosphate, 100 mM PMSF, 10 mM Na_3VO_4 , Halt protease inhibitor cocktail) に溶解した後, 100 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間煮沸した. タンパク質は SDS-PAGE で分離し, polyvinylidene difluoride membrane (Pall Corporation) に転写した. 次に, 転写膜を Blocking One (Nacalai Tesque) で 40 分ブロッキングし, 0.1% Tween 20 および 5% Blocking One を含む TBS で希釈した適切な一次抗体と HRP 標識二次抗体をそれぞれ順次反応させた. タンパク質の検出は Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を使用し, LAS-4000 mini (Fujifilm) で検出および画像の撮影を行った. 一次抗体はマウスモノクローナル抗 importin7 抗体 (1:1000; clone E-2, Santa Cruz Biotechnology), 抗 α -tubulin 抗体 (1:2000; clone DM1A, Sigma-Aldrich), 抗 TCF4 抗体 (1:1000; clone D-4, Santa Cruz Biotechnology), 抗 Smad4 抗体 (1:1000; clone B-8, Santa Cruz Biotechnology), ウサギモノクローナル抗 non-phospho (Active) β -catenin 抗体 (1:1000; clone S45, Cell Signaling Technology), 抗 c-Myc 抗体 (1:1000; clone E5Q6W, Cell Signaling Technology), 抗 Survivin 抗体 (1:1000; clone 71G4B7, Cell Signaling Technology), 抗 Smad2 抗体 (1:1000; clone D43B4, Cell Signaling Technology), 抗 Smad3 抗体 (1:1000; clone C67H9, Cell Signaling Technology), 抗 LaminB1 抗体 (1:2000; clone D9V6H, Cell Signaling Technology), および抗 β -actin 抗体 (1:2000; clone 13E5, Cell Signaling Technology) を使用した. 二次抗体は, HRP 標識ロバ抗マウス抗体 (1:4000; 715-035-150, Jackson Immuno Research Laboratories) および HRP 標識ロバ抗ウサギ抗体 (1:2000–4000; 711-035-152, Jackson Immuno Research Laboratories) を使用した.

統計処理

多群比較検定を行う時には、一元配置分散分析 (ANOVA) で等分散であることを検定し、Dunnett 検定で有意差を検定した。 ** $P < 0.01$ または* $P < 0.05$ の場合、差は有意であるとみなした。統計解析は、GraphPad Prism 8.43 を使用した。

引用文献

- 1) 国立がん研究センター 「がんの統計 2023」 (2023 年 1 月 31 日確認)
https://ganjoho.jp/public/qa_links/report/statistics/pdf/cancer_statistics_2023_fig_J.pdf
- 2) Maleki E. H., Bahrami A. R., Matin M. M., Cancer cell cycle heterogeneity as a critical determinant of therapeutic resistance. *Genes Dis.*, **2024**, 11(1), 189–204.
- 3) Gomez K., Rabadan R., A persistent look at how tumours evade therapy. *Nature*, **2021**, 596(7873), 491–493.
- 4) Clarke M. F., Dick J. E., Dirks P. B., Eaves C. J., Jamieson C. H. M., Jones D. L., Visvader J., Weissman I. L., Wahl G. M., Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.*, **2006**, 66(19), 9339–9344.
- 5) Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, **2001**, 414(6859), 105–111.
- 6) Bonnet D., Dick J. E., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.*, **1997**, 3(7), 730–737.
- 7) Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J., Clarke M. F., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, 100(7), 3983–3988.
- 8) Ginestier C., Hur M. H., Charafe-Jauffret E., Monville F., Dutcher J., Brown M., Jacquemier J., Viens P., Kleer C., Liu S., Schott A., Hayes D., Birnbaum D., Wicha M. S., Dontu G., ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, **2007**, 1(5), 555–567.
- 9) Ricci-Vitiani L., Lombardi D. G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., Maria R. D., Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, **2007**, 445(7123), 111–115.
- 10) Liu J., Xiao Q., Xiao J., Niu C., Li Y., Zhang X., Zhou Z., Shu G., Yin G., Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2022**, 7(1), 3.
- 11) Zhang Y., Wang X., Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *J. Hematol. Oncol.*, **2020**, 13, 165.
- 12) Ahmed Y., Nouri A., Wieschaus E., *Drosophila* Apc1 and Apc2 regulate Wingless transduction throughout development. *Development*, **2002**, 129(7), 1751–1762.
- 13) Dajani R., Fraser E., Roe S. M., Young N., Good V., Dale T. C., Pearl L. H., Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 β : structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*, **2001**, 105(6), 721–732.
- 14) MacDonald B. T., Tamai K., He X., Wnt/ β -Catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell*, **2009**, 17(1), 9–26.
- 15) Ashihara E., Takada T., Maekawa T., Targeting the canonical Wnt/ β -catenin pathway in

- hematological malignancies. *Cancer Sci.*, **2015**, 106(6), 665–671.
- 16) Bilić J., Huang Y. L., Davidson G., Zimmermann T., Cruciat C. M., Bienz M., Niehrs C., Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, **2007**, 316(5831), 1619–1622.
 - 17) Hadjimichael C., Chanoumidou K., Papadopoulou N., Arampatzi P., Papamatheakis J., Kretsovali A., Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J. Stem Cells*, **2015**, 7(9), 1150–1184.
 - 18) He T. C., Sparks A. B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., Da Costa L. T., Morin P. J., Vogelstein B., Kinzler K. W., Identification of *c-MYC* as a target of the APC pathway. *Science*, **1998**, 281(5382), 1509–1512.
 - 19) Kim P. J., Plescia J., Clevers H., Fearon E. R., Altieri D. C., Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Mech. Dis.*, **2003**, 362(9379), 205–209.
 - 20) Zhong Z., Virshup D. M., Wnt signaling and drug resistance in cancer, *Mol. Pharmacol.*, **2020**, 97(2), 72–89.
 - 21) Chen B., Dodge M. E., Tang W., Lu J., Ma Z., Fan C. W., Wei S., Hao W., Kilgore J., Williams N. S., Roth M. G., Amatruda J. F., Chen C., Lum L., Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, 5(2), 100–107.
 - 22) Huang S. M. A., Mishina Y. M., Liu S., Cheung A., Stegmeier F., Michaud G. A., Charlat O., Wiellette E., Zhang Y., Wiessner S., Hild M., Shi X., Wilson C. J., Mickanin C., Myer V., Fazal A., Tomlinson R., Serluca F., Shao W., Cheng H., Shultz M., Rau C., Schirle M., Schlegl J., Ghidelli S., Fawell S., Lu C., Curtis D., Kirschner M. W., Lengauer C., Finan P. M., Tallarico J. A., Bouwmeester T., Porter J. A., Bauer A., Cong F., Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*, **2009**, 461(7264), 614–620.
 - 23) Amado N. G., Predes D., Fonseca B. F., Cerqueira D. M., Reis A. H., Dudenhoefter A. C., Borges H. L., Mendes F. A., Abreu J. G., Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth *in vitro* by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **2014**, 289(51), 35456–35467.
 - 24) Soldi R., Horrigan S. K., Cholody M. W., Padia J., Sorna V., Bearss J., Gilcrease G., Bhalla K., Verma A., Vankayalapati H., Sharma S., Design, synthesis, and biological evaluation of a series of anthracene-9,10-dione dioxime β -catenin pathway inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58(15), 5854–5862.
 - 25) Nomura M., Rainusso N., Lee Y. C., Dawson B., Coarfa C., Han R., Larson J. L., Shuck R., Kurenbekova L., Yustein J. T., Tegavivint and the β -Catenin/ALDH axis in chemotherapy-resistant and metastatic osteosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2019**, 111(11), 1216–1227.
 - 26) Emami K. H., Nguyen C., Ma H., Kim D. H., Jeong K. W., Eguchi M., Moon R. T., Teo J. L., Oh S. W., Kim H. Y., Moon, S. H., Ha J. R., Kahn M., A small molecule inhibitor of β -catenin/CREB-binding protein transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, 101(34), 12682–12687.
 - 27) Masuda M., Uno Y., Ohbayashi N., Ohata H., Mimata A., Kukimoto-Niino M., Moriyama H., Kashimoto S., Inoue T., Goto N., Okamoto K., Shirouzu M., Sawa M., Yamada T., TNIK inhibition

- abrogates colorectal cancer stemness. *Nat. Commun.*, **2016**, 7, 12586.
- 28) Neiheisel A., Kaur M., Ma N., Havard P., Shenoy A. K., Wnt pathway modulators in cancer therapeutics: An update on completed and ongoing clinical trials. *Int. J. Cancer*, **2022**, 150(5), 727–740.
 - 29) Kuroda M., Sakurai K., Mimaki Y., Chemical constituents of the stems and twigs of *Lindera umbellata*. *J. Nat. Med.*, **2011**, 65(1), 198–201.
 - 30) Ichino K., Tanaka H., Ito K., A new flavanone, neolinderatone, from *Lindera umbellata* Thunb. var. *lancea* Momiyama. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, 37(5), 1426–1427.
 - 31) Ichino K., Tanaka H., Ito K., Revised structures of linderatone and methylinderatone. *Heterocycles*, **1990**, 31(3), 549–553.
 - 32) Shimomura H., Sashida Y., Mimaki Y., Oohara M., Fukai Y., A chalcone derivative from the bark of *Lindera umbellata*. *Phytochemistry*, **1988**, 27(12), 3937–3939.
 - 33) Mimaki Y., Kameyama A., Sashida Y., Miyata Y., Fujii A., A novel hexahydrodibenzofuran derivative with potent inhibitory activity on melanin biosynthesis of cultured B-16 melanoma cells from *Lindera umbellata* bark. *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, 43(5), 893–895.
 - 34) Abdullah N., Sahibul-Anwar H., Ideris S., Hasuda T., Hitotsuyanagi Y., Takeya K., Diederich M., Choo C. Y., Goniolandrene A and B from *Goniolanthus macrophyllus*. *Fitoterapia*, **2013**, 88, 1–6.
 - 35) Portet B., Fabre N., Roumy V., Gornitzka H., Bourdy G., Chevalley S., Sauvain M., Valentin A., Moulis C., Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry*, **2007**, 68(9), 1312–1320.
 - 36) Yamashita M., Yadav N. D., Sumida Y., Kawasaki I., Kurume A., Ohta S., Discrepancy of the spectral data between adunctin E and the synthetic one. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48(32), 5619–5622.
 - 37) Shenoy S., Genetic risks and familial associations of small bowel carcinoma. *World J. Gastrointest. Oncol.*, **2016**, 8(6), 509–519.
 - 38) Kwong L. N., Dove W. F., APC and its modifiers in colon cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2009**, 656, 85–106.
 - 39) Chandra S. H. V., Wacker I., Appelt U. K., Behrens J., Schneikert J., A common role for various human truncated adenomatous polyposis coli isoforms in the control of beta-catenin activity and cell proliferation. *PLoS One*, **2012**, 7(4), e34479.
 - 40) Peifer M., Polakis P., Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science*, **2000**, 287(5458), 1606–1609.
 - 41) Shigeyasu K., Okugawa Y., Toden S., Boland C. R., Goel A., Exportin-5 functions as an oncogene and a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, **2017**, 23(5), 1312–1322.
 - 42) Xu J, Xu W., Xuan Y., Liu Z., Sun Q., Lan C., Pancreatic cancer progression is regulated by IPO7/p53/lncRNA MALAT1/miR-129-5p positive feedback loop. *Front. Cell Dev. Biol.*, **2021**, 9, 630262.
 - 43) Han Y., Liu Y., Gui Y., Cai Z., Inducing cell proliferation inhibition and apoptosis via silencing dicer, drosha, and exportin 5 in urothelial carcinoma of the bladder. *J. Surg. Oncol.*, **2013**, 107(2),

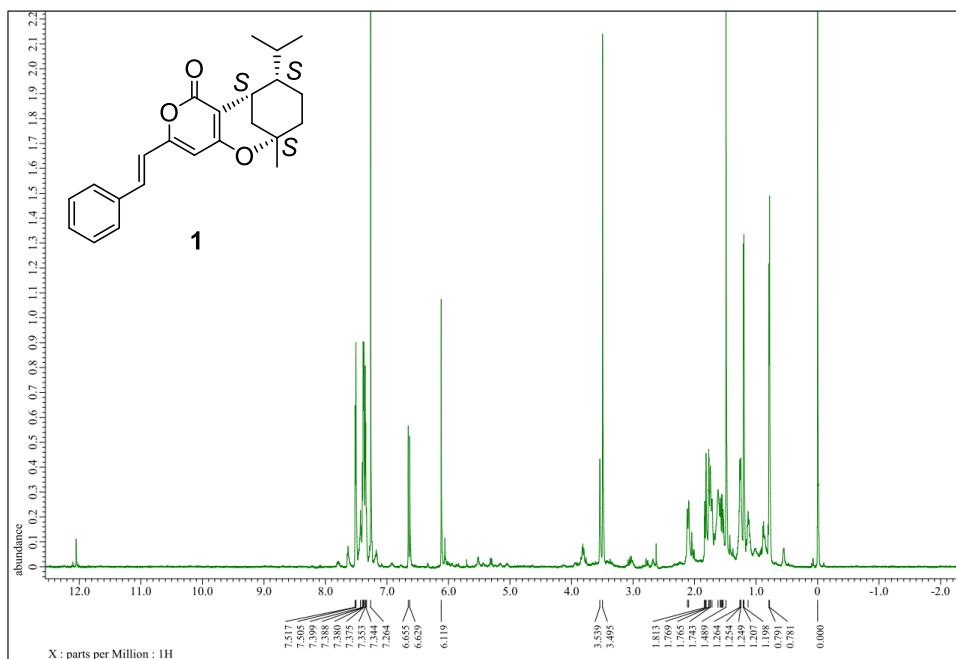
201–205.

- 44) Cai G. X., Kong W. Y., Liu Y., Zhong S. Y., Liu Q., Deng Y. F., Ye G. L., Nuclear transport maintenance of USP22-AR by Importin-7 promotes breast cancer progression. *Cell Death Discov.*, **2023**, 9(1), 211.
- 45) Wing C. E., Fung H. Y. J., Chook Y. M., Karyopherin-mediated nucleocytoplasmic transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2022**, 23(5), 307–328.
- 46) Khalil B., Linsenmeier M., Smith C. L., Shorter J., Rossoll W., Nuclear-import receptors as gatekeepers of pathological phase transitions in ALS/FTD. *Mol. Neurodegener.*, **2024**, 19(1), 8.
- 47) Chook Y. M., Süel K. E., Nuclear import by karyopherin- β s: Recognition and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1813(9), 1593–1606.
- 48) Leaderer D., Hoffman A. E., Zheng T., Fu A., Weidhaas J., Paranjape T., Zhu Y., Genetic and epigenetic association studies suggest a role of microRNA biogenesis gene exportin-5 (*XPO5*) in breast tumorigenesis. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.*, **2011**, 2(1), 9–18.
- 49) Chen J., Hu Y., Teng Y., Yang B. K., Increased nuclear transporter importin 7 contributes to the tumor growth and correlates with CD8 T cell infiltration in cervical cancer. *Front. Cell Dev. Biol.*, **2021**, 9, 732786.
- 50) Li S. R., Gyselman V. G., Dorudi S., Bustin S. A., Elevated levels of RanBP7 mRNA in colorectal carcinoma are associated with increased proliferation and are similar to the transcription pattern of the proto-oncogene *c-myc*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, 271(2), 537–543.
- 51) Waldmann T., Walde S., Kehlenbach R. H., Nuclear import of c-Jun is mediated by multiple transport receptors. *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282(38), 27685–27692.
- 52) Forwood J. K., Lam M. H., Jans D. A., Nuclear import of Creb and AP-1 transcription factors requires importin- β 1 and Ran but is independent of importin- α . *Biochemistry*, **2001**, 40(17), 5208–5217.
- 53) Waeber G., Habener J. F., Nuclear translocation and DNA recognition signals colocalized within the bZIP domain of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB. *Mol. Endocrinol.*, **1991**, 5(10), 1431–1438.
- 54) Mühlhäusser P., Müller E. C., Otto A., Kutay U., Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep.*, **2001**, 2(8), 690–696.
- 55) Baake M., Bäuerle M., Doenecke D., Albig W., Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways. *Eur. J. Cell Biol.*, **2001**, 80(11), 669–677.
- 56) Yang Y., Guo L., Chen L., Gong B., Jia D., Sun Q., Nuclear transport proteins: structure, function, and disease relevance. *Nature*, **2023**, 8(1), 425.
- 57) Kataoka N., Bachorik J. L., Dreyfuss G., Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J. Cell. Biol.*, **1999**, 145(6), 1145–1152.
- 58) Chachami G., Paraskeva E., Mingot J. M., Braliou G. G., Görlich D., Simos G., Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1 α into the nucleus involves importins 4 and 7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**, 390(2), 235–240.

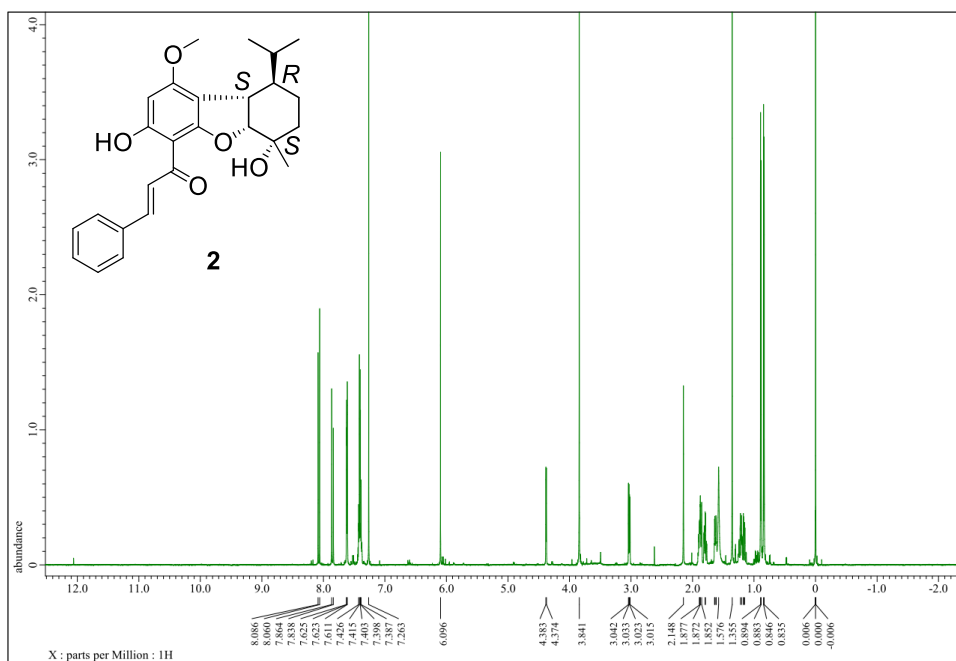
- 59) Jäkel S., Mingot J. M., Schwarzmaier P., Hartmann E., Görlich D., Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J.*, **2002**, 21(3), 377–386.
- 60) Chung K. M., Cha S. S., Jang S. K., A novel function of karyopherin β associated with apolipoprotein A-I secretion, *Mol. Cells*, **2008**, 26(3), 291–298.
- 61) James B. P., Bunch T. A., Krishnamoorthy S., Perkins L. A., Brower D. L., Nuclear localization of the ERK MAP kinase mediated by *Drosophila* α PS2 β PS integrin and Importin-7. *Mol. Biol. Cell*, **2007**, 18(10), 4190–4199.
- 62) García-García M., Sánchez-Perales S., Jarabo P., Calvo E., Huyton T., Fu L., Ng S. C., Sotodosos-Alonso L., Vázquez J., Casas-Tintó S., Görlich D., Echarrí A., Del Pozo M. A., Mechanical control of nuclear import by Importin-7 is regulated by its dominant cargo YAP. *Nat. Commun.*, **2022**, 13(1), 1174.
- 63) Yao X., Chen X., Cottonham C., Xu L., Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283(33), 22867–22874.
- 64) Plafker S. M., Macara I. G., Ribosomal protein L12 uses a distinct nuclear import pathway mediated by importin 11. *Mol. Cell. Biol.*, **2002**, 22(4), 1266–1275.
- 65) Plafker S. M., Plafker K. S., Weissman A. M., Macara I. G., Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import. *J. Cell Biol.*, **2004**, 167(4), 649–659.
- 66) Hopper A. K., Nostramo R. T., tRNA processing and subcellular trafficking proteins multitask in pathways for other RNAs. *Front. Genet.*, **2019**, 10, 96.
- 67) Thakar K., Karaca S., Port S. A., Urlaub H., Kehlenbach R. H., Identification of CRM1-dependent nuclear export cargos using quantitative mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, **2013**, 12(3), 664–678.
- 68) Mackmull M. T., Klaus B., Heinze I., Chokkalingam M., Beyer A., Russell R. B., Ori A., Beck M., Landscape of nuclear transport receptor cargo specificity. *Mol. Syst. Biol.*, **2017**, 13(12), 962.
- 69) Wu K., He J., Pu W., Peng Y., The role of exportin-5 in microRNA biogenesis and cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **2018**, 16(2), 120–126.
- 70) Stüven T., Hartmann E., Görlich D., Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *EMBO J.*, **2003**, 22(21), 5928–5940.
- 71) Ploski J. E., Shamsher M. K., Radu A., Paired-type homeodomain transcription factors are imported into the nucleus by karyopherin 13. *Mol. Cell. Biol.*, **2004**, 24(11), 4824–4834.
- 72) Kahle J., Baake M., Doenecke D., Albige W., Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin β and importin 13. *Mol. Cell. Biol.*, **2005**, 25(13), 5339–5354.
- 73) Gontan C., Güttler T., Engelen E., Demmers J., Fornerod M., Grosveld F. G., Tibboel D., Görlich D., Poot R. A., Rottier R. J., Exportin 4 mediates a novel nuclear import pathway for Sox family transcription factors. *J. Cell Biol.*, **2009**, 185(1), 27–34.
- 74) Liang P., Zhang H., Wang G., Li S., Cong S., Luo Y., Zhang B., KPNB1, XPO7 and IPO8 mediate

- the translocation of NF- κ B/p65 into the nucleus. *Traffic*, **2013**, 14(11), 1132–1143.
- 75) Mis M., O'Brien S., Steinhart Z., Lin S., Hart T., Moffat J., Angers S., IPO11 mediates β catenin nuclear import in a subset of colorectal cancers. *J. Cell Biol.*, **2020**, 219(2), e201903017.
 - 76) Hwang W. Y., Kostiuk V., González D. P., Lusk C. P., Khokha M. K., Kap- β 2/Transportin mediates β -catenin nuclear transport in Wnt signaling. *Elife*, **2022**, 11, e70495.
 - 77) Xu L., Yao X., Chen X., Lu P., Zhang B., Ip Y. T., Msk is required for nuclear import of TGF- β /BMP-activated Smads. *J. Cell Biol.*, **2007**, 178(6), 981–994.
 - 78) Xu F., Liu C., Zhou D., Zhang L., TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis. *J. Histochem. Cytochem.*, **2016**, 64(3), 157–167.
 - 79) Mangone F. R. R., Walder F., Maistro S., Pasini F. S., Lehn C. N., Carvalho M. B., Brentani M. M., Snitcovsky I., Federico M. H. H., Smad2 and Smad6 as predictors of overall survival in oral squamous cell carcinoma patients. *Mol. Cancer*, **2010**, 9, 106.
 - 80) Humeres C., Venugopal H., Frangogiannis N. G., Smad-dependent pathways in the infarcted and failing heart. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2022**, 64, 102207.
 - 81) Derynck R., Zhang Y., Feng X. H., Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell*, **1998**, 95(6), 737–740.
 - 82) Hirota M., Watanabe K., Hamada S., Sun Y., Strizzi L., Mancino M., Nagaoka T., Gonzales M., Seno M., Bianco C., Salomona D. S., Smad2 functions as a co-activator of canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway independent of Smad4 through histone acetyltransferase activity of p300. *Cell. Signal.*, **2008**, 20(9), 1632–1641.
 - 83) Miyamoto Y., Boag P. R., Hime G. R., Loveland K. L., Regulated nucleocytoplasmic transport during gametogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, 1819(6), 616–630.
 - 84) Moore M. S., Ran and nuclear transport. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273(36), 22857–22860.
 - 85) Tanaka H., Nakamura T., Ichino K., Ito K., A lignan from *Actinodaphne longifolia*. *Phytochemistry*, **1989**, 28(3), 952–954.
 - 86) Li C., Cheng B., Fang S., Zhou H., Gu Q., Xu J., Design, syntheses and lipid accumulation inhibitory activities of novel resveratrol mimics. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 143, 114–122.
 - 87) Kumagai M., Mishima T., Watanabe A., Harada T., Yoshida I., Fujita K., Watai M., Tawata S., Nishikawa K., Morimoto Y., 5,6-Dehydrokawain from *Alpinia zerumbet* promotes osteoblastic MC3T3-E1 cell differentiation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2016**, 80(7), 1425–1432.
 - 88) Shih-Yuan L. A., Hu Y. J., Chu S. F., A simple and highly efficient deprotecting method for methoxymethyl and methoxyethoxymethyl ethers and methoxyethoxymethyl esters. *Tetrahedron*, **2001**, 57(11), 2121–2126.

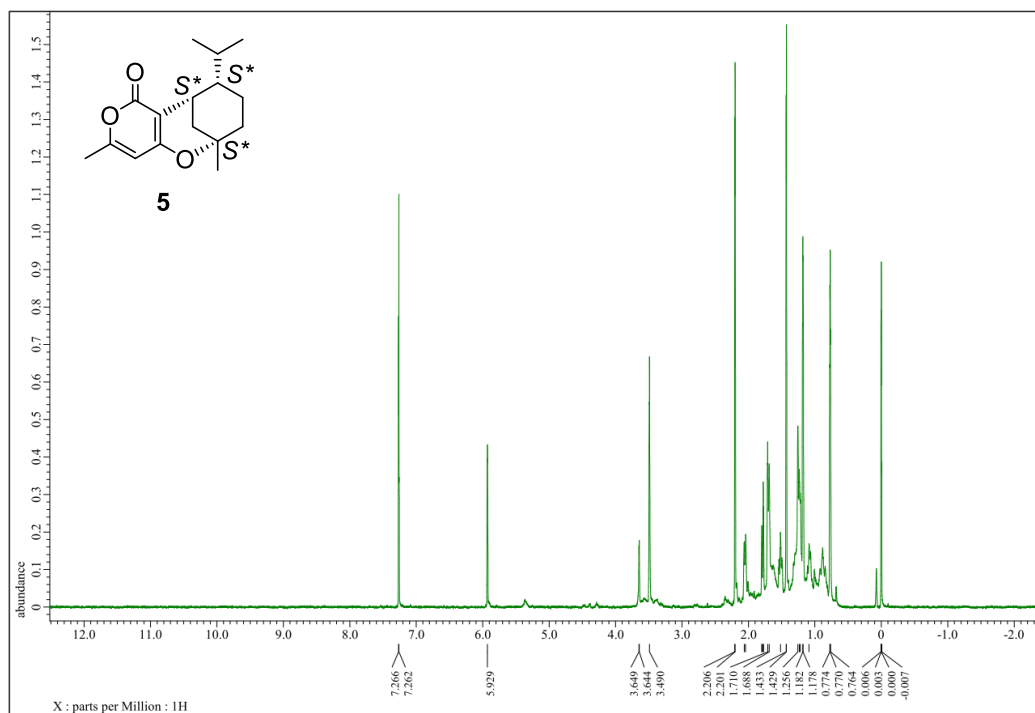
Supplemental data



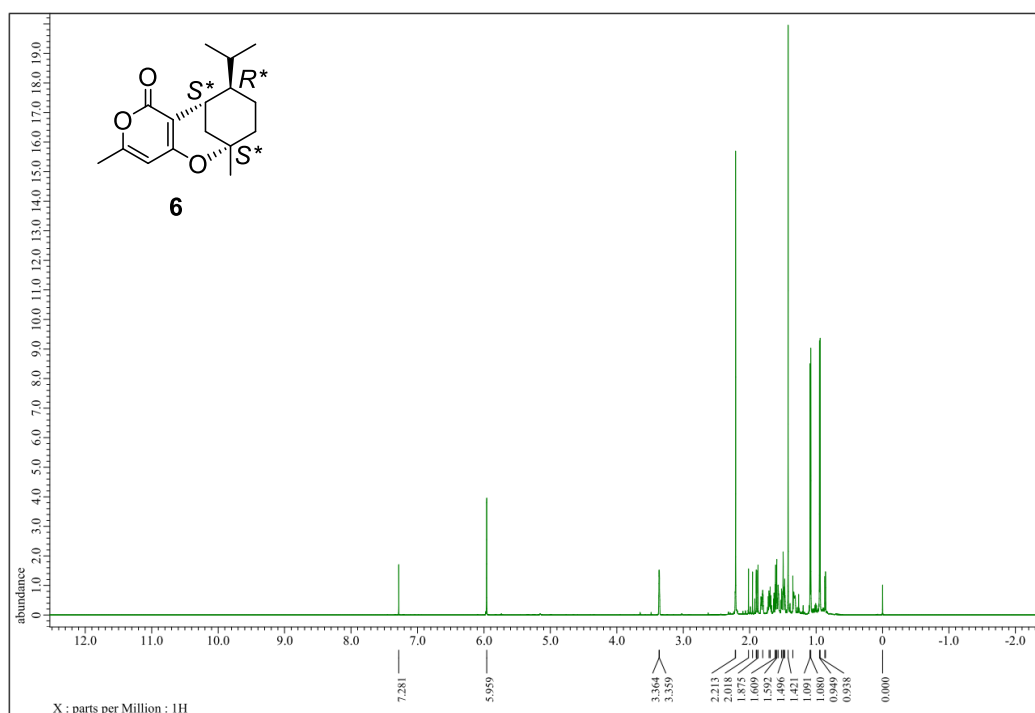
☒ 26 ¹H-NMR spectrum of **1**



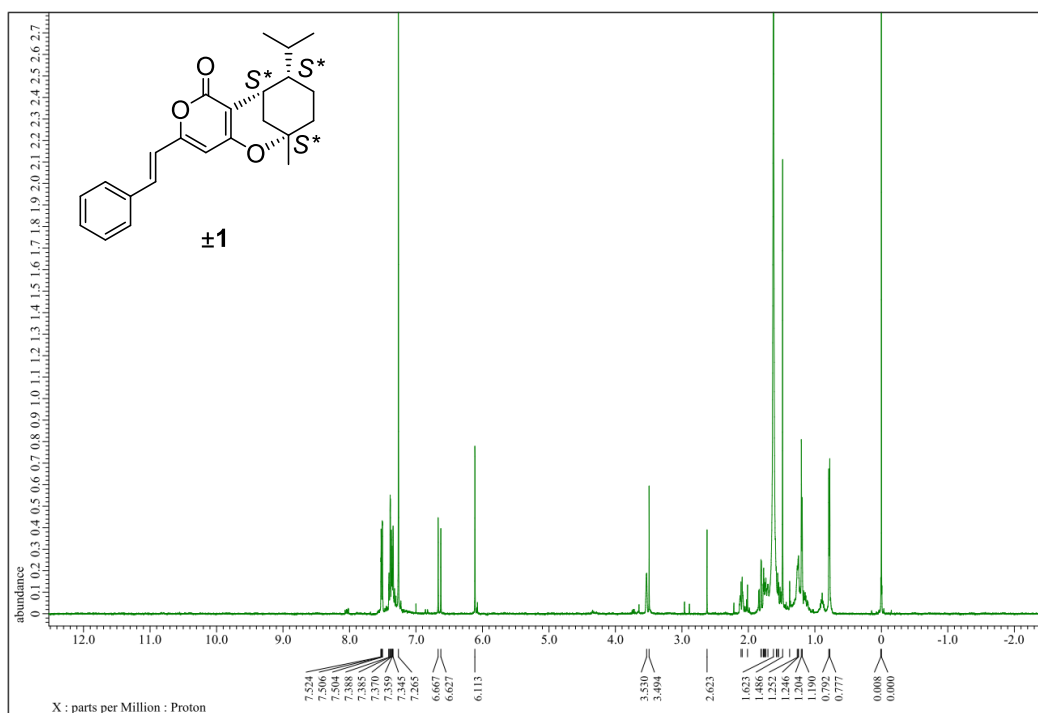
☒ 27 ¹H-NMR spectrum of **2**



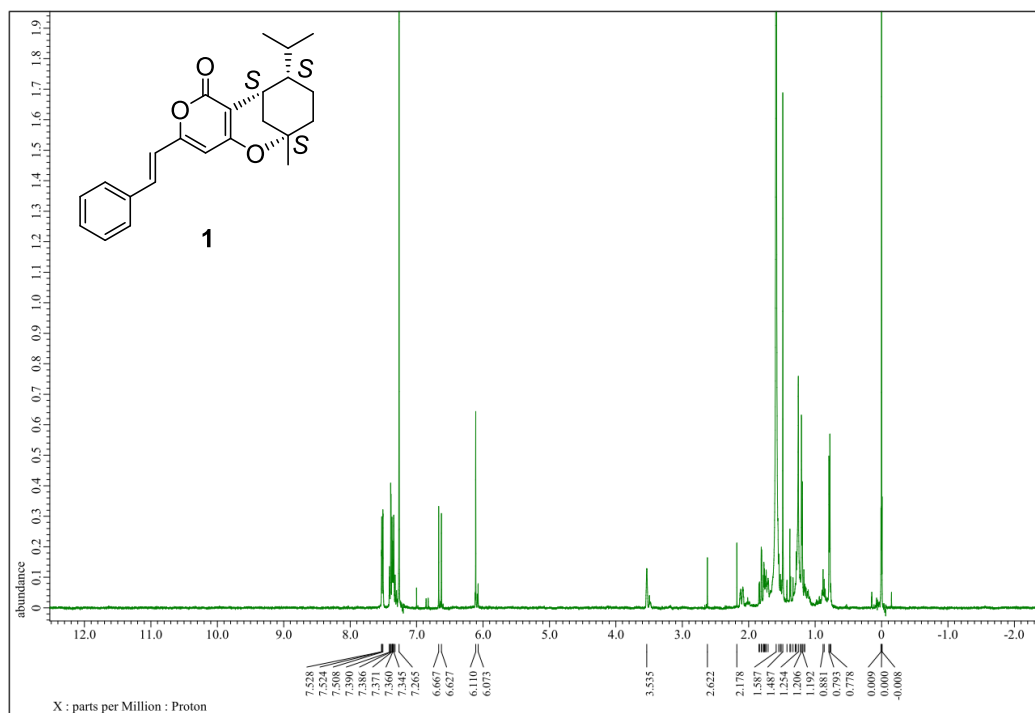
☒ 28 ^1H -NMR spectrum of **5**



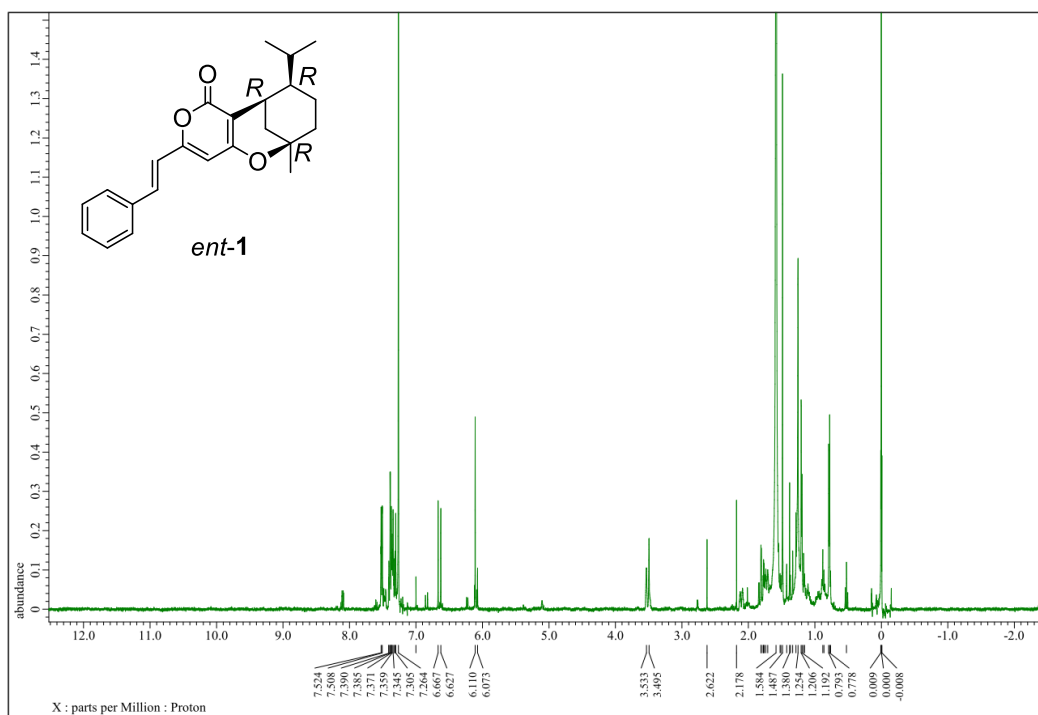
☒ 29 ^1H -NMR spectrum of **6**



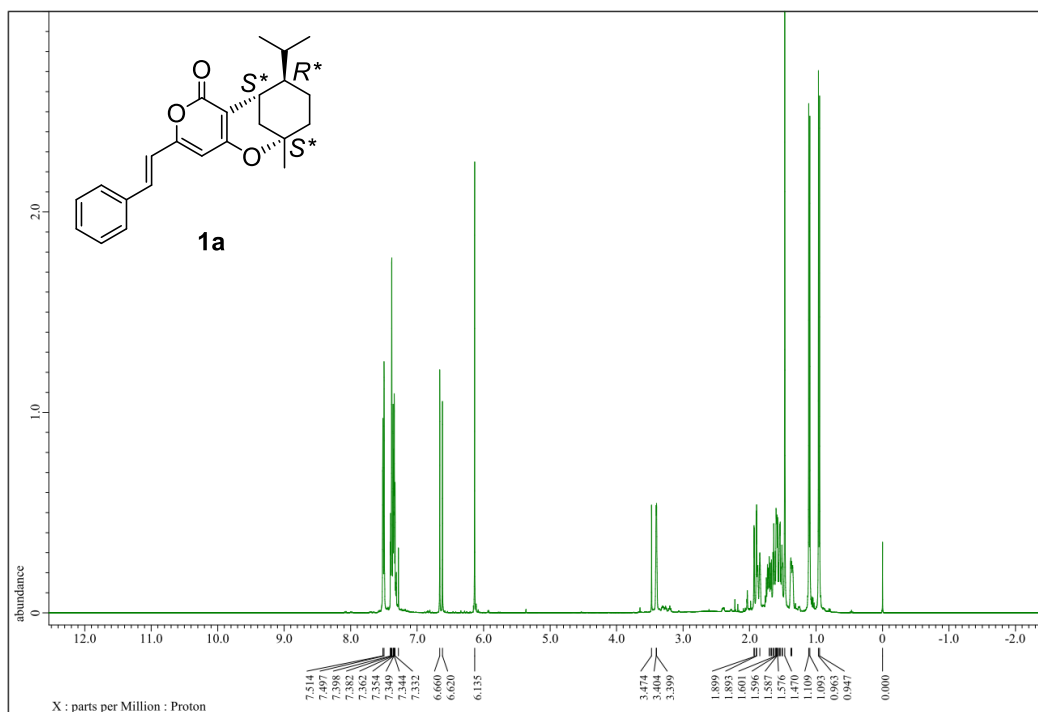
☒ 30 ¹H-NMR spectrum of **±1**



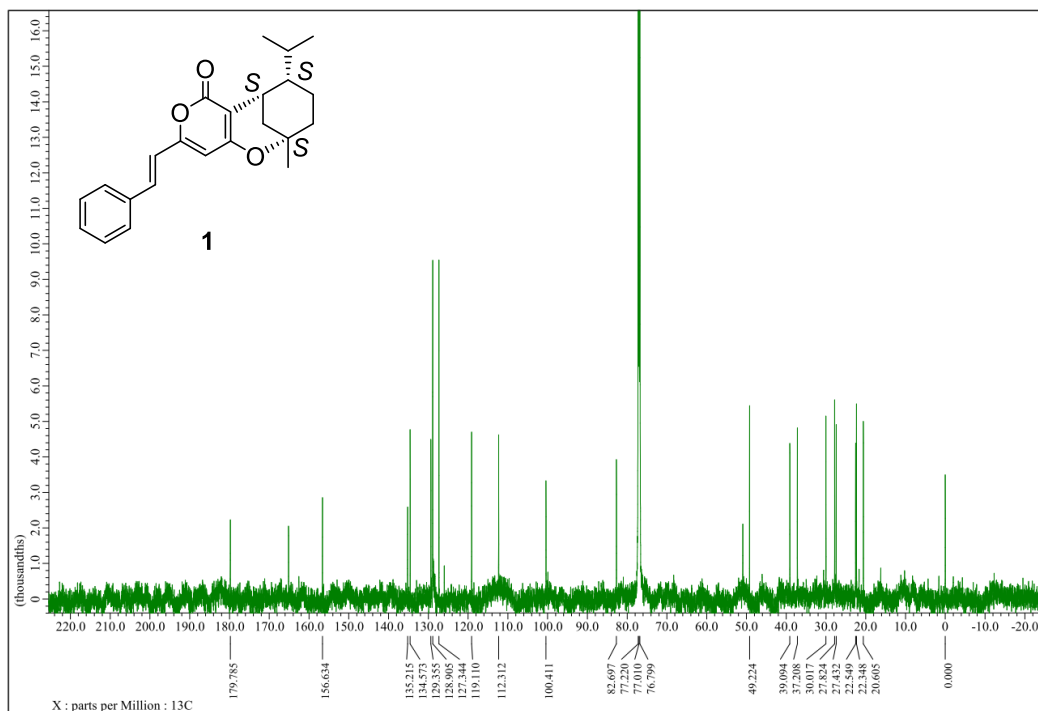
☒ 31 ¹H-NMR spectrum of **1** (Syn)



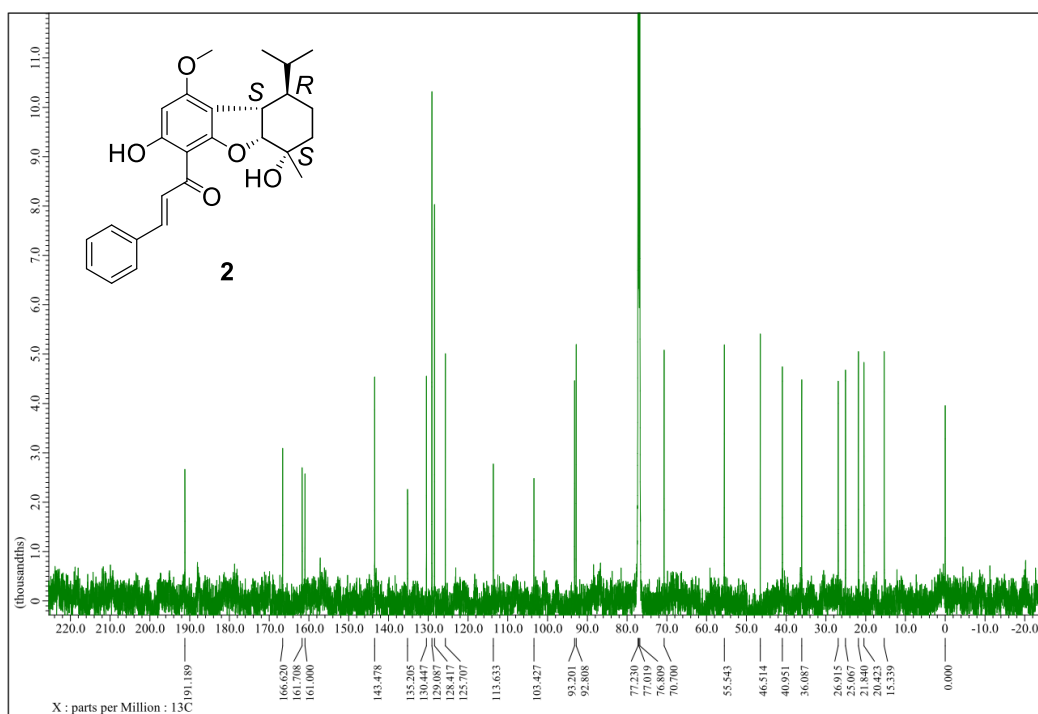
☒ 32 ^1H -NMR spectrum of **ent-1** (Syn)



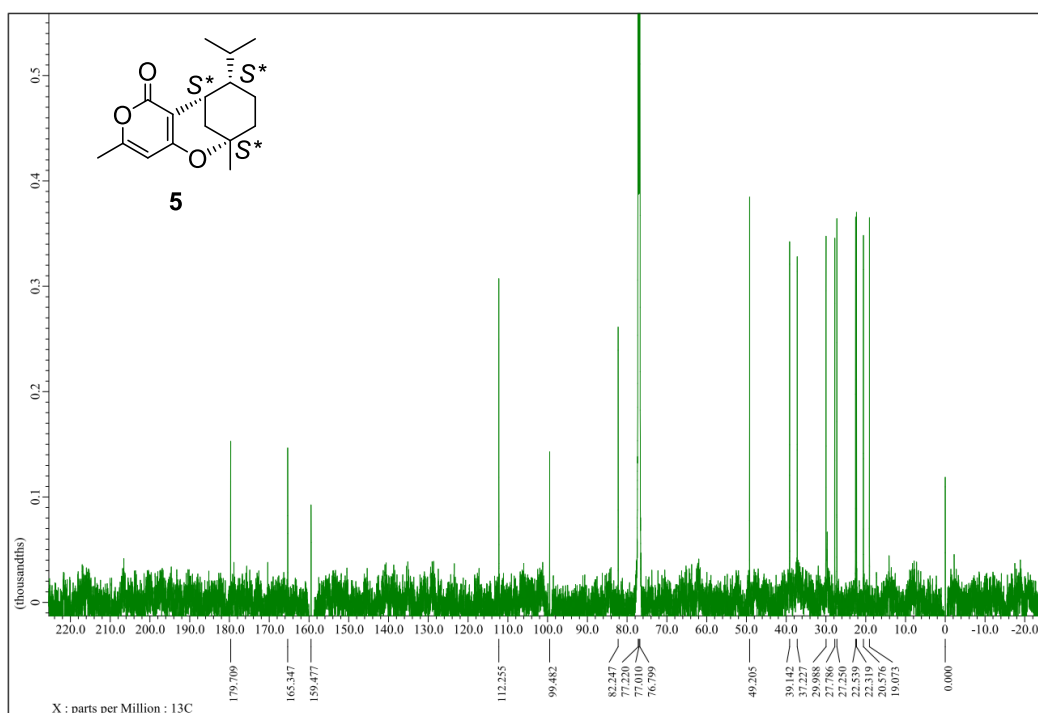
☒ 33 ^1H -NMR spectrum of **1a**



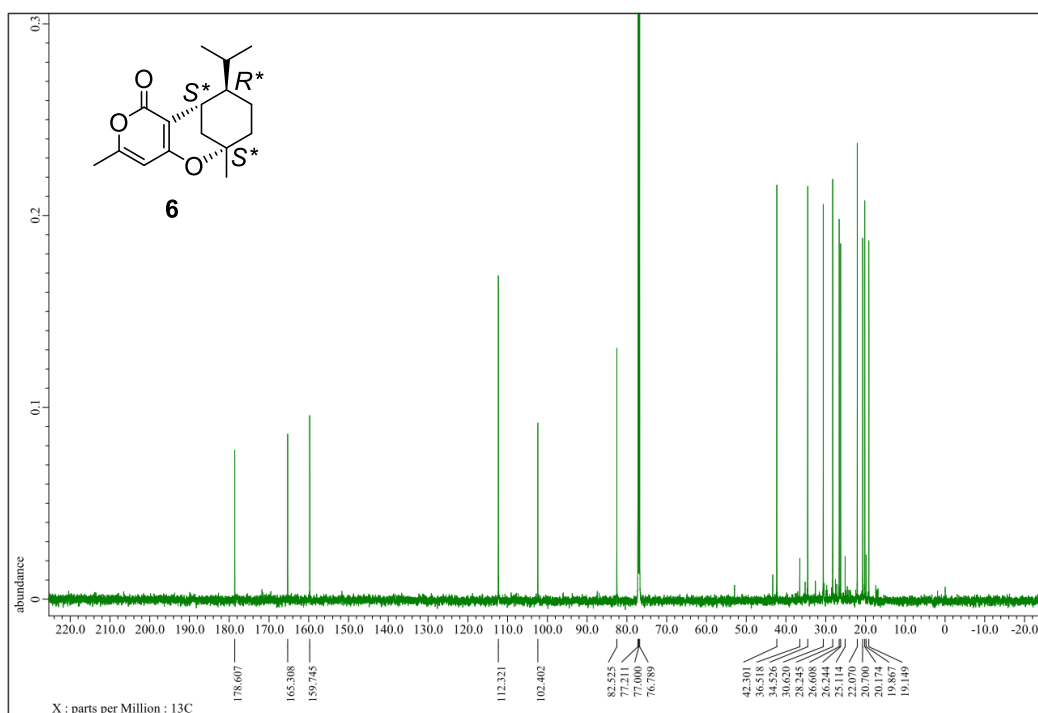
☒ 34 ^{13}C -NMR spectrum of **1**



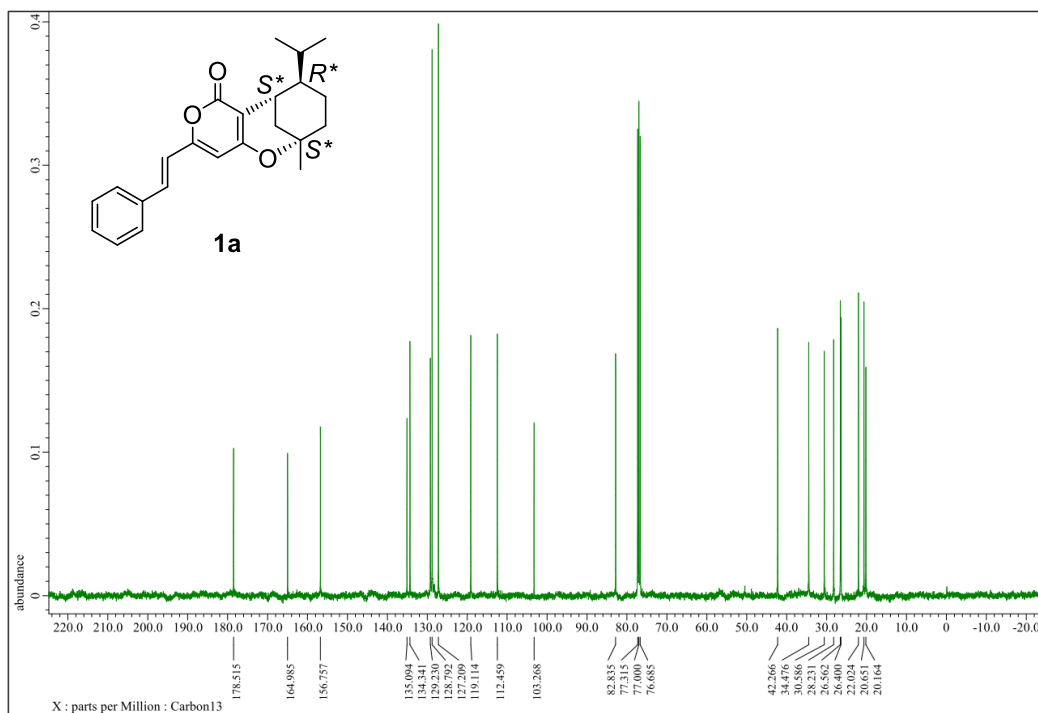
☒ 35 ^{13}C -NMR spectrum of **2**



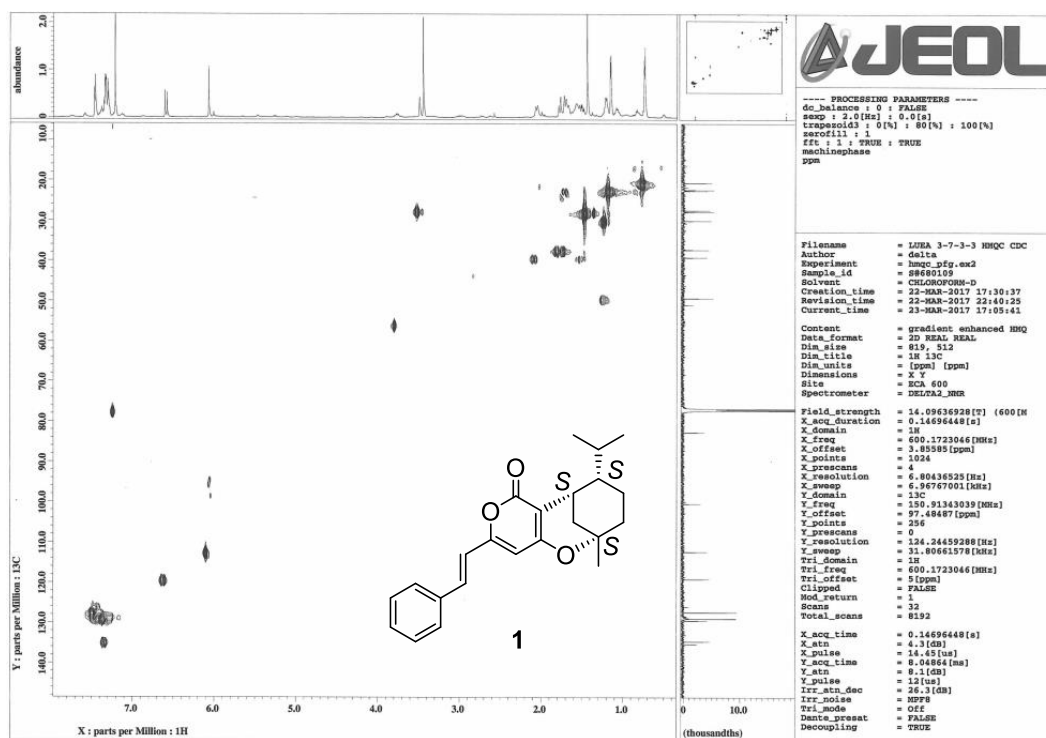
☒ 36 ^{13}C -NMR spectrum of **5**



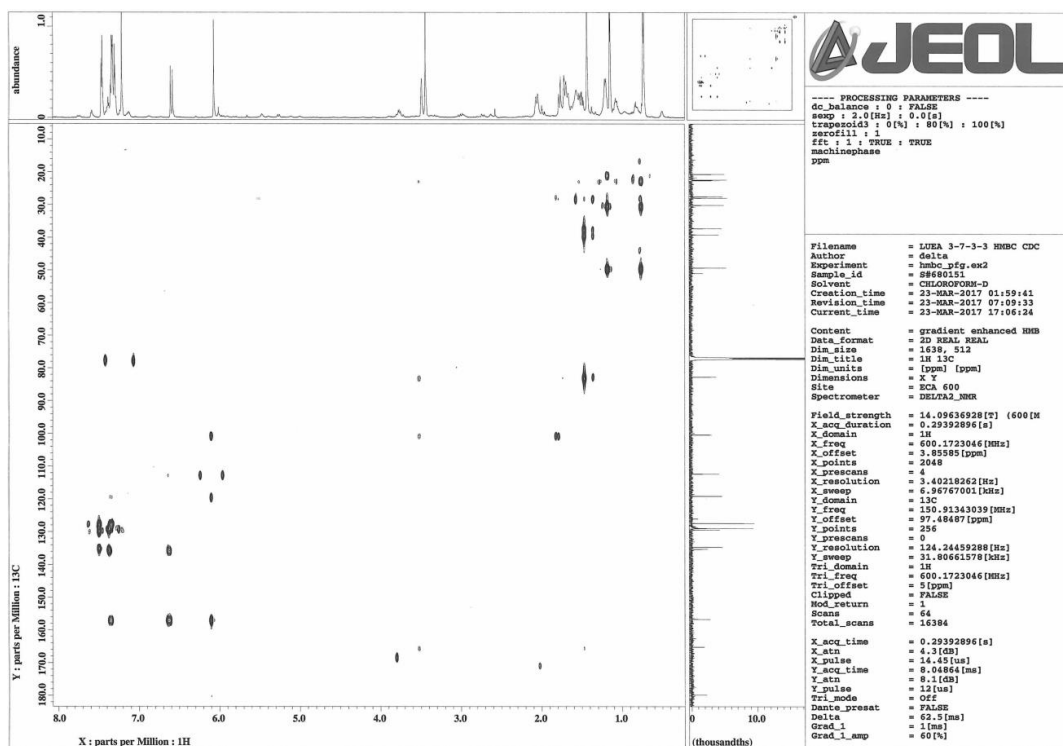
☒ 37 ^{13}C -NMR spectrum of **6**



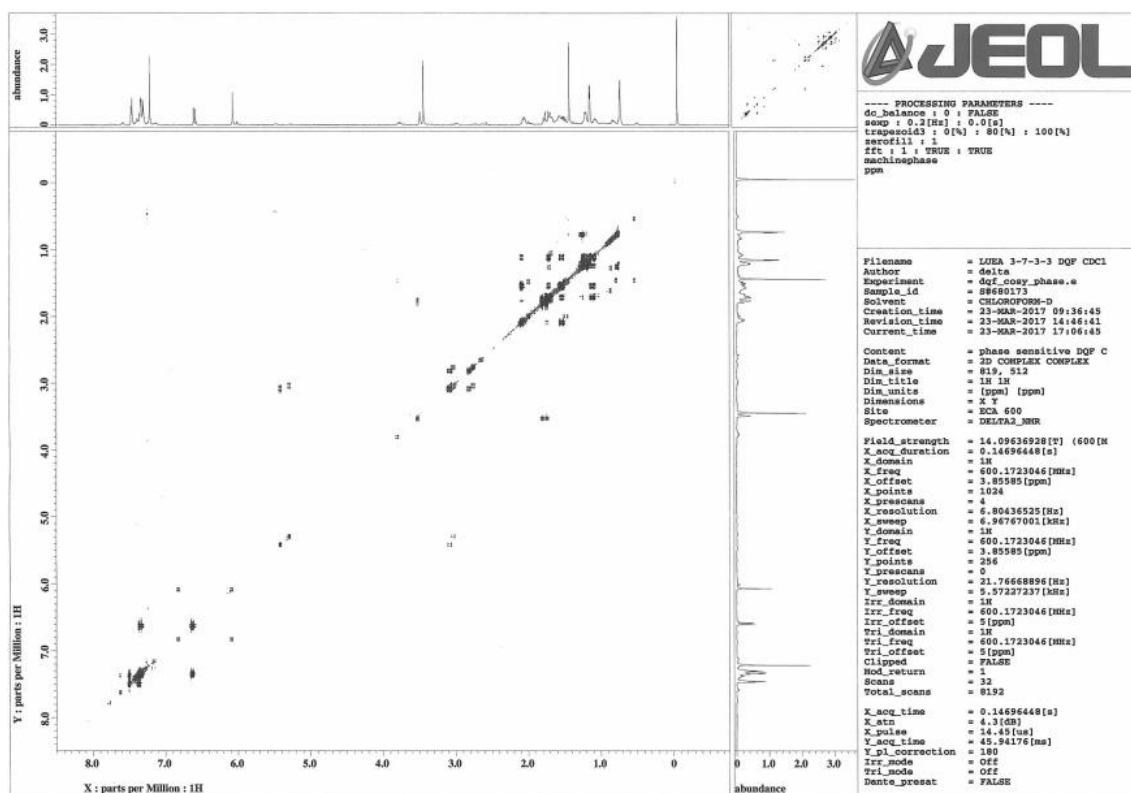
☒ 38 ^{13}C -NMR spectrum of **1a**



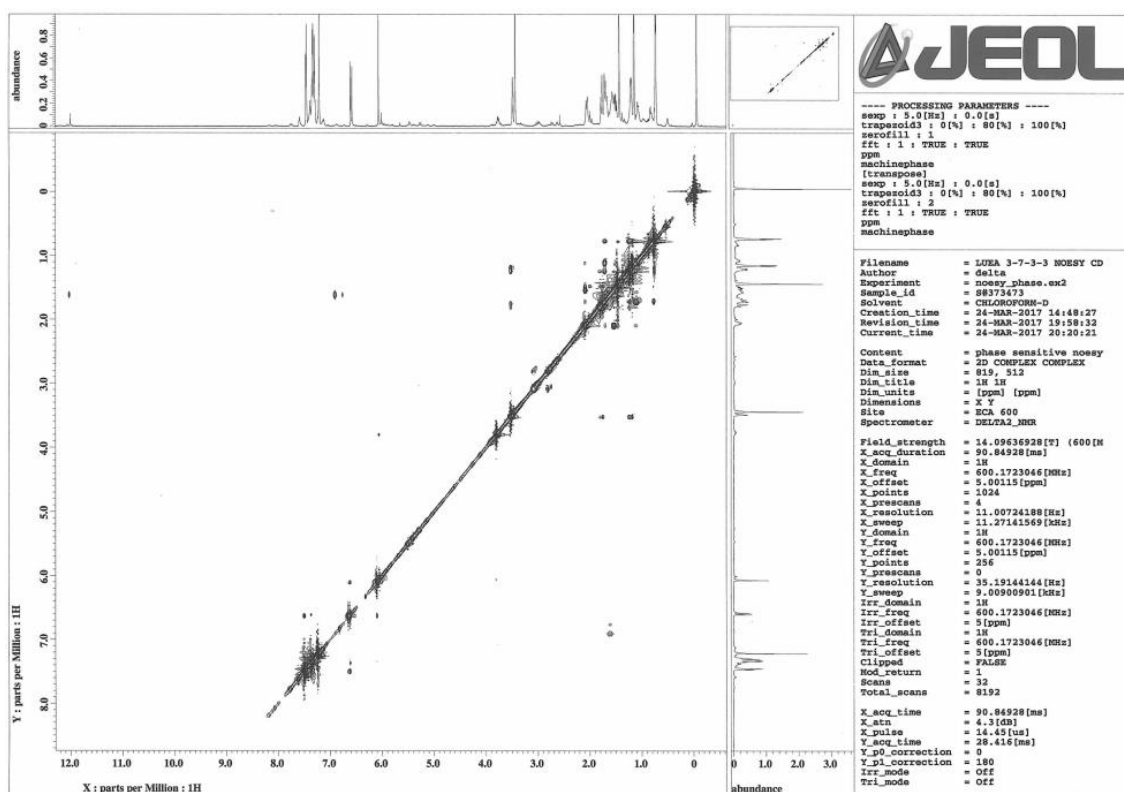
☒ 39 HMQC spectrum of **1**



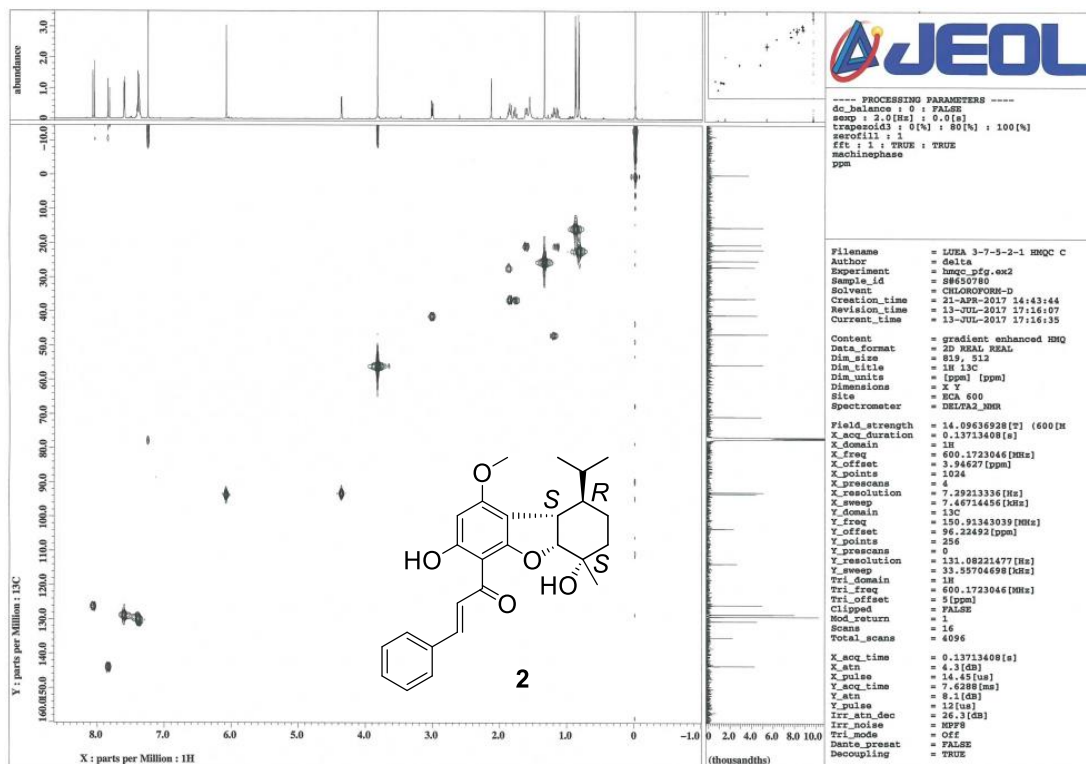
☒ 40 HMBC spectrum of 1



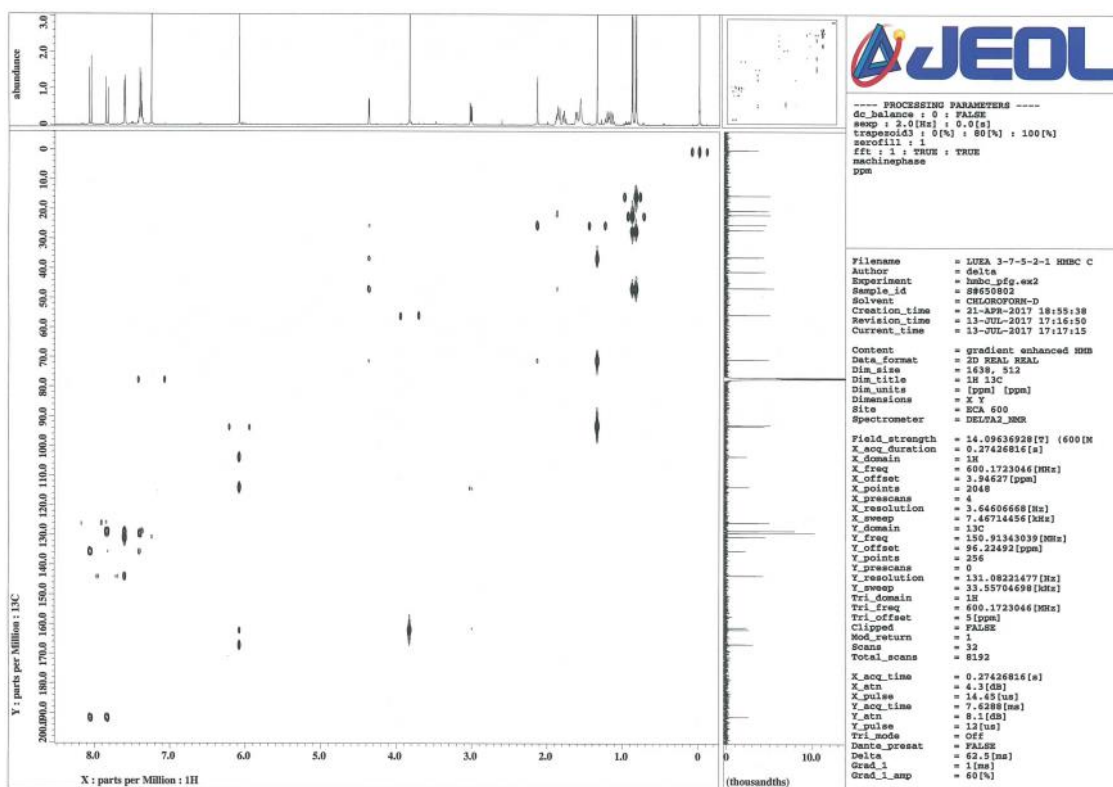
☒ 41 DQF spectrum of 1



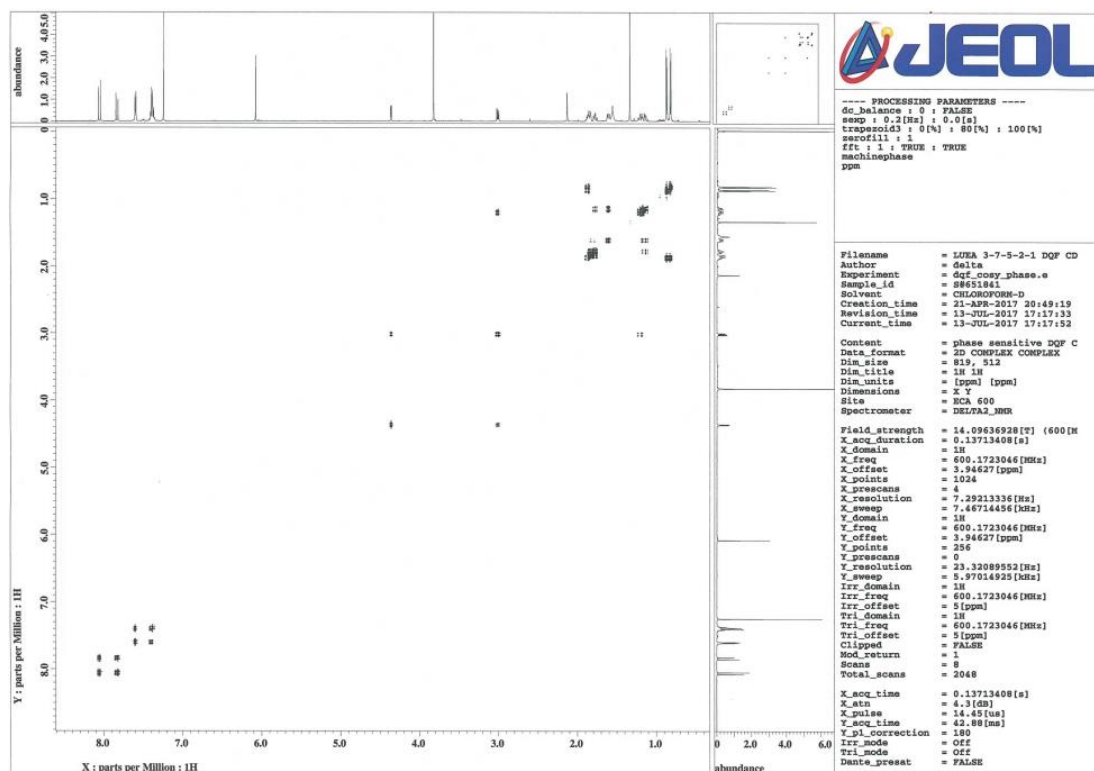
☒ 42 NOESY spectrum of 1



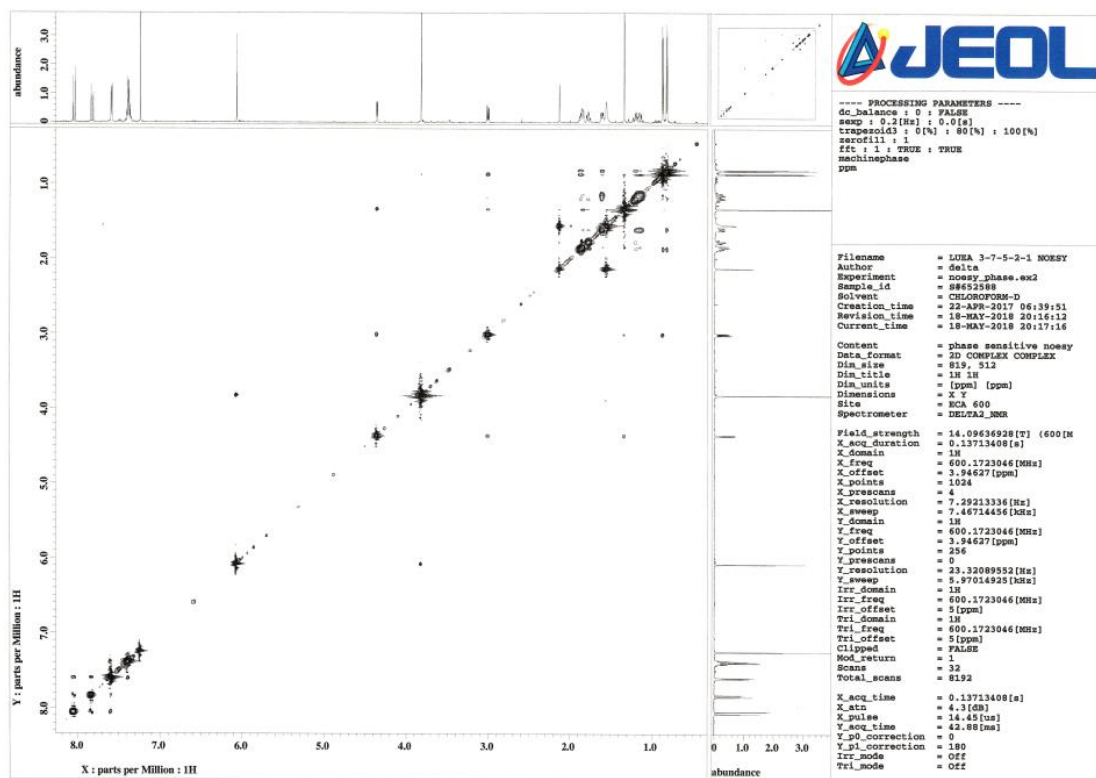
☒ 43 HMQC spectrum of 2



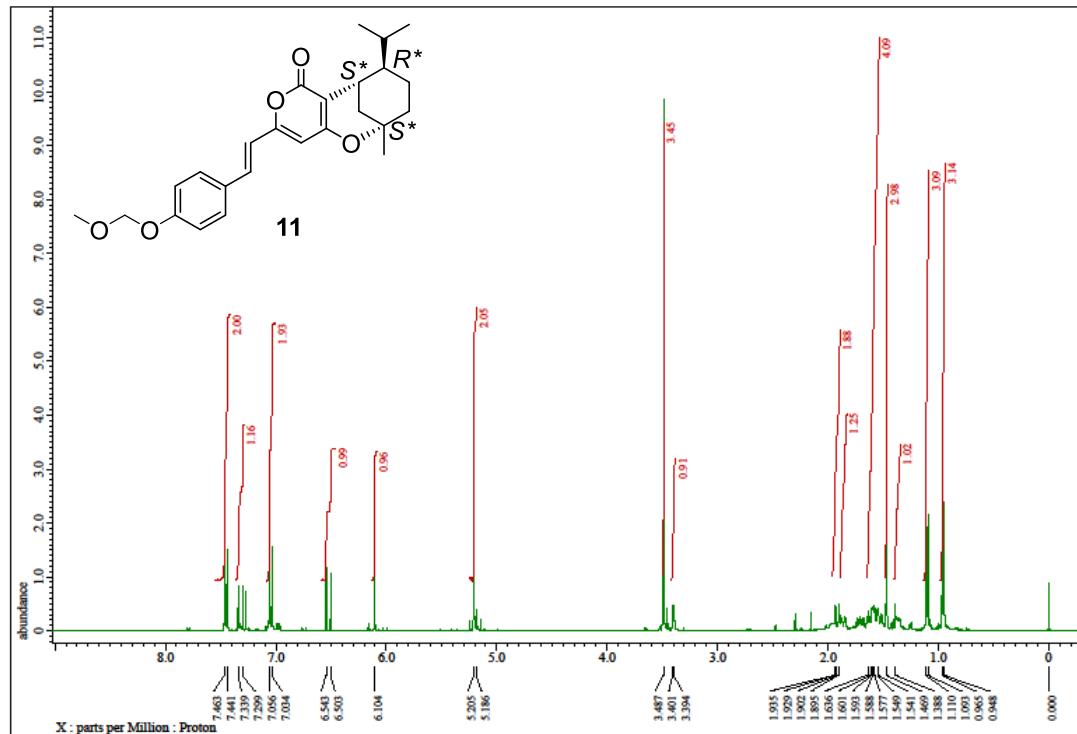
☒ 44 HMBC spectrum of 2



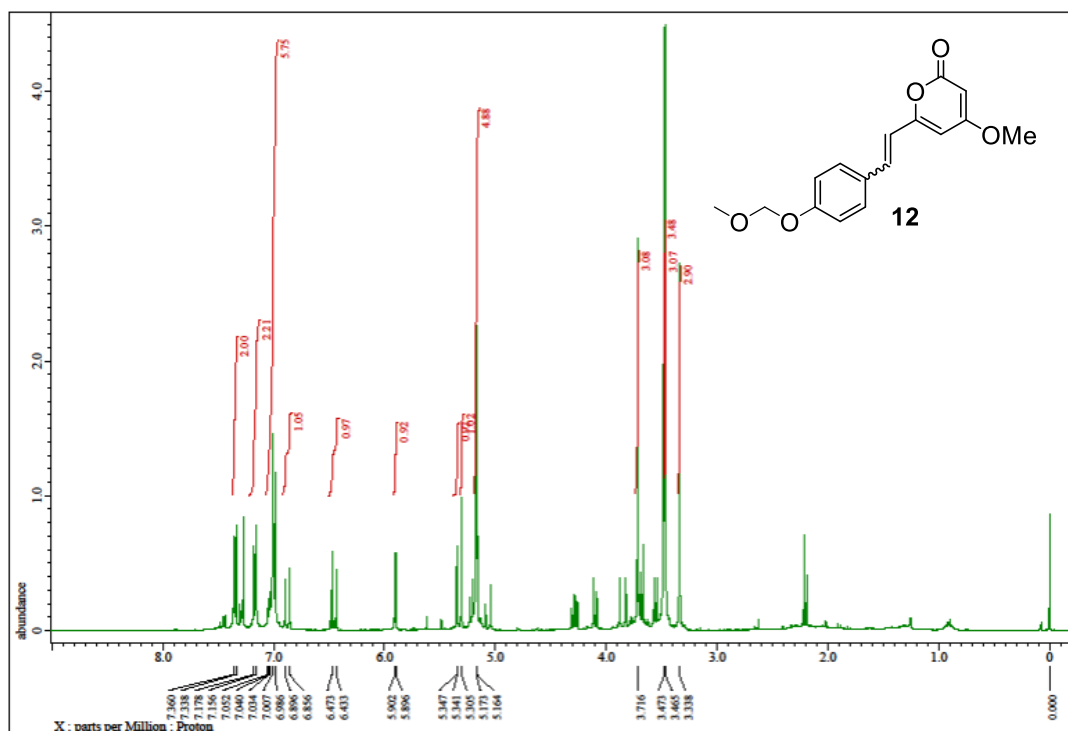
☒ 45 DQF spectrum of 2



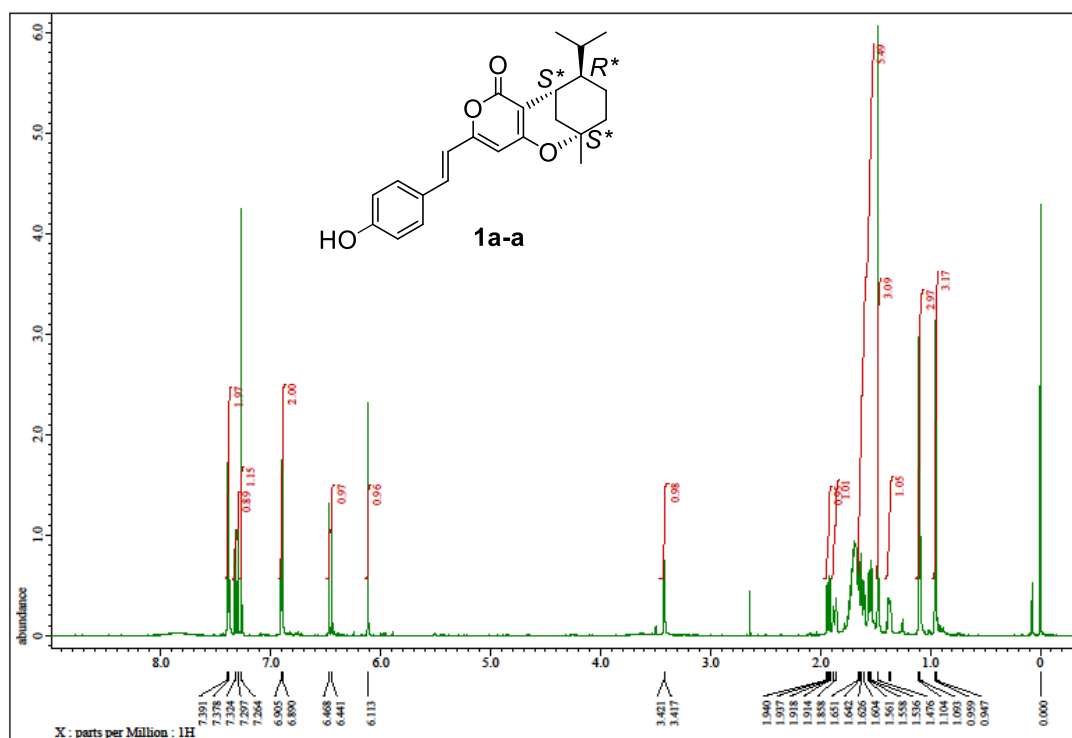
☒ 46 NOESY spectrum of **2**



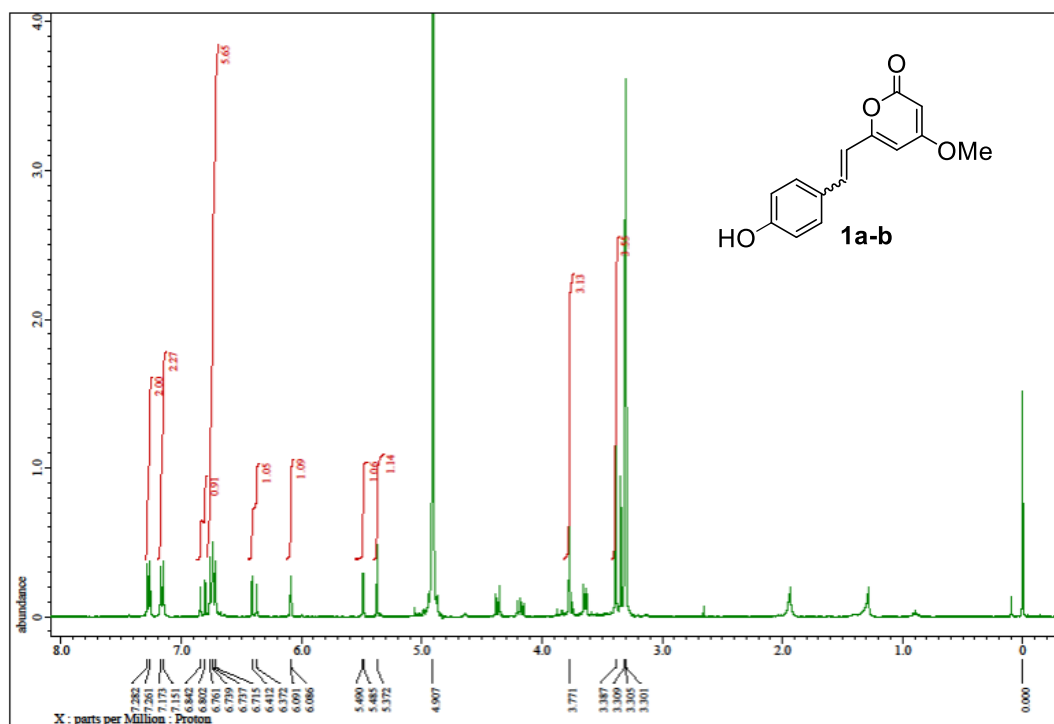
☒ 47 ¹H-NMR spectrum of **11**



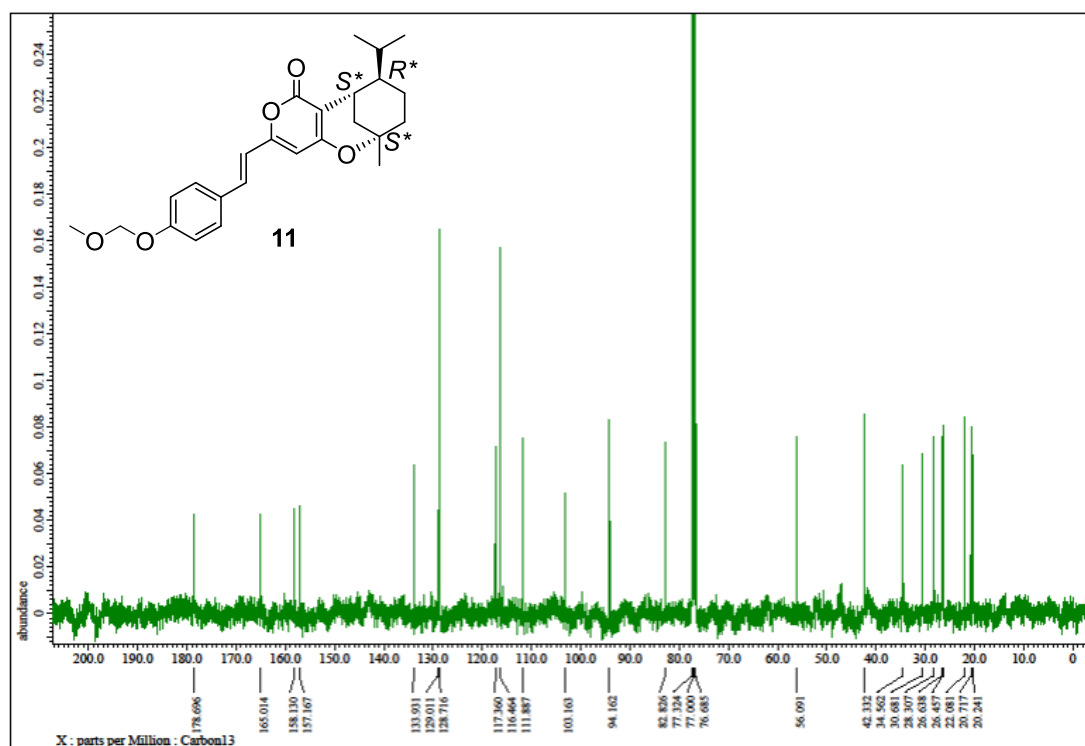
☒ 48 ¹H-NMR spectrum of **12**



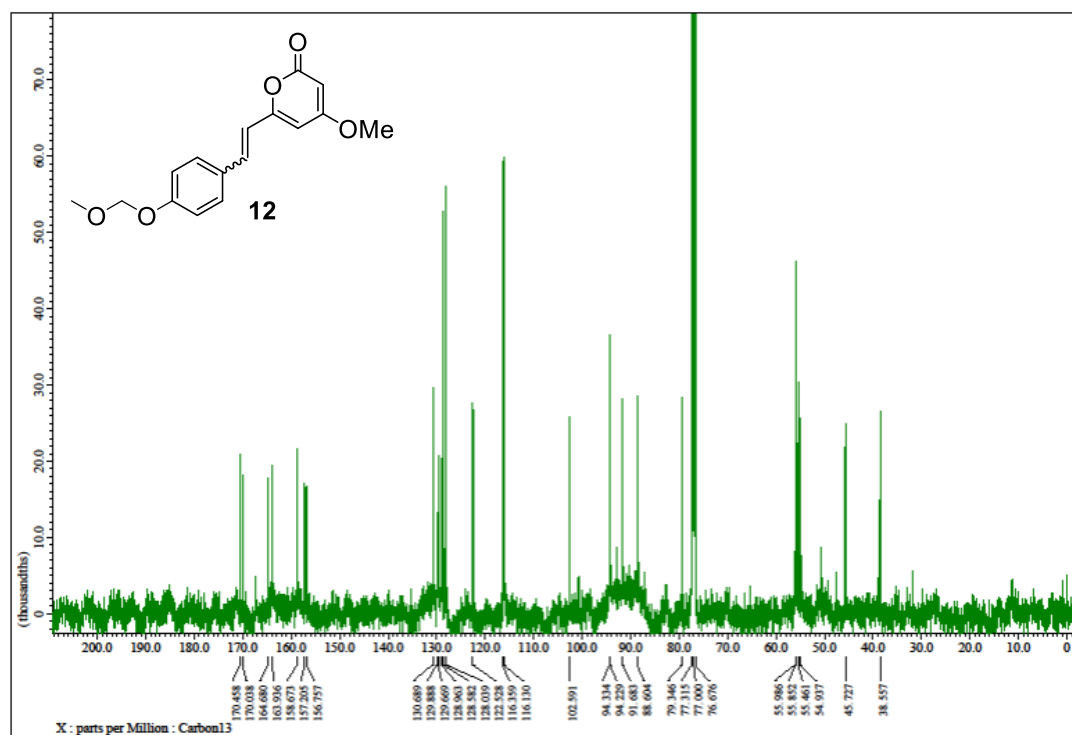
☒ 49 ¹H-NMR spectrum of **1a-a**



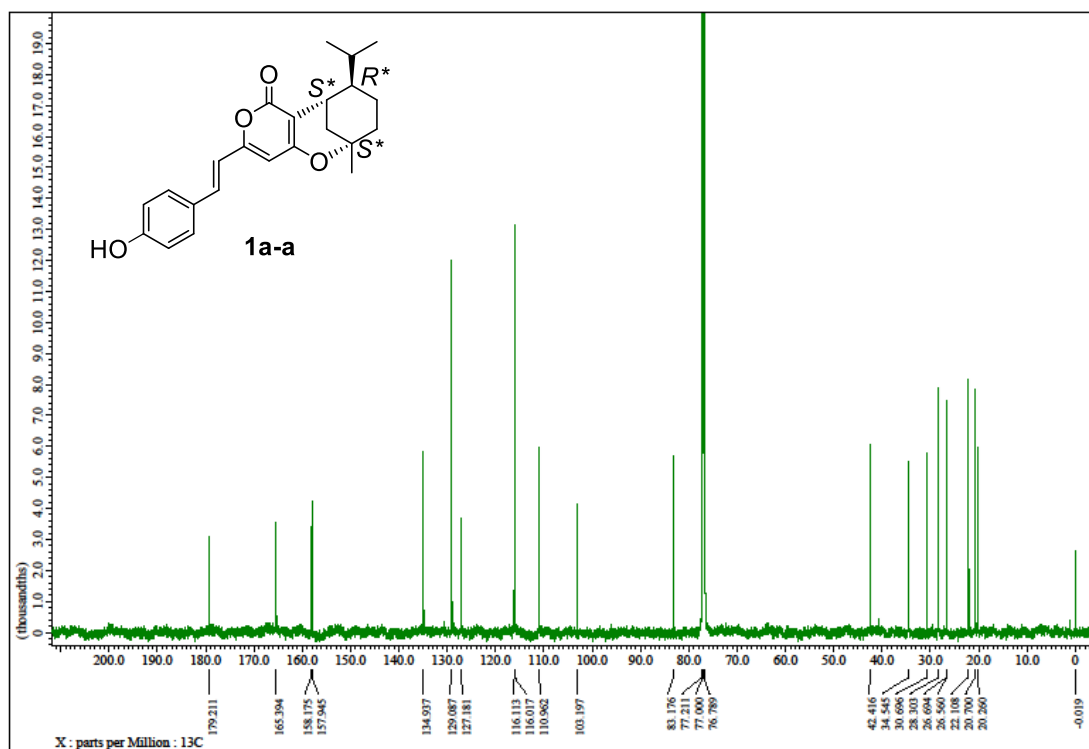
☒ 50 ¹H-NMR spectrum of **1a-b**



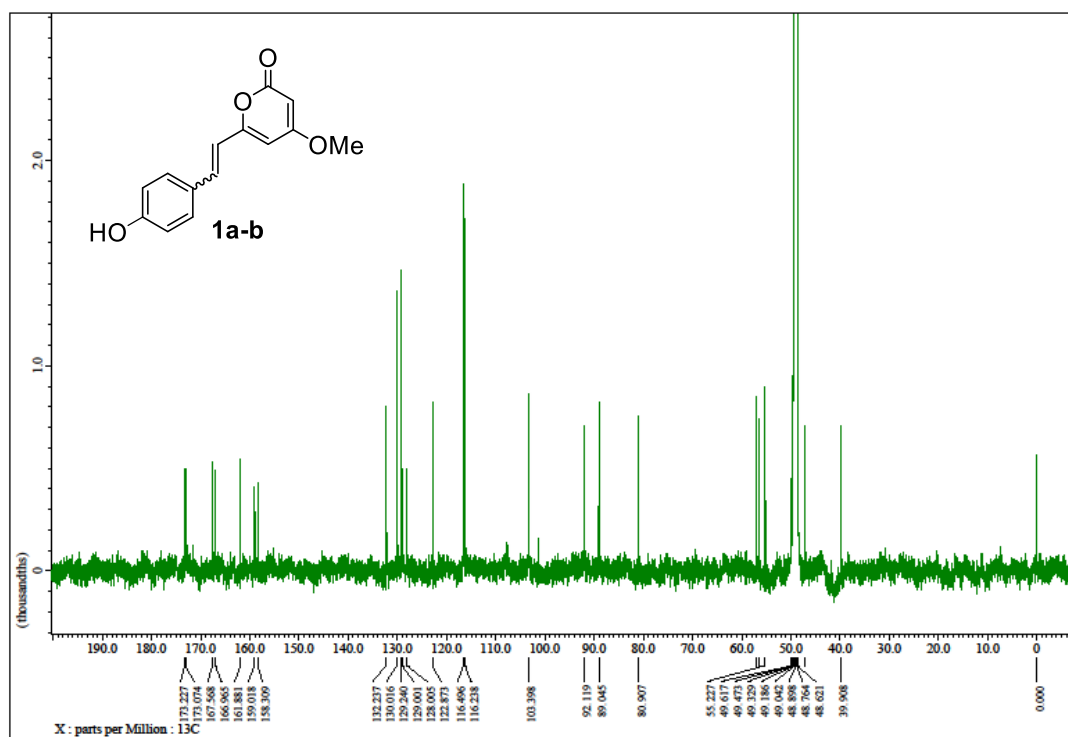
☒ 51 ¹³C-NMR spectrum of **11**



☒ 52 ^{13}C -NMR spectrum of **12**



☒ 53 ^{13}C -NMR spectrum of **1a-a**



☒ 54 ¹³C-NMR spectrum of **1a-b**