

令和元年6月14日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11519

研究課題名(和文)新規3-スチリルクロモン誘導体の口腔癌治療薬としての可能性に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic study of the possibility of newly synthesized 3-styrylchromone derivatives as therapeutic drugs for oral cancer

研究代表者

坂上 宏 (Sakagami, Hiroshi)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：50138484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多くの抗癌剤が高いケラチノサイト毒性を示した。新たに10グループ(計156化合物)のQSAR解析を行ったところ、クロモン誘導体の多くは、高い腫瘍選択性を与えること、2-(N-cyclicamino)chromonesに属する化合物5cは、ケラチノサイト毒性が低いこと、更に興味深いことに、アポトーシスを誘導しないことを突き止めた。今回の研究によりアポトーシス誘導能のない物質の中から副作用の少ない抗癌剤が創出できる可能性が示唆された。正常肝細胞と比較し、ヒト肝がん由来細胞に対する高い傷害性、そしてCYP3A4及びP-gpに対して有意な阻害活性を示した。消化器系がんの治療薬としての可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、自然界に存在するポリフェノールは、腫瘍選択性がそれほど高くないことを発表してきた。クロモン環が、フラボノイドの基本骨格であるため、生体に馴染みやすい。今回の研究により、クロモン誘導体の多くは、比較的高い腫瘍選択性を有すると同時に、上皮系細胞に対する毒性が、従来の抗癌剤よりも格段弱という特徴を有することが明らかになった。また、クロモン誘導体は、薬物代謝酵素や、薬物排出トランスポーターを阻害した。そのため、副作用の少ない抗癌剤治療薬の開発への寄与が期待される。また、アポトーシス誘導能がない化合物でも高い腫瘍選択性を示すため、新しい抗がん作用のメカニズムを発見できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The anticancer drug doxorubicin (DXR) was found to induce apoptosis in keratinocytes, and many other anticancer drugs showed high keratinocyte toxicity. QSAR analysis of 10 new groups (156 compounds in total) showed that most of the chromone derivatives gave high tumor-specificity, and the compound 5c belonging to 2-(N-cyclicamino) chromone has low keratinocyte toxicity and, more interestingly, it did not induce apoptosis. The present study suggested that an anticancer agent with few side effects can be manufactured from substances without apoptosis-inducing activity. Chromone derivative showed higher cytotoxicity against hepatocellular carcinoma cell line as compared with rat primary cultured hepatocyte, and inhibited the CYP3A4 and P-gp, suggesting the application to digestive cancer.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：クロモン環 腫瘍選択性 口腔扁平上皮癌細胞 アポトーシス 分子軌道解析 細胞周期 カスパーゼ-

1. 研究開始当初の背景

(1) クロモンの基本構造は、フラボンやイソフラボン等に見い出される。2-スチリルクロモンの論文はこれまで 12 編報告されているのに対して、3-スチリルクロモン類は自然界に存在しないため、合成法(引用文献)および、*in vitro* での抗腫瘍活性(引用文献 、)を調べた我々の論文しか報告されていない。

(2) 我々は、ヒト口腔正常細胞に対する 50%細胞傷害濃度(CC₅₀)の平均値を、ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する CC₅₀の平均値で割り算出した腫瘍選択係数(TS 値)を指標に、数百種の天然及び合成有機化合物の腫瘍選択性を評価した(引用文献)。ポリフェノール、抗酸化剤、レスベラトロール、クルクミンの腫瘍選択性は低いこと(TS=1~5)、15種の 3-styrylchromone 誘導体(平均 TS=14.9)は6種の 2-styrylchromone 誘導体(平均 TS=7.3)の約2倍の腫瘍選択性を示すこと、特に、クロモン環の6位炭素に OCH₃基が結合した3種の誘導体 (*E*)-6-methoxy-3-(4-methoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [4]、(*E*)-6-methoxy-3-(3,4,5-trimethoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [6]及び(*E*)-3-(4-hydroxystyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one [11]は、doxorubicin や 5-FU に匹敵する腫瘍選択性を示すことが明らかになった(引用文献)。我々は doxorubicin と 5-FU が、口腔ケラチノサイト に対して高い傷害活性を示すことを見出した(引用文献)。この3種の化合物の中で、最も高い腫瘍選択係数を示す [11]は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 において、早期(3h 後)にミトコンドリアの空胞化、オートファジー(LC3-II の発現)の阻害(4h 後)を、後期(23 時間後)にアポトーシス(PARP1 及び caspase-3 の切断)を誘導することを見出した(引用文献)。

2. 研究の目的

- (1) 我々は、上記[11]が抗癌剤に匹敵する腫瘍選択性を示すことを発見した。本研究は、このリード化合物のクロモン環の5~7位に種々の置換基を導入し、半経験的分子軌道法による活性構造の予測と検証を繰り返し、口腔扁平上皮癌細胞をより選択的に傷害する化合物を合成する。
- (2) さらに、置換基導入化合物により誘導される細胞死のタイプを特定するとともに、薬物代謝酵素に及ぼす影響を調べ、抗癌剤としての可能性についての基礎的な検討を行う。

3. 研究の方法

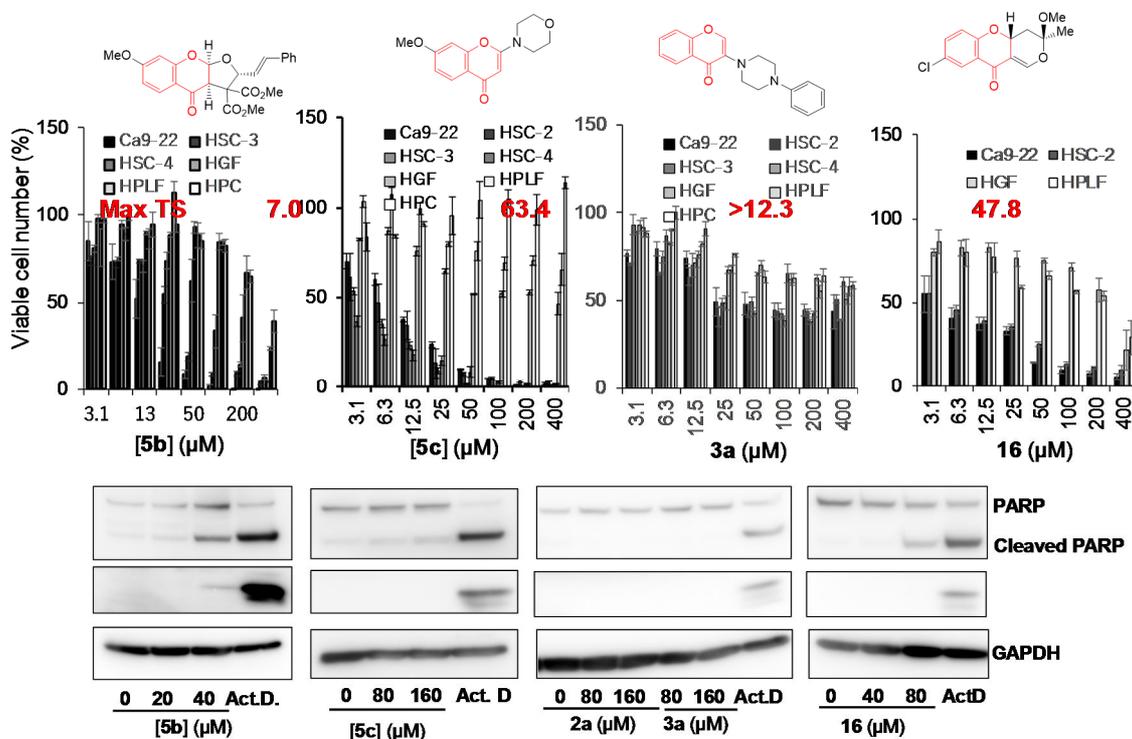
- (1) 有機合成：発表論文 ~ を参照(杉田、高尾)
- (2) 細胞毒性：ヒト口腔扁平上皮癌細胞(歯肉由来 Ca9-22、舌由来 HSC-2、HSC-3、HSC-4)、ヒト間葉系口腔正常細胞(歯肉線維芽細胞 HGF、歯根膜線維芽細胞 HPLF、歯髓細胞 HPC)、ヒト上皮系口腔正常細胞(HOK、HGEP)、ヒト肝がん由来細胞(HepG2)、正常肝細胞(ラット由来初代培養肝実質細胞)に対する傷害活性は、MTT 法で測定した。濃度依存性曲線より、50%細胞傷害濃度(CC₅₀)を算出した(須永、坂上)。
- (3) 腫瘍選択係数(TS)の算出：正常細胞に対する CC₅₀値の平均値を、癌細胞に対する CC₅₀値の平均で割り求めた。
- (4) アポトーシス誘導活性は、western blot 法(カスパーゼ-3の活性化)、cell sorter(sub G1 集団の割合)により測定した(奥平、坂東、友村)。
- (5) 分子軌道解析：約 3000 種類の物理化学的、構造的、量子化学的記述子は、force-field minimization で最適化された最安定化構造より計算した(永井、植沢)。
- (6) メタボローム解析及び統計処理：細胞を、5% D-mannitol で3回洗浄後、内部標準を含むメタノール 1 ml で抽出し、CE-TOFMS 解析を行った(杉本)。
- (7) 薬物代謝：CYP3A4、CYP2C9 及び CYP2D6 の阻害活性を HPLC 法にて測定し、P-gp 阻害活性は Pgp-Glo Assay kit (Promega) を用いて評価した(須永)。

4. 研究成果

(1) 3種 3-styrylchromone 誘導体 [4]、[6]及び[11]は、正常肝細胞と比較し、ヒト肝がん由来細胞に対する高い傷害性、そして CYP3A4 及び P-gp に対して有意な阻害活性を示した。消化器系がんの治療薬としての可能性を示した。

(2) 12種の Furo[2,3-*b*]chromone 類、15種の 2-(*N*-cyclicamino)chromones 類(15種)、15種の 3-(*N*-cyclicamino)chromon 類、20種の pyrano[4,3-*b*]chromone 類の各群の最大 TS 値は、7.0、63.4、>12.3、47.8 であった。最大の腫瘍選択性を示した物質は、いずれもアポトーシスを誘導しなかった。ヒト口腔ケラチノサイトに対する選択毒性は、ドキソルビシンの一桁低かった。

Group	Most active compd.	CC ₅₀ (μM)											TS					
		Human oral squamous cell carcinoma cell lines					Human mesenchymal normal oral cells				Human epithelial normal oral cells		Epi / Me (B/A)	Epi / Epi C/A	Apoptosis induction			
		Ca9-22	HSC-2	HSC-3	HSC-4	mean (A)	HGF	HPLF	HPC	mean (B)	HOK	HGFP				mean (C)		
Phenylpropanoid amides [1-12]	3	79	94	89	227	122	>400	>400	334	>378				>3.1				
Piperic acid-amides [1-12]	8	38	51	131	80	75	>800	>800	>800	>800				>10.7				
3-Styrylchromones [1-15]	11	2.1	1.0	3.6	1.2	2.0	67	74	272	138			19	>800	>410	69.0	>205.0	○
3-Styryl-2H-chromenes [1-16]	12	3.5	1.5	5.5	8.3	4.7	400	41	400	280			>400	>400	>400	59.9	>85.1	○
Oleoylamide [1-18]	8	2.0	0.2	0.1	0.2	0.6	2	18	9	10			3	0	1	15.5	2.3	
3-Flavones [1-10]	8	52	90	82	69	73	384	364	295	348			104	22	63	4.7	0.9	
3-Benzylidenechromones [1-17]	15	3.2	11.3			7.3	>400	>400		>400			4	3	4	>55.2	0.5	
Chalcones [1-15]	15	4.2	6.6	3.9	<3.1	<4.4	23	50	41	38						>8.6		○
Piperic acid esters [1-11]	4	5.5	27.6	21.6	13.4	17.0	118	151	138	136						8.0		○
Aurones [1-17]	7	36.5	57.2		30.5	41.4	>400	>400	>400	>400						>9.7		○
2-Azolychromones [1-24]	6c	1.6	1.3			1.5	36	35		36						24.1		○
Cinnamic acid phenetyl esters [1-10]	9	13.4	10.7	4.3	5.6	8.5	153	173	270	199						23.4		○
Furo[2,3-b]chromones [1-12]	5b	13.8		27.7	70.1	37.2	185	273	324	261						7.0		
2-(N-cyclicamino)chromone [1-15]	5c	9.1	6.0	3.7	3.1	5.5	244	>400	>400	>348			356	355.7		63.4	65.2	×
3-(N-cyclicamino)chromone [1-15]	3a	46.0	20.0	36.7	26.3	32.3	390	>400	>400	>397			>400	>400		>12.3	>12.4	×
Pyrano[4,3-b]chromones [1-20]	16	4.7	5.3			5.0	247	233		240			20	20		47.8	4.1	×
Total 239 compounds tested																		
5-FU		197	282	30	16	131	>1000	>1000	>1000	1000			370	23	197	>7.6	1.5	
DXR		0	0	0	0	0	5	8	6	6			1	0	0	35.4	2.2	
Melphalan		24	9	9	9	12	157	187	153	165						13.3	0.3	



T 値と関連のある化学的記述子は、それぞれ、「不飽和結合数・しなやかさ・分子密度・脂溶性・分子サイズ・分子形状」、「3次元形状」、「3次元形状・脂溶性」、「3次元形状・分極率・イオン化ポテンシャル・電気的な状態」であった。腫瘍選択性の高い化合物は、アポトーシス誘導活性を有しないこと、腫瘍選択性と3次元形状との間に高い相関がみられることが示唆された。

Furo[2,3-b]chromones	2-(N-cyclicamino)chromone	3-(N-cyclicamino)chromones	Pyrano[4,3-b]chromones
<i>Descriptor</i>	<i>Descriptor</i>	<i>Descriptor</i>	<i>Descriptor</i>
b_double Double bond	Mor22m 3D shape	CATS3D_12_LL Lipophilicity	R8s 3D shape , size and electric state
SlogP_VSA2 Size and lipophilicity	GCUT_SLOGP_1 Topological shape	VE3sign_G 3D shape	HATS7i 3D shape , size and ionization potential
rsynth Synthetic feasibility	Mor17v 3D shape and size	J_D/Dt Shape	HATS3i 3D shape , size and ionization potential
std_dim3 Shape	Mor17m 3D shape and size	FCASA- Shape and negative charge	HATS3u 3D shape and size
b_rotR Flexibility		CATS3D_11_LL Lipophilicity	HATS7u 3D shape and size
E_str Bond stretch		Chi_G/D 3D shape	Mor10i 3D shape and ionization potential

(3) メタボローム解析により、アポトーシスの誘導が起こる場合、ATPの利用が促進されることを見出した。ATPの利用は、アポトーシス誘導の判定に使用できる可能性が示唆された。

(4) 今後の方針

5cと11をリード化合物として用いて、より腫瘍選択性の高い化合物を合成するとともに癌細胞への取り込みを正常細胞と比較し、癌細胞に誘導される細胞死のタイプ、結合分子を明らかにする。メタボローム解析により、発現遺伝子や標的代謝経路を明らかにする。動物実験により抗癌剤としての可能性について検討する。

<引用文献>

Takao K, Ishikawa R, Sugita Y. Synthesis and biological evaluation of 3-styrylchromone derivatives as free radical scavengers and α -glucosidase inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 査読有 62(8), 2014, 810-815. PMID: 25087634

Sakagami H. Biological activities and possible dental application of three major groups of polyphenols. *J Pharmacol Sci* 査読有 126, 2014, 92-106. PMID: 25263279

Shimada C, Uesawa Y, Ishii-Nozawa R, Ishihara M, Kagaya H, Kanamoto T, Terakubo S, Nakashima H, Takao K, Sugita Y, Sakagami H. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of 3-styrylchromones. *Anticancer Res* 査読有 34, 2014, 1, 2014. PMID: 25275035

Sakagami H, Okudaira N, Masuda Y, Amano O, Yokose S, Kanda Y, Suguro M, Natori T, Oizumi H, Oizumi T. Induction of apoptosis in human oral keratinocyte by doxorubicin. *Anticancer Res*. 査読有 37(3), 2017, 1023-1029. DOI: 10.21873/anticancer.11412

Sakagami H, Shimada C, Kanda Y, Amano O, Sugimoto M, Ota S, Soga T, Tomita M, Sato A, Tanuma SI, Takao K, Sugita Y. Effects of 3-styrylchromones on metabolic profiles and cell death in oral squamous cell carcinoma cells. *Toxicol Rep*. 査読有 2, 2015, 1281-1290. doi: 10.1016/j.toxrep.2015.09.009.

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計 14 件)

Uesawa Y, Sakagami H, Kagaya H, Yamashita M, Takao K, Sugita Y. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of 3-benzylidenechromanones. *Anticancer Res* 査読有 36 (11), 2016, 5803-5812.

Sakagami H, Masuda Y, Tomomura M, Yokose S, Uesawa Y, Ikezoe N, Asahara D, Takao K, Kanamoto T, Terakubo S, Kagaya H, Nakashima H, Sugita Y. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of chalcones. *Anticancer Res* 査読有 37, 2017, 1091-1098.

Sugita Y, Takao K, Uesawa Y, Sakagami H. Search for new type of anticancer drugs with high tumor-specificity and less keratinocyte toxicity (Review). *Anticancer Res* 査読有 37(11), 2017, 5919-5924.

Sakagami H, Uesawa Y, Masuda Y, Tomomura M, Yokose S, Miyashiro T, Murai J, Takao K, Kanamoto T, Terakubo S, Kagaya H, Nakashima H, Sugita Y. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of newly synthesized piperic acid esters. *Anticancer Res* 査読有 37 (11), 2017, 6161-6168.

Uesawa Y, Sakagami H, Ikezoe N, Takao K, Kagaya H, Sugita Y. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of auronones. *Anticancer Res* 査読有 31(11), 2017, 6169-6176.

Sakagami H, Okudaira N, Uesawa Y, Takao K, Kagaya H, Sugita Y. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of 2-azolychromones. *Anticancer Res* 査読有 38(2), 2018, 763-770.

Uesawa Y, Sakagami H, Okudaira N, Toda K, Takao K, Kagaya H, Sugita Y. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of cinnamic acid phenetyl esters. *Anticancer Res* 査読有 38(2), 2018, 817-823.

Uesawa Y, Sakagami H, Shi H, Hirose M, Takao K, Sugita Y. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of furo[2,3-b]chromones. *Anticancer Res* 査読有 38(6), 2018, 3283-3290.

Shi H, Nagai J, Sakatsume T, Bandow K, Okudaira N, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Uesawa Y, Takao K, Sugita Y. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of 2-(N-cyclicamino)chromone derivatives. *Anticancer Res* 査読有 38(7), 2018, 3897-3906.

Shi H, Nagai J, Sakatsume T, Bandow K, Okudaira N, Uesawa Y, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Takao K, Sugita Y. Quantitative structure-cytotoxicity relationship of 3-(N-

cyclicamino)chromone derivatives. *Anticancer Res* 査読有 38, 2018, 4459-4467.
Nagai J, Shi H, Kubota Y, Bandow K, Okudaira N, Uesawa Y, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Takao K, Sugita Y. Quantitative structure–cytotoxicity relationship of pyrano[4,3-*b*]chromones. *Anticancer Res* 査読有 38, 2018, 4449-4457.
Sakagami H, Watanabe T, Hoshino T, Suda N, Mori K, Yasui T, Yamauchi N, Kashiwagi H, Gomi T, Oizumi T, Nagai J, Uesawa Y, Takao K, Sugita Y. Recent progress of basic studies of natural products and their dental application. *Medicines (Basel)*. 査読有 6(1), 2018, doi: 10.3390/medicines6010004.
Nagai J, Imamura M, Sakagami H, Uesawa Y. QSAR prediction model to search for compounds with selective cytotoxicity against oral cell cancer. *Medicines* 2019, 査読有 6(2), 2018, <https://doi.org/10.3390/medicines6020045>.
Sakagami H, Sugimoto M, Kanda Y, Murakami Y, Amano O, Saitoh J, Kochi A. Changes in metabolic profiles of human oral cells by benzylidene ascorbates and eugenol. *Medicines (Basel)*. 査読有 5(4), 2018, doi: 10.3390/medicines5040116.

[学会発表] (計 9 件)

植沢芳広、坂上宏、山下稔藻、高尾浩一、杉田義昭、3-Benzylidenechromanones の定量的構造-細胞傷害性相関解析、第 134 回日本薬理学会関東部会、国際医療、福祉大学薬学部、大田原市、栃木、2016.7
内田知里、小澤知佳、菊地秀与、高尾浩一、杉田義昭、坂上宏、津田整、須永克佳、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 に対する 3-styrylchromone 誘導体の抗腫瘍効果、日本薬学会第 138 年会、金沢、2018.3
坂上宏、植沢芳広、増田宜子、友村美根子、金本大成、寺久保繁美、宮城昂幹、村井淳一、高尾浩一、横瀬敏志、加賀谷肇、中島秀喜、杉田義昭、ピペリン酸エステル誘導体の構造活性相関：腫瘍選択性とアポトーシス誘導、第 137 回日本薬理学会関東部会、日本医科大学、東京、2017.10
植沢芳広、坂上宏、池添成彦、高尾浩一、加賀谷肇、杉田義昭、オーロン誘導体の定量的構造-細胞傷害性相関解析、第 137 回日本薬理学会関東部会、日本医科大学、東京、2017.10
植沢芳広、高尾浩一、杉田義昭、加賀谷肇、奥平准之、坂上宏、フラノクロモン誘導体の定量的構造-細胞傷害性相関解析、第 138 回日本薬理学会関東部会、慶応義塾大学薬学部、東京、2018.3
坂上宏、史海霞、永井純子、坂詰つかさ、坂東健二郎、奥平准之、植沢芳広、友村美根子、友村明人、高尾浩一、杉田義昭、3-(*N*-サイクリックアミノ)クロモン誘導体の定量的構造-細胞傷害性相関解析、第 139 回日本薬理学会関東部会、東京慈恵会医科大学、東京、2018.10
植沢芳広、史海霞、永井純子、坂詰つかさ、坂東健二郎、坂上宏、友村美根子、友村明人、高尾浩一、杉田義昭、2-(*N*-cyclicamino)chromone 誘導体の定量的構造-細胞傷害性相関解析、第 139 回日本薬理学会関東部会、東京慈恵会医科大学、東京、2018.10
永井純子、史海霞、久保田夕香、坂東健二郎、奥平准之、植沢芳広、坂上宏、友村美根子、友村明人、高尾浩一、杉田義昭、ピラノ[4,3-*b*]クロモン誘導体の定量的構造-細胞傷害性相関解析、第 139 回日本薬理学会関東部会、東京慈恵会医科大学、東京、2018.10
坂上宏、史海霞、坂東健二郎、友村美根子、友村明人、ヒト口腔扁平上皮癌に対する高い選択性と、低いケラチノサイト毒性を有する新規クロモン誘導体の創製、第 60 回歯科基礎医学会学術大会、2018.9 九州

[その他]

ホームページ等 Research map <http://researchmap.jp/read0025533/>
Orchid: <https://orcid.org/0000-0001-8001-2121>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

友村美根子(MINEKO TOMOMURA)
明海大学・保健医療学部・教授
研究者番号 30217559

杉本昌弘 (MASAHIRO SUGIMOTO)

慶應義塾大学・政策メディア研究科(藤沢)・特任教授
研究者番号 30458963

須永克佳(KATSUYOSHI SUNAGA)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号 70236040

杉田義昭(YOSHIAKI SUGITA)
城西大学・薬学部・教授
研究者番号 20255029

高尾浩一(KOICHI TAKAO)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号 70337484

植沢芳広(YOSHIHIRO UESAWA)
明治薬科大学・薬学部・教授
研究者番号 90322528

(2) 研究協力者

奥平准之(NORIYUKI OKUDIRA)
明海大学・歯学部・助教
研究者番号 10635585

坂東健二郎 (KENJIRO BANDOW)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号 50347093

永井純子(JUNKO NAGAI)
明治薬科大学・薬学部・助教
研究者番号 50828142