2018年

2018.11.7現在

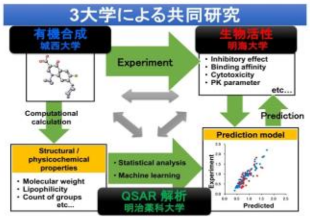
明海大学・城西大学・明治薬科大学との共同研究

第139回日本薬理学会関東部会 平成30年10月20日（土）東京慈恵会医科大学

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

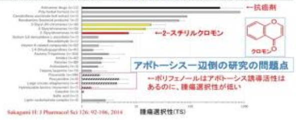
坂上宏、史海霞、永井純子、坂詰つかさ、坂東健二郎、奥平准之、植沢芳広、友村美根子、友村明人、高尾浩一、杉田義昭

3大学による共同研究



クロモン環誘導体の研究の歴史

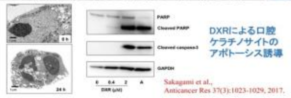
- 1990年、第3回Anticancer Research会議（ギリシャ、マラソン）で、明治薬科大学の名誉教授の本橋登先生と出会う。城西大学に知人が多い。
- 1997年、明海大学へ赴任、城西大学の横江一郎先生、杉田義昭先生（有機合成）と出会う。2ースチリルクロモン誘導体
- 日本薬理学会年会（横浜）で、明治薬科大学の植沢芳広先生（QSAR解析）と出会う。
- 歯科基礎医学会で、座長をしていた時の、発表者の日本歯科大学の呉黎先生と出会い、その高校生生時代のクラスメートの上海交通大学の史海霞先生の留学の受入。



Sakagami H: J Pharmacol Sci 126: 92-106, 2014

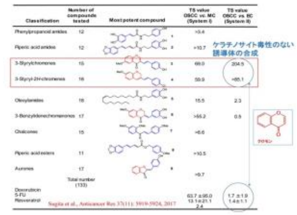
もう一つの問題点
古典的抗癌剤と分子標的治療薬は、ケラチノサイト毒性を有する。

	CC50 (μM)												TS	
	Human oral squamous cell carcinoma					Human oral normal cells								
						Mesenchymal cells				Epithelial cells			Mes.nor vs OSCC	Epi.Nor vs OSCC
	Ca9-22	HSC-2	HSC-3	HSC-4	mean (A)	HGF	HPLF	HPC	mean (B)	HOK	HGEP	mean (C)	(B/A)	(C/A)
CPT	<0.064	<0.064	<0.064	<0.064	<0.064	200.0	9.8	146.0	118.6	0.25	3.93	2.09	>1853	>33
SN-38	<0.064	<0.064	<0.064	<0.064	<0.064	143.0	29.3	15.7	62.7	<0.075	1.47	<0.77	>979	>12
DXR	0.13	0.06	0.09	0.06	0.09	7.3	1.3	9.3	6.0	0.13	0.17	0.15	70	1.7
DNR	0.27	0.07	0.13	0.09	0.14	4.9	10.0	8.2	7.7	<0.0039	0.41	<0.21	55	<1.5
ETP	11.27	3.00	2.67	2.47	4.85	351.3	500.0	500.0	450.4	1.80	3.17	2.48	93	0.5
MMC	3.97	0.36	0.14	0.78	1.31	22.0	65.0	34.3	40.4	0.10	0.28	0.19	31	0.1
MTX	8.97	0.19	<0.13	<0.13	<2.35	>400	>400	>400	>400	>1000	<0.13	>500	>170	>212
5-FU	15.27	100.33	166.33	82.67	86.65	>1000	>1000	>1000	>1000	12	14	13	>10	0.1
DOC	<0.032	<0.032	<0.032	<0.032	<0.032	89.7	89.7	80.7	86.7	0.12	0.032	0.076	>2700	>2.4
Melphalan	114.00	29.00	18.33	19.00	45.08	163.3	187.3	169.7	173.4	13.47	18.67	16.07	4	0.4
Gefitinib	18.00	22.33	15.67	13.67	17.42	57.7	68.3	83.0	69.7	3.47	4.10	3.78	4	0.2



DXRによる口腔ケラチノサイトのアポトーシス誘導

Sakagami et al., Anticancer Res 37(3):1023-1029, 2017.



Classification	Number of compounds tested	Most potent compound	TS value OSCC vs. MC (System I)	TS value OSCC vs. EC (System II)
Phenylpropanoid amides	12	1	>3.4	
Piperic acid amides	12	2	>10.7	
3-Styrylchromones	15	3	69.0	204.5
3-Styryl-2H-chromenes	16	4	59.9	>85.1
Oleoylamides	16	5	15.5	2.3
3-Benzylidenechromanones	17	6	>55.2	0.5
Chalcones	15	7	>6.6	
Piperic acid esters	11	8	>10.5	
Aurones	17	9	>9.7	
	Total number (133)			
Doxorubicin 5-FU Resveratrol			63.7 ±95.0 13.1±21.1 2.4	1.7 ±1.9 1.4±1.1

ケラチノサイト毒性のない誘導体の合成

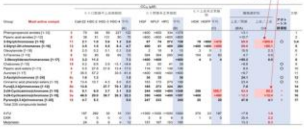
クロモン

Sugita et al., Anticancer Res 37(11): 5919-5924, 2017

17種類の化合物群の腫瘍選択性とケラチノサイト毒性

太字で示したクロモン誘導体が比較的高い腫瘍選択性を示した。

ケラチノサイト毒性が低い。



方法

◆細胞傷害性の測定（MMT法）
- ・ヒト口腔正常細胞（HGF、HPLF、HPC）
- ・ヒト口腔扁平上皮癌細胞（Ca9−22、HSC−2、HSC-3, HSC-4）

→それぞれに対する50%細胞傷害濃度（CC_{50}）を決定

◆TS値（tumor-specificity index）の算出

$$= \frac{\text{ヒト口腔正常細胞に対する}CC_{50}\text{の平均(D)}}{\text{ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する}CC_{50}\text{の平均(B)}}$$

◆PSE値（potency-selectivity expression）の算出

$$= \frac{D}{B^2} \times 100$$

◆細胞死の種類の同定（アポトーシス誘導の評価）

形態変化の観察、細胞周期解析、ウェスタンブロット法

◆定量的構造活性相関（QSAR）解析

- 各化合物をCorinaClassicにより最適化された最安定化構造（3D）へ変換
- 3,096種類の物理化学的・構造的・量子化学的特徴量（記述子）を算出
- 細胞傷害性（T、N、T-N）との相関を解析

> ➢T: 各腫瘍細胞のCC_{50}値の、負の常用対数（pCC_{50}）の平均値
> ➢N: 各正常細胞のpCC_{50}の平均値
> ➢T-N: TとNの差（＝logTS値）

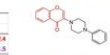
結果

3-(*N*-サイクリックアミノ)クロモン誘導体の細胞傷害性（CC_{50}）

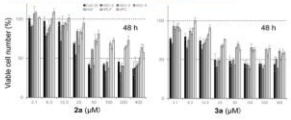
	CC50 (μM)												TS		PSE	
	Human oral squamous cell carcinoma cell lines						Human normal oral cells									
	Ca9-22 (A)	HSC-2	HSC-3	HSC-4	mean (B)	SD	HGF (C)	HPLF	HPC	mean (D)	SD		D/B	C/A	(D/B²)×100	(C/A²)×100
1a	335	251	268	360	299	46	380	398	>400	393	11		1.3	1.2	0.4	0.4
1b	300	296	278	370	311	41	330	358	323	337	18		1.1	1.1	0.3	0.4
1c	294	251	169	400	281	96	305	308	325	313	11		1.1	1.0	0.4	0.4
2a	42	31	88	48	50	24	338	>400	>400	>386	24		>7.7	8.4	>15.5	18.6
2b	50	22	209	85	92	83	272	181	221	225	45		2.4	5.4	2.7	10.7
2c	93	75	389	400	239	180	>400	>400	>400	>400	0		>1.7	>4.3	>0.7	>4.7
3a	46	28	37	38	32	11	390	>400	>400	>397	6		>12.3	8.5	>38.1	18.4
3b	36	8	178	65	71	74	390	288	317	332	54		4.7	11.3	6.6	32.7
3c	51	8	66	33	45	32	296	350	381	342	43		7.7	5.8	17.3	11.4
4a	>400	>400	350	>400	>388		>400	>400	>400	>400	0		><1.0	><1.0	><0.3	><0.3
4b	>400	>400	>400	>400	>400		>400	>400	>400	>400	0		><1.0	><1.0	><0.3	><0.3
4c	360	324	267	260	303	46	>400	>400	>400	>400	0		>1.3	>1.1	>0.4	>0.3
5a	>400	>400	>400	>400	>400		>400	>400	>400	>400	0		><1.0	><1.0	><0.3	><0.3
5b	>400	>400	>400	>400	>400		>400	>400	>400	>400	0		><1.0	><1.0	><0.3	><0.3
5c	316	>400	389	>400	>377		>400	>400	>400	>400	0		><1.1	>1.3	><0.3	>0.4
Doxorubicin	0.080	0.078	<0.078	<0.078	<0.080		>10	>10	6.50	>6.8			>85.6	>117.2	>107190.7	>137329.1
Melphalan	20	7	7	8	10	6	158	182	153	164	15		16.3	8.8	162.8	46.4

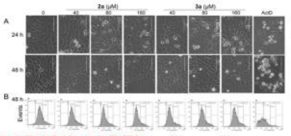
3aは腫瘍選択性が高く、かつ、DXRに比べてケラチノサイト毒性が10倍弱い。

	CC50 (mM)		
	OSCC (B)	HOK	TS
3a	32.3	400	12.4
Doxorubicin	0.08	0.119	1.5



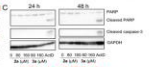
2a, 3aいずれもcytostaticな増殖阻害を示した。





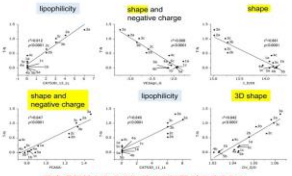
SubG1期の細胞はなし、G1とS期が増加

	Cells in phase (%)							
		2a (μM)			3a (μM)			
	Control	40	80	160	40	80	160	ActD
SubG1	4.7	3.6	5.7	5.2	4.9	5.3	4.2	50.9
G1	74.1	74.5	76.9	77.4	74.3	76.3	76.1	40.6
S	18.7	18.8	15.7	16.0	18.2	16.1	17.9	7.3
G2+M	3.3	4.8	3.0	2.7	4.2	3.8	3.4	1.8



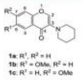
アポトーシスを誘導しない。

平均pCC_{50}（腫瘍細胞ー正常細胞）との相関

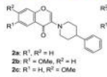


腫瘍選択性と分子の形状との相関が示唆された。

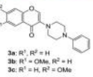
3-(*N*-サイクリックアミノ)クロモン誘導体



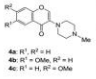
1a: R¹, R² = H
1b: R¹ = OMe, R² = H
1c: R¹ = H, R² = OMe



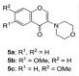
2a: R¹, R² = H
2b: R¹ = OMe, R² = H
2c: R¹ = H, R² = OMe



3a: R¹, R² = H
3b: R¹ = OMe, R² = H
3c: R¹ = H, R² = OMe



4a: R¹, R² = H
4b: R¹ = OMe, R² = H
4c: R¹ = H, R² = OMe



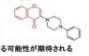
5a: R¹, R² = H
5b: R¹ = OMe, R² = H
5c: R¹ = H, R² = OMe

抗腫瘍活性を系統的に調査した報告例は存在しない

考察・結論

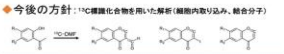
◆化合物3aは、15種類の3-(N-サイクリックアミノ)クロモン誘導体中、最大のTS値とPSE値を示す
- Melphalanと同等なTS値、DXRよりも弱いケラチノサイト毒性

◆化合物3aはアポトーシス誘導しない



- 腫瘍選択性とアポトーシス誘導活性は関連しない可能性
- 3aを化学修飾した物質は新たな抗癌剤の候補化合物となる可能性が期待される

◆今後の方針：^{13}C標識化合物を用いた解析（細胞内取り込み、結合分子）



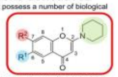
Shi H, Nagai J, Sakatsume T, Bandow K, Okudaira N, Uesawa Y, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Takao K and Sugita Y: Quantitative structure–cytotoxicity relationship of 3-(*N*-cyclicamino)chromone derivatives. Anticancer Res 38: 4459-4467, 2018

2-(N-cyclicamino)chromone誘導体の定量的構造 - 細胞傷害性相関解析

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 derivatives

are a sub-set of the chromone family that possess a number of biological activities.



Previous study
① Anti-cancer activity
② Anti-microbial activity
③ Modulation of DNA repair
④ Anti-inflammatory activity, etc.

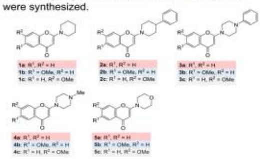
Due to their high availability, simple synthesis and generally low toxicity, aminochromone could be attractive candidates for safer cancer drugs.

However, only limited information is available on the cytotoxicity and tumor specificity of 2-(N-cyclicamino)chromone derivatives.

In the present study,
we have investigated 2-(N-cyclicamino)chromone derivatives for their cytotoxicity and tumor-specificity, and then subjected to QSAR analysis.

Materials and Methods

Fifteen 2-(N-cyclicamino)chromone derivatives were synthesized.



Materials and Methods

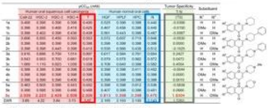
Cytotoxicity was assayed by MTT methods.

- Human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines
  - ➢ Ca9-22
  - ➢ HSC-2
  - ➢ HSC-3
  - ➢ HSC-4
- Human oral normal cells
  - ➢ HGF (gingival fibroblasts)
  - ➢ HPLF(periodontal ligament fibroblast)
  - ➢ HPC (pulp cells)

Tumor-specificity index (TS)
= CC_{50} against normal oral cells / CC_{50} against tumor cells

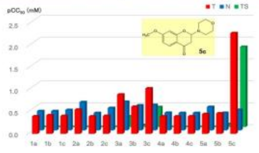
Assay Results

Tumor-specificity
of fifteen 2-(N-cyclicamino)chromone derivatives

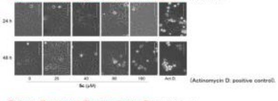


Each value represents the mean of triplicate determinations.

Assay Results



Production of enlarged cell population by 5c in HSC-2 cells



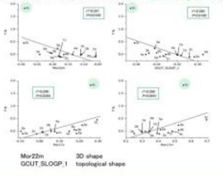
(Actinomycin D: positive control).

Failure of caspase-3 activation by 5c in HSC-2 cells

PARP
Cleaved PARP
Cleaved caspase-3
GAPDH
0 80 160 Act D
[5c] (μM)

HSC-2 cells were incubated for 24 h with the indicated concentrations of 5c or 1 μM actinomycin D.

Determination coefficients between Chemical Descriptors and Tumor Specificity (T – N)

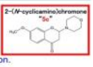


Mor22m 3D shape
GCUT_SLOGP_1 topological shape

Conclusion

- "5c" showed the highest tumor-specificity, comparable with that of doxorubicin.
- "5c" did not induce apoptotic cell death
  - (i) it induced cell enlargement.
  - (ii) it did not activate caspase-3.
  - (iii) it did not produce sub G1 population.
- Tumor specificity was reflected by molecular shape, especially 3D-shape.

2-(*N*-cyclicamino)chromone "5c"



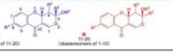
Chemical modification using "5c" as a lead compound may be a potential choice for designing a new type of anticancer drugs.

Quantitative Structure-Cytotoxicity Relationship of Aurones: HAIXIA SHI et al., *Anticancer Res.* 2018, 38:3897-3906.

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

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

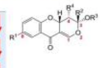
ピラノ[4,3-*b*]クロモン誘導体



Compound A	Compound B	R¹	R²	R³	R⁴	Fomula	MW
1	11	H	H	Et	H	$C_{14}H_{14}O_4$	246
2	12	H	H	Bu	H	$C_{16}H_{18}O_4$	274
3	13	H	Me	Me	H	$C_{14}H_{14}O_4$	246
4	14	Cl	H	Et	H	$C_{14}H_{13}ClO_4$	280.5
5	15	Cl	H	Bu	H	$C_{16}H_{17}ClO_4$	308.5
6	16	Cl	Me	Me	H	$C_{14}H_{13}ClO_4$	280.5
7	17	OMe	H	Et	H	$C_{15}H_{16}O_5$	276
8	18	OMe	H	Bu	H	$C_{17}H_{20}O_5$	304
9	19	OMe	Me	Me	H	$C_{15}H_{16}O_5$	276
10	20	H	H	—(CH₂)₃—		$C_{15}H_{14}O_4$	258

ピラノクロモン誘導体の細胞傷害性（CC_{50}）

	R¹	R²	R³	R⁴	扁平上皮癌細胞 平均CC50	正常細胞 平均CC50
1	H	H	Et	H	282	>400
2	H	H	Bu	H	146	>394
3	H	Me	Me	H	30	257
4	Cl	H	Et	H	>357	>400
5	Cl	H	Bu	H	155	>400
6	Cl	Me	Me	H	37	167
7	OMe	H	Et	H	158	>399
8	OMe	H	Bu	H	153	>396
9	OMe	Me	Me	H	14	95
10	H	H	—(CH₂)₃—		82	297
11	H	H	Et	H	109	307
12	H	H	Bu	H	58	266
13	H	Me	Me	H	20	150
14	Cl	H	Et	H	73	220
15	Cl	H	Bu	H	32	211
16	Cl	Me	Me	H	5	240
17	OMe	H	Et	H	12	>352
18	OMe	H	Bu	H	56	300
19	OMe	Me	Me	H	15	129
20	H	H	—(CH₂)₃—		202	>394



- ・R³: Et→Bu
- ・R³: Et→Meかつ
- ・R²: H→Me
- ・R¹: Cl、OMeを導入

↓
CC_{50}値が減少する傾向

細胞傷害性（CC_{50}）と腫瘍選択性（TS値・PSE値）

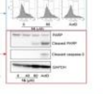
	ヒト口腔扁平上皮癌細胞			ヒト口腔正常細胞			TS		PSE	
	Ca9-22	HSC-2	mean	HGF	HPLF	mean				
	A		B	C		D	D/B	C/A	(D/B²)×100	(C/A²)×100
1	194	369	282	>400	>400	>400	>1.4	>2.1	>0.6	>1.1
2	105	187	146	>400	>387	>394	>2.7	>3.8	>1.9	>3.7
3	28	32	30	245	270	257	8.6	8.7	28.7	31.2
4	313	>400	>357	>400	>400	>400	><1.1	>1.3	><0.3	>0.4
5	74	237	155	>400	>400	>400	>2.6	>5.4	>1.7	>7.3
6	33	41	37	142	192	167	4.6	4.3	12.4	13.2
7	142	175	158	>400	>398	>399	>2.5	>2.8	>1.6	>2.0
8	84	221	153	>391	>400	>396	>2.6	>4.6	>1.7	>5.5
9	12	15	14	88	103	95	7.0	7.1	51.6	57.1
10	68	95	82	347	246	297	3.6	5.1	4.4	7.5
11	103	115	109	340	273	307	2.8	3.3	2.6	3.2
12	42	75	58	288	244	266	4.5	6.8	7.8	16.5
13	16	24	20	175	125	150	7.6	11.2	38.8	72.0
14	52	93	73	294	146	220	3.0	5.7	4.2	10.9
15	21	43	32	182	240	211	6.6	8.5	20.5	39.5
16	4.7	5.3	5	247	233	240	47.8	52.6	953.0	1116.2
17	11.1	13.9	12	>386	318	>352	>28.2	>34.9	>225.9	>315.4
18	35	76	56	316	285	300	5.4	9.1	9.7	26.1
19	15	15	15	142	117	129	8.6	9.5	57.2	63.8
20	137	267	202	>397	391	>394	>1.9	>2.9	>1.0	>2.1
5-FU	31	198	115	>1000	>1000	>1000	>8.7	31.8	>7.6	101.2
Melphalan	29	10	20	182	182	182	9.2	6.2	46.9	21.4
Doxorubicin	0.33	0.08	0.21	>10	>10	>10	>48.5	>30.4	>23488.8	>9220.0

化合物16の腫瘍選択性とアポトーシス誘導

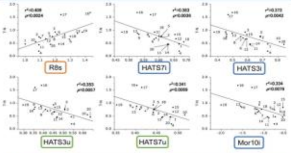
◆ヒト口腔ケラチノサイトを用いた評価

	CC50 (μM)		
	ヒト口腔 扁平上皮癌細胞	ヒト口腔 ケラチノサイト	TS
16	5	20.3	4.1
Doxorubicin	0.21	0.119	0.6

◆アポトーシス誘導の評価
- ・形態変化の観察：HSC-2細胞
  →化合物16の濃度依存的に肥大
- ・細胞周期解析
  →sub-G1期の割合は増加しない
- ・ウェスタンブロット法
  →カスパーゼ-3の活性化は認められない



平均pCC_{50}（腫瘍細胞ー正常細胞）との相関



🟧 3D shape,size and electric state 🟩 3D shape and size
🟦 3D shape,size and ionization potential

考察

◆5-FUとMelphalanよりも小さいCC_{50}値と大きいTS値・PSE値を示す化合物
- →化合物16：R¹の塩素、R²・R³のメチル基
- →化合物17：R¹ のメトキシ基
- ⇒置換基の違いによる、活性の変化

化合物16

◆細胞傷害性や腫瘍選択性と相関する記述子
- 3次元構造
- 極性
- イオンポテンシャル
- 電荷状態

化合物17

細胞傷害性と腫瘍選択性には、化学構造が関与する

考察・結論

◆化合物16は20種類のピラノ[4,3-*b*]クロモン誘導体中、最大のTS値とPSE値を示す
- →Doxorubicinと比較しても大きいTS値
- ⇒細胞傷害活性と腫瘍選択性に優れる

◆化合物16はアポトーシス誘導しない
- →腫瘍選択性とアポトーシス誘導活性は関連しない可能性
- →化合物16の抗腫瘍作用に関しては更なる検討が必要

化合物16を化学修飾した物質は新たな抗癌剤の候補化合物となる可能性が期待される

Quantitative Structure-Cytotoxicity Relationship of Pyrano[4,3-*b*]chromones: Nagai J, Shi H, Kubota Y, Bandow K, Okudaira N, Uesawa Y, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Takao K, Sugita Y., *Anticancer Res.* 2018, 38: 4449-4457.