

天然有機化合物に置換基を導入した新規化合物群の
ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞毒性の解析

嶋田 智哉子

明海大学歯学部

病態診断治療学講座 薬理学分野

(指導：坂上 宏 教授)

Analysis of cytotoxicity of three groups of newly synthesized
substituent-introduced natural products against human oral
squamous cell carcinoma cell lines

Chiyako SHIMADA

Division of Pharmacology
Department of Diagnostic and Therapeutic Sciences
Meikai University School of Dentistry
(Mentor: Prof. Hiroshi SAKAGAMI)

本学位論文は、下記の既発表論文 1,2,3 に、最新公表された論文 4 の一部を追加して作成したテーシス論文である。

1. Shimada C, Uesawa Y, Ishihara M, Kagaya H, Kanamoto T, Terakubo S, Nakashima H, Takao K, Saito T, Sugita Y and Sakagami H: Quantitative structure-cytotoxicity relationship of phenylpropanoid amide. *Anticancer Research* 34(7), 3543-3548, 2014
2. Shimada C, Uesawa Y, Ishihara M, Kagaya H, Kanamoto T, Terakubo S, Nakashima H, Takao K, Miyashiro T, Sugita Y and Sakagami H: Quantitative structure-cytotoxicity relationship of piperic acid amides. *Anticancer Research* 34 (9), 4877-4884, 2014
3. Shimada C, Uesawa Y, Ishii-Nozawa R, Ishihara M, Kagaya H, Kanamoto T, Terakubo S, Nakashima H, Takao K, Sugita Y and Sakagami H: Quantitative structure-cytotoxicity relationship of 3-styrylchromones. *Anticancer Research* 34(10), 5405-5412, 2014
4. Sakagami H, Shimada C, Kanda Y, Amano O, Sugimoto M, Ota S, Soga T, Tomita M, Sato A, Tanuma S, Takao K and Sugita Y: Effects of 3-styrylchromones on metabolic profiles and cell death in oral squamous cell carcinoma cells. *Toxicology Reports* 2: 1281-1290, 2015.

目次

和文抄録

英文抄録

1. 緒言

2. 材料と方法

1. 材料と試薬

2. 細胞培養

3. 生細胞数の測定

4. 口腔扁平上皮癌細胞に対する相対的細胞毒性の測定

5. HIV に対する複製抑制作用の測定

6. QSAR 解析

7. 細胞内微細構造の解析

8. メタボローム解析

9. 統計処理

3. 結果と考察

1. Phenylpropanoid amide 誘導体の定量的構造 - 細胞傷害性相関解析

2. Piperic acid amide 誘導体の定量的構造-細胞傷害性相関解析

3. 3-Styrylchromone 誘導体の定量的構造 - 細胞傷害性相関解析

4. (*E*)-3-(4-Hydroxystyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one のヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞毒性の解析

4. 全体のまとめ

謝辞

引用文献

表

図の説明

図

和文抄録

自然界に存在するリグニン配糖体、タンニン、フラボノイド等のポリフェノール類は、一般的に抗酸化作用および抗ウイルス活性を示すが、腫瘍細胞に対する選択毒性は低いことが報告されている。しかし、リグニンの基本骨格の **phenylpropanoid** やアルカロイドにアミド基を導入した合成有機化合物は新しい生物活性を示すこと、また、フラボノイドに存在するクロモン環の 2 位に **styryl** 基を導入した化合物は口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞毒性を示すことが報告されている。一方、クロモン環の 3 位に **styryl** 基を導入した化合物の生物活性に関する研究は少ない。このような背景を踏まえ、本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌細胞を選択的に傷害する物質を探索する一環として、**phenylpropanoid** にアミド基を導入した誘導体 12 種、アルカロイドの **piperic acid** にアミド基を導入した誘導体 12 種、クロモン環の 3 位に **styryl** 基を導入した誘導体 15 種の細胞傷害活性および抗 HIV 活性について検討した。

4 種のヒト口腔扁平上皮癌細胞 (HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22) 及び 3 種の正常ヒト口腔細胞 (歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞, 歯髓細胞) に対す細胞傷害性を、MTT 法を用いて検討した。選択毒性(TS 値)は、正常細胞に対する腫瘍細胞の CC_{50} 値の比として評価した。さらに、各化合物の物理化学的、構造的、量子化学的特徴量を、化学構造に基づいて計算機化学的に取得した。すなわち、分子動力学法により得られた最安定 3 次元構造を初期配座とし、密度汎関数法による分子軌道計算に基づいて多様な物理化学的特徴を算定するとともに、各特徴量の CC_{50} 値及び選択毒性に対する相関を解析した。抗 HIV 活性は、非感染/感染細胞に対する CC_{50}/EC_{50} 比 (=SI 値) で計測した。細胞をグルタルアルデヒド：オスミウム酸二重固定、レジン包埋、薄切切片を作成して透過型電子顕微鏡用試料とした。細胞内代謝物をメタノール液で抽出してメタボローム解析用試料とした。

Phenylpropanoid amide 誘導体は若干の選択毒性を示したが(TS=1~3)、抗 HIV 活性は示さなかった(SI<1)。特に、**vanillylamine** もしくは **tyramine** と結合した数種類の **N-Caffeoyl** 誘導体は比較的高い選択毒性を示した。正常細胞に対する細胞毒性は、極性表面積等の静電的相互作用を反映する特徴と関連していた。一方、腫瘍細胞に対する毒性は、自由エネルギー、分子表面積、分子の楕円率と関連していた。さらに、選択毒性は分子サイズと静電的相互作用によって規定されることが明らかとなった。

Piperic acid amide 誘導体は若干の選択毒性を示したが、抗 HIV 活性は示さなかった。腫瘍細胞に対する **piperic acid amide** 誘導体の傷害活性は部分電荷を反映

する構造記述子と良い相関を示した。正常細胞に対する細胞傷害活性は親水性相互作用エネルギーおよび水素結合と関連する構造的特徴と有意に関連していた。本化合物群の選択毒性は親水性相互作用と分子形状を反映する構造記述子と有意に相関することが明らかとなった。

3-Styrylchrome 誘導体は最大の選択毒性を示したが、抗 HIV 活性は示さなかった。特に、chromone 環の 6 位の炭素に OCH₃ 基が結合した 3 種の新規化合物 (*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], (*E*)-3-(4-hydroxystyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one [11]は抗癌剤(doxorubicin, 5-FU)に匹敵する選択毒性を示した。[11]による細胞死誘導の初期過程で、ミトコンドリアの空胞化、細胞内のジエタノラミン濃度の急上昇が観察された。選択性は、置換基、分子形状、疎水性相互作用を組み合わせた重回帰分析で推定できることが判明した ($R^2=0.76$, $Q^2=0.57$)。

[11]のクロモン環の 5 ~7 位に置換基を導入することが可能である。置換基導入化合物の選択毒性を検証し、細胞死誘導の機序、口腔ケラチノサイト細胞および歯肉上皮前駆細胞を用いた二次スクリーニングを行うことが今後の課題である。

索引用語：口腔扁平上皮癌、選択毒性、構造活性相関、スチリルクロモン、置換基導入、細胞内微細構造、メタボローム解析

欄外表題：新規合成有機化合物のヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞毒性

Abstract

Three fundamental polyphenols present in natural kingdom (lignin-carbohydrate complex, tannin and flavonoid) have been reported to generally show anti-oxidant and antiviral activity, but shown lower selectivity toxicity against tumor cells. However, the introduction of amide groups into phenylpropanoids (component unit of lignin) and alkaloid has been reported to produce new biological activity. And the introduction of styryl group into 2-position of chromone ring (that is present in flavonoid) has been shown to increase cytotoxicity against human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines, whereas reports of compounds having styryl group at 3-position of chromone ring have been much less. In search of substances having selective cytotoxicity against human OSCC cell lines, the present thesis paper is aimed to investigate cytotoxicity and anti-HIV activity of twelve phenylpropanoid amides, twelve piperic acid amides and fifteen 3-styrylchromones.

Cytotoxicity against four OSCC cell lines (HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22) and three normal oral cells (gingival fibroblast, periodontal ligament fibroblast, pulp cell) was determined by MTT method. Selective cytotoxicity (TS) was evaluated by the ratio of mean CC_{50} against normal cells to mean CC_{50} against tumor cells. Physicochemical, structural and quantum-chemical parameters were calculated based on the conformations optimized by the LowModeMD method followed by the density functional theory (DFT) method, and the correlation of these parameters to cytotoxicity and tumor-selective cytotoxicity was analyzed. Anti-HIV activity was evaluated by the ratio of CC_{50} to EC_{50} (50% cytoprotective concentration from HIV infection) using HTLV-I carrying human T-cell line MT4. Fine cell structure was observed under transmission electron microscope after fixation with glutaraldehyde. Cellular metabolites were extracted with methanol and subjected to metabolomics analysis.

Phenylpropanoid amines showed moderate cytotoxicity against both normal and OSCC cell lines. *N*-Caffeoyl derivatives coupled with vanillylamine and tyramine exhibited relatively higher tumor selectivity. Cytotoxicity against normal cells was correlated with descriptors related to electrostatic interaction such as polar surface area and chemical hardness, whereas cytotoxicity against tumor cells correlated with free energy, surface area and ellipticity. The tumor-selective cytotoxicity correlated with molecular size (surface area) and electrostatic interaction (the maximum electrostatic potential).

Piperic acid amides showed low to moderate tumor selectivity, but no anti-HIV activity. Cytotoxicity against tumor cells was well correlated to structural descriptors

that reflect partial charge. Cytotoxicity to normal cells correlated to hydrophilic interaction-energy moment and energy, H-bond donor capacity. Tumor-selectivity correlated well with molecular shape and electrostatic interaction.

3-Styrylchrome derivatives showed moderate to high tumor selectivity, but no anti-HIV activity. Especially, compounds that have a methoxy group at 6-position of the chromone ring and hydroxyl group at 4'-position of phenyl group in styryl moiety [11] showed the highest tumor-selectivity, comparable with that of anti-cancer agents. During early stage of cytotoxicity induction by [11], mitochondrial enlargement and accumulation of diethanolamine were observed. Multivariate statistics with chemical descriptors for the location of substituted group, molecular shape and electrostatic interaction may be useful for designing the most favorable compound with higher tumor selectivity.

Further substitutions at 5~7 position of lead compound [11] may be a potential choice for designing new anticancer drugs. It is urgent to investigate the selective cytotoxicity of the substituted compounds, mechanism of cell death induction, and perform the second screening test with human oral keratinocyte and gingival epithelial precursor cells.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, selective cytotoxicity, structure-activity, 3-styrylchromone, introduction of substituted groups, fine cell structure, metabolome analysis

Running title: Cytotoxicity of newly synthesized organic compounds against humanoral squamous cell carcinoma cell lines

1. 緒言

自然界には、タンニン、フラボノイド、リグニン配糖体などで代表されるポリフェノールが無尽蔵に存在している。タンニンは、没食子酸、ヘキサヒドロキシジフェノイル基、バロネオイル基等とグルコース等の糖がエステル結合した加水分解性タンニンと、カテキンが重合した縮合型タンニン（プロシアニジン）に大別される¹⁾。フラボノイドは、カルコンから生合成される植物二次代謝産物の総称であり、フラバノン、フラボン、フラボノール、イソフラボン、プテロカルパン、クメスタン等到大別される。近年、抗加齢効果が報告されているレスベラトロールは、スチルベノイドという別のグループに分類される²⁾。リグニンは、フェニルプロパノイド経路の代謝中間体が脱水素重合されて形成され、木質化植物細胞壁において多糖と結合し、リグニン配糖体を形成する³⁾。また、フェニルプロペノイド部分と多糖部分の比率に応じて、分子量、酸性度、溶解性等が微妙に異なる。完全な構造決定が困難なためか、リグニン配糖体の薬理活性に関する報告は、タンニンやフラボノイド類と比較してはるかに少ない。

自然界に存在するこれらのポリフェノール類は、一般的に抗酸化作用および抗ウイルス活性を示すことはよく知られているが、口腔扁平上皮癌細胞に対する網羅的解析はなされていなかった。坂上らは、ヒト口腔扁平上皮癌細胞(Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4)およびヒト口腔正常細胞（歯肉/歯根膜線維芽細胞、歯髓細胞）に対する50%細胞傷害濃度の比を選択毒性の指標として採用した場合、タンニン、フラボノイド、リグニン配糖体などのポリフェノール類の選択係数(TS=1~5)は、抗癌剤(doxorubicin, 5-FU, docetaxel, camptotecin)(SI=56~2961)と比較して遥かに低いことを報告している⁴⁾。これらポリフェノール類を有効活用するためには、その基本骨格に官能基を導入する必要性が生じた。

リグニンの基本骨格である phenylpropanoid にアミド基を導入した誘導体は、抗酸化作用^{5,6)}、チロシナーゼ阻害活性⁶⁻⁸⁾、COX-2 阻害活性⁹⁾、抗菌¹⁰⁾・抗真菌¹¹⁾活性等の生理活性を示すことが報告されている。また、phenylpropanoid amide は、メラニン合成を阻害するため、化粧品成分や機能性食品に有用である¹²⁾。しかしながら、口腔扁平上皮癌細胞に対する傷害性を研究した論文は報告されていない。

Piperine {1-[5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]piperidine} ([1], Fig. 4)は、そのイソ体の chavicine と並んで、黒コショウに含まれるアルカロイドである¹³⁾。Piperine の強烈な刺激性の辛味感は、痛みを感知する神経細胞における heat and acidity-sensing human transient receptor potential vanilloid receptor (TRPV1) を活性化することにより生じる¹⁴⁾。Piperine は、P-糖タンパク質を介する細胞排

出機構や cytochrome P450 (CYP) 3A4 を阻害するにより、併用薬の消化管吸収を高め、その結果、生体利用率を高めることが報告されている^{15,16}。Piperine はまた、多剤耐性薬剤排出ポンプを阻害することにより、rifampicin の抗菌活性を高める¹⁷。動物を用いた研究では、piperine は、抗鬱、認知機能改善作用¹⁸、抗炎症作用¹⁹、そして抗血管新生作用²⁰を示すことが報告されている。Piperine は、選択されたグラム陽性、陰性細菌に対する軽度な抗菌作用を示し²¹、ヒト大腸癌²²、メラノーマ²³、肺癌²⁴、腎癌細胞²⁵にはアポトーシスを、ヒトの前立腺癌細胞には、オートファジー²⁶を誘導すること、また、細胞死のタイプに関係なく、G0/G1 期に休止させることが報告されている^{22,23,26}。Piperine は、赤芽球系白血病細胞を単球・マクロファージに成熟分化誘導するが²⁷、cadmium²⁸、cisplatin²⁹や glutamate³⁰誘発性のアポトーシスから、正常細胞を防御する。しかし、piperine の抗腫瘍活性を同じ組織あるいは同じ種類（間葉系、上皮系）の正常細胞を対照として行った厳密な研究は報告されていない。唯一、肺癌由来ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 に対する細胞傷害性を、ヒト肺線維芽細胞と比較検討した論文が一編あるのみである²⁴。また、piperine の抗ウイルス活性を調べた論文は報告されていない。しかし、piperic acid amide 誘導体の生物活性、特にヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する傷害性を検討した論文はなかった。

Chromones (4*H*-1-benzopyran-4-ones) は、そのコア構造が flavone、isoflavone、2-styrylchromone 類に見出されるが故に、重要な酸化ヘテロ環化合物である。Flavone や isoflavone 類と比較して、2-styrylchromone 類は、自然界には僅かしか存在しない。これまでに、合成 2-styrylchromone 誘導体の抗酸化作用³¹、抗アレルギー作用³²、抗炎症作用³³、抗腫瘍作用³⁴⁻³⁶、抗ウイルス作用^{37,38}が報告されている。一方、3-styrylchromone 誘導体に関しては、抗ウイルス作用³⁹と抗菌作用⁴⁰を調べた 2 報の論文しか報告されていない。最近、高尾らは、3-styrylchromone の新しい生物作用を解明するために、一連の 3-styrylchromone 誘導体を合成し、その抗酸化作用と α -glycosidase 阻害活性を報告している⁴¹。

本研究において、ヒト口腔扁平上皮癌細胞を選択的に傷害する物質を探索する一環として、リグニン配糖体前駆体の phenylpropanoid にアミド基を導入した誘導体 12 種（テーシス論文 # 1）、アルカロイドの piperine にアミド基を導入した誘導体 12 種（テーシス論文 # 2）、フラボノイドに存在するクロモン環の 3 位に styryl 基を導入した誘導体 15 種（テーシス論文 # 3）の細胞傷害活性及び抗 HIV 活性を検討し、QSAR 解析を行った。さらに、その中で、ヒト口腔扁平上皮癌細胞を強く傷害する 3-styrylchromone 誘導体については、細胞内微細構造および細胞内代謝産物に対する変動について若干の検討を加えた（テーシス論文 # 4）。

2. 材料と方法

1. 材料と試薬

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), phenol red-free DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、 fetal bovine serum (FBS) (Gemini Bio-Products, Woodland, CA, USA)、 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)、 dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma Chem., St. Louis, MO, USA)

12 種類の phenylpropanoid amide 誘導体、すなわち、*N-p*-coumaroylvanillylamine [1], *N*-feruloylvanillylamine [2], *N*-caffeoylvanillylamine [3], *N-p*-coumaroyltyramine [4], *N*-feruloyltyramine [5], *N*-caffeoyltyramine [6], *N-p*-coumaroyldopamine [7], *N*-feruloyldopamine [8], *N*-caffeoyldopamine [9], *N-p*-coumaroylserotonin [10], *N*-feruloylserotonin [11], *N*-caffeoylserotonin [12] (Fig. 1) は、*N,N*-dimethylformamide および dichloromethane 中で、triethylamine、1-hydroxy-1*H*-benzotriazole、そしてカップリング剤の 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide の存在下で、cinnamic acid 誘導体と vanillylamine, dopamine あるいは serotonin のカップリングにより合成した⁴²⁾。全ての化合物は、DMSO に 40 mM の濃度に溶かし、使用するまで-20°C で保存した。

12 種類の piperic acid amide 誘導体、すなわち、*N*-piperoyl ethanolamine [2], *N*-piperoylputrescine [3], *N*-piperoylcadaverine [4], *N*-piperoylphenethylamine [5], *N*-piperoyl-3-phenylpropylamine [6], *N*-piperoyltyramine [7], *N*-piperoyldopamine [8], *N*-piperoylvanillylamine [9], *N*-piperoylserotonin [10], *N*-piperoylhistamine [11], *N*-piperoyl-2-(2-pyridinyl)ethylamine [12] (Fig. 4)は、既報⁴³⁾を修正した方法で、piperic acid と適当なアミンをカップリングさせて合成した。Piperic acid (1.0 mmol)と oxalyl chloride (10 mmol)を CH₂Cl₂ (5 ml)中で混和し、室温で 3 時間攪拌した。減圧下で、溶媒と過剰な oxalyl chloride を飛ばした。粗 acid chloride を CH₂Cl₂あるいは dimethylformamide (DMF)(2 ml)に溶かし、氷浴中で CH₂Cl₂あるいは DMF (5 ml)に溶かした適当なアミンあるいはその塩酸塩 (1.2 mmol)および Et₃N (8 mmol)に添加した。反応液は、室温で 5 時間攪拌した。冷水を加え、CHCl₃で抽出した。有機溶媒層を回収し、Na₂SO₄を用いて乾燥させ、溶媒は、減圧下で蒸発させた。残渣をシリカゲルクロマトグラフィーにかけ、対応する piperic acid amide を精製した。全ての抱合体は、¹H nuclear magnetic resonance (NMR)と mass spectrometry (MS) データから同定した。全ての化合物は、DMSO に 40 mM の濃度に溶かし、使用するまで-20°C で保存した。

15 種類の 3-styrylchromone 誘導体、すなわち、(*E*)-3-(4-Methoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [1],

(*E*)-3-(3,4-Dimethoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [2], (*E*)-3-(3,4,5-Trimethoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [3], (*E*)-6-Methoxy-3-(4-methoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [4], (*E*)-6-Methoxy-3-(3,4-dimethoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [5], (*E*)-6-Methoxy-3-(3,4,5-trimethoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [6], (*E*)-3-(4-Fluorostyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one [7], (*E*)-3-(4-Chlorostyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one [8], (*E*)-3-(4-Hydroxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [9], (*E*)-3-(3,4-Dihydroxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [10], (*E*)-3-(4-Hydroxystyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one [11], (*E*)-3-(3,4-Dihydroxystyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one [12], (*E*)-6-Hydroxy-3-(4-methoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [13], (*E*)-6-Hydroxy-3-(4-hydroxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [14], (*E*)-6-Hydroxy-3-(3,4-dihydroxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [15] (Fig. 7)は、3-formylchromone と phenylacetic acid 誘導体の Knoevenagel 縮合反応により、合成した⁴¹⁾。全ての化合物は、DMSO に 80 mM の濃度に溶かし、使用するまで-20°C で保存した。

2. 細胞培養

ヒト歯肉線維芽細胞(human gingival fibroblasts, HGF)、ヒト歯根膜線維芽細胞(human periodontal ligament fibroblasts, HPLF)、ヒト歯髓細胞(human pulp cell, HPC)は、明海大学歯学部倫理委員会規定に従い(承認番号 A0808)、12歳女児の左下第二大臼歯より歯肉を採取した⁴⁴⁾。また、抜歯の際に歯に付着している歯根膜細胞、歯肉細胞、歯髓腔に存在する歯髓細胞を採取した。これらの細胞が outgrowth して、confluent 状態になったものを初代培養とした。これらの正常細胞は、それぞれ、47 および 43 population doubling level (PDL) まで増殖したので、本実験では、10~15 PDL の細胞を使用した。ヒト口腔扁平上皮癌細胞(Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4)は、理研セルバンク(筑波)から入手した。使用した細胞は、全て、10 %FBS を含む DMEM 培地中で、37 °C、5 %CO₂ 環境下で培養した。

3. 生細胞数の測定

相対的生細胞数は、MTT 法により求めた。すなわち 0.2 mg/mL の MTT 試薬を含む DMEM で 4 時間培養し、培養液を除去後 0.1 ml の DMSO に置換後測定した。相対的生細胞数(抽出された色素の濃さ)は、マイクロプレートリーダー(Multiskan Biochromatic, Labsystem, Osaka)を用いて、540 nm の波長における吸光

度により測定した。種々の濃度の試料を添加し、濃度依存曲線より、50% 細胞傷害濃度(CC₅₀) を求めた。

4. 口腔扁平上皮癌細胞に対する相対的細胞毒性の測定

最近、piperineがヒト肺胞基底上皮腺癌細胞A549細胞株（上皮系細胞）の増殖を濃度依存的に抑制するが、正常ヒト胎児肺線維芽細胞WI38（間葉系細胞）の増殖を傷害しないことを踏まえ、宿主に対して毒性を示さずに肺癌の予防と治療に抗癌剤として応用できる可能性を示唆している²⁴。この報告に従い、本実験においても、4種のヒト口腔扁平上皮癌細胞（Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4）（上皮系）に対する選択毒性を、3種のヒト口腔正常細胞(HPC, HPLF, HPC)（間葉系）と比較して、次式で求めた(Tables 1, 3, 5)。TS (D/B) = 3種の口腔正常細胞に対するCC₅₀の平均値 / 4種のヒト口腔扁平上皮癌細胞に対するCC₅₀の平均値。

Ca9-22細胞およびHGF細胞は、いずれも歯肉組織由来であるので⁴⁵、Ca9-22細胞とHGF細胞の感受性の比較も行った。TS (C/A) = HGF細胞に対するCC₅₀ / Ca9-22細胞に対するCC₅₀。

5. HIV に対する複製抑制作用の測定

96 穴マイクロタイタープレートに、種々の濃度の試験物質(phenypronanoid amides: 0, 0.0051, 0.0256, 0.128, 0.64, 3.2, 16, 60, 400 μM; piperic acid amides, 3-styrylchromones: 0.01, 0.051, 0.256, 1.28, 6.4, 32, 160, 800 μM)、陽性対照 (0.00256~1000 μg/ml dextran sulfate, 0.00256~1000 μg/ml curdlan sulfate, 0.0000512~20 μM azidothymidine, 0.0128~5000 μM 2',3'-dideoxycytidine)とともに HIV 感染 MT-4 細胞 (3.0×10⁴/well、MOI: 0.01) を感染直後に加えた。試料の MT-4 細胞に対する細胞毒性を知るために、ウイルス非感染細胞を同様に種々の濃度の試料とともに培養を行った。CO₂ インキュベーターで 37 °C 5 日間培養した後、MTT 法で生存細胞数を測定した。抗ウイルス活性は、HIV 感染による細胞傷害を 50% 抑制する濃度 (EC₅₀; 50% effective concentration)、細胞毒性は試験物質による 50%細胞傷害濃度 (CC₅₀; 50% cytotoxic concentration) でそれぞれ表現した⁴⁶。また、有効係数 (Selectivity Index; SI) は CC₅₀/EC₅₀ として計算した。各値は、平均値 ± SD (n=3)を表している。

6. QSAR 解析

各化合物の物理化学的、構造的、量子化学的特徴量を、化学構造に基づいて計算機化学的に取得した[Merck Molecular Force Field (MMFF94) in Molecular Operating Environment (MOE) 2013.08, Chemical Computing Group, Quebec, Canada)]. すなわち、分子動力学法により得られた最安定 3 次元構造を初期配座とし、密度汎関数法による分子軌道計算に基づいて HOMO エネルギー、LUMO エネルギー、静電的特徴量等の多様な物理化学的特徴を算定するとともに、各特徴量の細胞傷害性、選択毒性に対する相関を解析した。

計算方法は、密度汎関数 (DFT) 法を使用した。不等号の入った CC_{50} 値は、調和平均による推定値を用いた。例えば、“>400”は“from 400 ~ ∞ ”と等しい。 $1/[\text{average}(1/400, 1/\infty)]=800$ となる。 CC_{50} 値は $-\log$ 値である pCC_{50} 値とした。腫瘍細胞の pCC_{50} 平均値を T とし、正常細胞の pCC_{50} 平均値を N とした。以前、選択毒性として $(T-N)/(T+N)$ を使用したが⁴⁷⁾、今回のデータでは T-N とほとんど完全に相関したので、より単純な T-N を採択した。T と N は対数値なので、T-N は腫瘍 CC_{50} 値/正常 CC_{50} 値の対数値と同義である。

使用したソフトと記述子数(Wavefunction, Irvine, CA, USA)は、Spartan: 量子化学関連記述子 (DFT-B3LYP/6-31G**) 34 種類、MOE:量子化学的、構造的、物理化学的記述子 330 種類、Dragon:WHIM descriptors (分子の 3 次元形状に関する記述子) 114 種類、および、置換基の部位と種類を記述子化:9 種類である。 $\log P(o/w)$ のみ MOE を、他は spartan 用いて算定した。

7. 細胞内微細構造の解析

細胞(3×10^5)を 10-cm シャーレ(Becton-Dickinson)に播き、48 時間培養した。新鮮培地に置換後、培地の pH と温度を安定化するために、30 分、5% CO_2 インキュベーター内で培養した。0 (control), 3, 10 μM の化合物[11]を添加してさらに 3 時間処理した。5 ml の PBS(-)で 3 回洗浄後、細胞を 4°C で、1 時間 2% glutaraldehyde-0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) で固定した。細胞をラバー・ポリスマンで剥離後、90 分 1% osmium tetroxide-0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)で後固定した。脱水後、Araldite M (CIBA-GEIGY Swiss; NISSHIN EN, Tokyo, Japan)中に包埋した。切片を uranyl acetate と lead citrate で染色し、JEM-1210 透過型電子顕微鏡(Japan Electron Optics Laboratory, JEOL, Akishima, Tokyo, Japan) (倍率: $\times 5,000$ 、accelerating voltage:100 kV)で観察した⁴⁸⁾。

8. メタボローム解析

細胞(3×10^5)を 10-cm シャーレ(Becton–Dickinson)に播き、48 時間培養した。新鮮培地に置換後、培地の pH と温度を安定化するために、30 分、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。0 (control), 3, 10 μ M の化合物[11]を添加してさらに 3 時間処理した。一部の細胞は、トリプシン処理後、血球算定版を用いて生細胞数を測定した。残りの細胞は 5 ml の 5 % D-mannitol 液で 2 回洗浄し、1 ml の内部標準(25 μ M methionine sulfone, 25 μ M 2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, 25 μ M D-camphor-10-sulfonic acid)を含むメタノールを添加し、10 分室温放置した。細胞の入ったメタノールを回収し、-70°C にて保存した。細胞とメタノールとの懸濁液 400 μ l をエッペンチューブに移し、CHCl₃ 400 μ l, MilliQ 水 200 μ l を加えて攪拌し 4 °C, 10,000 \times g で 3 分間遠心分離した。上層の水-メタノール層より 400 μ l を限外ろ過フィルター (分画分子量 5,000 Da) にとり 4 °C, 9,100 \times g で 4 時間遠心分離。ろ液 320 μ l を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に 3-aminopyrrolidine, trimesate 各 200 μ M 水溶液 50 μ l で溶解し、CE-TOFMS で測定した⁴⁹⁾。

9. 統計処理

細胞毒性と選択毒性と、化学記述子との相関は、JMP Pro version 10.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた単純回帰分析により検討した。有意水準を $p < 0.05$ にセットした。官能基間の平均値の検定のみ、*t*-検定を使用した。

3. 結果と考察

1. Phenylpropanoid amide 誘導体の定量的構造 - 細胞傷害性相関解析

1) 細胞毒性

全ての phenylpropanoid amide 誘導体は、抗癌剤 (docetaxel, fluorouracil, doxorubicin) と比較して (TS=6.8 ~>128)、口腔扁平上皮癌細胞に対する選択性ははるかに低かった (TS=0.9 ~>3.4) (Table I). Phenylpropanoid/tyramine 誘導体 [4-6] の選択毒性は、口腔扁平上皮癌細胞 4 種 (Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4) と正常口腔細胞 3 種 (歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞、歯髓細胞) を用いて比較しても (D/B 値)、歯肉癌細胞 (Ca9-22) と歯肉線維芽細胞 (HGF) を比較しても (C/A 値) を比較しても、ほぼ同等の値を示した [TS=0.9 ~>3.4 (D/B), 1.0 ~ 3.0 (C/A)]. 12 種の化合物の中では、caffeyl 基を持つ [6] が、細胞傷害活性 (CC₅₀=100 μM) は、[4] (CC₅₀=47 μM) より弱い、最大の選択毒性与えた [TS>3.4 (D/B), 2.1 (C/A)].

2) 抗 HIV 活性

陽性対照 (dextran sulfate, curdlan sulfate, azidothymidine, 2',3'-dideoxycytidine) (SI=1789-15882) と比較し、12 種の phenylpropanoid amides は、HIV 感染による細胞変性効果を抑制することはできなかった (SI<1) (Table 2). この結果を踏まえ、下の述べる QSAR 解析は、phenylpropanoid amides の細胞傷害性に焦点を当てることにした.

3) QSAR 解析

Phenylpropanoid amide 誘導体の口腔扁平上皮癌細胞腫に対する傷害性 (T) は、ギブスの自由エネルギー (G°) (r²=0.367)、エントロピー (S°) (r²=0.495)、エンタルピー (H°) (r²=0.367)、分子表面積 (r²=0.442)、楕円率 (r²=0.387)、水素結合受容カウント (r²=0.357) と相関した (Fig. 2A).

他方、phenylpropanoid amide 誘導体の正常細胞に対する傷害性 (N) は、水が接近できる極性表面積 (r²=0.362)、最高被占軌道 (HOMO) エネルギー (r²=0.381)、化学ハードネス (r²=0.536)、脂溶性 (r²=0.362)、水素結合受容カウント (r²=0.287) に相関した (Fig. 2B).

Phenylpropanoid amide 誘導体の口腔扁平上皮癌細胞に対する選択毒性 (T - N) は、表面積 (r²=0.339)、最大静電ポテンシャル (r²=0.356) と相関した (Fig. 3).

4) 結論と考察

本研究により、初めて、12種の phenylpropenoid amide 誘導体は、弱い選択毒性を示すが、抗 HIV 活性を示さないことが明らかになった。その中で、vanillylamine [3]あるいは tyramine [6]と共役した *N*-caffeoyl 誘導体は、比較的高い選択毒性を示した。この選択毒性は、これらのアミンを serotonin で置換すると消去されたことより、選択毒性の発現には ligand 分子の表面積の減少、あるいは、静電相互作用（最大静電ポテンシャル）の増加が関与する可能性が考えられる (Fig. 3)。また、dopamine と共役した phenylpropanoid 誘導体は、カテコール骨格を持つが、選択毒性は示さなかった。

Octopamine あるいは dopamine で共役された phenylpropanoid amide を用いた研究により、分子内のカテコールの存在は、抗酸化作用には必要であるが、チロシナーゼ活性の阻害には必要ではないことが報告されている⁶⁾。しかし、カテコールは、実験条件により、抗酸化作用と酸化作用の両方を発現することが知られているので^{50, 51)}、*N*-caffeoyl 部分に存在するカテコールも、生物作用に影響する可能性がある。Phenylpropanoid amide 誘導体の brasiliamide A および B¹⁰⁾、*N*-*p*-coumaroylserotonin そして *N*-feruloylserotonin¹¹⁾ は、それぞれ、抗菌、抗真菌活性を示すことが報告されている。最近、*p*-coumaric acid 誘導体は、強力なチロシナーゼ阻害活性を示すことが報告された⁸⁾。これらの結果は、phenylpropanoid と phenylethylamine あるいは phenylmethylamine 部分の比率を変えることにより、新しい生物作用を生み出せる可能性を示唆する。

QSAR 解析は、正常細胞、および癌細胞に対する細胞傷害性を予測するのに有効である。極性表面積や化学ハードネスなどの静電相互作用に関連した記述子は、phenylpropanoid amides の正常細胞に対する傷害性に関与し、自由エネルギーや表面積、楕円率は、癌細胞に対する細胞傷害性に関与するのかもしれない。これらの実験結果は、分子の大きさ、形、静電相互作用が、phenylpropanoid amide 誘導体による細胞傷害性の発現に関与していることを示唆する。

以上をまとめると、TあるいはNに特異的な記述子がたくさんあるが、これらの記述子を複数使用することにより、選択毒性を予測するのに役立つと思われる。

2. Piperic acid amide 誘導体の定量的構造-細胞傷害性相関解析

1) 細胞毒性

陽性対照の抗癌剤 5-FU [TS=>22.2 (D/B); >11.4 (C/A)]と比較して、piperine の選択毒性は弱かった[TS=1.1 (D/B); 3.6 (C/A)](Table III). Piperine 以外の 11 化合物では、カテコール骨格を持つ[8]が最大の選択毒性を与えたが[TS=>10.7 (D/B); >21.1 (C/A)]、他の化合物[2-7, 9-12]の選択毒性は弱かった[TS=0.3~1.8 (D/B); 0.8~6.8 (C/A)] (Table 3).

2) 抗 HIV 活性

陽性対照(dextran sulfate, curdlan sulfate, azidothymidine, 2',3'-dideoxycytidine)の高い抗 HIV 活性(SI=1789-15882)と比較して、piperic acid amides [1-12]は、HIV 感染による細胞変性を抑制できなかつた(SI<1) (Table 4). 抗 HIV 活性は、phenylpropanoid amide 誘導体と一緒に測定したので、同じ陽性対照を使用した. この結果を踏まえ、以下の QSAR 解析は、piperic acid amide の細胞傷害性に焦点を当てることにした.

3) QSAR 解析

Piperic acid amide 誘導体の口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞傷害性 (T) は、PEOE_VSA_NEG (合計負ファンデルワールス表面積) ($r^2=0.751$, $p<0.0005$), PEOE_VSA_FPOS (フラクショナル正のファンデルワールス表面積) ($r^2=0.701$, $p<0.001$), PEOE_VSA_FNEG (フラクショナル負のファンデルワールス表面積) ($r^2=0.701$, $p<0.001$), オクタノール/水分配係数の対数(log P) ($r^2=0.492$, $p<0.05$), a_{hyd} (疎水性の原子数) ($r^2=0.473$, $p<0.05$), 水溶解度のログ(log S) ($r^2=0.432$, $p<0.05$)と相関した (Fig. 5A).

他方、piperic acid amide 誘導体の口腔正常細胞に対する細胞傷害性 (N) は vsurf_IW7 (親水性相互作用エネルギーの瞬間 7 ($r^2=0.530$, $p<0.01$), vsurf_EWmin1 (最低親水エネルギー1) ($r^2=0.491$, $p<0.05$), vsurf_HB7 (H 結合供与能力 7) ($r^2=0.484$, $p<0.05$), vsurf_W7 (親水ボリューム 7) ($r^2=0.484$, $p<0.05$), vsurf_HB6 (H 結合供与能 6) ($r^2=0.476$, $p<0.05$), PEOE_VSA_FPOS (フラクショナル正のファンデルワールス表面積) ($r^2=0.425$, $p<0.05$) と相関した(Fig. 2B).

Piperic acid amide 誘導体の選択毒性 (T-N) は、t vsurf_IW8 (親水性相互作用エネルギーモーメント 8) ($r^2=0.638$, $p<0.005$), PEOE_VSA_POL (合計極性ファンデルワールス表面積) ($r^2=0.609$, $p<0.005$), PEOE_VSA + 4 (部分電荷を持つ原子における合計ファンデルワールス表面積($r^2=0.583$, $p<0.005$), PEOE_VSA_PPOS

(合計正極性ファンデルワールス表面積) ($r^2=0.583$, $p<0.005$), PEOE_VSA_PNEG (合計負極性ファンデルワールス表面積) ($r^2=0.519$, $p<0.01$), a_nO (酸素原子の数) と相関した($r^2=0.467$, $p<0.05$) (Fig. 6).

4) 結論と考察

本研究により、piperine は口腔扁平上皮癌細胞に対する弱い選択毒性を示すが、抗 HIV 活性を示さないこと、そして、カテコール骨格を持つ[8]が比較的高い選択毒性を示すことを初めて明らかになった。選択毒性を示す指標である D/B と C/A に間で大きな相違が見られたが(Table 3)、これは、使用した7種の細胞の12種の piperic acid amide 誘導体に対する感受性が大きく異なることによると思われる。従って、正常および癌細胞については、少なくとも3種以上は比較検討した方が良いと思われる。これらの知見をもとに、D/B 値を用いて QSAR 解析を行った。

量子化学的アプローチからは、T に関する良い記述子が見つからなかったため、分子オペレーティング環境 (MOE) で計算される記述子を援用して、330 種のパラメータを検索した。電荷についての情報を提供する多くの PEOE 記述子、分子の形を反映する vsurf 記述子が、piperic acid amide 誘導体の細胞傷害性と選択毒性をよく説明することを見出した。電子の部分電荷を計算する PEOE 法⁵²⁾では、電荷は、平衡に達するまで結合している原子間を移動する。Vsurf 記述子は、VolSurf 記述子⁵³⁾と似ており、構造の結合性と立体配座に依存する。今回の研究により、腫瘍細胞に対する piperic acid amide 誘導体の傷害性は部分電荷を反映する構造記述子とよく相関すること、正常細胞に対する傷害性は親水性相互作用エネルギーおよび水素結合と関連する構造的特徴と相関すること、選択毒性は親水性相互作用と分子形状を反映する構造記述子と有意に相関することが明らかとなった。以上の結果は、静電的相互作用、水素結合、および分子形状が piperic acid amide 誘導体の選択毒性の評価に有用であることを示唆している。化合物[8] が最大の選択毒性を示したのは、そのユニークな分子形と、特に、最大の PEOE 及び vsurf 記述子で表現される静電相互作用によると思われる。

Curcumin (diferuloylmethane)は、*Curcuma longa* L から単離される天然有機化合物であり、多くの研究者により、癌細胞の増殖、発癌、移植腫瘍の増殖を抑制することが報告されている⁵⁴⁾。しかし、本研究で用いた選択毒性評価系では、curcumin は狭い治療濃度域を示した(TS=1.7)^{1, 55)}。Curcumin に glycine⁵⁶⁾、demethoxy、bisdemethoxy あるいは piperoyl 基⁵⁷⁾ を導入して抗腫瘍性を増加させようとする試みは全て失敗に終わっている。

以上をまとめると、正常細胞及び癌細胞に対する傷害性に特異的な多くの化学記述子が存在しており、選択毒性は、分子形と静電相互作用と相関することが明らかになった。これらの化学記述子を組み合わせた多変量統計は、より選択毒性の高い化合物をデザインするのに有用であると思われる。

3. 3-Styrylchromone 誘導体の定量的構造 - 細胞傷害性相関解析

1) 細胞毒性

15種の化合物の中では、[11]が口腔扁平上皮癌細胞に対して最大の傷害活性を与え(mean CC_{50} = 2.0 ± 1.2 μ M)、以下、[4] (6.4 ± 2.4 μ M)、[6] (13 ± 6.1 μ M)の順に低下した (Table 5)。これらの化合物は、口腔正常細胞に対しては弱い傷害活性しか与えないので(mean CC_{50} = 138 ± 116 , 258 ± 126 , 339 ± 183 μ M)、抗癌剤の doxorubicin (TS=>26) や 5-FU (TS=>55.6)に匹敵する最大の選択毒性を与えた[TS (D/B)=69.0, 40.3, 26.1] (Table 5)。選択毒性を歯肉癌細胞 Ca9-22 と歯肉線維芽細胞 HGF を用いて計算すると([TS(C/A)]、これらの化合物は、TS 値 31.9, 52.0, 54.4 を与えた (Table 5)。

2) 抗 HIV 活性

陽性対照(dextran sulfate, curdlan sulfate, azidothymidine, 2',3'-dideoxycytidine)の高い抗 HIV 活性(SI=2445-20421)と比較して、3-styrylchromone 誘導体[1-15]は、HIV感染による細胞変性を抑制できなかった(SI<1) (Table 6)。この結果を踏まえ、以下の QSAR 解析は、3-styrylchromone 誘導体の細胞傷害性に焦点を当てることにした。

3) QSAR 解析

3-Styrylchromone 誘導体の口腔扁平上皮癌細胞に対する傷害性 (T) は、置換基の影響を強く受ける。特に、クロモン環の6位のメトキシ基(R^1 OMe) ($p=0.100$)、スチリル側鎖のフェニル基の4'位の水酸基(R^3 OH) ($p=0.0182$)は、細胞傷害活性の発現に重要であった(Fig. 8)。

3-Styrylchromone 誘導体の口腔正常細胞に対する傷害性 (N) は、was correlated with vsurf_DD23 (分子周囲に仮定した疎水性 probe との相互作用に関連する記述子) ($r^2=0.413$, $p=0.0078$)および Glu (分子の3次元形状において、第一長軸方向の

対称性に関する記述子($r^2=0.445$, $p=0.0066$)と相関した(Fig. 9).

3-Styrylchromone 誘導体の選択毒性 (T-N) は、 R^3 OH ($p=0.0616$)、 $vsurf_DD23$ ($r^2=0.280$, $p=0.0426$)、そして G2u (分子の3次元形状において、第二長軸方向の対称性に関する記述子)($r^2=0.406$, $p=0.0106$)と相関した(Fig. 10).

重回帰分析モデルを用いると、Tは、 R^1 OMe と R^3 OH により($r^2=0.702$, $Q^2=0.532$, $s=0.409$) (左図)、Nは BCUT_SMR_3 (分子のトポロジカルな形状と低分子-蛋白質間相互作用に関連する記述子)、 $rgyr$ (慣性半径：分子のサイズと形状に関連する記述子)と $vsurf_DD23$ により($R^2=0.834$, $Q^2=0.695$, $s=0.194$) (中図)、T-Nは $diameter$ (分子のトポロジカルなサイズを反映する記述子)、 $vsurf_DD23$ と R^3 OH により($R^2=0.764$, $Q^2=0.570$, $s=0.308$) (右図)、推定可能である(Fig. 11).

4) 結論と考察

本研究により、15種類の3-styrylchromone誘導体は、比較的強い選択毒性を示すが、抗HIV活性は示さないことが初めて明らかになった。特に [4, 6, 11]は、抗癌剤 doxorubicin や 5-FU に匹敵する選択毒性を示した(Table 5).

4H-Chromen-4-one および 2H-chromen 誘導体は、ピコルナウイルスの複製を抑制することが報告されている⁵⁸。しかし、この著者らは化学療法係数(安全域)を算出していないので、宿主に対する毒性は不明である。

本研究は、3-styrylchromone 誘導体の初めての QSAR 解析である。今回、解析ソフトとして、Spartan (34の量子化学に関連した記述子)、MOE (330の量子化学、構造、物理化学に関連した記述子)、dragon (114の3次元の分子の形に関連した記述子)、そして置換基の場所と種類に関連した9の記述子を用いた。変数として、T, N, そしてT-Nを用いた。有意な差あるいは傾向を示したものは($p \leq 0.1$)、 R^1 OMe、 R^3 OH、 $vsurf_DD23$ 、G1u、そしてG2uであった。

6位へのメトキシ基を介するファンデルワールス相互作用、および4'位の水酸基を介する水素結合が、口腔扁平上皮癌細胞に対する傷害性(Fig. 8)、疎水性と分子形は、正常細胞に対する傷害性(Fig. 9)、そして、分子形と4'位の水酸基の置換が選択毒性(Fig. 10)において重要であるかも知れない。

重回帰分析モデルを用いると、T, N, T-Nは、以下の式で推定できることが示唆された(Fig. 11).

$$T = 0.806(\pm 0.182)R1OMe + 0.999(\pm 0.221)R3OH + 0.739(\pm 0.182)$$

($n=15$, $R^2=0.702$, $Q^2=0.532$, $s=0.409$)

$$N = 120(\pm 24)BCUT_SMR_3 - 2.49(\pm 0.49)rgyr + 0.166(\pm 0.024)vsurf_DD23 - 304$$

(± 62) ($n=15$, $R^2=0.834$, $Q^2=0.695$, $s=0.194$)

$T - N = 0.607(\pm 0.169)\text{diameter} - 0.121 (\pm 0.035)\text{vsurf_DD23} + 1.11 (\pm 0.235)\text{R3OH} - 7.17 (\pm 2.26)$ (n=15, $R^2=0.764$, $Q^2=0.570$, s=0.308)

桃井らは、スチリル側鎖のフェニル基にメトキシ基を導入した 2-styrylchromone 誘導体が、ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する比較的高い選択毒性と、ヒト前骨髄性白血病細胞にアポトーシスを誘導することを報告している³⁴⁾。これに対して、3-styrylchromone 誘導体のヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する選択毒性は、クロモン環へのメトキシ基の導入、スチリル側鎖のフェニル基への水酸基の導入により増加することが本研究により明らかになった(Fig. 8)。3-Styrylchromone 誘導体で口腔扁平上皮癌細胞に誘導される細胞死のタイプ（アポトーシス、ネクローシス、オートファジー）に関しては、今後の検討課題である。

4. (*E*)-3-(4-Hydroxystyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one のヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞毒性の解析

実験項目 3 で、15 種類の 3-styrylchromone 誘導体の中では、chromone 環の 6 位の炭素に OCH₃ 基が結合した(*E*)-3-(4-hydroxystyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one [11](TS=69)、(*E*)-6-methoxy-3-(4-methoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [4](TS=40)、(*E*)-6-methoxy-3-(3,4,5-trimethoxystyryl)-4*H*-chromen-4-one [6] (TS=26)がヒト口腔扁平上皮癌細胞に対して高い選択毒性を示すことが明らかになった。化合物 [4,6,11]の薬理活性については、我々の論文以外に 2 例しか報告されていない。そこで、今回、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 に対する選択毒性の解析を更に進めることにした。

1) 細胞毒性

[4,6,11]の傷害活性は、3 時間後から発現し、24 時間後にプラトーに達した。[4,11]は cytotoxic な作用を、[6]は cytostatic な作用を示した。細胞傷害活性の強さは、[11](IC₅₀=0.39 μM)>[4](C₅₀=2.4 μM)>[6](IC₅₀=4.2 μM)で順であった(Fig. 12, Table 7)。

2) 細胞内微細構造への影響

化合物[11]で処理後 3 時間以内に、ミトコンドリアの空胞化を誘導した(Fig. 13).

3) 細胞内代謝産物の動態

化合物[11]による細胞死誘導の初期過程(3 h)で、細胞内のジェタノラミン濃度の急上昇、コリン濃度の低下と CDP-コリンの増加が観察された(Fig. 14).

4) 結論と考察

本研究により、化合物[11]の細胞傷害性の強さが再確認された。その作用点として、ミトコンドリアの変性が考えられる。ミトコンドリアの構造変化に、カスパーゼなどアポトーシスに関与する分子の変動を検討すべきであると考えている。

ジェタノラミンは、マウスにおいて脳の神経細胞を傷害すること、その時にコリンの取り込みを減少させることが報告されており^{59,60}、本実験結果と一致している(Fig. 14)。また、CDP コリンは、ホスファチジルコリンなどのリン脂質の合成に関与することが報告されているが⁶¹、細胞死との関連は不明である。現在、クラスター解析を進行中であり、他の代謝物の関与に関するデータも集計中である。

4. 全体のまとめ

今回の研究により、以下のことが初めて明らかになった。

1. 3-Styrylchromone 誘導体は、2-styrylchromone 誘導体よりも高い細胞傷害活性、選択毒性を示す。
2. 特に、最大の選択毒性を示した化合物[11]は新規物質であり、その選択毒性は抗癌剤と同等であった。
3. これに対して、phenylpropanoid amide 誘導体、piperic acid amide 誘導体の選択毒性は低い。
4. これら、三種の化合物群は、どれも抗 HIV 活性を示さない。

今回、合成有機化合物の口腔扁平上皮癌細胞に対する選択毒性の第一次スクリーニングとして、ヒト口腔扁平上皮癌細胞(HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22)およびヒト正常組織由来細胞（歯肉線維芽細胞、歯髓細胞、歯根膜線維芽細胞）を用いた。この測定系では、生薬エキス（24種）の中では、喜樹の葉のメタノールエキスが最大の腫瘍選択性（TS= 88.3）が高い選択毒性を示すこと⁶²⁾、また、喜樹の樹皮と幹から単離されたカンプトテシン(TS=2961)⁶³⁾、アントラサイクリン系抗生物質(doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, mitoxantrone) (TS=181±100 (47~259))⁶⁴⁾、docetaxel (TS=>128)⁶⁵⁾、5-FU (TS=>66)⁴⁾などの抗悪性腫瘍薬が高い腫瘍選択性を示すことが報告されている。ヒト口腔正常細胞は間葉系であり、ヒト口腔扁平上皮癌細胞は上皮系であるので、正常細胞としては、上皮系の口腔ケラチノサイト細胞および歯肉上皮前駆細胞を用いた二次スクリーニングを行うことが必要である。しかし、口腔ケラチノサイト細胞および歯肉上皮前駆細胞は細胞の増殖維持に、増殖因子を添加した特殊な培地を使用しなければならず、これら因子との相互作用により、細胞間の感受性を正確に比較できなくなる可能性もあり、慎重な予備実験が必要である。また、増殖因子を添加した場合、正常細胞と癌細胞の増殖の差により抗腫瘍効果を発現する従来の古典的治療薬の効果がどの程度影響を受けるか興味深い。最近、我々は、ヒト不死化皮膚角化細胞 (HaCaT) が、doxorubicin に対して、ヒト口腔扁平上皮癌細胞(HSC-3, HSC-4)と同様に高い感受性を示すことを見出した（鈴木ら、unpublished data）。この現象は、不死化すると、正常な機能を発現していても、抗癌剤に対して高い感受性を持つようになる可能性を示唆する。

化合物[11]による細胞死誘導にはジエタノラミンの誘導およびコリン代謝の変調が関与することが示唆された。ジエタノラミンの細胞傷害活性とコリン代謝異常の論文は、マウスの系で数編報告されているのみであり^{59, 60)}、ヒト細胞

を用いた研究報告はない。化合物が細胞内で結合する分子や、誘導される細胞死のタイプを究明することが今後の課題である。

化合物[11]のクロモン環の5～7位に、さらに置換基を導入することが可能である。これら置換基導入化合物を合成し、その選択毒性を検証することが重要である。また、コンピューターケミストリーを駆使して、活性物質の構造を予測し、合成し、活性を検証することも有効であると思われる。

謝辞

本研究において、試料の合成と分析に御協力、そして論文作成に御指導いただきました、明海大学歯学部病態診断治療学講座薬理学分野 坂上 宏教授、形態機能育成学講座解剖学分野 天野 修教授、口腔生物再生医工学講座基礎化学分野 石原真理子講師、電子顕微鏡室 神田由未子先生、城西大学薬学部 杉田義昭教授、高尾浩一助教、明治薬科大学 植沢芳広准教授、慶應義塾大学先端研究所 杉本昌弘准教授、聖マリアンナ医科大学微生物学教室 中島秀喜教授、金本大成講師、寺久保繁美先生に謹んで深謝申し上げます。

論文執筆に終始御教示、御校閲を賜りました、明海大学歯学部口腔生物再生医工学講座生化学部分野 友村明人教授、病態診断治療学講座病理学分野 草間薫教授、ならびに機能保存回復学講座歯内療法学分野 横瀬敏志教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を行うにあたり御協力を戴きました、明海大学歯学部病態診断治療学講座薬理学研究室の皆様にも謹んで深謝申し上げます。

引用文献

- 1) Okuda T, Yoshida T and Hatano T: Hydrolyzable tannins and related polyphenols. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* 66, 1-117, 1995
- 2) Nomura T and Fukai T. Phenolic constituents of licorice (*Glycyrrhiza* species). *In: Progress in Chemistry of Organic Natural Products* 73. (Herz W, Kirby GW, Moore RF, Steglich W, Tam Ch, eds), Wien, Springer, 1998, pp 1-140
- 3) Lewis NG and Yamamoto E: Lignin, occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41, 455-496, 1990
- 4) Sakagami H: Biological activities and possible dental application of three major groups of polyphenols. *J Pharmacol Sci* 126, 92-106, 2014
- 5) Choi J-Y, Kim H, Choi Y-J, Ishihara A, Back K and Lee S-G: Cytoprotective activities of hydroxycinnamic acid amides of serotonin against oxidative stress-induced damage in HepG2 and HaCaT cells. *Fitoterapia* 81, 1134-1141, 2010
- 6) Wu Z, Zheng L, Li Y, Su F, Yue X, Tang W, Ma X, Nie J and Li H: Synthesis and structure–activity relationship and effects of phenylpropanoid amides of octamine and dopamine on tyrosinase inhibition and antioxidation. *Food Chem* 134, 1128-1131, 2012
- 7) Takahashi T and Miyazawa M: Synthesis and structure–activity relationships of phenylpropanoid amides of serotonin on tyrosinase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 1983-1986, 2011
- 8) Mellay-Hamon VL and Criton M: Phenylethylamide and phenylmethanamide derivatives as new tyrosinase inhibitors. *Biol Pharm Bull* 32, 301-303, 2009.
- 9) Takahashi T and Miyazawa M: *N*-Caffeoyl serotonin as selective COX-2 inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 2494-2496, 2012
- 10) Fill TP, Geris dos Santos RM, Barisson A, Rodrigues-Filho E and Souza AQ: Co-production of *bis*phenylpropanoid amides and meroterpenes by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in the root bark of *Melia azedarach*. *Z Naturforsch C*. 64, 355-360, 2009
- 11) Tanaka E, Tanaka C, Mori N, Kuwahara Y and Tsuda M: Phenylpropanoid amides of serotine accumulate in witches' broom diseased bamboo. *Phytochemistry* 64, 965-969, 2003
- 12) Kang K, Park S, Kim YS, Less S and Back K: Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. *App Microbiol Biotechnol* 83, 27-34, 2009

- 13) Butt MS, Pasha I, Sultan MT, Randhawa MA, Saeed F and Ahmed W: Black pepper and health claims: a comprehensive treatise. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53(9), 875-886, 2013
- 14) McNamara FN, Randall A and Gunthorpe MJ: Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1)". *Br. J. Pharmacol* 144 (6), 781-790, 2005
- 15) Bhardwaj RK, Glaeser H, Becquemont L, Klotz U, Gupta SK and Fromm MF: Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther* 302 (2), 645-650, 2002
- 16) Najjar IA, Sharma SC, Singh GD, Koul S, Gupta PN, Javed S and Johri RK: Involvement of P-glycoprotein and CYP 3A4 in the enhancement of etoposide bioavailability by a piperine analogue. *Chem Biol Interact* 190(2-3), 84-90, 2011
- 17) Sharma S, Kumar M, Sharma S, Nargotra A, Koul S and Khan IA: Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 65(8), 1694-1701, 2010
- 18) Wattanathorna J, Chonpathompikunlerb P, Muchimapuraa S, Pripremc A and Tankamnerdthai O: Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food Chem Toxicol* 46 (9), 3106–3110, 2008.
- 19) Bang JS, Oh DH, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, Yang HI, Yoo MC, Hahm DH and Kim KS: Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res Ther* 11(2), R49, 2009. Doi. 10.1186/ar2662
- 20) Doucette CD, Hilchie AL, Liwski R and Hoskin DW: Piperine, a dietary phytochemical, inhibits angiogenesis. *J Nutr Biochem* 24, 231-239, 2013
- 21) Das B, Kundu J, Bachar SC, Uddin MA and Kundu JK: Antitumor and antibacterial activity of ethylacetate extract of *Ludwigia hyssopifolia* Linn and its active principle piperine. *Pak J Pharm Sci* 20(2), 128-131, 2007
- 22) Yaffe PB, Power Coombs MR, Doucette CD, Walsh M and Hoskin DW: Piperine, an alkaloid from black pepper, inhibits growth of human colon cancer cells via G1 arrest and apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Mol Carcinog*. 2014 in press. Doi: 10.1002/mc.22176
- 23) Fofaria NM, Kim SH and Srivastava SK: Piperine causes G1 phase cell-cycle arrest and apoptosis in melanoma cells through checkpoint kinase-1 activation. *PLoS One* 9(5): 2014 e94298. doi:10.1371/journal.pone.0094298
- 24) Lin Y, Xu J, Liao H, Li L and Pan L: Piperine induces apoptosis of lung cancer A549 cells via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Tumour Biol* 35(4),

3305-3310, 2014

- 25) Yaffe PB, Doucette CD, Walsh M and Hoskin DW: Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. *Exp Mol Pathol* 94(1), 109-114, 2013
- 26) Ouyang DY, Zeng LH, Pan H, Xu LH, Wang Y, Liu KP and He XH: Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell-cycle arrest and autophagy. *Food Chem Toxicol* 60, 424-430, 2013
- 27) Song QF, Qu YC, Zheng HB, Zhang GH, Lin HG and Yang JL: Differentiation of erythroleukemia K562 cells induced by piperine. *Ai Zheng* 27(6), 571-574, 2008 (in Chinese)
- 28) Pathak N and Khandelwal S: Cytoprotective and immunomodulating properties of piperine on murine splenocytes: an in vitro study. *Eur J Pharmacol* 576(1-3), 160-170, 2007
- 29) Choi BM, Kim SM, Park TK, Li G, Hong SJ, Park R, Chung HT and Kim BR: Piperine protects cisplatin-induced apoptosis via heme oxygenase-1 induction in auditory cells. *J Nutr Biochem* 18(9), 615-622, 2007
- 30) Fu M, Sun ZH and Zuo HC: Neuroprotective effect of piperine on primarily cultured hippocampal neurons. *Biol Pharm Bull* 33(4), 598-603, 2010
- 31) Gomes A, Fernandes E, Silva AMS, Santos CMM, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS and Lima JLFC: 2-Styrylchromones: novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Bioorg Med Chem* 15, 6027-6036, 2007
- 32) Doria G, Romeo C, Forgione A, Sberze P, Tibolla N, Corno ML, Cruzzola G and Cadelli G: Antiallergic agents. III. Substituted trans-2-ethenyl-4-oxo-4H-benzopyran-6-carboxylic acids. *Eur J Med Chem* 14, 347-351, 1979
- 33) Gomes A, Fernandes E, Silva AMS, Pinto DCGA, Santos CMM, Cavaleiro JAS and Lima JLFC: Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. *Biochem Pharmacol* 78, 171-177, 2009
- 34) Momoi K, Sugita Y, Ishihara M, Satoh K, Kikuchi H, Hashimoto K, Yokoe I, Nishikawa H, Fujisawa S, and Sakagami H: Cytotoxic activity of styrylchromones against human tumor cell lines. *In Vivo* 19: 157-163, 2005
- 35) Marinho J, Pedro M, Pinto DCGA, Silva AMS, Cavaleiro JAS, Sunkel CE and Nascimento MSJ: 4'-Methoxy-2-styrylchromone a novel microtubule-stabilizing antimitotic agent. *Biochem Pharmacol* 75, 826-835, 2008
- 36) Shaw AY, Chang CY, Liao HH, Lu PJ, Chen HL, Yang CN and Li HY: Synthesis of

- 2-styrylchromones as a novel class of antiproliferative agents targeting carcinoma cells. *Eur J Med Chem* 44, 2552-2562, 2009
- 37) Desideri N, Mastromarino P and Conti C: Synthesis and evaluation of antirhinovirus activity of 3-hydroxy and 3-methoxy 2-styrylchromones. *Antivir Chem Chemother* 14, 195-203, 2003
 - 38) Conti C, Mastromarino P, Goldoni P, Portalone G and Desideri N: Synthesis and anti-rhinovirus properties of fluoro-substituted flavonoids. *Antivir Chem Chemother* 16, 267-276, 2005
 - 39) Conti C and Desideri N: New 4H-Chromen-4-one and 2H-chromene derivatives as anti-picornavirus capsid-binders. *Bioorg Med Chem* 18, 6480-6488, 2010
 - 40) Silva VLM., Silva AMS, Pinto DCGA, Cavaleiro JAS, Vasas A and Patonay T: Synthesis of (E)- and (Z)-3-styrylchromones. *Monatsh Chem* 139, 1307-1315, 2008
 - 41) Takao K, Ishikawa R and Sugita Y: Synthesis and biological evaluation of 3-styrylchromone derivatives as free radical scavengers and α -glucosidase inhibitors. *Chem Pharm Bul* 62, 810-815, 2014
 - 42) Takahashi T and Miyazawa M: Synthesis and structure-activity relationships of serotonin derivatives effect on α -glucosidase inhibition. *Med Chem Res* 21, 1762-1770, 2012
 - 43) Singh IP, Jain SK, Kaur A, Singh S, Kumar R, Garg P, Sharma SS and Arora SK: Synthesis and antileishmanial activity of piperoyl-amino acid conjugates. *Eur J Med Chem* 45, 3439-3445, 2010
 - 44) Kantoh K, Ono M, Nakamura Y, Nakamura Y, Hashimoto K, Sakagami H and Wakabayashi H: Hormetic and anti-radiation effects of tropolone-related compounds. *In Vivo* 24, 843-852, 2010
 - 45) Horikoshi M, Kimura Y, Nagura H, Ono T and Ito H: A new human cell line derived from human carcinoma of the gingiva. I. Its establishment and morphological studies. *Jpn J Oral Maxillofac Surg* 20: 100-106, 1974 (in Japanese)
 - 46) Nakashima H, Murakami T, Yamamoto N, Sakagami H, Tanuma S, Hatano T, Yoshida T and Okuda T: Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Res* 18, 91-103, 1992
 - 47) Ohno H, Araho D, Uesawa Y, Kagaya H, Ishihara M, Sakagami H and Yamamoto M: Evaluation of cytotoxicity and tumor specificity of licorice flavonoids based on chemical structures. *Anticancer Res* 33, 3061-3068, 2013
 - 48) Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Ando Y, Kanda Y,

- Hibino Y, Nakajima H and Sakagami H: Effects of TiO₂ nanoparticles on cytotoxic action of chemotherapeutic drugs against human oral squamous cell carcinoma cell lines. *In Vivo* 28, 209-216, 2014
- 49) Sakagami H, Sugimoto M, Tanaka S, Onuma H, Ota S, Kaneko M, Soga T and Tomita M: Metabolomic profiling of sodium fluoride-induced cytotoxicity in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Metabolomics* 10, 270-279, 2014
- 50) Bisaglia M, Greggio E, Beltramini and Bubacco L: Dysfunction of dopamine homeostasis: clues in the hunt for novel Parkinson's disease therapies. *FASEB J* 27, 2101-2110, 2013
- 51) Kunwari A, Barik A, Sandur SK and Indira Priyadarsini K: Differential antioxidant/pro-oxidant activity of dimethoxycurcumin, a synthetic analogue of curcumin. *Free Radic Res* 45, 959-956, 2011
- 52) Gasteiger J and Marsili M: Iterative partial equalization of orbital electronegativity - A rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* 36, 3219, 1980
- 53) Cruciani G, Crivori P, Carrupt P-A and Testa B: Molecular Fields in Quantitative Structure-Permeation Relationships: the VolSurf Approach. *J Mol Struct (Theochem)* 503, 17-30, 2000.
- 54) Ji JL, Huang XF and Zhu HL: Curcumin and its formulations: potential anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem* 12(3), 210-218, 2012
- 55) Sakagami H, Chowdhury SA, Suzuki F, Hashimoto K, Hatano H, Takekawa H, Ishihara M, Kikuchi H, Nishikawa H, Taniguchi S, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Fukai T, Shirataki Y, Kawase M, Watanabe K, Mimaki Y, Itoh K, Horiuchi A, Chai W, Horiuchi A and Motohashi N: Tumor-specific cytotoxic activity of polyphenols, terpenoids, ketones and other synthetic compounds. In: *Functional Polyphenols and Carotenes with Antioxidative Action*, ed., Motohashi, Research Signpost, Lerala, India, pp133-176, 2005
- 56) Singh DV, Agarwal S, Singh P, Godbole MM and Misra K: Curcumin conjugates induce apoptosis via a mitochondrion-dependent pathway in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 14(10), 5797-804, 2013
- 57) Singh AK and Misra K: Human papilloma virus 16 E6 protein as a target for curcuminoids, curcumin conjugates and congeners for chemoprevention of oral and cervical cancers. *Interdiscip Sci* 5(2), 112-118, 2013
- 58) Conti C and Desideri N: New 4H-Chromen-4-one and 2H-chromene derivatives as anti-picornavirus capsid-binders. *Bioorg Med Chem* 18, 6480-6488, 2010
- 59) Nickescu MD, Wu R, Guo A, de Costa KA and Zeisel SH: Diethanolamine alters proliferation and choline metabolism in mouse neural precursor cells. *Toxicol Sci*

96, 321-326, 2007

- 60) Craciunescu CN, Wu R and Zeisel SH: Diethanolamine alters neurogenesis and induces apoptosis in fetal mouse hippocampus. *FASEB J* 20, 1635-1640, 2006
- 61) Ishidate K: Choline/ethanolamine kinase from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1348, 70-78, 1997
- 62) Suzuki R, Matsuo S, Sakagami H, Okada Y and Shirataki Y: Search of new cytotoxic crude materials against human oral squamous cell carcinoma using NMR metabolomics. *Anticancer Res* 34 (8), 4117-4120, 2014
- 63) Tamura N, Hirano K, Kishino K, Hashimoto K, Amano O, Shimada J and Sakagami H: Analysis of type of cell death induced by topoisomerase inhibitor (SN-38) in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 32(11), 4823-4832, 2012
- 64) Suzuki F, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Matsumoto H, Shimada J, Kawase M, Sunaga K, Tsuda T, Satoh K and Sakagami H: Induction of tumor-specific cytotoxicity and apoptosis by doxorubicin. *Anticancer Res* 25, 887-894, 2005
- 65) Iida S, Shimada J and Sakagami H: Cytotoxicity induced by docetaxel in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *In Vivo* 27, 321-332, 2013

Table 1. Cytotoxic activity of twelve phenylpropanoid amide derivatives. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate assays.

Phenylpropanoid amides	CC ₅₀ (μ M)										TS	
	Human oral squamous cell carcinoma cell					Human normal oral cell						
	Ca9-22 (A)	HSC-2	HSC-3	HSC-4	mean \pm S.D. (B)	HGF (C)	HPLF	HPC	mean \pm S.D. (D)	D/B	C/A	
1	68 \pm 39	155 \pm 9.4	262 \pm 11	218 \pm 37	176 \pm 8.4	180 \pm 25	243 \pm 3.8	255 \pm 5.5	226 \pm 40	1.3	2.6	
2	66 \pm 38	229 \pm 8.6	238 \pm 40	269 \pm 60	201 \pm 91	207 \pm 13	295 \pm 11	257 \pm 2.9	253 \pm 44	1.3	3.1	
3	79 \pm 44	94 \pm 28	89 \pm 10	227 \pm 20	122 \pm 70	>400	>400	334 \pm 42	>378	>3.1	>5.1	
4	21 \pm 7.5	25 \pm 7.3	88 \pm 22	53 \pm 14	47 \pm 31	62 \pm 9.9	65 \pm 18	51 \pm 6.4	59 \pm 7.4	1.3	3.0	
5	222 \pm 49	274 \pm 18	277 \pm 7.5	299 \pm 11	268 \pm 33	211 \pm 7.0	220 \pm 13	275 \pm 29	235 \pm 35	0.9	1.0	
6	153 \pm 11	45 \pm 9.6	74 \pm 7.5	126 \pm 4.0	100 \pm 49	325 \pm 73	333 \pm 115	>363	>340	>3.4	2.1	
7	261 \pm 74	54 \pm 6.5	174 \pm 29	83 \pm 1.5	143 \pm 84	269 \pm 16	212 \pm 12	271 \pm 3.6	251 \pm 34	1.8	1.0	
8	>400	87 \pm 8.7	316 \pm 40	272 \pm 7.8	268 \pm 132	352 \pm 54	278 \pm 62	320 \pm 8.7	317 \pm 37	1.2	0.9	
9	361 \pm 46	72 \pm 25	172 \pm 49	221 \pm 2.1	207 \pm 120	318 \pm 12	306 \pm 13	322 \pm 6.7	315 \pm 8.3	1.5	0.9	
10	236 \pm 92	74 \pm 5.5	122 \pm 24	184 \pm 5.0	154 \pm 71	111 \pm 11	146 \pm 12	212 \pm 24	156 \pm 51	1.0	0.5	
11	134 \pm 7.8	142 \pm 1.0	139 \pm 17	181 \pm 2.0	149 \pm 22	164 \pm 5.5	175 \pm 2.0	242 \pm 7.5	194 \pm 42	1.3	1.2	
12	157 \pm 16	102 \pm 11	139 \pm 20	130 \pm 4.6	132 \pm 23	117 \pm 26	117 \pm 15	158 \pm 3.5	131 \pm 24	1.0	0.7	
Positive controls:												
Docetaxel	<0.0078	<0.0078	<0.0078	<0.0078	<0.0078	>1	>1	>1	>1	>128	>128	
5-FU	59.4 \pm 17.7	12.1 \pm 3.1	41.5 \pm 10.5	<7.8	30.2 \pm 24.6	>2000	>2000	>2000	>2000	>66	>34	
Doxorubicin	0.74 \pm 0.23	0.22 \pm 0.03	0.40 \pm 0.11	0.20 \pm 0.05	0.39 \pm 0.25	1.70 \pm 0.47	1.30 \pm 0.20	>5.0	2.67 \pm 2.0	6.8	2.3	

HGF: Human gingival fibroblast; HPC, pulp cells; HPLF, periodontal ligament fibroblast; Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4: oral squamous cell carcinoma cell lines; TS: Tumor selectivity index; CC₅₀: 50% cytotoxic concentration; 5-FU: 5-fluorouracil.

Table 2. Anti-HIV activity of phenylpropanoid amides and chemotherapeutic agents.

Each value represents the mean of triplicate determinations.

Phenylpropanoid amides	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	SI
1	196.84	>400	<1
2	226.11	>400	<1
3	121.51	>400	<1
4	30.19	>400	<1
5	192.25	>400	<1
6	158.56	>400	<1
7	49.75	>400	<1
8	51.16	>400	<1
9	43.74	>400	<1
10	220.69	>400	<1
11	193.13	>400	<1
12	47.16	>400	<1
Positive controls			
Dextran sulfate (μg/ml)	620.5	0.05	12363
Curdan sulfate (μg/ml)	>1000	0.18	>5523
Azidothymidine (μM)	232.87	0.015	15882
2',3'-Dideoxycytidine (μM)	2145.33	1.2	1789

CC₅₀: 50% Cytotoxic concentration; EC₅₀: 50% effective concentration; SI: selectivity index (CC₅₀/EC₅₀).

Table 3. Cytotoxic activity of twelve piperic acid amides. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate assays.

Piperic acid amide	CC ₅₀ (μ M)										TS	
	Human oral squamous cell carcinoma cells					Human normal oral cells						
	Ca9-22	HSC-2	HSC-3	HSC-4	mean \pm S.D.	HGF	HPLF	HPC	mean \pm S.D.			
(A)				(B)	(C)			(D)	(D/B)	(C/A)		
1	128 \pm 14	512 \pm 38	583 \pm 202	600 \pm 24	456 \pm 222	473 \pm 22	513 \pm 13	501 \pm 39	496 \pm 21	1.1	3.6	
2	239 \pm 50	335 \pm 54	487 \pm 57	450 \pm 72	378 \pm 113	539 \pm 19	510 \pm 7.0	518 \pm 19	522 \pm 15	1.4	2.3	
3	103 \pm 15	114 \pm 14	134 \pm 14	122 \pm 11	118 \pm 13	81 \pm 22	127 \pm 1.5	137 \pm 13	115 \pm 30	1.0	0.8	
4	107 \pm 7.6	118 \pm 51	170 \pm 31	152 \pm 18	137 \pm 29	122 \pm 8.0	137 \pm 7.0	131 \pm 47	130 \pm 7.5	1.0	1.1	
5	7.4 \pm 0.8	13 \pm 2.1	73 \pm 23	199 \pm 174	73 \pm 89	21 \pm 4.0	68 \pm 45	82 \pm 31	57 \pm 32	0.8	2.8	
6	13 \pm 4.6	18 \pm 7.0	81 \pm 2.1	208 \pm 88	80 \pm 91	16 \pm 3.8	41 \pm 2.6	19 \pm 1.5	25 \pm 14	0.3	1.3	
7	11 \pm 0.1	16 \pm 6.4	18 \pm 4.2	14 \pm 2.5	15 \pm 3.0	13 \pm 0.58	23 \pm 3.2	20 \pm 1.0	19 \pm 5.1	1.3	1.2	
8	38 \pm 8.5	51 \pm 13	131 \pm 60	80 \pm 17	75 \pm 41	>800	>800	>800	>800	>10.7	>21.1	
9	79 \pm 11	447 \pm 331	97 \pm 3.2	>800	>356	535 \pm 8.7	535 \pm 13	573 \pm 26	548 \pm 22	<1.5	6.8	
10	33 \pm 1.2	51 \pm 13	38 \pm 7.2	58 \pm 15	45 \pm 12	41 \pm 1.7	46 \pm 2.3	75 \pm 1.2	54 \pm 18	1.2	1.2	
11	455 \pm 123	696 \pm 105	>800	500 \pm 53	>613	658 \pm 36	617 \pm 33	680 \pm 41	652 \pm 32	<1.1	1.4	
12	183 \pm 9.0	262 \pm 14	268 \pm 6.5	250 \pm 3.5	241 \pm 39	343 \pm 104	497 \pm 5.5	467 \pm 50	436 \pm 82	1.8	1.9	
5-FU	88 \pm 11	24 \pm 7.8	38 \pm 7.6	28 \pm 4.9	45 \pm 30	>1000	>1000	>1000	>1000	>22.2	>11.4	

HGF: Human gingival fibroblast; HPC, pulp cells; HPLF, periodontal ligament fibroblast; Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4: oral squamous cell carcinoma cell lines; TS: tumor-selectivity index; CC₅₀: 50% cytotoxic concentration; 5-FU: 5-fluorouracil.

Table 4. Anti-HIV activity of piperic acid amides and chemotherapeutic agents. Each value represents the mean of triplicate determinations.

Piperic acid amides	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	SI
1	324	>800	<1
2	253	>800	<1
3	112	>800	<1
4	89	>800	<1
5	36	>800	<1
6	279	>800	<1
7	2	>800	<1
8	46	>800	<1
9	688	>800	<1
10	279	>800	<1
11	32	>800	<1
12	175	>800	<1
Positive controls			
Dextran sulfate (μg/ml)	621	0.05	12363
Curdlan sulfate (μg/ml)	>1000	0.18	5523
Azidothymidine	233	0.015	15882
2',3'-Dideoxycytidine	2145	1.2	1789

CC₅₀: 50% Cytotoxic concentration; EC₅₀: 50% effective concentration; SI: selectivity index (CC₅₀/EC₅₀).

This experiment was performed with the samples of phenylpropanoid amides, and therefore used the same positive control.

Table 5. Cytotoxic activity of fifteen 3-styrylchromones. Each value represents the mean of triplicate determinations.

3-Styrylchromones	CC ₅₀ (μM)										TS	
	Human oral squamous cell carcinoma cell lines					Human normal oral cells						
	Ca9-22 (A)	HSC-2	HSC-3	HSC-4	mean±S.D. (B)	HGF (C)	HPLF	HPC	mean (D)	(D)/(B)	(C)/(A)	
1	183	94	200	80	139±61	643	533	475	550±85	4.0	3.5	
2	41	82	41	77	60±22	64	68	156	96±52	1.6	1.6	
3	263	300	278	310	288±21	560	518	715	598±104	2.1	2.1	
4	4.4	4.4	7.7	9.2	6.4±2.4	229	150	396	258±126	40.3	52.0	
5	33	92	36	61	56±27	98	83	171	117±47	2.1	3.0	
6	10	6.8	21	13	13±6.1	544	190	284	339±183	26.1	54.4	
7	43	57	58	38	49±10	140	126	97	121±22	2.5	3.3	
8	13	48	83	204	87±83	554	657	733	648±90	7.4	42.6	
9	23	25	14	28	23±6.0	457	520	600	526±72	22.9	19.9	
10	33	6.3	24	6.3	17±13	154	141	241	179±54	10.5	4.7	
11	2.1	1.0	3.6	1.2	2.0±1.2	67	74	272	138±116	69.0	31.9	
12	25	2.4	32	3.3	16±15	161	187	267	205±55	12.8	6.4	
13	>800	>800	240	>800	>660±280	>800	>800	>800	>800	><1.2	><1.0	
14	19	11	11	15	14±3.8	19	31	80	43±32	3.1	1.0	
15	33	9.1	22	7.5	18±12	247	222	507	325±158	18.1	7.4	
Positive control												
Doxorubicin	0.26	0.12	0.11	0.094	0.15±0.077	0.87	0.87	>10	>3.9±5.3	>26.0	3.3	
5-FU	29	13	16	13	18±7.6	>1000	>1000	>1000	>1000	>55.6	>34.5	

HGF, human gingival fibroblast; HPC, pulp cells; HPLF, periodontal ligament fibroblast; Ca9-22, HSC-2, HSC-3 and HSC-4, oral squamous cell carcinoma cell lines; TS, tumor selectivity index; CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; 5-FU, 5-fluorouracil.

Table 6. Anti-HIV activity of 3-styrylchromones and chemotherapeutic agents. Each value represents the mean of triplicate determinations.

3-Styrylchromones	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	SI
1	528.45	>800	<1
2	463.38	>800	<1
3	629.23	>800	<1
4	5.87	>800	<1
5	>800	>800	><1
6	3.39	>800	<1
7	435.71	>800	<1
8	270.56	>800	<1
9	13.76	>800	<1
10	12.92	>800	<1
11	3.26	>800	<1
12	59.91	>800	<1
13	223.28	>800	<1
14	3.59	>800	<1
15	4.76	>800	<1
Positive controls			
Dextran sulfate (μg/ml)	985.6	0.06	17125
Curdan sulfate (μg/ml)	>1000	0.14	>7002
Azidothymidine	222.2	0.011	20421
2',3'-Dideoxycytidine	2511.59	1.03	2445

CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; EC₅₀, 50% effective concentration; SI: selectivity index (CC₅₀/EC₅₀).

Table 7. Time course of cytotoxicity induction by [4], [6] and [11].

Exposure time (h)	CC50 (μM)		
	[4]	[6]	[11]
Exp. I			
1	61	65	18
3	20	45	10
6.7	21	50	9.5
21	2.5	5.1	<1.56
31	2.4	4.5	<1.56
47	2.4	4.6	<1.56
Exp. II			
1	41	42	14
3	19	19	5.9
7	20	20	5.5
23	2.6	4.2	<0.39
31	3.9	4.7	<0.39
47	4.3	2.2	<0.39

HSC-2 cells were exposed for the indicated times with various concentrations of [4], [6] or [11], replaced with fresh culture medium without sample, and incubated until 47 hours after addition of sample. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined from the dose-response curve described in Figure 12.

図の説明

Fig. 1. Structure of phenylpropanoid amides.

Fig. 2. Correlation coefficient of chemical descriptors and cytotoxicity against tumor cells (defined as T) (A) and normal cells (defined as N) (B). The mean (pCC_{50} *i.e.*, the $-\log CC_{50}$) values for normal cells and tumor cell lines were defined as N and T, respectively.

Fig. 3. Correlation coefficient of chemical descriptors and tumor specificity, defined as T-N.

Fig. 4. Structure of piperic acid amides: piperine {1-[5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]piperidine} (1), *N*-piperoyl ethanolamine (2), *N*-piperoyl putrescine (3), *N*-piperoyl cadaverine (4), *N*-piperoyl phenethylamine (5), *N*-piperoyl-3-phenylpropylamine (6), *N*-piperoyl tyramine (7), *N*-piperoyl dopamine (8), *N*-piperoyl vanillylamine (9), *N*-piperoyl serotonin (10), *N*-piperoyl histamine (11) and *N*-piperoyl-2-(2-pyridinyl)ethylamine (12).

Fig. 5. Correlation coefficient of chemical descriptors and cytotoxicity of piperic acid amides against tumor cells (defined as T) (A) and normal cells (defined as N) (B). The mean (pCC_{50} *i.e.*, the $-\log CC_{50}$) values for normal cells and tumor cell lines were defined as N and T, respectively. The descriptors used were: a_hyd (Number of hydrophobic atoms), logP(o/w) (Log of the octanol/water partition coefficient), logS (Log of the aqueous solubility), PEOE_VSA_FNEG (Fractional negative van der Waals surface area), PEOE_VSA_FPOS (Fractional positive van der Waals surface area), PEOE_VSA_NEG (Total negative van der Waals surface area), vsurf_EWmin1 (Lowest hydrophilic energy 1), vsurf_HB6 (H-bond donor capacity 6), vsurf_HB7 (H-bond donor capacity 7), vsurf_IW7 (Hydrophilic interaction-energy moment 7), vsurf_W7 (Hydrophilic volume 7).

Fig. 6. Correlation coefficient of chemical descriptors and tumor specificity of piperic acid amides, defined as T-N. The descriptors used were: a_nO (Number of oxygen atoms), PEOE_VSA_PNEG (Total negative polar van der Waals surface area), PEOE_VSA_POL (Total polar van der Waals surface area), PEOE_VSA_PPOS (Total positive polar van der Waals surface area), PEOE_VSA+4 (Sum of v_i where q_i is in the range [0.20,0.25]; v_i and q_i denote the van der Waals surface area and the partial charge of atom i , respectively), vsurf_IW8 (Hydrophilic interaction-energy moment 8).

Fig. 7. Structure of 3-styrylchromones.

Fig. 8. Effects of functional groups on cytotoxicity of 3-styrylchromones against tumor cells (defined as T). The mean (pCC₅₀ i.e., the $-\log CC_{50}$) values for tumor cell lines were defined as T.

Fig. 9. Determination coefficient of chemical descriptors and cytotoxicity of 3-styrylchromones against normal cells (defined as N). The mean (pCC₅₀ i.e., the $-\log CC_{50}$) values for normal cells were defined as N.

Fig. 10. Determination coefficient of chemical descriptors and tumor specificity of 3-styrylchromones (defined as T-N).

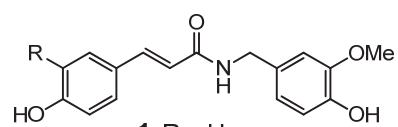
Fig. 11. Multiple regression models for the estimation of T, N and T-N.

Fig. 12. Time course of cytotoxicity induction by (*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] and (*E*)-3-(4-hydroxystyryl)-6-methoxy-4*H*-chromen-4-one [11]. Cells were incubated for the indicated times, and medium was replaced with fresh medium and incubated

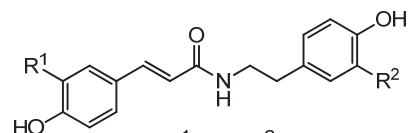
further until 47 hours after the initial addition of samples. The relative viable cell number was then determined by the MTT method. Each value presents mean of triplicate (Exp. I) and quadruplicate (Exp. II) assays. Two experiments (Exp. I and II) showed similar results. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was calculated and listed in Table VII.

Fig. 13. Induction of mitochondrial enlargement by [11]. Cells were treated for 3 h with 0 (control), 3 or 10 μ M of [11]. After washing three times with 5 ml of cold PBS(-), the cells were fixed for 1 h with 2% glutaraldehyde and the fine cell structures were observed under TEM.

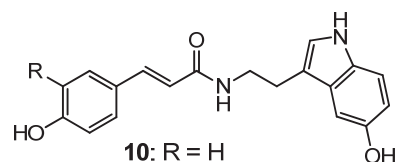
Fig. 14. Accumulation of diethanolamine during early stage of cytotoxicity induction by [11]. HSC-2 cells were treated for 3 h with 0 (control), 1, 3 and 10 μ M of [11], and intracellular concentrations of diethanolamine (A), Each value represents mean \pm S.D. of quadruplicate assays.



- 1:** R = H
2: R = OMe
3: R = OH



- 4:** R¹ = H, R² = H
5: R¹ = OMe, R² = H
6: R¹ = OH, R² = H
7: R¹ = H, R² = OH
8: R¹ = OMe, R² = OH
9: R¹ = OH, R² = OH



- 10:** R = H
11: R = OMe
12: R = OH

Fig. 1

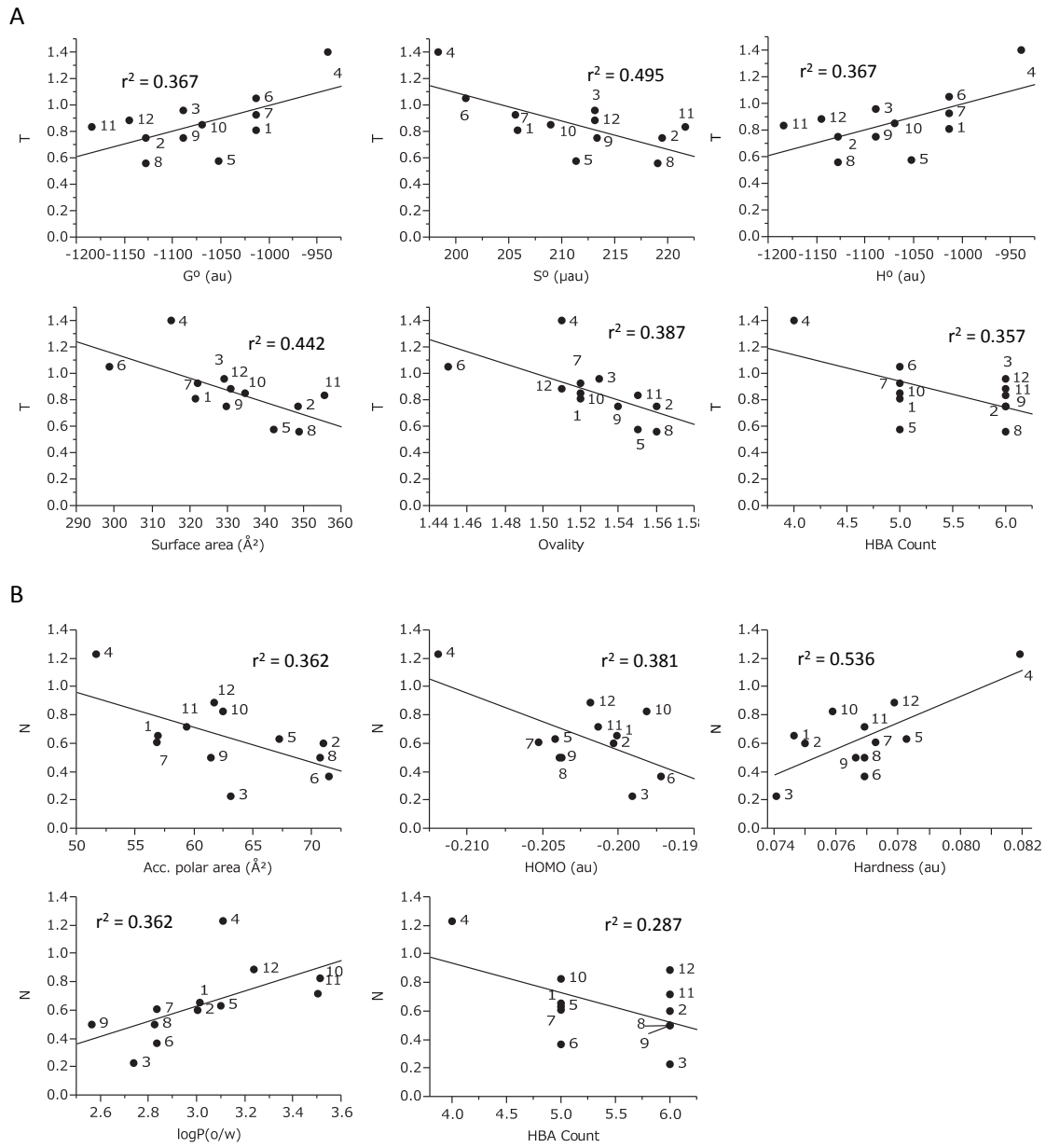


Fig. 2

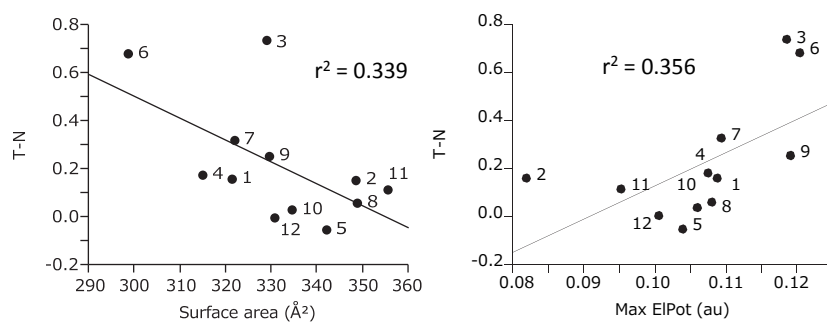


Fig. 3

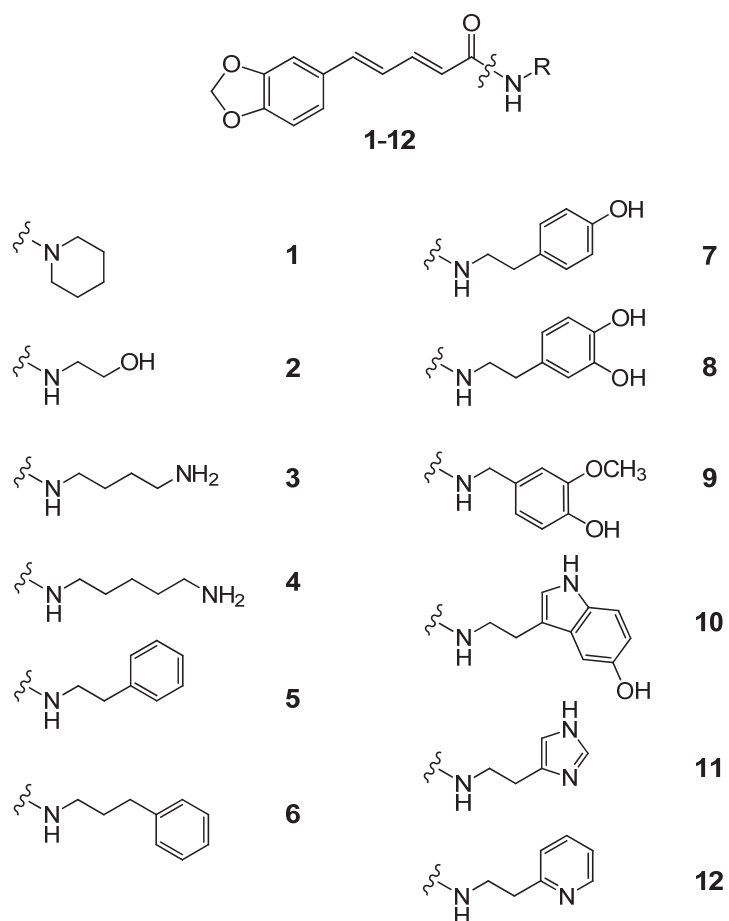


Fig. 4

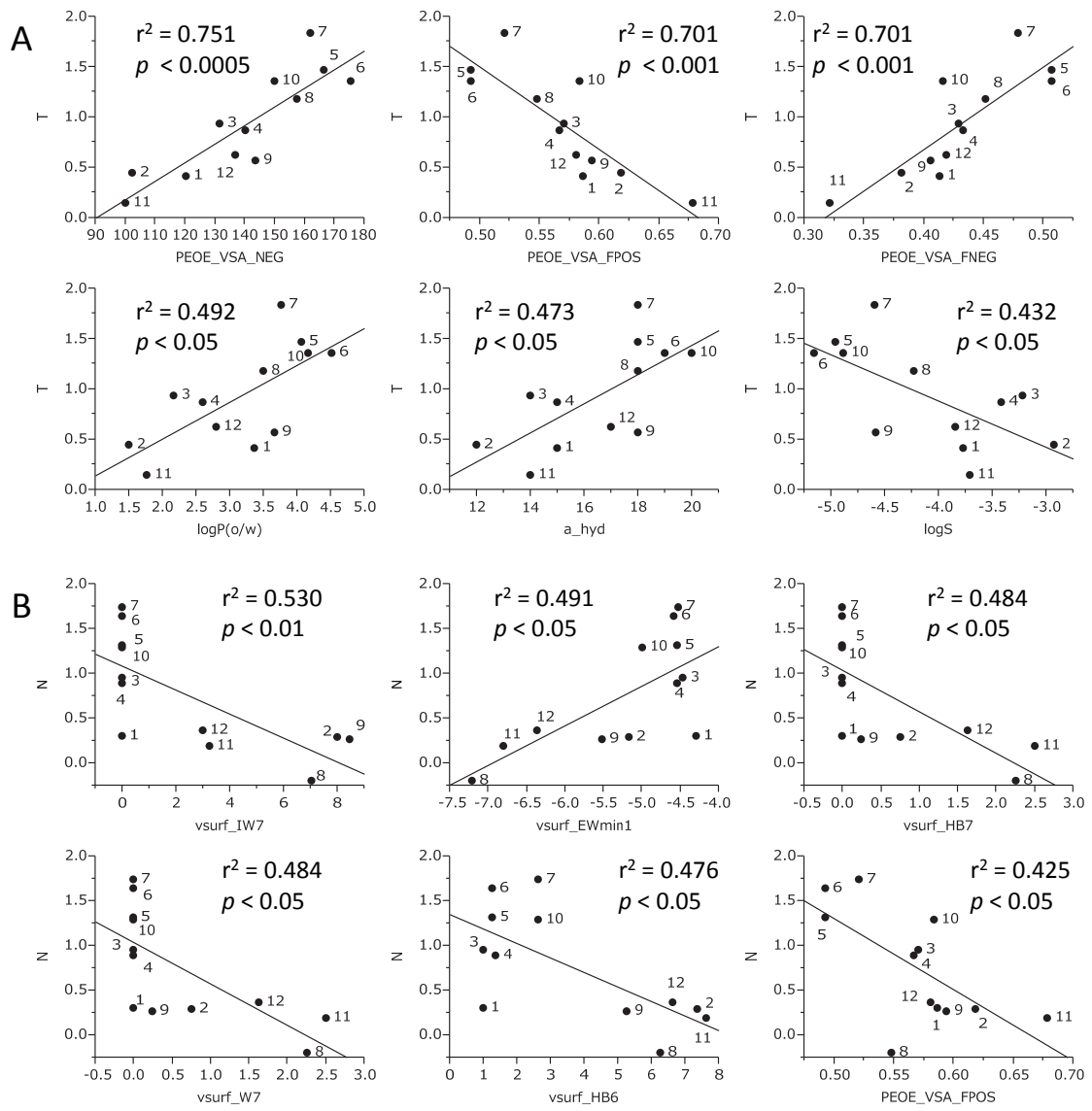


Fig. 5

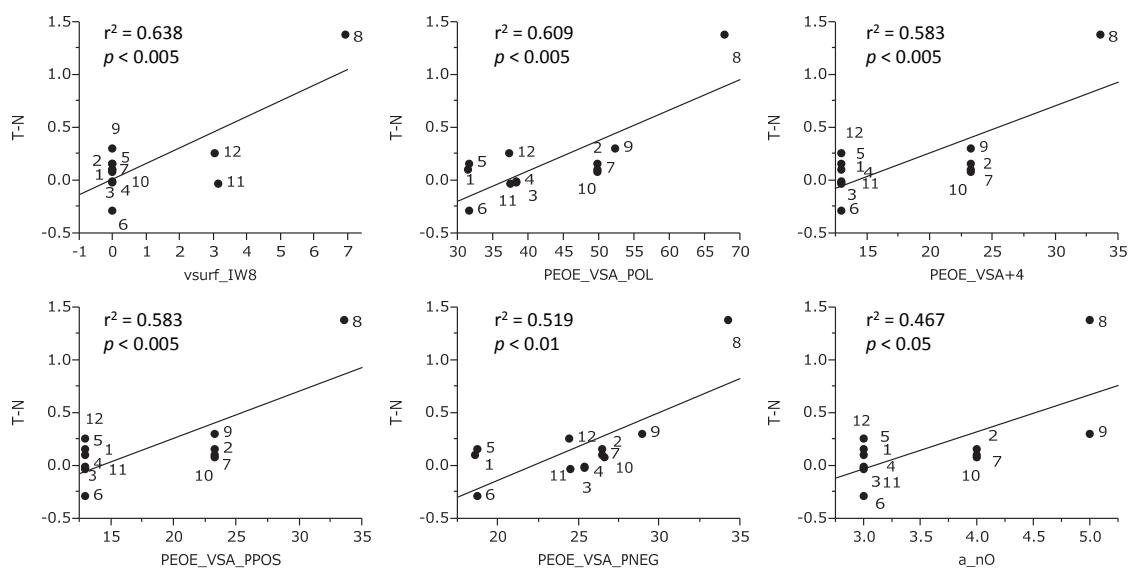
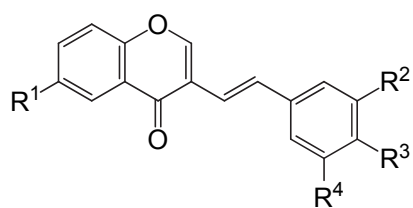


Fig. 6



Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	H	H	OMe	H
2	H	OMe	OMe	H
3	H	OMe	OMe	OMe
4	OMe	H	OMe	H
5	OMe	OMe	OMe	H
6	OMe	OMe	OMe	OMe
7	OMe	H	F	H
8	OMe	H	Cl	H
9	H	H	OH	H
10	H	OH	OH	H
11	OMe	H	OH	H
12	OMe	OH	OH	H
13	OH	H	OMe	H
14	OH	H	OH	H
15	OH	OH	OH	H

Fig. 7

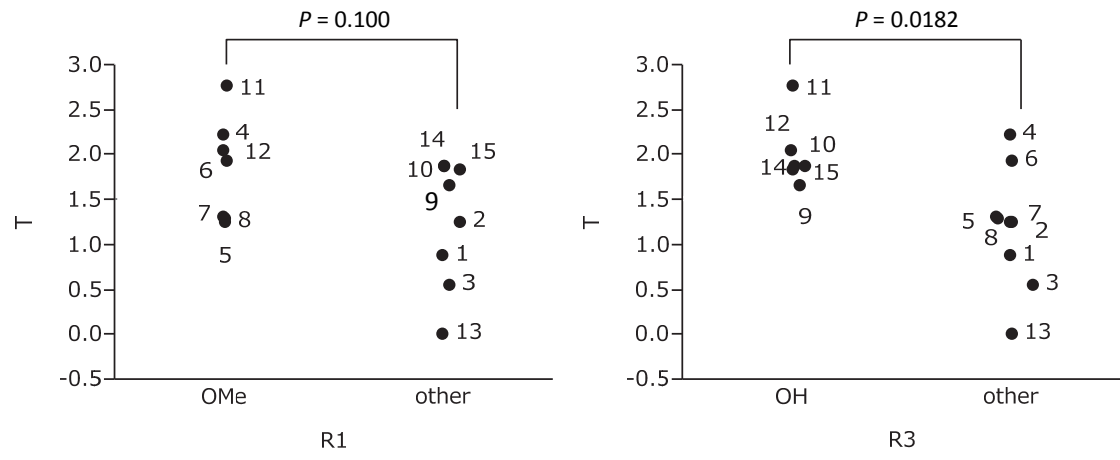


Fig. 8

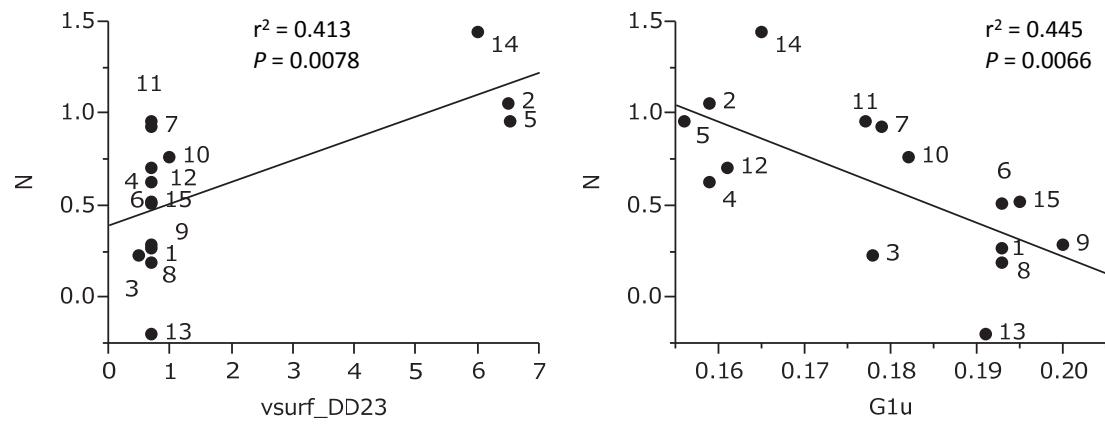


Fig. 9

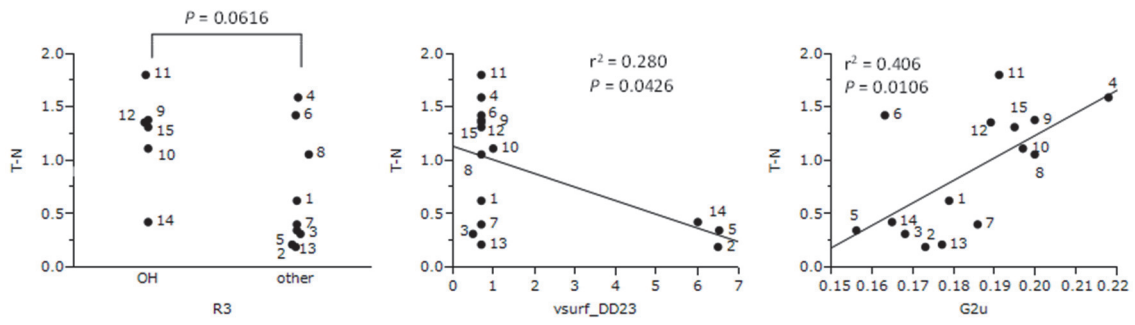
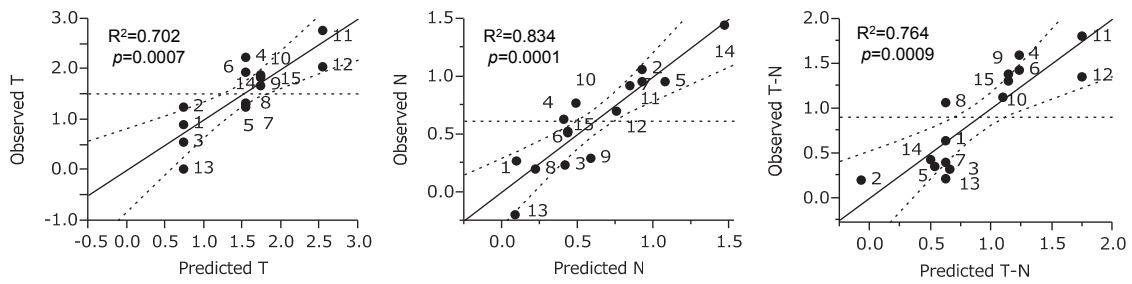


Fig. 10



$T = 0.806(\pm 0.182)R10Me + 0.999(\pm 0.221)R3OH + 0.739(\pm 0.182)$, $n=15$, $R^2=0.702$, $Q^2=0.532$, $s=0.409$
 $N = 120(\pm 24)BCUT_SMR_3 - 2.49(\pm 0.49)rgyr + 0.166(\pm 0.024)vsurf_DD23 - 304(\pm 62)$, $n=15$, $R^2=0.834$, $Q^2=0.695$, $s=0.194$
 $T - N = 0.607(\pm 0.169)diameter - 0.121(\pm 0.035)vsurf_DD23 + 1.11(\pm 0.235)R3OH - 7.17(\pm 2.26)$, $n=15$, $R^2=0.764$, $Q^2=0.570$, $s=0.308$

Fig. 11

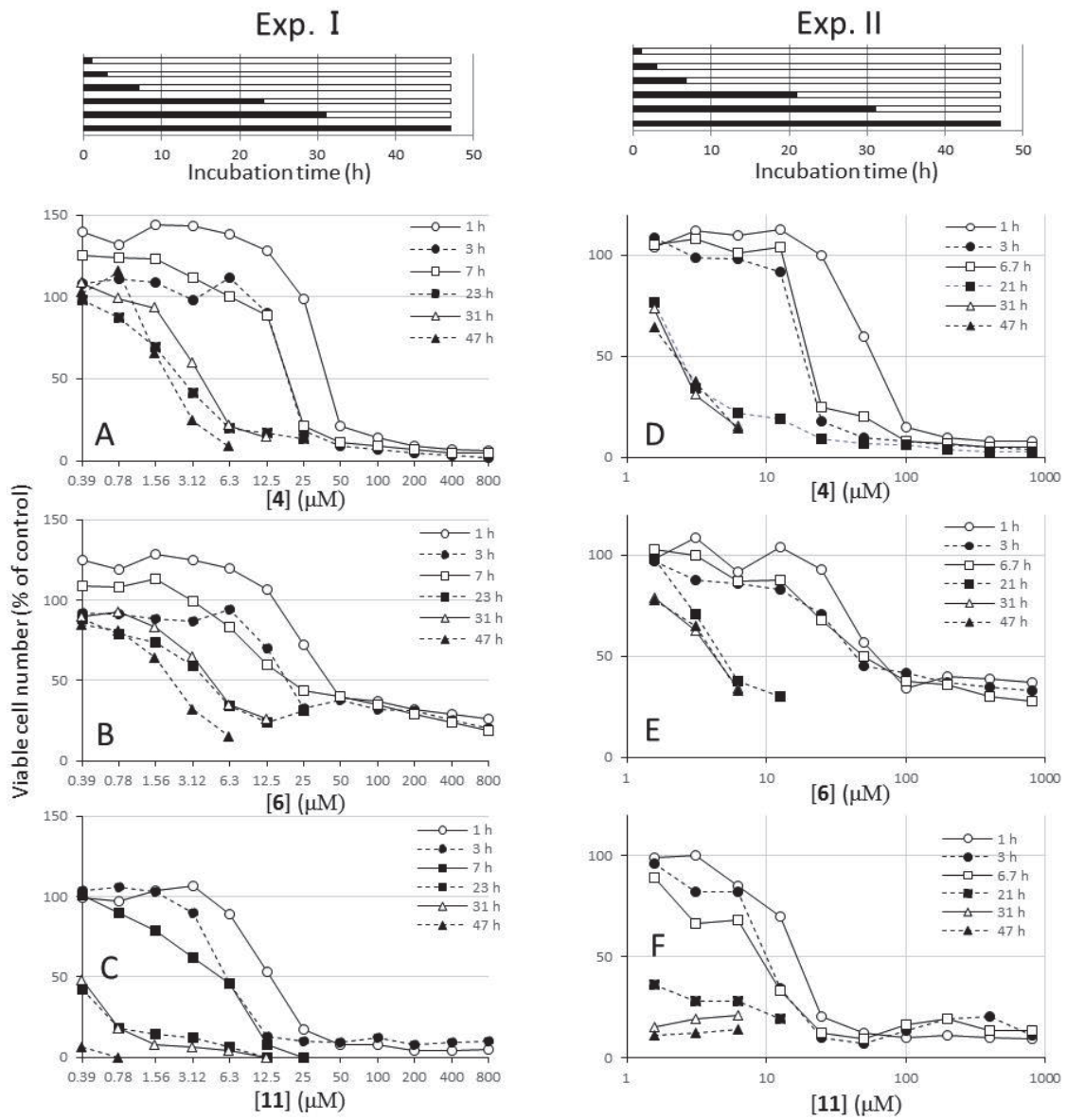


Fig. 12

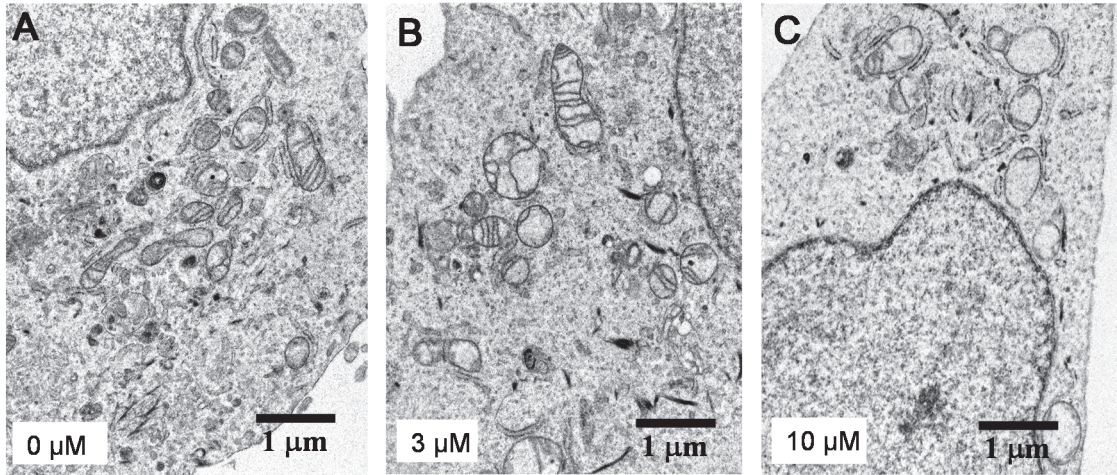


Fig. 13

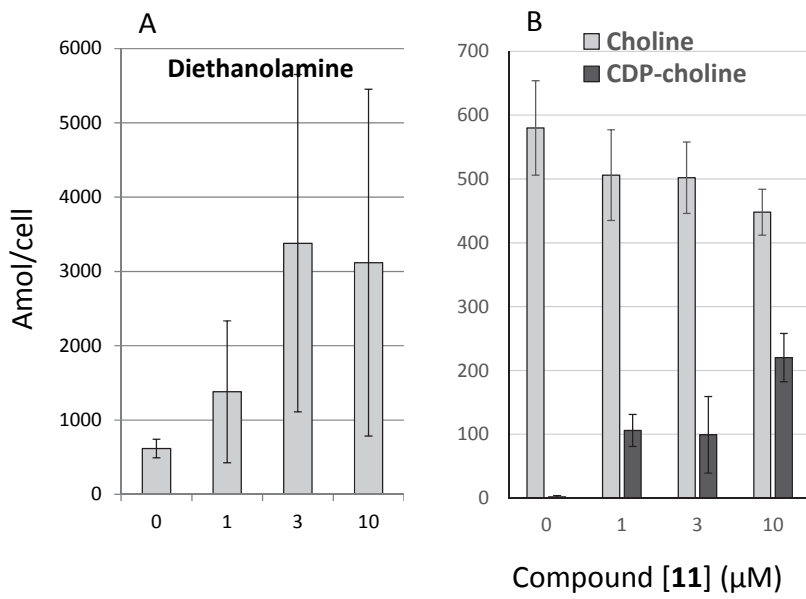


Fig. 14