

N-カフェオイルアミノ酸類の血管平滑筋弛緩作用飯塚 徹,^{*a} 船山浩子,^a 草野源次郎,^b 永井正博^aVasorelaxant Activity of *N*-Caffeoylamino AcidsToru IIZUKA,^{*a} Hiroko FUNAYAMA,^a Genjiro KUSANO,^b and Masahiro NAGAI^a
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University,^a 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku,
Tokyo 142-8501, Japan and Osaka University of Pharmaceutical Sciences,^b
4-20-1 Nasahara, Takatsuki City 569-1094, Japan

(Received June 27, 2003; Accepted August 29, 2003)

Twelve *N*-caffeoylamino acids and *N*-cinnamoylamino acids were synthesized and their vasorelaxation activity against norepinephrine (NE)-induced contraction of rat aorta was examined. The following structure-activity relationships were found. 1) On the benzene ring, the caffeoyl structure is effective for vasorelaxation, while the cinnamoyl structure reduced vasorelaxation activity. 2) Four to six carbons are more effective as the carbon chain connecting the acylamino and carboxyl terminal groups. *N*-Caffeoyl- β -alanine and *N*-caffeoyltranexamic acid were used to investigate the action mechanism of vasorelaxing activities. It is believed that these compounds antagonize NE-induced vasoconstriction by inhibiting receptor-operated calcium channels.

Key words—*N*-caffeoylamino acids; vasorelaxant activity; structure-activity relationship; receptor-operated calcium channel

緒 言

フェノールカルボン酸は構造中にフェノール性水酸基とカルボキシル基を持つ化合物の総称で、多くの植物に含有され、様々な薬理作用を持つものが多い。また、比較的簡単な構造を持つフェノールカルボン酸にも、いくつかの薬理活性が知られている。カフェー酸は、血管に対し部分作動薬として働き、¹⁾ カフェー酸メチルは抗 HIV 作用が報告されている。²⁾ 我々は、血管弛緩作用を持つ天然物に関する研究を行い、いくつかのフェノールカルボン酸類を活性物質として明らかにしてきた。^{3,4)} 特に升麻(キンポウゲ科 *Cimicifuga spp.* の根茎)の含有成分である fukinolic acid 及び関連化合物については詳細な検討を行い、その構造活性相関について検討した。⁵⁾ その結果、化合物の構造中にカフェー酸を持つものに血管平滑筋弛緩作用を見出し、fukinolic acid を始めとする数種のカフェー酸誘導体の作用を明らかにした。さらに fukinolic acid 類似のカフェー酸エステル構造を持つ、chicoric acid (キク科

植物キクニガナ *Cichorium intybus* に含まれる) 及び dicaffeoyl-meso-tartaric acid (トクサ科植物スギナ *Equisetum arvense* に含まれる) も血管弛緩作用を持つことを明らかにした (Fig. 1)。⁶⁾ これらの知見から、特にカフェー酸とヒドロキシ酸のエステル化合物の血管作用に興味を持たれた。しかしながら、カフェー酸エステルには、そのエステル結合に化学的不安定が懸念された。そこでヒドロキシ酸をアミノ酸とした化合物、すなわちカフェー酸及び桂皮酸と各種アミノ酸とのアミド化合物を合成し、それらの血管平滑筋に対する作用について構造活性相関を検討した。

材 料 と 方 法

1. 試薬 各種溶媒及び試薬は次のものを使用した。KH₂PO₄, HCl, NaCl, KCl, CaCl₂ · 2H₂O, MgSO₄ · 7H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O, NaHCO₃, glucose, diethanolamine, caffeic acid, NaOH, ethyl chloroformate, ethyl acetate, acetone, dicyclohexylcarbodiimide, dioxan, *N*-hydroxysuccinimide, glycine, β -alanine, γ -aminobutyric acid, 5-aminovaleric acid, 6-aminohexanoic acid, tranexamic acid (以上、和光

^{a)} 星薬科大学, ^{b)} 大阪薬科大学
e-mail: iizuka@hoshi.ac.jp

純薬), triethylamine, hydrazine monohydrate, 4-piperidine carboxylic acid, 4-aminocyclohexane carboxylic acid (以上, 東京化成), norepinephrine, acetylcholine, EGTA (ethylene glycol-bis(β -amino-ethylether) *N, N, N', N'*-tetraacetic acid), nicardipine \cdot HCl (以上, SIGMA)

2. 使用機器 融点は柳本ミクロ融点測定装置で測定した. EI-MS 及び CI-MS は, 日本電子 JMS-600W 型で測定した. NMR スペクトルは日本電子 JMN GX-270 型, JMN GX-500 型で測定し,

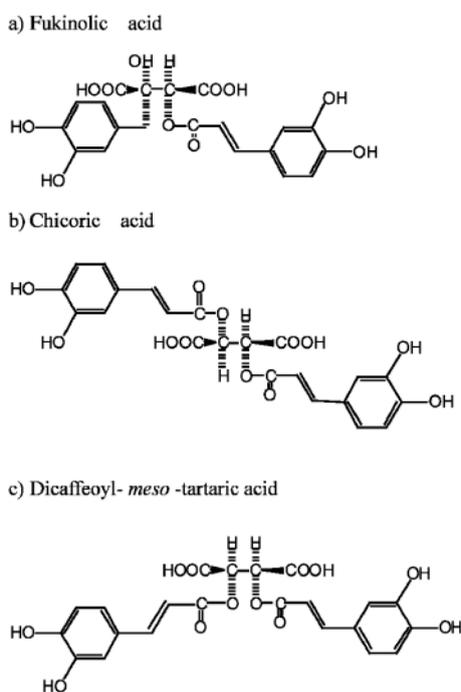


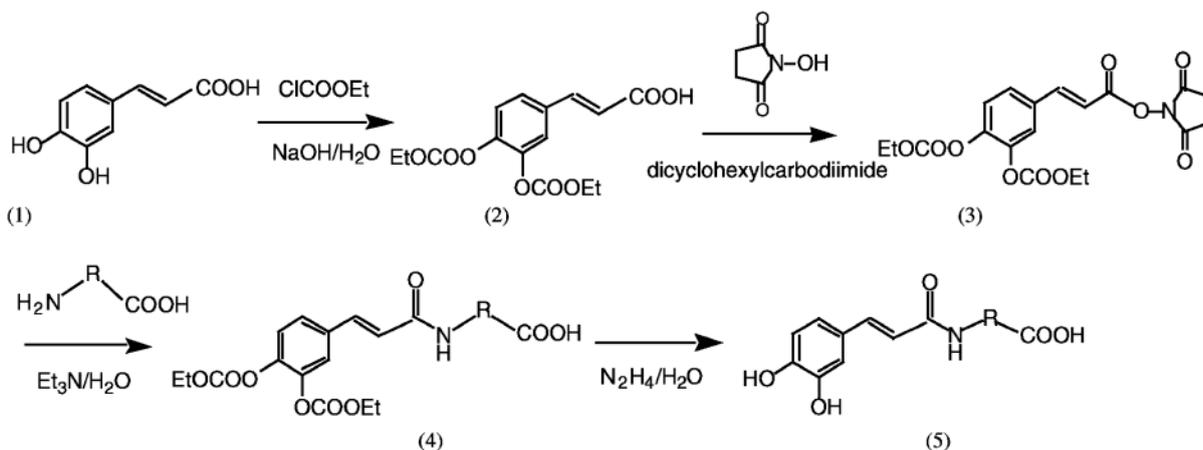
Fig. 1. Caffeic Acid Derivatives

a) Fukinolic acid, b) Chicoric acid and c) Dicafeoyl-*meso*-tartaric acid.

内標準物質として tetramethylsilane (TMS) を用いた. 元素分析は Yanaco CHN CORDER MT-5 で測定した.

3. 化合物の合成 すべての *N*-カフェオイルアミノ酸類の合成は Hanselaer らの方法⁷⁾ を一部修飾して行った (Scheme 1). すなわち, N_2 気流下で, カフェー酸 (1) を 1M NaOH に溶かし, この溶液中に ethyl chloroformate を攪拌しながら加える. さらに 2 時間反応後ろ過し, ろ液を塩酸酸性下で酢酸エチルにて抽出する. 酢酸エチル層を濃縮後 benzene から再結晶し, diethoxycarbonylcaffeic acid (2, mp 136–137°C) を得る. 次に, dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) を dioxan に溶かした溶液を, (2) 及び *N*-hydroxysuccinimide の dioxan 溶液に加え, 室温で一夜攪拌後, ろ過してろ液を得る (3). 各種アミノ酸と triethylamine の等モルを水及び dioxan に溶かす. この溶液にろ液 (3) を滴加し, 得られた混合液を 24 時間以上攪拌する (4). さらに 80% hydrazine 一水和物を (4) に加えて一夜攪拌する. 反応混合物は減圧濃縮のち, 水を加え, 塩酸で pH 3 に調整する. これを酢酸エチルで抽出し, 抽出液を水, 次に飽和食塩水で洗浄したのち, 無水硫酸ナトリウムで乾燥する. これをろ過し, ろ液を減圧濃縮し, 残留物をシリカゲルカラムクロマトに付して精製し, *N*-カフェオイルアミノ酸類 (5) を得た.

他方, *N*-シンナモイルアミノ酸類の合成は次のように行った. 各種アミノ酸のエチルエステル塩酸塩, triethylamine の等モルを水及び dioxan に溶かす. この溶液にケイヒ酸クロライドの dioxan 溶液



Scheme 1. Synthesis of *N*-Caffeoylamino Acid Derivatives

を滴加し、反応混合物を 24 時間以上攪拌し、*N*-シンナモイルアミノ酸エチルエステルを得る。減圧濃縮後、残留物に EtOH を加えて溶かし、1M の NaOH を加え、暗所で一夜放置する。これを減圧濃縮後塩酸で pH 2 に調整し一夜放置すれば、*N*-シンナモイルアミノ酸類の粗結晶を得る。これを各種溶媒から再結晶する。上の方法で合成した各化合物を Fig. 2 に示す。

1) *N*-Caffeoylglycine (**6**) Colorless needles from MeOH, mp 177—178°C (*lit.*⁷⁾ 190—210°C). ¹H-NMR は文献値に一致した.⁷⁾

2) *N*-Cinnamoylglycine (**7**) Colorless needles from EtOH/water, mp 197—198°C (*lit.*⁸⁾ 194—195°C).

3) *N*-Caffeoyl-β-Alanine (**8**) Colorless scales from MeOH, mp 185°C. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 2.49 (2H, t, *J*=6.7 Hz), 3.41 (2H, q, *J*=6.4 Hz), 6.39 (1H, d, *J*=15.9 Hz), 6.80 (1H, d, *J*=8.2 Hz, ABX type 5'-CH), 6.89 (1H, dd, *J*=1.8, 8.2 Hz, ABX type 6'-CH), 6.99 (1H, d, *J*=1.8 Hz, ABX type 2'-CH), 7.28 (1H, d, *J*=15.7 Hz), 8.1 (1H, t, *J*=5.5 Hz, NH). ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ: 34.0 (t), 34.9 (t), 113.8 (d), 115.7 (d), 118.4 (d), 120.4 (d), 126.4 (s), 139.1 (d), 145.5 (s), 147.2 (s), 165.6 (s), 172.9 (s). EI-MS *m/z*: (M⁺) 251, 121. High resolution EI-MS *m/z*: (M⁺) 251.0789 (Calcd for C₁₂H₁₃NO₅: 251.0793)

4) *N*-Cinnamoyl-β-Alanine (**9**) Colorless plates from ethyl acetate, mp 130—131°C (*lit.*⁸⁾ 145—146°C). ¹H-NMR は文献値に一致した.⁸⁾

5) *N*-Caffeoyl-γ-Aminobutyric Acid (GABA) (**10**) Colorless plates from ethyl acetate, mp 137—138°C. (*lit.*⁹⁾ 166—169°C). ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR は文献値に一致した.⁹⁾

6) *N*-Cinnamoyl GABA (**11**) Colorless plates from acetone/hexane, mp 87—89°C (*lit.*⁸⁾ 84—85°C).

7) 5-Caffeoylamino-pentanoic Acid (**12**) Colorless needles from MeOH, mp 211—212°C; ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 1.60 (2H, m), 1.66 (2H, m), 2.34 (2H, t, *J*=7.3 Hz), 3.29 (2H, t, *J*=6.7 Hz), 4.88 (1H, s, NH), 6.36 (1H, d, *J*=15.9 Hz), 6.76 (1H, d, *J*=8.2 Hz, ABX type 5'-CH), 6.90 (1H, dd, *J*=2.1, 8.2 Hz, ABX type 6'-CH), 7.00 (1H, d, *J*=2.1 Hz, 2'-CH), 7.38 (1H, d, *J*=15.9 Hz); ¹³C-NMR (CD₃OD) δ= 23.4 (t), 29.9 (t), 34.5 (t), 40.1 (t), 115.0 (d), 116.4 (d), 118.4 (d), 122.1 (d), 128.3 (s), 142.1 (d), 146.7 (s), 148.7 (s), 169.3 (s), 177.3 (s). EI-MS *m/z*: (M⁺) 279, 163. *Anal.* Calcd for C₁₇H₂₁NO₅: C, 60.20; H, 6.14; N, 5.02. Found: C, 60.17; H, 6.37; N, 5.02.

8) 6-Caffeoylamino-hexanoic Acid (**13**) Colorless plates from MeOH, mp 165—166°C; ¹H-NMR (CD₃OD) δ: 1.40 (2H, m), 1.58 (2H, p, *J*=7.3 Hz), 1.64 (2H, q, *J*=7.6 Hz), 2.31 (2H, t, *J*=7.3 Hz),

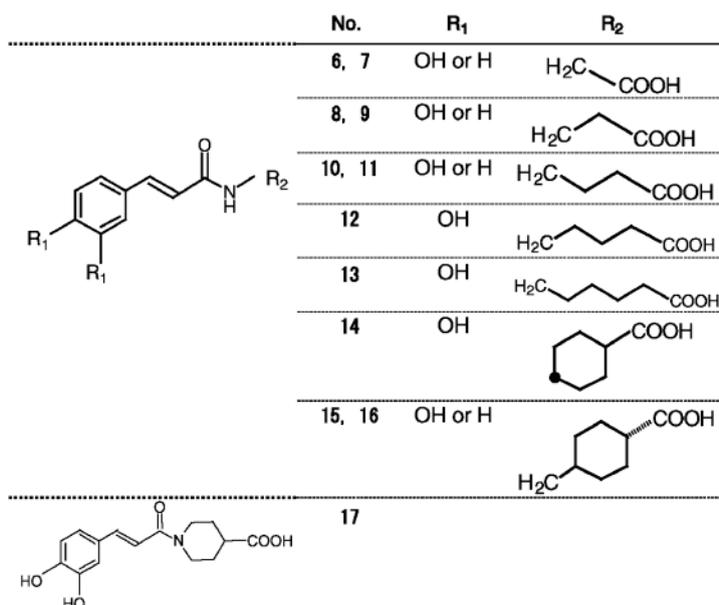


Fig. 2. Test Compounds

3.28(2H, t, $J=7.0$ Hz), 4.88(1H, s, NH), 6.35(1H, d, $J=15.6$ Hz), 6.76(1H, d, $J=8.2$ Hz, ABX type 5'-CH), 6.90(1H, dd, $J=1.8, 8.2$ Hz, ABX type 6'-CH), 7.00(1H, d, $J=1.8$ Hz, 2-CH), 7.38(1H, d, $J=15.6$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD) δ : 25.8(t), 27.6(t), 30.2(t), 34.8(t), 40.4(t), 115.0(d), 116.4(d), 118.5(d), 122.1(d), 128.3(s), 142.1(d), 146.7(s), 148.7(s), 169.3(s), 177.6(s). High resolution CI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 294.1351 (Calcd for $[\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_5+\text{H}]$: 294.1341)

9) *cis*-4-Caffeoylamino-cyclohexane Carboxylic Acid (14) Colorless needles from MeOH, mp 123—125°C, 固化, 152—154°C(double mp), $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 1.50(2H, m), 1.58(2H, m), 1.61(2H, m), 1.84(2H, m), 2.34(1H, m), 3.80(1H, m), 6.40(1H, d, $J=15.9$ Hz), 6.73(1H, d, $J=7.9$ Hz, ABX type 5'-CH), 6.81(1H, dd, $J=1.8, 8.2$ Hz, ABX type 6'-CH), 6.92(1H, d, $J=1.8$ Hz, ABX type 2'-CH), 7.23(1H, d, $J=15.9$ Hz), 7.86(1H, t, $J=7.9$ Hz, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 24.6(t), 29.1(t), 39.6(d), 45.2(d), 113.8(d), 115.7(d), 118.9(d), 120.2(d), 126.5(s), 138.8(d), 145.5(s), 147.1(s), 164.5(s), 176.2(s). EI-MS m/z : (M^+) 305, 178. High resolution EI-MS m/z : 305.1267 (Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_5$: 305.1263)

10) *N*-Caffeoyltranexamic Acid (15) Colorless needles from MeOH, mp 149—150°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 0.93(2H, dd, $J=3.0, 13.1$ Hz), 1.26(2H, dd, $J=3.0, 12.8$ Hz), 1.38(1H, m), 1.75(2H, dd, $J=2.7, 13.1$ Hz), 1.90(2H, dd, $J=2.7, 13.1$ Hz), 2.12(1H, tq, $J=3.6, 12.8$ Hz), 3.01(1H, m), 6.35(1H, d, $J=15.6$ Hz), 6.74(1H, d, $J=8.2$ Hz, ABX type 5'-CH), 6.82(1H, dd, $J=1.8, 8.2$ Hz, ABX type 6'-CH), 6.93(1H, d, $J=1.8$ Hz, ABX type 2'-CH), 7.21(1H, d, $J=15.6$ Hz), 7.94(1H, t, $J=5.8$ Hz, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 24.7(t), 31.1(t), 38.0(t), 113.8(d), 115.7(d), 118.5(d), 120.3(d), 126.4(s), 139.0(d), 145.5(s), 147.2(s), 165.4(s), 174.2(s). EI-MS m/z : (M^+) 319, 163. High resolution EI-MS m/z : 319.1430 (Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_5$: 319.1420)

11) *N*-Cinnamoyltranexamic Acid (16) Colorless needles from ethyl acetate/acetone, mp 190—191°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 0.94(2H, d, $J=12.4$ Hz),

1.24(2H, dd, $J=2.5, 12.7$ Hz), 1.40(1H, m), 1.76(2H, d, $J=10.9$ Hz), 1.90(2H, d, $J=13.1$ Hz), 2.13(1H, tq, $J=3.5, 12.0$ Hz), 3.04(1H, m), 6.65(1H, d, $J=15.8$ Hz), 7.41(1H, d, $J=15.7$ Hz), 7.44(3H, m), 7.55(2H, d, $J=8.1$ Hz), 8.10(1H, t, $J=5.6$ Hz, NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 28.2(t), 29.4(t), 37.0(d), 42.4(d), 44.7(t), 122.3(d), 128.8(d), 127.3(d), 129.2(d), 134.9(s), 138.3(d), 164.8(s), 176.6(s). EI-MS m/z : (M^+) 319, 163. Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_5$: C, 71.05; H, 7.37; N, 4.87. Found: C, 70.85; H, 7.49; N, 4.82.

12) *N*-Caffeoyl-4-Piperidine Carboxylic Acid (17) Colorless plates from ethyl acetate/acetone, mp 210—211°C; $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ は文献値に一致した。¹⁰⁾

4. ラット大動脈の摘出 血管に対する作用は、前報⁵⁾に準じて試験した。すなわち、実験動物として Wistar 系雄性ラット(体重 250—400 g)を使用した。張力測定装置は等尺性張力装置を用い、反応を等尺的に記録した。

ラットをエーテル麻酔後瀉血し、胸部大動脈を摘出した。大動脈は長さ約 20 mm, 幅約 2 mm の螺旋標本又は長さ約 3 mm のリング標本とした。標本を 10 ml の modified Krebs's-Henseleit 溶液 (NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.8 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, NaHCO_3 25.0 mM, glucose 11.1 mM) で満たしたバス内に懸垂し、37°C に保温し 95% O_2 + 5% CO_2 混合ガスを通気した。標本に 1.0 g の負荷をかけ、1 時間のインキュベート(設置してから 20 分, 40 分, 55 分後に各 1 回洗浄)後、実験を行った。Norepinephrine (NE) を 10^{-7} M 投与したのち、血管収縮が平行状態に達したところで acetylcholine (ACh) 10^{-5} M を投与し、NE による収縮に対し、80% 以上の弛緩を示したものを内皮保護標本、血管条片の内皮細胞をろ紙で軽くこすり、NE 収縮に対し、ACh による弛緩反応が 5% 未満のものを内皮細胞剥離標本とした。

5. 血管反応の測定 血管内皮保護の螺旋標本に対し、NE を 10^{-7} M 投与したのち、血管収縮が平行状態に達した時に各種試料を投与し、投与から 1 時間経過後の張力変化をみた。なお、試料は少量の EtOH 又は DMSO に溶解したのち、生理食塩水

を加えて希釈・調製した。オルガンバス投与時の有機溶媒濃度は0.3%以下であり、血管の作用に影響を与えないことを確認した。検体数は、 $n=4$ である。ただし、Comp. 11, 16は作用が弱く、controlと同等なので例数を増やすための実験は行わなかった。

脱分極した血管に対し、 Ca^{2+} が誘起する収縮作用は次のように試験した。リング標本とした血管条片は通常のmodified Krebs's-Henseleit溶液中で40分間のインキュベート(20分, 40分後に1回洗浄)後、 Ca^{2+} -freeで0.01 mMのEGTAを含むmodified Krebs's-Henseleit溶液(NaCl 119.8 mM, KCl 4.7 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, NaHCO_3 25.0 mM, glucose 11.1 mM)に置換した。さらに15分間のインキュベートののち、等張の高濃度 K^+ , Ca^{2+} -freeのmodified Krebs's-Henseleit溶液(KCl 124.5 mM, KHCO_3 25.0 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, glucose 11.1 mM)の当量(3.8 ml)と置換し、バス内 K^+ 濃度を60 mMとした。この状態で、 Ca^{2+} (CaCl_2)が 10^{-5} M~ 10^{-3} Mになるよう累積的に投与して、コントロールとした。 Ca^{2+} -freeのmodified Krebs's-Henseleit溶液でバス内を洗浄後、再び高濃度 K^+ , Ca^{2+} -freeのmodified Krebs's-Henseleit溶液の当量と置換し、バス内 K^+ 濃度を60 mMとした。ここで試料を加え60分間のインキュベートののち、先と同様に Ca^{2+} が 10^{-5} M~ 10^{-3} Mになるよう累積的に投与して、コントロールと比較した。

NE存在下の血管に対し、 Ca^{2+} が誘起する収縮作用は次のように試験した。リング標本とした血管条片は通常のmodified Krebs's-Henseleit溶液中で40分間のインキュベート(20分, 40分後に1回洗浄)ののち、 Ca^{2+} -freeで0.01 mMのEGTAを含むmodified Krebs's-Henseleit溶液に全置換した。15分間のインキュベートののち、nicardipine 10^{-6} M, 続いてNE 10^{-6} Mを投与した。この溶液中でNEがもたらす速効性の収縮は静止レベルにまで低下させられている。さらに15分間のインキュベート後、 Ca^{2+} (CaCl_2)が 10^{-5} M~ 10^{-3} Mになるよう累積的に投与して、コントロールとした。 Ca^{2+} -freeのmodified Krebs's-Henseleit溶液でバス内を洗浄後、試料を加え60分間のインキュベート後、先と同様にnicardipine 10^{-6} M, 続いてNE 10^{-6} Mを投与し

た。15分間のインキュベート後、 Ca^{2+} が 10^{-5} M~ 10^{-3} Mになるよう累積的に投与して、コントロールと比較した。なお、すべての試薬試料の濃度は、オルガンバス投与時の最終濃度である。

6. 統計処理 すべての結果は平均値±SEで示した。データの統計的評価は、Bonferroni-type multiple *t*-testによった。 $p < 0.05$ のとき、有意差ありと判断した。

結果及び考察

1. 各化合物の血管作用と構造活性相関 化合物6・17についてvasorelaxant activityをTable 1に示した。Tableに示すカフェー酸誘導体(Comp. 6, 8, 10, 15)と桂皮酸誘導体(Comp. 7, 9, 11, 16)との比較で明らかなように、カフェー酸誘導体の弛緩作用に対し、ベンゼン環に水酸基を持たない桂皮酸構造では、作用は著しく減少した。また、すべての化合物は、その構造中のacylamino基とカルボン酸の間を、炭素鎖で結合させている。Tableに示すとおり、中間炭素鎖に環構造を持つComp. 14, 15, 17と、同じ炭素鎖長(acylamino基~カルボン酸)を持つ直鎖化合物誘導体Comp. 12, 13, 10と比較すると、環構造を持つ化合物の方が作用が弱かった。ここで、いくつかの化合物の最小投与濃度における結果をFig. 3に示す。Comp. 6, 8, 10の比較から、中間炭素鎖が長くなるにつれ明らかに弛緩作用が増強していた。そこでComp. 10から、さらに炭素鎖を伸ばしたComp. 12, 13を調べてみると、今度は炭素鎖を長くしても弛緩作用はあまり変わらず、むしろ減弱傾向を示した。

以上の実験結果から、カフェー酸及び桂皮酸アミド誘導体の血管弛緩作用について、次の1)・2)に示す構造活性相関が考えられた。

- 1) ベンゼン環構造の影響について カフェー酸構造が弛緩作用に重要であり、水酸基を持たない桂皮酸構造では、作用は著しく減少する。
- 2) 中間炭素鎖の直鎖構造と環構造の影響について 中間炭素鎖の長さはC4が至適と推測される。また環構造を伴って延長した炭素鎖は、作用が減弱する。

2. 電位依存性 Ca^{2+} チャネル(VDC)に対する作用 中間炭素鎖が直鎖構造の化合物からComp. 8(*N*-Caffeoyl- β -alanine)を、中間炭素鎖に環構造を持つ化合物からComp. 15(*N*-Caffe-

Table 1. Vasorelaxant Activities of *N*-Caffeoylamino Acid Derivatives and *N*-Cinnamoylamino Acid

Comp. No.	Compound names	Concentration			
		10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	3×10 ⁻⁷ M
Control	Control	21.2±10.1			
6	<i>N</i> -Caffeoylglycine		19.0±3.4		
8	<i>N</i> -Caffeoyl-β-alanine		75.7±23.8	8.8±3.4	
10	<i>N</i> -Caffeoyl GABA				55.5±36.7
12	5-Caffeoylaminopentanoic acid			100.0±0.0	43.8±24.4
13	6-Caffeoylaminohexanoic acid			104.8±2.9	49.0±28.9
17	<i>N</i> -Caffeoyl-4-piperidine carboxylic acid			44.2±30.5	18.1±4.8
14	<i>cis</i> -4-Caffeoylaminocyclohexane carboxylic acid			69.8±4.3	18.4±4.7
15	<i>N</i> -Caffeoyltranexamic acid			36.6±23.9	15.0±2.0
7	<i>N</i> -Cinnamoylglycine	14.4±0.1			
9	<i>N</i> -Cinnamoyl-β-alanine	72.8±8.5	20.1±6.7		
11	<i>N</i> -Cinnamoyl GABA		11.3		
16	<i>N</i> -Cinnamoyltranexamic acid		8.0		

Derivatives against NE-induced vasocontraction of rat aorta. values are the means ± S.E. of 4 determinations.

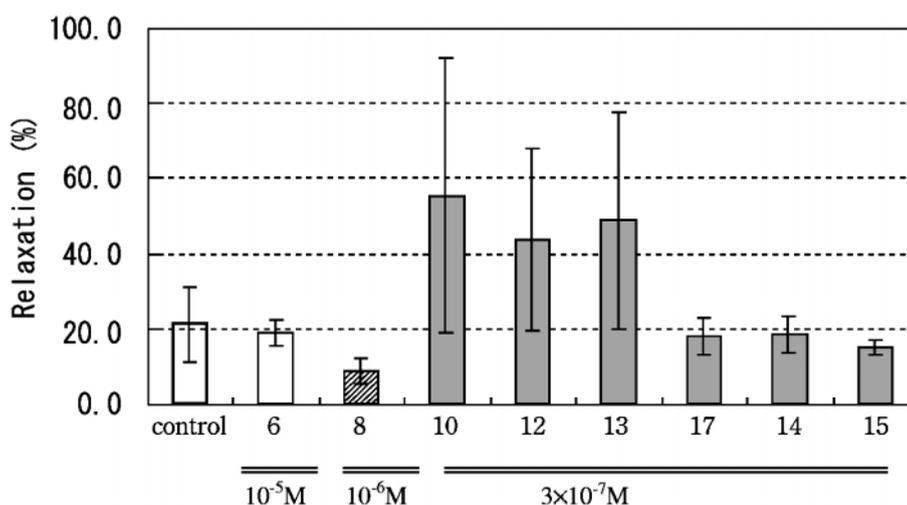


Fig. 3. Vasorelaxant Activities of *N*-Caffeoylamino Acid Derivatives and *N*-Cinnamoylamino Acid Derivatives against NE-induced vasocontraction of rat aorta at minimum concentration. Values are the means±S.E. of 4 determinations.

oyltranexamic acid) をそれぞれ選び、これらを用いて高濃度 K⁺ (60 mM) が誘起する収縮に対する反応を調べた。

Ca²⁺ (10⁻⁵ M~10⁻³ M) は、Ca²⁺-free で等張の高濃度 K⁺ (60 mM) 栄養液 (NaCl 119.8 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, glucose 11.1 mM) 中に懸垂した血管条片に対し、濃度依存的な収縮を起こす。この収縮に対し、Comp. 8, 15 の 10⁻⁵ M では control 群との差は生じなかった (Fig. 4)。

3. 受容体作動性 Ca²⁺ チャンネル (ROC) に対す

る作用 Ca²⁺-free で nicardipine 10⁻⁶ M 及び NE10⁻⁶ M を投与した栄養液中に懸垂した血管条片に対し、Ca²⁺ (10⁻⁵ M~10⁻³ M) は濃度依存的な収縮を起こす。この収縮に対し、Comp. 8 の 10⁻⁵ M はわずかな抑制傾向を示すものの有意ではなかった。一方、Comp. 15 の 10⁻⁵ M は有意な抑制を示した (Fig. 5)。

Comp. 8, 15 はラット大動脈条片に対し、ゆっくりとした弛緩作用を示した。この弛緩反応は、内皮細胞を剥離した標本に対しても同様であった (data not shown)。これはこの作用が内皮細胞に依存し

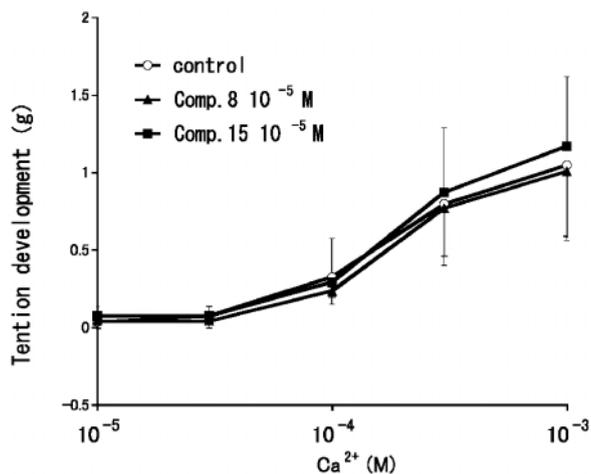


Fig. 4. Concentration-Response Curves for Contractile Responses of the Aortic Strips to Ca^{2+} in a Ca^{2+} -Free Medium Preincubated with High Potassium (60 mM)
 —○—: control, —▲—: Comp. 8 10^{-5} M, —■—: Comp. 15 10^{-5} M.
 Values are the means \pm S.E. of 4 determinations.

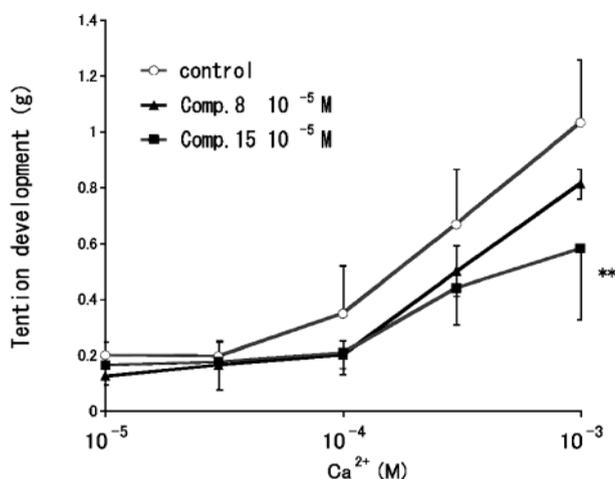


Fig. 5. Concentration Response Curves for Contractile Responses of Aortic Strips to Ca^{2+} in a Ca^{2+} -Free Medium Preincubated with NE (10^{-6} M) and Nicardipine (10^{-6} M)
 —○—: control, —▲—: Comp. 8 10^{-5} M, —■—: Comp. 11 10^{-5} M.
 Values are the means \pm S.E. of 4 determinations. ** $p < 0.01$ vs control.

ないことを示している。また、Comp. 8, 15 は、高濃度 K^+ (60 mM) で脱分極した血管条片に対する Ca^{2+} 誘起の収縮を抑制しなかった。これは Comp. 8, 15 は電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDC) に対して抑制作用を持たないことを示している。一方で Comp. 15 は、nicardipine 及び EGTA 存在下で NE 前投与した際の Ca^{2+} が誘起する収縮に対し、有意な抑制を示した。これは Comp. 15 が受容体作動性 Ca^{2+} チャネル (ROC) に対する抑制作用を持つ可

能性を示している。Comp. 8 ではわずかな抑制傾向を示すものの、有意ではなかった。以上の結果から、2種の化合物の弛緩反応は、ROC 抑制作用の関与が考えられた。また、中間炭素鎖の形状 (直鎖状か、環構造か) による作用機序の違いは検出されなかった。

結 論

今回試験したアミド化合物のうち、いくつかの化合物は単離又は合成報告がなされている。Comp. 10 はタバコ (*Nicotina tabcum* cv.) の細胞から検出され、putrescine の同化への関与が指摘されている。⁹⁾ また、Comp. 6,⁷⁾ 7, 9, 11,⁸⁾ 17¹⁰⁾ の合成が報告されている。このうち Comp. 17 は selectin inhibitor として喘息やがん、炎症性疾患などの治療効果が検討されている。¹⁰⁾ しかしながらこれらの化合物は、血管に対する作用を検討した報告はなされていない。

さて、我々は既に升麻由来のフェノールカルボン酸の血管弛緩反応から、次に示す仮説を提示している。⁵⁾ すなわち、Fig. 6 に示す構造において (1) benzyltartaric acid 部分に *p*-coumaric acid がエステル結合したものは血管収縮作用、caffeic acid がエステル結合したものは血管弛緩作用を持ち、(2) benzyltartaric acid 部分が fukiic acid ($\text{R}_1 = \text{OH}$, $\text{R}_2 = \text{H}$) と piscidic acid ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{H}$) のどちらであっても、血管に対する作用には関係しないというものである。

今回はカフェー酸とヒドロキシ酸とのエステル構造の代替に、カフェー酸と各種アミノ酸とのアミド化合物を合成し、それらについても血管弛緩作用が得られることが分かった。さらにいくつかのカフェー酸アミド化合物の血管弛緩作用から、興味ある構造活性相関を得た。これは、カフェー酸エステル類の血管弛緩作用に関して、いっそう詳細な知見を与えるものであった。また、今回得られた化合物は、作用の一部に ROC 阻害の可能性が示唆された。ここで、既報⁶⁾ ではカフェー酸誘導体の作用の一部に受容体依存性 Ca^{2+} チャネルの阻害が関与する可能性を示しており、構造の類似性から今回試験した化合物も同様の作用を持つことが推定された。

さて、カルシウムチャネル阻害薬はニフェジピンなどのジヒドロピリジン系や、ベンゾジアゼピン系のジルチアゼム、ジフェニルアルキルアミン系のベ

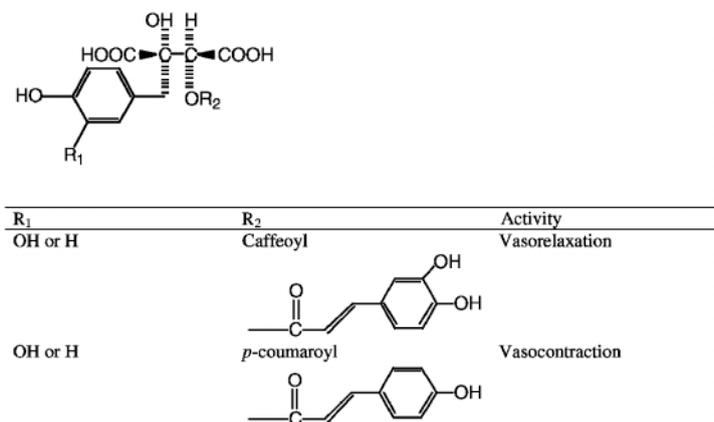


Fig. 6. Structure-Activity Relationships of Caffeic Acid Derivatives

ラパミルなどが広く用いられている。¹¹⁾ これらは L 型 VDC の阻害薬として知られる。ペプリジルもカルシウムチャンネル阻害薬に分類されるが、¹¹⁾ 心臓のナトリウム-カルシウム交換を阻害することから抗不整脈の作用を示す。^{12,13)} ピペラジン系カルシウムチャンネル阻害薬にフルナリジンなどがある。¹⁴⁾ これらは脳循環傷害に用いられる。ROC 阻害作用は、ベラパミルとジルチアゼム、¹⁵⁾ 及び SK&F96365 に見られる。¹⁶⁾ この他にいくつかの天然物由来成分が VDC 阻害作用及び VDC 以外の細胞内カルシウムの流入抑制を持つと示唆されているが、¹⁷⁻²¹⁾ 構造の相関性は明らかではない。

既に示したように、今回用いた化合物は受容体依存性 Ca²⁺ チャンネルの阻害が主に考えられる。したがって上述の各種カルシウムチャンネル阻害薬とは作用の様式が異なると考えられる。カフェー酸誘導体の構造活性相関を精査することにより、既存のカルシウムチャンネル阻害薬とは異なるタイプの心血管系疾患治療薬が開発される可能性がある。

REFERENCES

- Escubedo E., Camarasa J., Adzet T., *IRCS Med. Sci.*, **14**, 1196-1197 (1986).
- Yang C.-C., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2002).
- Kamata K., Iizuka T., Nagai M., Kasuya Y., *Gen. Pharmacol.*, **24**, 977-981 (1993).
- Nagai M., Noguchi M., Iizuka T., Otani K., Kamata K., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 228-232 (1996).
- Noguchi M., Nagai M., Koeda M., Nakayama S., Sakurai N., Takahira M., Kusano G., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1163-1168 (1998).
- Sakurai N., Iizuka T., Nakayama S., Funayama H., Noguchi M., Nagai M., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 593-598 (2003).
- Hanselaer R., D'Haenens L., Martens M., Nieuwenhuysse H. V., Van Sumere C. F., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **92**, 1029-1037 (1983).
- Moon S.-J., Jein J. W., Kim H., Suh M. P., Suh J., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7742-7749 (2000).
- Balint R., Cooper G., Staebell M., Filner P., *J. Biol. Chem.*, **262**, 11026-11031 (1987).
- Anderson M. B., Kobayashi Y., Ito K., Holme K. R., Cui J., Fugedi P., Peto C. F., Wang L., Vazir H., U.S. Patent W0 9929705 (1999) [*Chem. Abst.*, **131**, 45047K (1999)]
- Young L. Y., Koda-Kimble M. A., "Applied Therapeutics 6th ed. Japanese edition Vol. 4," ed. by Technomics Inc., Tokyo, 2001, pp. (71) 15-16.
- Garcia M. L., Slaughter R. S., King V. F., Kaczorowski G. J., *Biochemistry*, **27**, 2410-2415 (1988).
- Watanabe Y., Kimura J., *Jpn. J. Pharmacol.*, **85**, 370-375 (2001).
- Godfraind T., *Am. J. Cardiol.*, **59**, 11B-23B (1987).
- Muramatsu I., Fujiwara M., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **87**, 199-207 (1986).
- Merrit J. E., Armstrong W. P., Benham C. D., Hallam T. J., Jacob R., Jaxachamiec A., Leigh B. K., McCarthy S. A., Moores K. E., Rink T. J., *Biochem. J.*, **271**, 515-522 (1990).

-
- 17) Irie K., Yoshioka T., Nakai A., Ochiai K., Nishihori T., Wu G.-R., Shibuya H., Muraki T., *Eur. J. Pharmacol.*, **403**, 235–242 (2000).
- 18) Matsuda H., Murakami T., Nishida N., Kageura T., Yoshikawa M., *Cham. Pharm. Bull.*, **48**, 1429–1435 (2000).
- 19) Lee J. W., Roh T. C., Rho M.-C., Kim Y. K., Lee H. S., *Planta Med.*, **68**, 891–895 (2002).
- 20) Dias C. S., Barbosa-Filho J. M., Lemos V. S., Côrtes S. F., *Planta Med.*, **68**, 1049–1051 (2002).
- 21) Wang H. X., Ng T. B., *Life Sci.*, **65**, 2663–2677 (1999).