

アミノ酸付加ベツリン誘導体の抗腫瘍効果の検討

小笠原 勝, 松永 孝之, 大戸 幹也, 川筋 透, 長井 良憲¹, 高津 聖志

¹富山大学大学院医学薬学研究部免疫バイオ・創薬探索研究講座

Anti-tumor effects of betulin derivatives with amino acids in a tumor-burden mouse model.

Masaru OGASAWARA, Takayuki MATSUNAGA, Mikiya OHTO, Toru KAWASUJI,
Yoshinori NAGAI¹, Kiyoshi TAKATSU

¹Department of Immunobiology and Pharmacological Genetics, Graduate School of
Medicine and Pharmaceutical Science for Research, University of Toyama

要 約

植物成分のベツリンは、試験管内では様々な癌細胞に対して顕著な増殖阻害作用を示すが、がん移植マウスモデルでの有効性は限定的である。我々は、この要因はベツリンの水溶性の低さにあると考え、これまでに水溶性を改善した化合物を多数合成し、がん移植マウスモデルを用いて抗腫瘍効果を検証してきた。本研究では、アミノ酸を付加させることで水溶性を改善したベツリン誘導体17種を開発し、これらについて抗腫瘍効果を比較検討した。その結果、リジンを付加した誘導体に顕著な抗腫瘍効果を見出した。リジンをベツリンの3位に付加したBD-10、28位に付加したBD-42、及び、3及び28位に付加したBD-9は、いずれも80%以上の顕著な抑制効果を示した。BD-9について細胞増殖に対する影響を検討したところ、ベツリンよりも明らかに強い阻害作用が認められた。これらのことから、ベツリンへのリジンの付加は、水溶性の改善と抗腫瘍効果の増強に有用な方法であると考えられた。

Summary

It has been shown that betulin, a plant constituent, inhibits the growth of various kinds of tumor cells *in vitro*, however, its inhibitory effects are limited in a tumor-inoculated mouse model. To this limited effectiveness *in vivo*, we have assumed that its low water-solubility may be one of crucial reasons and approached to produce several kinds of betulin derivatives with higher water-solubility, and examined the *in vivo* anti-tumor effects. In this study, we developed 17 betulin derivatives with amino acids and examined the anti-tumor effects in a tumor-burden mouse model. As a result, we identified that lysine esterification brought about remarkable anti-tumor effect. Three lysine-esterified derivatives, which are BD-10 with lysine at position 3 of betulin, BD-42 with lysine at position 28, and BD-9 with lysine at positions both 3 and 28, exhibited over 80% inhibition *in vitro*. Additionally, BD-9 showed much more potent anti-cell proliferative effect than betulin *in vitro*. These results suggest that lysine-esterification may be promising strategy for improving the water-solubility as well as the anti-tumor effect of betulin.

キーワード：ベツリン誘導体；悪性黒色腫；増殖抑制；リジン

Key words: betulin derivative; melanoma; growth inhibition; lysine

本研究では平成20年度より、ほくりく健康創造クラスター事業（～24年度）において「免疫抑制因子」の働きを解除（阻止）する物質の探索研究を進めてきた¹⁾。その結果、白樺成分のベツリンに目的とする有効性を見出した²⁾。ベツリンは既知化合物であったが、免疫抑制解除作用については報告がなされておらず、新しい作用機序に基づくがん治療薬になる可能性があると考え特許を取得した³⁾。

一方で、ベツリンは水に非常に溶けにくい性質であるため、マウス体内では消化管からの吸収や血液への移行性が

極めて低く、その血中濃度が有効域に到達しないことが懸念された。実際、LC/MS/MSを用いた分析から、経口投与されたベツリンは消化管からほとんど吸収されないこと、静脈内に投与しても血液中にはほとんど移行しないこと（未発表データ）、さらに、がん移植マウスモデルにおいて、ベツリンを腫瘍内に直接投与しても、その抗腫瘍効果は50%程度しか認められないこと等を明らかにしてきた⁴⁾。このため、動物実験においてより高い有効性を得るには、水に溶けやすく血液や組織への移行性が良好な誘導体を開

結 果

発する必要があった。ベツリンの水溶性や有効性を向上させる方法として、カルバメート構造への変換やアミノ酸の付加による誘導体化が報告されている^{5,6)}。昨年度は、カルバメート化したベツリン誘導体について比較検討し、顕著な抗腫瘍効果を示すBD-23を見出した。今回、アミノ酸を付加したベツリン誘導体17種を開発し、がん移植マウスモデルを用いて有効性を比較検討した。

実験方法

1. 実験試薬

ベツリン誘導体は神戸天然物化学株式会社に合成委託した。シスプラチンは和光純薬工業株式会社より購入し、ベツリンはExtrasyntheseより購入した。試験管内の実験では、いずれもジメチルスルホキシドに溶解して用いた。マウスに投与する場合は、いずれも0.1% Tween 80を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁して実験に供した。

2. 細胞及び細胞培養

マウスB16F10悪性黒色腫細胞は、10%の非働化ウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン、0.1 mg/mlのストレプトマイシン及び55 μ Mの2-メルカプトエタノールを含むRPMI-1640培地中にて継代、維持した。

3. がん移植マウスモデルを用いた評価

マウス悪性黒色腫細胞(B16F10)を 2×10^5 個/0.05 ml PBSに調製し、C57BL/6マウス(8週令、雌、8匹/群)にマウス当たり0.05 ml ずつ下腹部皮下に接種した。化合物はがん接種後2日目から16日目まで1日1回、腫瘍内に投与した。対照群には溶媒(0.1% Tween 80を含むPBS)を同様に投与した(50 μ l/マウス)。腫瘍径は2日あるいは3日ごとに測定し、見かけの腫瘍体積は、長径 \times 短径 \times 短径/2で算出した。

4. 細胞毒性の評価

10% FBSを含むDMEM培地(GIBCO)でB16F10細胞を 4×10^4 個/mlに調製し、96ウェルプレート(Corning)に各ウェル当たり 4×10^3 個を播種した。細胞がプレートに接着後、化合物を各濃度で添加し、インキュベーター内(37°C, 5% CO₂)で48時間培養した。コントロールにはジメチルスルホキシドを同様に添加した。培養終了後、各ウェルの培地を、WST-1(Wako)を5%含む10% FBS-DMEM培地に交換し、さらに4時間培養した後、波長450 nmにおける吸光度を測定した。

がん皮下移植マウスモデルにおけるベツリン誘導体の抗腫瘍効果

B16F10細胞の皮下移植モデルを用いて、アミノ酸を付加したベツリン誘導体17種の抗腫瘍効果を比較検討した。付加したアミノ酸の種類により抗腫瘍効果に大きな差が認められ、リジンを付加した場合にベツリンよりも強くかつ最も顕著な抑制効果が認められた(Fig. 1)。リジンを付加する位置をベツリンの3位としたBD-10、28位としたBD-42、あるいは、3及び28位としたBD-9の間では抑制率に大きな差は認められず、いずれも80%以上の顕著な抑制効果を示した(Fig. 1)。

BD-9について、制癌剤の5-フルオロウラシル(5-FU)、シスプラチン、プレオマイシンの抗腫瘍効果と比較検討した(Fig. 2A)。BD-9は、シスプラチンやプレオマイシンの抑制効果ほどは強くなかったが、5-FUよりも強い抗腫瘍効果を示した。また、生存日数について調べたところ、生存率が50%になるまでの日数は、コントロール群では17.5日であったのに対して、BD-9投与群では39.5日であり、約2.3倍に延長した(Fig. 2B)。一方、シスプラチンあるいはプレオマイシンを同様の条件で投与したところ、全例で腫瘍の消失が認められた(Fig. 2Bにおいて、プレオマイシンのシンボルはシスプラチンと重なっている)。このことから、BD-9の延命効果はシスプラチンやプレオマイシンの効果ほどは強くなかったが、5-FU投与群での50%生存日数(25日)と比較すると明らかに長かった。

がん細胞の増殖能に対するベツリン誘導体の抑制作用

ベツリンにアミノ酸を付加することにより、細胞増殖阻害作用が増強されることが報告されている⁵⁾。そこで、BD-9の作用機序の解析として、試験管内でのB16F10細胞の増殖能に与える影響を検討した(Fig. 3)。その結果、BD-9は濃度に依存した顕著な阻害作用を示し、50%阻害濃度は1.73 μ Mであった。一方、ベツリンの50%阻害濃度は、昨年度報告したように13.0 μ Mであった⁷⁾。これらのことから、BD-9の細胞増殖阻害効果はベツリンよりも明らかに強いことが分かった。

考 察

本研究では、ベツリンの水溶性を改善するとともに、その抗腫瘍効果の増強を図るため、アミノ酸を付加したベツリン誘導体17種を合成し、担癌マウスモデルを用いて有効性を比較検討した。その結果、リジンを付加した場合に最も顕著な抗腫瘍効果が得られることを明らかにした。ま

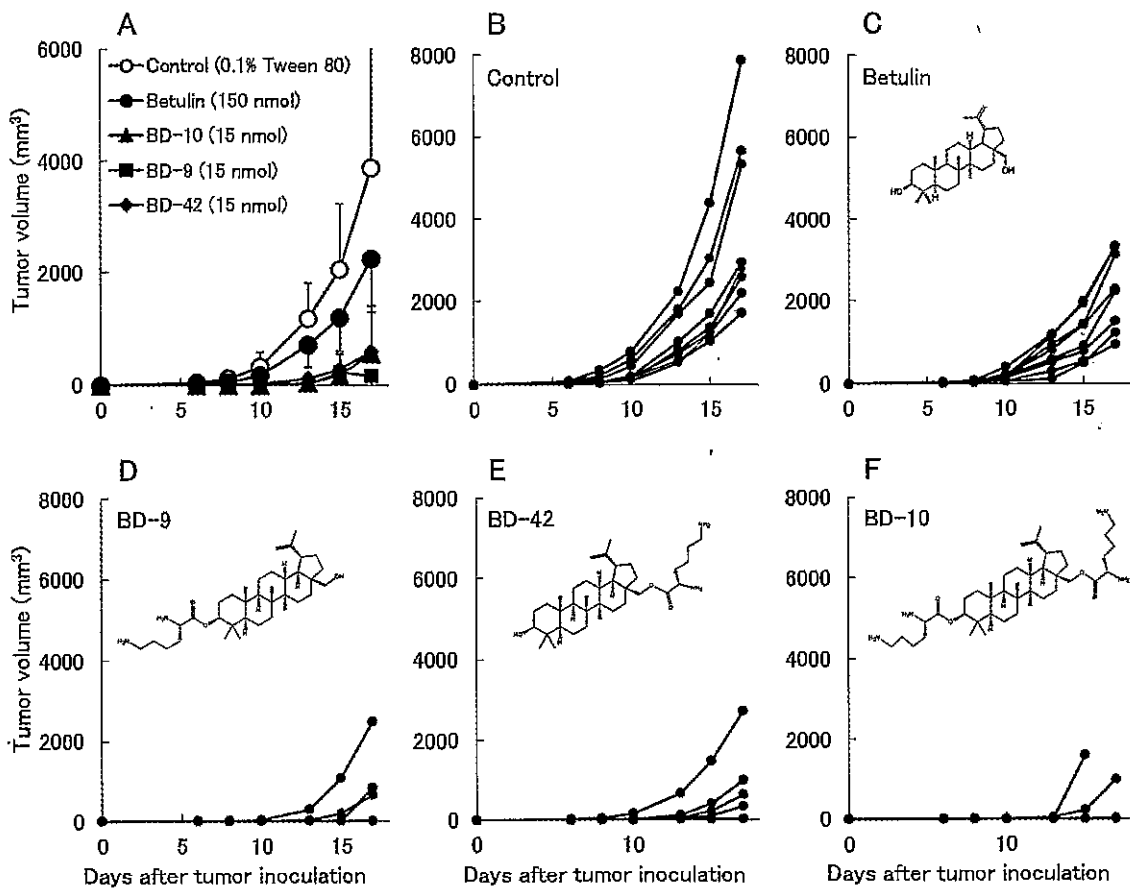


Fig. 1 Effects of betulin and lysine-esterified betulin derivatives on the growth of B16 melanoma in mice. Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. Betulin, BD-9, BD-10 or BD-42 was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated 2 or 3 times in a week. (A) Data are expressed as mean \pm S.D. of 8 mice. (B-F) Tumor volume of each mouse.

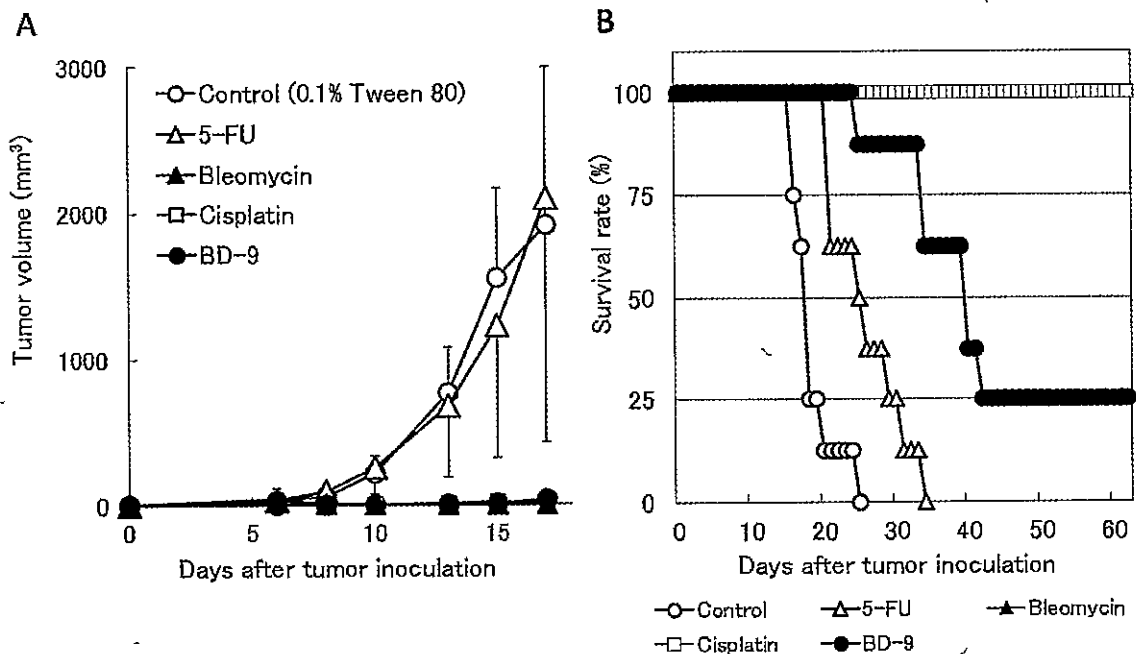


Fig. 2 Effects of BD-9 and cytotoxic drugs on the growth of B16 melanoma in mice. Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. BD-9, bleomycin, 5-FU or cisplatin was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume (A) and survival rate (B) were evaluated. Data are expressed as mean \pm S.D. of 8 mice.

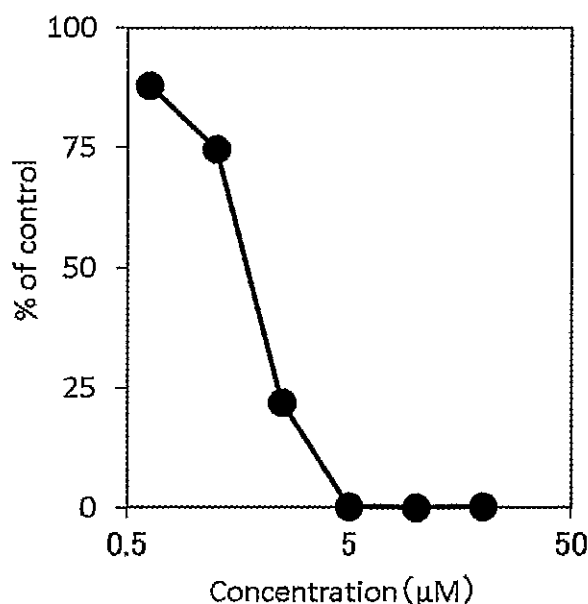


Fig. 3 Effects of BD-9 on the in vitro proliferation of B16 melanoma cells.

Tumor cells were cultured in 10% FBS-medium containing various concentrations of BD-9 for 48 h. After that, WST-1 solution was added into each well, and cells were incubated for an additional 4 h. Absorbance of each well was measured at 450 nm. Data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells.

た、その抗腫瘍効果は、これまでに示したベツリンの抗腫瘍効果⁴⁾よりも明らかに強力であり、さらに、前報で示したベツリンのカルバメート誘導体 (BD-23) の抗腫瘍効果と同程度であった⁷⁾。試験管内でのがん細胞の増殖能に対する阻害効果はベツリンよりも10倍程度に亢進し、この点においてもBD-23の場合と同程度の増強効果が認められた。

しかし、リジン付加ベツリン誘導体は培養ヒト線維芽細胞に対して強い細胞毒性を示し (データ省略)、がん細胞への選択性毒性は全く認められなかった。また、担癌マウスにおける抗腫瘍効果は、ベツリンよりは優れていたが、シスプラチンやプレオマイシンよりは明らかに劣っていた。前報において示したように、BD-23を腫瘍内に投与した場合、投与部位では発赤と腫脹を伴う炎症反応が認められ、腫瘍局所への好中球及びマクロファージの顕著な浸潤も認められた⁷⁾。このことは、医薬品開発におけるマイナス要因と考えられるが、本研究においても、リジン付加ベツリン誘導体を腫瘍内に投与した場合、投与部位では発赤と腫脹を伴う明らかな炎症反応が認められた。

これらのことから、ベツリンへのリジンの付加は水溶性の改善と抗腫瘍効果の増強に有用な方法であると考えられたが、医薬品開発を進めるためには、炎症の誘導や正常細胞への毒性について改善する必要があると考えられた。今後、ベツリンよりも細胞毒性が低く、かつ、より高い抗腫

瘍効果を示す化合物の開発を目指す。

謝 辞

本研究の一部は JSPS 科研費 24590109 の助成を受けて実施された。

文 献

- 1) 小笠原勝, 生谷尚士, 刈米アイ, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索, 富山県薬事研究所年報, 38, 21-27 (2011)
- 2) 小笠原勝, 山崎思乃, 宮本朋美, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索 (2), 富山県薬事研究所年報, 39, 21-25 (2012)
- 3) 高津聖志, 小笠原勝, 松永孝之: 発明の名称「がん免疫抑制解除剤及びがん免疫治療用組成物」(特許第5548874号, 平成26年5月30日登録)
- 4) 小笠原勝, 松永孝之, 長井良憲, 高津聖志: がん移植マウスモデルにおけるベツリンの抗腫瘍メカニズムの解析, 富山県薬事研究所年報, 42, 17-22 (2015)
- 5) Kommera H., Kaluderović G.N., Dittrich S., Kalbitz J., Dräger B., Mueller T., Paschke R.: Carbamate derivatives of betulinic acid and betulin with selective cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20** (11), 3409-3412 (2010)
- 6) Drag-Zalesinska M., Kulbacka J., Sączko J., Wysocka T., Zabel M., Surowiak P., Drag M.: Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19** (16), 4814-4817 (2009)
- 7) 小笠原勝, 松永孝之, 大戸幹也, 川筋透, 長井良憲, 高津聖志: ベツリン誘導体の抗腫瘍効果の検討, 富山県薬事研究所年報, 43, 17-21 (2016)