

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 a betulin derivative in a tumor-burden mouse model.

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

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

要 約

前報において、植物成分ベツリンが、B16F10細胞の皮下移植マウスモデルにおいて、腫瘍の増殖を50%程度抑制することを報告した。ベツリンは難水溶性の化合物であることから、動物実験において有効性を高めるには水溶性を向上させる必要がある。そこで本研究では、カルバメート化したベツリン誘導体6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、BD-23が顕著な抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。BD-23の抗腫瘍メカニズムとして、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。また、ベツリンの抗腫瘍メカニズムには腫瘍内に浸潤した白血球の関与が示唆されていたことから、BD-23についても同様に検討したところ、白血球の顕著な増加が認められた。ところが、ベツリンの場合とは異なり、好中球、マクロファージ、及び、T細胞の増加は認められたが、NK細胞はむしろ減少した。これらのことから、BD-23の抗腫瘍メカニズムには、がん細胞に対する直接的な増殖阻害作用と腫瘍内に集積したこれらNK細胞以外の免疫細胞を介する作用が関与していると考えられた。

Summary

We have previously reported that betulin, a plant constituent, inhibits the growth of B16 melanoma in a subcutaneously inoculated murine model. As betulin is practically insoluble in water, it is needed to improve its water solubility to enhance the anti-tumor effect in mice. In this study, we developed 6 carbamate derivatives of betulin and identified that BD-23 inhibited tumor growth in mice most effectively among them. Then, to reveal the mechanism of action of BD-23, we examined its effect on *in vitro* proliferation of B16 melanoma and found that it inhibited the tumor growth more markedly than betulin. As the anti-tumor mechanism of betulin is suggested to involve tumor-infiltrated leucocytes, we additionally examined the effect of BD-23 on accumulation of leucocytes at tumor sites in mice and found that administration of BD-23 induced remarkable infiltration of leucocytes into tumor. Detailed examination revealed that the increased accumulation of leucocytes consisted of neutrophils, macrophages, and T cells, and NK cells were rather decreased, unlike the case of betulin. These results suggest that the antitumor mechanism of action of BD-23 is ascribed to its direct and indirect cytotoxicity to tumor cells. Indirect cytotoxicity is considered to mediate the killing activity on tumor cells of leucocytes, except NK cells, accumulated into tumor tissues.

キーワード：ベツリン誘導体；悪性黒色腫；増殖抑制；immune cells

Keywords：betulin derivative；melanoma；growth inhibition；免疫細胞

がんの局所では、がん細胞から分泌される様々な免疫抑制因子（TGF- β 、PGE₂等）が複雑に絡み合い免疫抑制環境が形成されている。近年、このことが、がん治療、とりわけ、がん免疫療法の治療効果を低下させる要因となっていることが分かってきた。そのため、治療効果の向上には免疫抑制因子の作用を効果的に阻止する薬剤が必要とされ

ている¹⁾。本研究では上記課題を解決するため、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に着手した²⁾。

免疫抑制に対する解除作用を示す化合物を見出すため、本研究ではTGF- β あるいはPGE₂により抑制されたマウスNK

細胞のがん細胞傷害活性を指標に約800種の天然物をスクリーニングした。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³⁾。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⁴⁾。

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⁵⁾。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、アミノ酸の付加やカルバメート構造への変換による誘導体化が報告されている^{6,7)}。そこで今回、カルバメート化に着目してベツリン誘導体6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、涌沢伸哉先生（北陸大学）より恵与された。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。

5. がん組織に集積した免疫細胞の解析

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、3~6匹/群）にマウス当たり0.05mlずつ下腹部皮下に接種した。がん接種後2日目から9日目まで1日1回、化合物をマウス当たり45 nmolの用量で腫瘍内に投与した。対照群には溶媒（0.1% Tween 80を含むPBS）を同様に投与した。がん組織は、がん接種後3日目、実験によっては6日目、あるいは、10日目に採取した。採取したがん組織を1 mg/mlコラゲナーゼA（ロシュ）及び200 U/ml DNase I（Sigma）で処置（37°C、30分間）し、ハサミで細切後、ナイロンフィルター（70 μ mポアサイズ）（Falcon）を通してデブリスを除去した。遠心（1500 rpm、10 min）後、上清を除去し、得られた細胞を 10^5 個/mlとなるように調製した。細胞を抗CD16/32抗体（2.4G2）で処置（1.5 μ g/ml、4°C、15 min）しFc受容体をブロックした後、各種の蛍光色素で標識された抗CD19抗体（1D3）、抗CD3e抗体（145-2C11）、抗NK1.1抗体（PK136）、抗CD11b抗体（M1/70）、抗Gr-1抗体（RB6-8C5）、抗CD11c抗体（HL3）、抗CD45抗体（30-F11）で処置（0.25-1.25 μ g/ml、4°C、0.5時間）した。細胞を洗浄後、7 AADを添加してフローサイトメーター（FACSCanto II、日本BD）により測定した。

結 果

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、ベツリン誘導体6種の抗腫瘍効果を比較検討した。その結果、BD-23が腫瘍移植後17日目において、コントロール群に比較して90%以上の顕著な抑制効果を示した（Fig. 1）。また、生存日数

を調べたところ、生存率が50%になるまでの日数は、コントロール群では30日であったのに対して、BD-23投与群では54日であり、約1.8倍に延長した。この効果は、前報で示したベツリンの抗腫瘍効果に比較して明らかに強い効果であった。しかし、汎用抗がん剤のシスプラチ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ことから、BD-23の抗腫瘍効果はシスプラチンほど強くないことが分かった。

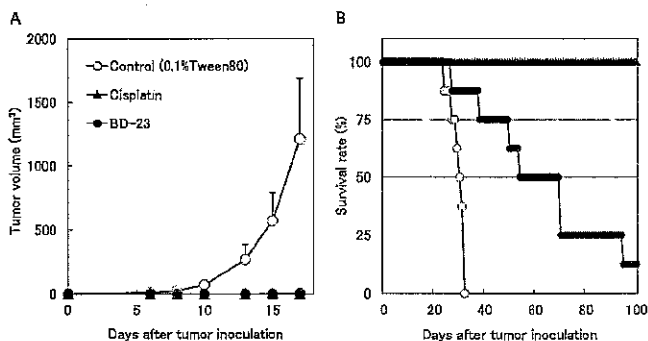


Fig. 1. Effects of BD-23 and cisplatin on the growth of B16 melanoma in mice.

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. BD-23 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±S.D. of 8 mice.

がん細胞の増殖能に対するベツリン誘導体の抑制作用

ベツリンは様々ながん細胞に対して細胞増殖阻害作用を示すことが報告されており、ベツリンをカルバメート化することで、さらに、細胞増殖阻害作用が強くなることが報告されている⁷⁾。そこで、BD-23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

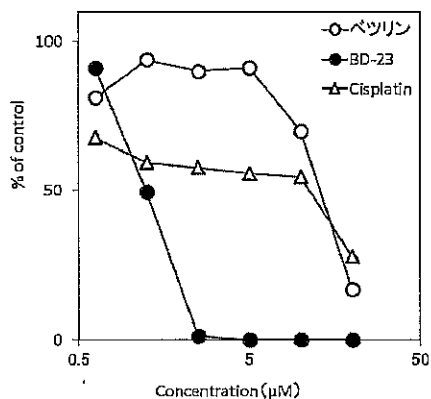


Fig. 2. Effects of betulin, BD-23 and cisplatin on the *in vitro* proliferation of B16 melanoma cells.

Tumor cells were cultured in 10% FBS-medium containing various concentrations of betulin, BD-23 or cisplatin 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±S.D. of triplicate wells.

討した (Fig. 2). その結果、BD-23は濃度に依存した顕著な阻害作用を示し、50%阻害濃度は1.24 µMであった。一方、ベツリン及びシスプラチンの50%阻害濃度は、それぞれ13.0 µM及び11.2 µMであった。これらのことから、BD-23の細胞増殖阻害効果は、ベツリンの約10倍に亢進しているとともに、シスプラチンよりも明らかに強いことが分かった。

ベツリン誘導体の投与部位への白血球の集積

前報で示したように、ベツリンを腫瘍内に投与したところ、腫瘍局所での白血球数はコントロール群に比較して約3倍に増加した⁵⁾。そこで、BD-23についても同様に腫瘍内投与後の白血球の集積について検討した (Fig. 3). その結果、投与の翌日 (day 1) において、投与部位では明らかな浮腫が認められるとともに、腫瘍内及び周囲に集積した白血球の数はコントロール群に比較して約12倍に増加した。そこで、この増加した白血球が何であるのかを明らかにするため、フローサイトメトリーを用いて各種免疫細胞について解析した (Fig. 4). その結果、BD-23を投与した翌日 (day 1) において、腫瘍内に浸潤した白血球の大部分は、マクロファージと好中球であることが分かった。

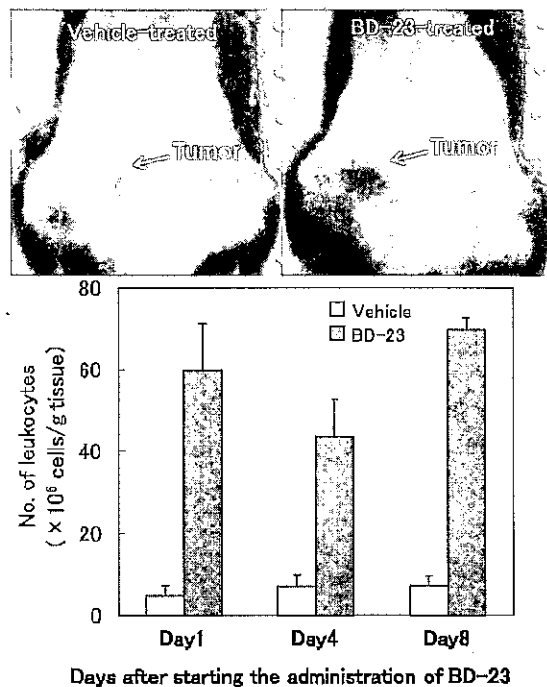


Fig. 3. Accumulation of leukocytes to the site of administration of BD-23 in mice.

Tumor cells were subcutaneously inoculated into mice. BD-23 was intratumorally administered for 1 to 8 consecutive days starting 2 days after tumor inoculation. On day 1, 4, or 8 of post of the initial injection of BD-23, leukocytes accumulated in tumor sites were analyzed as CD45 positive cells in a flow cytometer. Data are expressed as mean±S.D. of 3 mice. Photos indicate representatives of vehicle-treated or BD-23-treated mice one day after the initial injection of BD-23.

投与を継続してもマクロファージは徐々に減少したが、好中球は投与後8日目(day 8)において再び顕著に増加し、コントロール群の約50倍に達した。また、前報⁵⁾で示したベツリンの場合とは異なり、ナチュラルキラー細胞の増加は認められなかった。これらのことから、BD-23の抗腫瘍効果には、これら腫瘍内及び周囲に集積したマクロファージ、好中球が関与していることが示唆された。

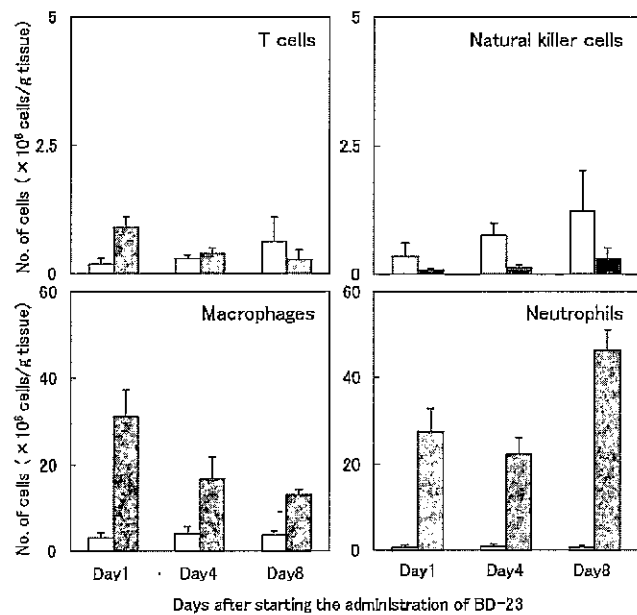


Fig. 4. Comparison of each immune cell population accumulated to the site of administration of BD-23 in mice.

The absolute cell number of each population of immune cells in the leukocytes accumulated in tumor sites as shown in fig. 3 were evaluated by a flow cytometer. Data are expressed as mean±S.D. of 3 mice.

考 察

本研究では、ベツリンをカルバメート化することにより有効性の向上を期待した6種の誘導体について、担癌マウスモデルにおける抗腫瘍効果を比較検討し、BD-23が最も顕著な抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。また、その抗腫瘍効果は、前報で示したベツリンの抗腫瘍効果よりも明らかに強力であった。さらに、BD-23の作用機序について検討したところ、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倍程度に亢進するとともに、腫瘍局所への白血球の浸潤もベツリンに比較して4倍程度に亢進したところが、集積した白血球について解析したところ、ベツリンを投与した場合とは異なり、NK細胞の集積の増大は認められなかった。

ベツリンの抗腫瘍効果は、これまでも報告されており、その作用機序はがん細胞の増殖能に対する阻害作用である

と報告されている⁸⁾。一方、我々の一連の研究においては、ベツリンは、脾臓細胞のNK活性を指標としてTGF- β あるいはPGE₂の抑制作用を解除する天然化合物として見出された³⁾。さらに前報では、担癌マウスモデルにおいてベツリンを腫瘍内に投与すると、腫瘍局所への好中球、マクロファージ、T細胞、及び、NK細胞の集積が、対照群に比較してより高く認められることを報告した⁵⁾。また、集積したNK細胞の多くは活性化していたことから、ベツリンはがん局所で認められる免疫抑制状態の解除に寄与していると考えた。一方、本研究においてBD-23を腫瘍内に投与した場合、腫瘍局所への好中球、マクロファージ、及び、T細胞の集積の増大は認められたが、NK細胞の集積はむしろ低下した。この点は、ベツリンの作用と大きく異なる点であり、このことは、BD-23の作用機序がベツリンとは異なる可能性を示していると考えられた。

当初、ベツリンはTGF- β あるいはPGE₂の免疫抑制作用を解除する天然化合物として見出されたことから、新しいタイプのがん治療薬の開発に有用である可能性があると考えた³⁾。しかし、本研究において見出したBD-23は、上述のようにベツリンとは異なる作用機序を有している可能性が示された。現時点において、BD-23の作用機序は十分に解明されていないが、がん治療薬開発における当該化合物の有用性について、以下のように考えた。まず、試験管内での細胞毒性については、ベツリンよりも飛躍的に強くなり、また、シスプラチンと比較しても明らかに強かった。しかし、BD-23は培養ヒト線維芽細胞に対しても同程度の細胞毒性を示したことから(データ省略)、正常細胞への毒性が懸念されるとともに、がん細胞への選択性は全く認められなかった。また、担癌マウスにおけるBD-23の抗腫瘍効果は、ベツリンよりは優れていたが、シスプラチンよりは明らかに劣るものであった。これらのことから、がん治療薬開発におけるBD-23及びその標的分子の有用性は、残念ながら期待されたほどは高くないと考えられた。

今後は、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有する化合物の開発、及び、その標的分子の解析を目指したい。

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) Teicher B.A.: Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease. *Clin. Cancer Res.*, **13**(21), 6247-6251 (2007)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) Drag-Zalesinska M., Kulbacka J., Saczko 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) 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)
- 8) Soica C., Dehelean C., Danciu C., Wang H.M., Wenz G., Ambrus R., Bojin F., Anghel M.: Betulin complex in γ -cyclodextrin derivatives: properties and antineoplastic activities in in vitro and in vivo tumor models. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**(11), 14992-15011 (2012)