

カチオン型 C₆₀ 誘導体の医薬品応用を目指した研究

~抗 HIV 活性、抗腫瘍活性を示すリード化合物の創出~

81554026 安野拓実

指導教員 増野匡彦 教授

担当教員 大江知之 准教授

[背景]

ダイヤモンドやグラファイトと同様に炭素同素体であるフラーレンは 60 以上の炭素原子で構成されたケージ状の多環縮環構造を有する炭素クラスターの総称である。フラーレンの中でも特に、全て等価な sp² 炭素原子 60 個から成る C₆₀ は対称性が高く、端のない縮合芳香環であるという構造的特徴を有する。そのため機能性材料や医薬品への応用を目指して活発に研究されている。当研究室では高脂溶性の C₆₀ に水溶性置換基を導入した誘導体に着目し、導入する置換基によって異なる生理活性を示すこと、たとえばピロリジニウム構造を有する **1** (Fig. 1) は、HIV 逆転写酵素 (HIV-RT) 阻害活性やがん細胞増殖抑制効果を示すことを明らかとしてきた。

現在、HIV 感染者に対する薬物治療としては、抗レトロウイルス療法 (ART) が確立されている。ART は逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬、インテグラーゼ阻害薬など作用機序の異なる複数の治療薬を組み合わせて HIV の増殖をマルチに阻害する多剤併用治療法である。しかし HIV は変異が速く、耐性ウイルスの出現も多数報告されており、さらに多剤併用療法において問題となる薬物間相互作用などの発生リスク低減のために、単剤で複数のターゲットに作用可能な新薬の創製が継続的に望まれている。また抗悪性腫瘍薬に関しても代謝拮抗薬やアルキル化剤、微小管阻害薬、ホルモン類似薬、白金製剤、分子標的薬など様々な作用機序の治療薬が臨床応用されている。しかし転移性がん患者においては、高い確率で多剤耐性を獲得しているという報告も存在しており、薬剤耐性がん治療薬の創製は急務である。

[研究目的]

先述のように **1** は HIV-RT 阻害活性およびがん細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなっている。またこれらの活性には、C₆₀ 誘導体であるがゆえの構造的特徴および既存薬とは異なる活性発現メカニズムが関与している。したがって **1** は薬剤耐性が問題となっている抗 HIV 薬や抗悪性腫瘍薬への応用が期待される。しかし **1** は 1 つの C₆₀ 骨格上に 2 つの置換基を有するビス付加体である。C₆₀ 誘導体のビス付加体には理論上 8 種類の位置異性体が存在し、合成段階で分離が容易ではない位置異性体の混合物となる。そこで **1** と同様にカチオン構造を有し、より分離が容易なモノ付加の構造活性相関 (SAR) を検討し、**1** よりも有用なリード化合物の創出を研究目的とした。

[抗 HIV 活性を示す C₆₀ 誘導体の創出]

当研究室ではこれまでにモノ付加体である **2** も強い HIV-RT 阻害活性を示すこと、また弱いながら HIV プロテアーゼ (HIV-PR) 阻害活性を示すことも見出している。さらに **2** の構造を生かしつつ、カチオン性置換基となるピリジン環を導入した類縁体の SAR 検討から *cis-3* が比較的強い HIV-RT 阻害活性を示すことを筆者のこれまでの研究で見出した。そこでより強い抗 HIV 活性誘導体の創出を目的とし、*cis-3* を基盤にピロリジニウム環 2 位の置換基や分子内におけるピリジン環の位置の変更、スピロピペリジニウム環の導入などによる SAR を検討した (Fig. 1)。

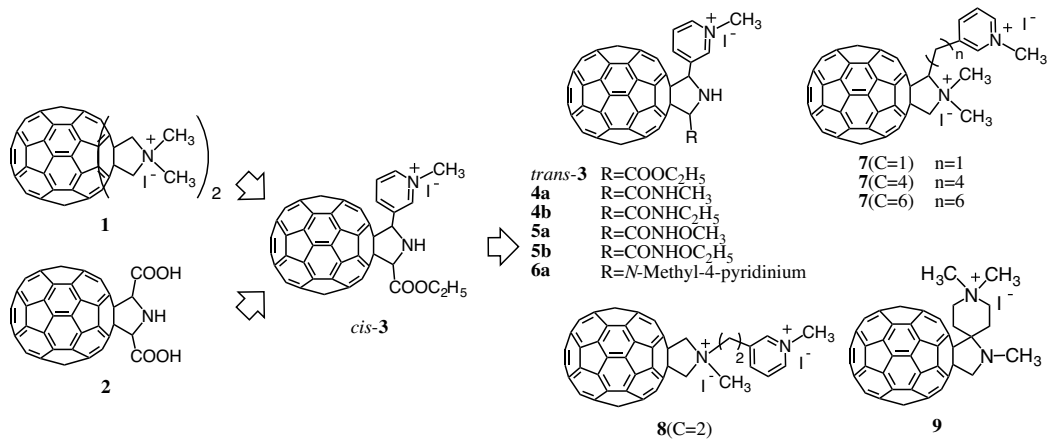
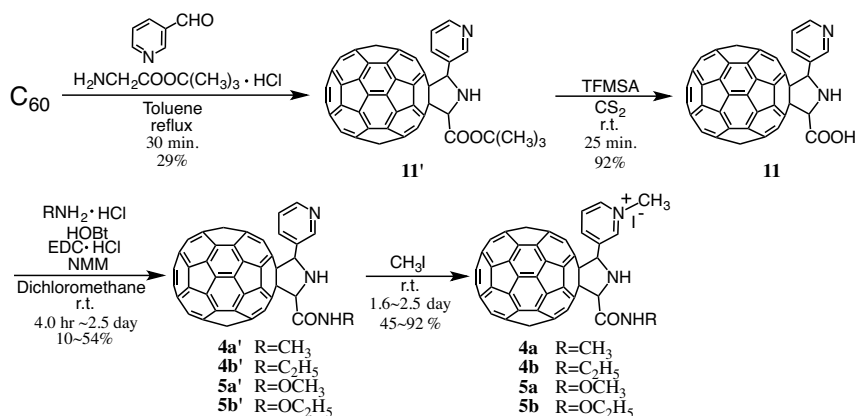


Fig. 1 抗 HIV 活性を評価した新規 C₆₀ 誘導体

C₆₀ 誘導体は全て対応するグリシン誘導体/アミンおよびアルデヒド/ケトンより系中にて発生させたアゾメチンイリドと C₆₀ による 1,3-双極子付加環化反応により置換基を導入し、ヨウ化メチルによる窒素原子の第四級化を経て合成した。ただし **4a~5b** に関しては 1,3-双極子付加環化反応、トリフルオロメタンスルホン酸 (TFMSA) による脱保護によって中間体 **11** を合成したのちに対応するアミンとの縮合、ピリジン環窒素原子の第四級化を経て合成した (Scheme)。



Scheme C₆₀ 誘導体の合成

新規 C₆₀ 誘導体および修士研究時に合成済みの C₆₀ 誘導体 (Fig. 2) を用いて HIV-RT 阻害活性、HIV プロテアーゼ (HIV-PR) 阻害活性、細胞毒性、細胞系における抗 HIV 活性を以下に示す方法に従って評価した。

HIV-RT 阻害活性 : Biotin-dG₁₅-Poly(C)を鋳型、³H-dGTP を基質として HIV-RT 及び被験化合物を加えてインキュベーションした。新たに生成した DNA にストレプトアビジンコートシンチレーションプロキシミティアッセイ (SPA) ビーズを結合させ、発光強度を測定することで HIV-RT 阻害活性を評価した。

HIV-PR 阻害活性 : HIV-PR に認識、切断される 8 残基のペプチド鎖を基質として HIV-PR および被験化合物を加えてインキュベーションした。生成したペプチド断片を LC-MS の SIM モードで検出したクロマトグラムのピーク面積から定量することで HIV-PR 阻害活性を評価した。

細胞毒性 : 播種したマウス胎児線維芽細胞 (NIH3T3 細胞) に、被験化合物を加えてインキュ

ベーションした。その後トリパンブルー染色法により生細胞数を測定して細胞毒性を評価した。細胞系における抗 HIV 活性：本活性評価は熊本大学薬学部の藤田美歌子准教授に依頼した。pNLLuc[\square Bg (pHLA-3 の *nef* の位置にルシフェラーゼ遺伝子を持ち、かつ *env* が欠損しているプラスミドベクター)、pNLn[\square Bs (HIV-1 Env 発現ベクター) の 2 種類の遺伝子をヒト胎児由来腎臓上皮細胞 (293T 細胞) にトランスフェクションし、ウイルスおよび被験化合物のみ透過可能なメンブレンインサートとともに CD4 陽性ヒト T 細胞 (M8166 細胞) を添加した。その後、M8166 細胞および 293T 細胞を回収、破碎してルシフェラーゼアッセイにて抗 HIV 活性を評価した。

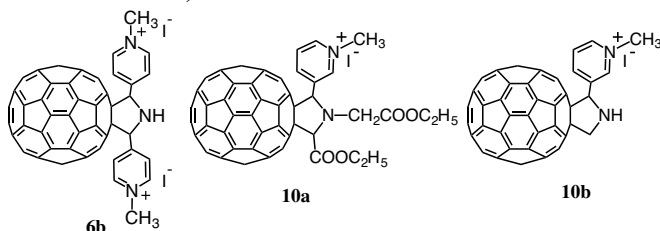


Fig. 2 C₆₀誘導体の構造

HIV 感染前期過程に対する活性：本活性評価は熊本大学薬学部の藤田美歌子准教授に依頼した。M8166 細胞に HIV ウイルス (*luc* を有しかつ Env をもたないウイルスを放出するベクターおよび Env 発現ベクターを共導入して産生したもの) および被験化合物 (10 μ M) を添加して 3 日間培養した。その後細胞を破碎し、ルシフェラーゼ活性を評価した。

HIV 感染後期過程に対する活性：本活性評価は熊本大学薬学部の藤田美歌子准教授に依頼した。293T 細胞に HIV-1 感染性クローン pNL4-3 をトランスフェクションさせたのちに被験化合物 (10 μ M) を添加し、3 日間インキュベーションした。その後、細胞から放出されたウイルス量を p24 ELISA により測定した。

Table 1 C₆₀誘導体の HIV-RT 阻害活性および HIV-PR 阻害活性、細胞毒性

Compound	HIV-RT inhibitory activity IC ₅₀ (μ M)	HIV-PR inhibitory activity IC ₅₀ (μ M)	NIH3T3 growth inhibition activity CC ₅₀ (μ M)	Compound	HIV-RT inhibitory activity IC ₅₀ (μ M)	HIV-PR inhibitory activity IC ₅₀ (μ M)	NIH3T3 growth inhibition activity CC ₅₀ (μ M)
1	0.98	>10	>50	7(C=1)	0.32	>20	>50
2	0.055	6.4	>50	7(C=4)	0.21	>10	5.8
<i>cis-3</i>	0.35	>10	>50	7(C=6)	0.12	>20	4.2
<i>trans-3</i>	0.40	7.7	>50	8(C=2)	0.51	>10	>50
4a	0.59	6.2	>50	9	0.46	5.7	>50
4b	0.34	6.4	>50	10a	0.38	>10	>50
5a	0.57	1.9	>50	10b	0.97	>10	>50
5b	0.33	8.7	>50	Nevirapine	2.1	-	-
6a	1.5	>10	>50	Ritonavir	-	1.7 nM	-
6b	1.6	>10	>50				

結果を Table 1 に示す。HIV-RT 阻害活性に関しては、全ての C₆₀ 誘導体がポジティブコントロールであるネビラピンよりも強い活性を示した。また *trans-3* の活性が *cis-3* とほぼ同程度であり、化合物の立体化学は活性の強弱に影響しないことが示唆された。一方で *cis-3* のピロリジン環 2 位をエステルからアミド (**4a**, **4b**) やヒドロキサム酸エステル (**5a**, **5b**) に変換しても活性がほぼ同程度であったが、置換基をなくした **10b** や *N*-メチル-ピリジニウム構造を有する **6a** や **6b** は活性が低下したため、強い HIV-RT 阻害活性発現にはピロリジン環 2 位にカルボン酸

類縁体のような適度な大きさの置換基が必要であると考えられる。HIV-PR 阻害活性に関してはほとんどの誘導体が活性を示さなかったものの、**2**、*trans*-**3**、**4a**、**4b**、**5a**、**5b**、**9** が弱いながら活性を示すことが明らかとなった。なお **7**(C=4)、**7**(C=6) 以外の誘導体は細胞毒性を示さなかった。

C₆₀ 誘導体の中から *cis/trans*-**3**、**9**、**10a**、**10b** を選抜し、細胞系における抗 HIV 活性を検討した。その結果、いずれの C₆₀ 誘導体も有意に相対ルシフェラーゼ活性が低下し (p<0.01)、細胞系においても抗 HIV 活性を示すことが明らかとなった (Fig. 3)。しかし C₆₀ 誘導体はいずれも細胞系における抗 HIV 活性と HIV-RT 阻害活性との相関が弱く、ネビラピンよりも活性が低かった。この原因として、抗 HIV 活性の発現には HIV-RT 阻害活性や HIV-PR 阻害活性に加え、細胞膜透過性などの物性パラメーターが影響していると考えられる。

HIV 感染前期過程に対する活性を評価したところ、**10a** を除く全ての C₆₀ 誘導体が活性を示した。しかしこの活性は HIV-RT 阻害活性、細胞系における抗 HIV 活性のいずれとも相関がほとんど見られなかったため、C₆₀ 誘導体の抗 HIV 活性には複数の要因が関与していることが示唆された。また HIV 感染後期過程に対する活性を評価したところ、いずれの C₆₀ 誘導体も有意な活性を示しており、特に **9** が比較的強い活性を示した。**9** は他の C₆₀ 誘導体よりも HIV-PR 阻害活性が強いため、感染後期過程においても強い活性を示したと考えられる。また C₆₀ 誘導体は HIV 感染前期/後期いずれにも作用する、すなわち HIV-RT/PR を含む複数の作用点を阻害することで強い抗 HIV 活性を示すことが示唆された。

以上の結果から、細胞系における抗 HIV 活性が強かった *cis/trans*-**3**、**9**、**10a**、**10b** は抗 HIV 薬の有用なリード化合物であることが示唆された。特に HIV-RT/HIV-PR いずれに対しても比較的強い活性を示し、細胞系における抗 HIV 活性も良好であった **9** は、ART とは異なり、単剤で複数のターゲットを阻害することで耐性獲得を回避しようという点で、新規な抗 HIV 薬リード化合物として有用であると考えられる。

[抗腫瘍活性を示す C₆₀ 誘導体の創出]

当研究室の西澤らにより **1** はヒト前骨髄球性白血病細胞 (HL60 細胞) に対して増殖抑制効果を示し、その活性発現には細胞内酸化ストレス惹起によるアポトーシス誘導が関与していることが明らかとなっている。また **1** と同様に分子内に 2 箇所のカチオン構造を有する *cis*-**12** が HL60 細胞に対して強いがん細胞増殖抑制効果を示すことを筆者は修士研究時に見出した。そこで *cis*-**12** と同様に分子内にジカチオン構造を有する誘導体 (Fig. 4) に注目し、そのがん細胞増殖抑制効果および *in vivo* 系における抗腫瘍活性を評価した。

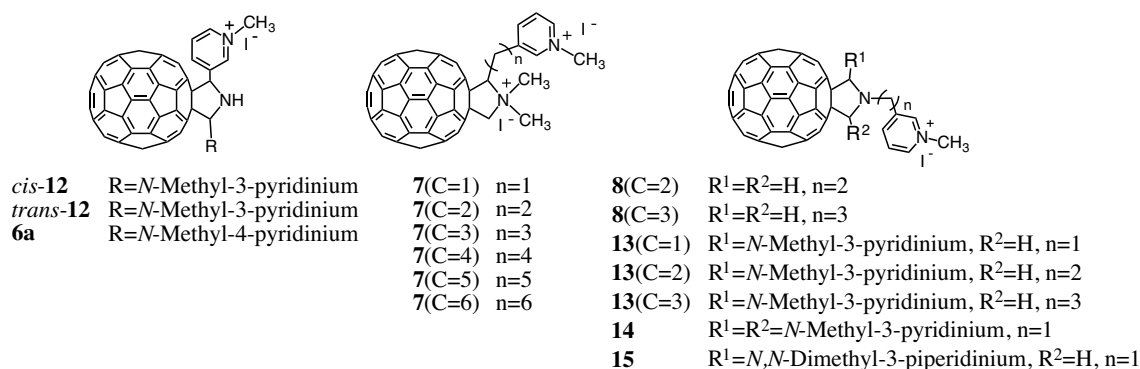


Fig. 4 抗腫瘍活性を検討した C₆₀ 誘導体

C₆₀誘導体はこれまでと同様に1,3-双極子付加環化反応による置換基導入およびヨウ化メチルによる窒素原子の第四級化を経て合成した。またがん細胞増殖抑制効果および *in vivo* 系における抗腫瘍活性は以下に示す方法にしたがって評価した。

がん細胞増殖抑制効果 : Table 2 に示す各種細胞 (HL60、A549 (ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞)、HeLa (ヒト子宮頸がん細胞)、NIH:OVCAR-3 (シスプラチン耐性ヒト卵巣腺がん上皮細胞)、K562 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞)、K562/ADM (ドキシソルビシン耐性ヒト慢性骨髄性白血病細胞))を播種したのちに、被験化合物を加えてインキュベーションした。その後トリパンブルー染色法により生細胞数を測定することで細胞毒性を評価した。

in vivo 系における抗腫瘍活性 : A549 細胞 (1.0x10⁷ cells) をヌードマウス (雌性4週齢) の皮下に移植した。移植17日後よりオリーブオイルに懸濁した被験化合物を1日1回、6日間連続で腹腔内投与した。投与開始日を Day 1 とし、投与完了日より14日間 (Day 20) の腫瘍体積を測定し、抗腫瘍活性を評価した。なお本実験は慶應義塾動物実験委員会に実験計画書を提出し、その内容が承認 (承認番号 : 17043-(0)) されている。

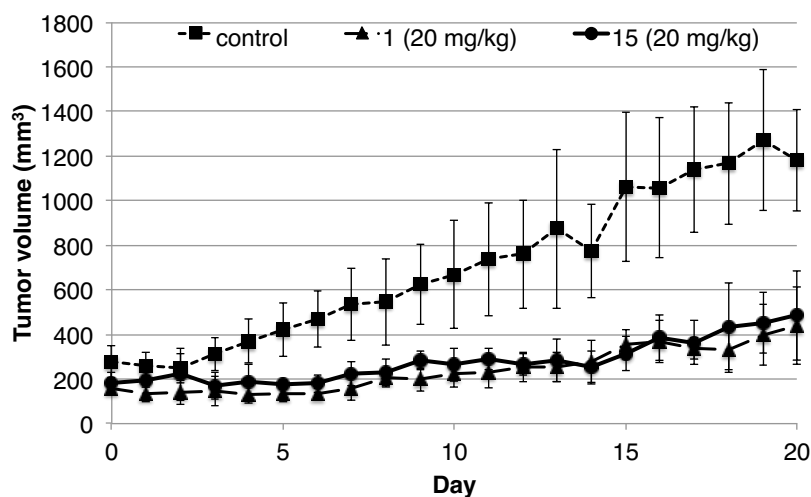
まず HL60 細胞を用いてがん細胞増殖抑制効果を評価したところ、新規誘導体のうち **6a**、**7(C=1)**、**8(C=2)** を除く誘導体は **1** よりも強い活性を示すことが明らかとなった (Table 2)。また SAR の検討から、1) ピロリジン環 2 位にカチオン性置換基を導入した方が強い活性発現に有利であるものの *N*-メチル-4ピリジニウム構造の導入は不適切であること、2) ピリジニウム構造とピロリジニウム構造間のスペーサー長は長い方が強い活性を示すこと、3) ピリジニウム構造を2箇所以上導入しても活性は変化しないことの3点が明らかとなった。なお HL60 細胞に対して活性を示した誘導体のうち *cis*-**12**、**13(C=1)**、**15** については **1** と同様に細胞内酸化ストレスを惹起することで細胞のアポトーシスを誘導していることを確認した (data not shown)。また HL60 細胞に対して活性を示した誘導体を用いて A549 細胞、HeLa 細胞、NIH:OVCAR-3 細胞、K562 細胞、K562/ADM 細胞に対する活性を評価した。その結果いずれの細胞に対しても先述の3点の SAR が確認された。さらにシスプラチン耐性細胞 (NIH:OVCAR-3 細胞) あるいはドキシソルビシン耐性細胞 (K562/ADM 細胞) に対してもそれぞれ対応する非耐性細胞 (シスプラチン非耐性細胞 : HeLa 細胞、アドリアマイシン非耐性細胞 : K562 細胞) と同程度に強い活性を示したため、C₆₀誘導体は薬剤耐性がん治療にも応用可能であることが示唆された。

Table 2 C₆₀誘導体のがん細胞増殖抑制効果

Compound	Cell growth inhibition EC ₅₀ (μM)					
	HL60	A549	HeLa	NIH:OVCA3	K562	K562/ADM
1	32.2	>50	31.2	28.4	21.1	22.1
6a	>50	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
7(C=1)	>50	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
7(C=2)	10.1	12.0	16.1	9.9	11.3	14.4
7(C=3)	11.6	16.2	13.0	11.3	11.4	16.8
7(C=4)	9.0	13.1	11.1	10.4	10.8	13.7
7(C=5)	9.5	12.6	10.7	10.9	9.4	15.2
7(C=6)	6.1	7.1	7.3	8.6	5.4	11.8
8(C=2)	28.4	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
8(C=3)	17.1	36.6	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
<i>cis</i> - 12	3.8	6.4	7.0	8.4	4.6	5.8
<i>trans</i> - 12	3.5	9.4	7.5	9.5	4.5	6.7
13(C=1)	3.6	5.7	6.2	7.6	4.2	8.9
13(C=2)	6.6	7.0	6.9	6.4	8.9	10.7
13(C=3)	3.1	5.1	5.0	7.1	4.9	8.6
14	2.9	8.8	8.3	10.0	4.6	7.5
15	3.2	7.4	6.7	7.6	5.4	9.9
Cisplatin	2.7	N. T.	17.3	>100	N. T.	N. T.
Etoposide	1.4	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.
Doxorubicin(ADM)	0.057	0.20	N. T.	N. T.	0.14	15.8

N.T. : Not Tested

また A549 細胞に対して強い活性を示した **15** を用いて A549 細胞を移植したマウスゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍活性を評価した。その結果、**15** は有意に腫瘍体積の増加を抑制し ($p < 0.05$)、**1** と同程度に強い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった (Fig. 5)。また **15** 添加群において有意な体重減少や肝臓重量、脾臓重量の増加は確認されなかったため、**15** は肝臓や脾臓に対する毒性を示していないことが示唆された (data not shown)。

Fig. 5 C₆₀誘導体の抗腫瘍活性 (n=4)

[総括]

抗 HIV 活性の評価により、強い活性を示すことに加えて HIV に対して複数のステップを阻害することで耐性獲得を回避しうる **9** を、抗腫瘍活性の評価により薬剤耐性がん細胞、さらに

はマウスゼノグラフトモデルにおいて強い活性を示す **15** を見出した。これらの誘導体は強い活性を示すことに加え、位置異性が存在しないモノ付加体であり、さらにピロリジン環 2 位にスピロペリジニウム構造を導入したことで分子内に不斉炭素を含んでおらず、医薬品として開発する際に障害となる鏡像異性が存在しないことから医薬品リード化合物として適していると考えられる。

[謝辞]

細胞系における抗 HIV 活性を測定していただきました熊本大学薬学部の藤田美歌子准教授および大塚雅巳教授に御礼申し上げます。

[主論文に関する原著論文]

T. Yasuno, T. Ohe, K. Takahashi, S. Nakamura, T. Mashino : The human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition activity of novel pyridine/pyridinium-type fullerene derivatives; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, 25, 3226-3229.

[参考論文]

T. Yasuno, T. Ohe, K. Takahashi, S. Nakamura, T. Mashino : Antiproliferative activity of novel pyridinium fullerene derivatives in drug-resistant cell lines; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, submitted (Jan. 1, 2018).