

抗 HIV 活性を有する伝統薬物の研究

中村 憲夫

Inhibitory Effects of Some Traditional Medicines on Proliferation of HIV-1 and Its Protease

Norio NAKAMURA

*Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University,
2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan*

(Received April 5, 2004)

In attempts to discover anti-HIV agents from natural sources, various traditional medicine extracts were tested for their inhibitory effects on HIV-1 proliferation and its protease. An extract of the seeds of *Croton tiglium* showed potent inhibitory effects on the proliferation of HIV-1. The active principle was determined to be phorbol esters. Several derivatives of phorbol ester were evaluated for inhibition of proliferation as well as activation of protein kinase C (PKC). Of these compounds, 12-*O*-acetylphorbol 13-decanoate (6) showed the most potent inhibition of proliferation without activating PKC. Some triterpenes from the stems of *Cynomorium songaricum* and the woody part of *Xanthoceras sorbifolia* showed inhibitory activity against HIV-1 protease. Various derivatives of oleanolic acid were synthesized and evaluated for their inhibitory activity against HIV-1 protease. Their inhibitory mechanism was also investigated.

Key words—HIV; phorbol ester; triterpene; HIV protease; AIDS

1. はじめに

1981年に発見されたエイズ(AIDS, 後天性免疫不全症候群)は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)が免疫機構の司令塔である「CD4陽性T細胞」を破壊し、感染症に対する抵抗力を低下させ、最終的には死に至る病気である。

UNAIDS(国連合同エイズ計画)/WHO(世界保健機関)の調べによると2003年末現在HIV感染者/AIDS患者数は全世界で4000万人、2003年の新規HIV感染者数は500万人、AIDSによる死亡者数は300万人いると言われている。¹⁾HIV感染者/AIDS患者はサハラ以南のアフリカ(2500—2820万人)で多く、ついで南・南東アジア(460—820万人)に多い。また、今後アジアでエイズ被害が爆発的に拡大していくと言う指摘もあり、いまだに深刻な社会問題を引き起こしており、優れた特効薬の開発が待ち望まれている疾病の1つである。

これまでエイズ治療薬開発のためにHIVのライフサイクルを遮断する物質の探索が世界中で数多く行われてきた。中でもウイルスのゲノムRNAをDNAに逆転写する際に必須な逆転写酵素(reverse transcriptase, RT)とウイルス由来の前駆体蛋白質を切断し、成熟型ウイルスにするために必須なプロテアーゼ(protease, PR)の2種の酵素が主なターゲットとして検討され、azidothymidine(AZT)(RT阻害剤)やsaquinavir, indinavir(PR阻害剤)のように臨床的に有効な薬物が開発された。²⁾また、HAART(highly activated anti-retrovirus therapy)と呼ばれる抗レトロウイルス薬併用療法も功を奏しており、³⁾先進諸国では「死の病気」というイメージから脱却しつつある。しかし、まだ完全にウイルスを排除するまでに至っておらず、しかも強い副作用や薬剤耐性株の出現などの問題も生じている。また、抗エイズ薬を最も必要としている発展途上国の人々には、既存のエイズ治療薬は非常に高価であるため広く行き渡らない現状である。

このような背景から、筆者らは新しいタイプ又は新しい作用メカニズムを有する天然薬物由来の抗HIV物質の開発を目的として、RT阻害、PR阻

富山医科薬科大学和漢薬研究所(〒930-0194 富山市杉谷2630)

e-mail: ikki@ms.toyama-mpu.ac.jp

本総説は、平成15年度日本薬学会北陸支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

害, また, MT-4 細胞に感染させた HIV そのものの増殖を抑制する効果 (抗 HIV 作用) を指標として, これまで世界各地から収集した約 1000 種の伝統薬物について検討を行ってきた.⁴⁻¹⁵⁾ 発展途上国の人々が日頃用いている伝統薬物を基源とするエイズ治療薬の開発は, すなわち地域への成果の還元であるとともに安価でかつ大量供給につながると考えたからである. 今回は, これまでの成果の中からホルボールエステル類の抗 HIV 作用とトリテルペン類の HIV-1 PR 阻害活性について述べる.⁴⁻¹⁰⁾

2. *Croton tiglium* に含まれるホルボールエステル類の抗 HIV 作用について⁴⁻⁶⁾

初めに筆者らが行っている抗 HIV 作用の測定方法について説明する. HIV-1 を MT-4 細胞に感染させたのち, 細胞を培地に懸濁させた. この懸濁液と検体溶液を 37°C でインキュベートした. 5 日後, 細胞の状態を光学顕微鏡で観察して阻害濃度 (IC) を決定した. また, 細胞毒性 (CC) はトリパンプルー法で求めた.

この方法によりエジプト民間薬について HIV 増殖抑制作用を指標としてスクリーニングをしたところ *Croton tiglium* の種子のメタノール及び水エキスに効果が見られた. その IC₁₀₀ 値はそれぞれ 0.025, 2.0 µg/ml であった.¹⁶⁾ また, *C. tiglium* のメタノールエキスは巨細胞形成も強く阻害した. *C. tiglium* の種子は日本名を「巴豆」といい, 発ガンプロモーション作用を始め多くの生物活性を示す *tigliane* タイプのホルボールエステル類を数多く含むことが知られている.¹⁷⁻²⁵⁾ *C. tiglium* の種子のメタノールエキスをヘキサン, エーテル, 水可溶部に分け, 各画分について抗 HIV 作用を調べるとエーテル可溶部に強い活性があった. エーテル可溶部を各種カラムクロマトにより 8 種類の化合物 (1-8) を単離した. これらの構造は NMR 及び MS からいづれもホルボールエステルであり, アシル側鎖の結合位置と種類はそれぞれの化合物を CH₃ONa, KOH, HClO₄ で選択的に加水分解し, 得られたカルボン酸メチルエステルを GC で分析して決定した. このうち, 化合物 6-8 は既知化合物であったが, 1-5 の 5 種は新化合物であった (Chart 1).^{4,5)}

今回単離したホルボールエステル類について抗 HIV 作用を調べると化合物 8 と 6 に非常に強い活性があり, IC₁₀₀ 値はそれぞれ 0.48, 7.6 ng/ml で,

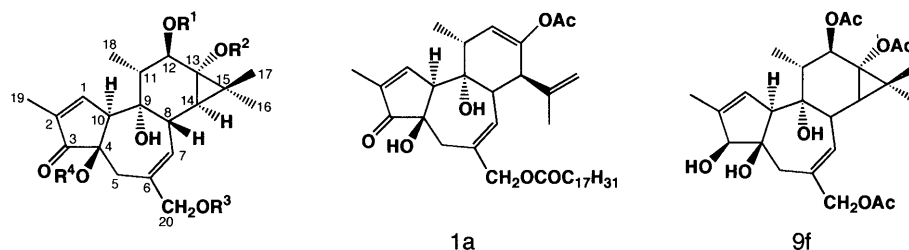
ついで化合物 2 と 4 で, IC₁₀₀ 値はともに 7.8 µg/ml であった (Table 1). これらの結果より *C. tiglium* の種子の活性本態はこれらホルボールエステル類によるものと結論した.

ところでプロテインキナーゼ C (PKC) はイオンの膜透過の調節, 受容体の抑制調節, 平滑筋の収縮などを行うシグナルの伝達に重要な役割を持っている. 化合物 8 すなわち TPA のようなホルボールタイプの化合物は PKC を活性化して発ガンプロモーション作用を引き起こすことが知られている.^{26,27)} しかし, TPA の 12-deacyl 体である prostatin のように発ガンプロモーション作用がなく, 抗 HIV 作用のある化合物も報告されていること²⁴⁾ から, non-tumor promotor の新しい抗 HIV 化合物を見つけるため, ホルボールエステル類を種々変化させ検討を行った.

筆者らが行った PKC の活性化の測定方法は, 脂質として L- α -phosphatidyl serine, 活性部位の threonine を含むペプチド, カルシウムバッファーに放射能ラベルした ATP と PKC を加え, 反応混合液を 37°C でインキュベートするものである. この反応によりペプチドがリン酸化されるので, 15 分後リン酸溶液を加え binding paper に移し, 洗浄後シンチレーションカウンターを測定した.

C. tiglium より単離したホルボールエステルについて PKC の活性化を測定すると, 化合物 8 は強い PKC の活性化を示したが, 化合物 4 と 6 には PKC の活性化は 10 ng/ml の濃度でなく, 最小活性化濃度はどちらの化合物も 50 µg/ml 以上であった. したがって 12-O-acetylphorbol 13-decanoate (6) をシード化合物として化学構造を変換することにより新しいタイプの抗 HIV 物質の開発が可能でないかと予想された. そこで, phorbol alcohol 及び isophorbol alcohol を基本骨格として種々の誘導体を合成し, 抗 HIV 作用と PKC の活性化を検討した.⁶⁾

原料となる phorbol (9), isophorbol (14), 4-deoxy-4 α -phorbol (23) は種々のホルボールエステルを含む croton oil を Ba(OH)₂ で加水分解して得た. Phorbol (9) から 8 種の化合物 (9a-g, 10) を合成した (Chart 1). また, isophorbol (14) から 13 種の誘導体 (14a-e, 15-22) を作った. 一方, 4-deoxy-4 α -phorbol 誘導体 (23a-c, 24, 25) は 23 及



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	H	Ac	C ₁₈ H ₃₁ O	H
1b	Ac	Ac	C ₁₈ H ₃₁ O	H
2	H	tigloyl	C ₁₈ H ₃₁ O	H
3	Ac	tigloyl	H	H
4	C ₁₀ H ₁₉ O	2-Me butyryl	H	H
4a	C ₁₀ H ₁₉ O	2-Me butyryl	Ac	H
5	tigloyl	2-Me butyryl	H	H
6	Ac	C ₁₀ H ₁₉ O	H	H
6a	Ac	C ₁₀ H ₁₉ O	Ac	H
6b	Ac	C ₁₀ H ₁₉ O	Ac	Me
7	2-Me butyryl	C ₁₂ H ₂₃ O	H	H
8	C ₁₄ H ₂₇ O	Ac	H	H
8a	C ₁₄ H ₂₇ O	Ac	Ac	H
8b	C ₁₄ H ₂₇ O	Ac	Ac	Me
8c	Ac	C ₁₄ H ₂₇ O	H	H
8d	Ac	C ₁₄ H ₂₇ O	C ₁₄ H ₂₇ O	H
9	H	H	H	H
9a	Ac	H	H	H
9b	H	Ac	H	H
9c	Ac	Ac	H	H
9d	Ac	Ac	Ac	H
9e	Ac	Ac	Ac	Me
9g	Ac	Ac	Ac	Ac
10	Bz	Bz	Bz	H
11	Ac	C ₆ H ₁₁ O	H	H
12	Ac	C ₉ H ₁₇ O	H	H
13	Ac	C ₁₂ H ₂₃ O	H	H

Chart 1. Chemical Structures of Phorbol and Its Derivatives

び **23b** からアセチル化及びアシル化により調製した (Chart 2).

これら合成した誘導体について抗 HIV 活性と PKC の活性化を測定した (Table 1). Phorbol (**9**), isophorbol (**14**), 4-deoxy-4 α -phorbol (**23**) には抗 HIV 作用も PKC の活性化もなかった. 大部分の isophorbol 及び 4-deoxy-4 α -phorbol 誘導体には抗 HIV 作用は見られなかったが, **16**, **23a—b**, **24**, **25** が中程度の抗 HIV 作用を示した. さらに **23b** の acetyl 体 (**23c**) では抗 HIV 作用は大きく増強した. また, phorbol 誘導体では, mono- 及び di-acetate

体 (**9a—9c**) には抗 HIV 活性は見られなかったが, triacetate 体 (**9d**) には活性が見られ, その methyl 体 (**9e**) では 2 倍強くなり, 3-deoxy 体 (**9f**) では消失した. また **9d** や **9e** には PKC の活性化は見られなかった.

この結果を基に *C. tigium* から単離した化合物のうち, **1**, **4**, **6**, **8** についてさらに修飾を行い, 抗 HIV 活性と PKC の活性化を測定した. 化合物 **1a**, **1b** では **1** に比べ抗 HIV 活性は 2 倍強くなった. **1** と **1b** では PKC の活性化は見られず, **1a** では 24% の活性化があった. 化合物 **4** もアセチル化により抗

Table 1. Inhibition of HIV-1 Induced CPE and Activation of PKC by Phorbols and Their Derivatives

	Inhibition of CPE ($\mu\text{g/ml}$)		Activation of PKC		Inhibition of CPE ($\mu\text{g/ml}$)		Activation of PKC		
	IC ₁₀₀	CC ₀	% ^{a)}	MAC ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₁₀₀	CC ₀	% ^{a)}	MAC ($\mu\text{g/ml}$)	
Phorbol derivatives				Isophorbol derivatives					
1	15.6	62.5	0		14	NE	500	0	
1a	7.81	125	24		14a	NE	>1000	NT	
1b	7.81	62.5	0		14b	NE	>1000	NT	
2	7.81	62.5	14		14c	250	500	0	
3	125	500	16		14d	NE	500	0	
4	7.81	31.1	0	>50	14e	NE	500	0	
4a	3.90	15.6	10	>50	15	NE	62.5	0	
5	31.3	62.5	10		16	31.25	500	NT	
6	0.0076	62.5	0	>100	17	125	500	NT	
6a	15.6	31.3	11		18	125	500	NT	
6b	NE	1.95	0		19	NE	1000	NT	
7	15.6	62.5	16		20	NE	1000	NT	
8	0.00048	31.3	100	0.01	21	NE	>1000	NT	
8a	15.6	62.5	0		22	250	500	NT	
8b	NE	15.6	0		4-Deoxy-4 α -phorbol derivatives				
8c	NE	125	0		23	NE	500	0	
8d	62.5	125	0		23a	62.5	1000	NT	
9	NE	1000	8		23b	62.5	500	NT	
9a	NE	500	13		23c	7.81	250	NT	
9b	125	>1000	0		24	31.25	1000	NT	
9c	NE	>1000	57		25	62.5	1000	NT	
9d	62.5	125	0						
9e	31.3	125	0						
9g	125	250	0						
9f	500	1000	0						
10	NE	31.3	100						
11	NE	62.5	27						
12	31.3	31.3	10						
13	250	500	35						

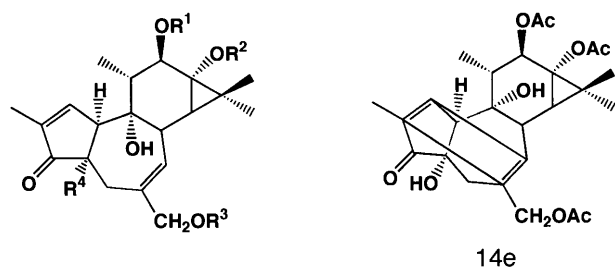
^{a)} at 100 ng/ml, relative to that shown by TPA (100% inhibition) (**8**), MAC: minimum concentration for maximum activation of PKC, NE: not effective, NT: not tested. Under the same conditions, dextrin sulfate DS8000 (positive control) showed IC₁₀₀ and CC₀ value of 3.90 and >1000, respectively.

HIV 活性は 2 倍強くなり, **4**, **4a** も PKC の最大活性化は 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった. 化合物 **6** ではアセチル化, メチル化により抗 HIV 活性が大きく下がった. また, 最も強い抗 HIV 活性と PKC の活性化を示した **8** では, アセチル化やメチル化により両作用ともなくなった. また, **8** の異性体 **8c** は抗 HIV 活性も PKC の活性化もなかった. 13,20- ジェスチル誘導体 **8d** では弱い抗 HIV 活性が見られた.

次に, アシル側鎖の違いによる活性の変化を調べるため, 13 位が種々の炭素数のホルボールエステル (**9c**, **11**, **12**, **6**, **13**, **8c**) を合成した. それらについて抗 HIV 活性と PKC の活性化を測定すると,

炭素鎖の短いアシル化合物では抗 HIV 活性はなかったが, C₉ で活性が見られ, C₁₀ で最も強い抗 HIV 活性を示した. またこの時 PKC の活性化もなかった.

以上の結果より, 筆者らはホルボール類の抗 HIV 活性を次のように結論した (Chart 3). (1)抗 HIV 活性には 4 β -水酸基すなわち A/B トランス体が必要である. (2)また, 3 位のカルボニルの還元体は活性がなくなる. (3)活性発現にはジエステルは必要であり, 13,20- ジエステル体より 12,13- ジエステル体の方が強いことが分かった. (4)そしてジエステルはデカノイル (C₁₀) とアセチル (C₂) の組み



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
14	H	H	H	OH
14a	H	Ac	H	OH
14b	H	Ac	Ac	OH
14c	Ac	Ac	Ac	OH
14d	Ac	Ac	Ac	OAc
15	C ₄ H ₇ O	C ₄ H ₇ O	C ₄ H ₇ O	OH
16	C ₈ H ₁₅ O	Ac	Ac	OH
17	C ₁₀ H ₁₉ O	Ac	Ac	OH
18	10-Undecenoyl	Ac	Ac	OH
19	C ₁₂ H ₂₃ O	Ac	Ac	OH
20	C ₁₄ H ₂₇ O	Ac	Ac	OH
21	C ₁₇ H ₃₃ O	Ac	Ac	OH
22	1-Adamantanoyl	Ac	Ac	OH
23	H	H	H	H
23a	H	Ac	H	H
23b	H	Ac	Ac	H
23c	Ac	Ac	Ac	H
24	C ₁₀ H ₁₉ O	Ac	Ac	H
25	C ₁₄ H ₂₇ O	Ac	Ac	H

Chart 2. Chemical Structures of Isophorbol and Its Derivatives

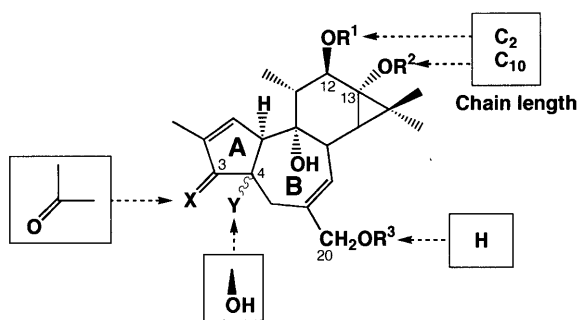


Chart 3.

合わせが最もよく、この場合 PKC の活性化は見られない。

本研究により、12-*O*-acetylphorbol 13-decanoate (6) には非常に強い抗 HIV 作用が見られ、PKC の活性化もなかった。今後の課題としては、化合物 6 の有効性をさらに明らかとするために大量に化合物

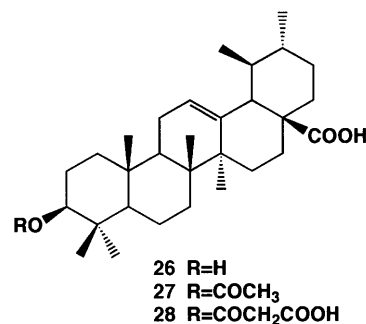


Chart 4.

6 を合成し、作用メカニズムの解析や動物実験を行う必要があると思われる。

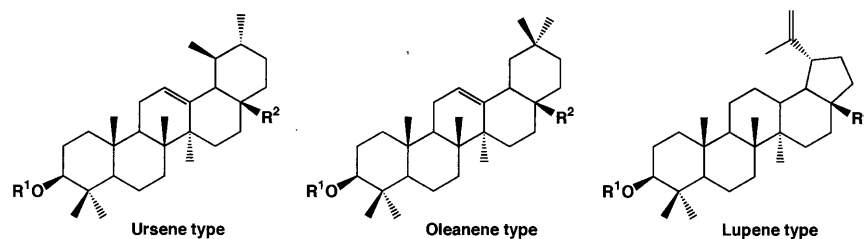
3. HIV-1 PR 阻害活性を示すトリテルペン類について⁷⁻¹⁰⁾

HIV-1 PR 阻害活性を指標とした漢薬及び蒙薬のスクリーニングで「鎖陽」に比較的強い阻害活性が見られた。²⁸⁾ なお、PR の阻害活性はリコンビナントな酵素を用い、阻害率を HPLC で定量する方法により求めている。鎖陽はオシヤグジタケ科 (Cynomoriaceae) *Cynomorium songaricum* の茎で、主に内蒙古に生育する寄生植物である。中国では古くから強壯薬として用いられており、²⁹⁾ 成分としてはトリテルペン、ステロイド、脂肪酸などが知られている。^{30,31)} 鎖陽の抽出エキスから 18 種の化合物を単離した。これらの化合物について 100 μg/ml の濃度で HIV-1 PR 阻害活性を測定すると ursolic acid (26), acetyl ursolic acid (27), malonyl ursolic acid hemiester (28) のみに比較的強い活性 (IC₅₀ 値はそれぞれ 8, 13, 6 μM) が見られ、ほかの 15 種には効果が見られなかった (Chart 4)。⁷⁾

鎖陽に含まれるトリテルペン類に HIV-1 PR 阻害活性が見られ、3 位にマロン酸ヘミエステルの導入で、さらに阻害活性が増大した。そこで構造の類似した ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid について一連のジカルボン酸ヘミエステルの合成を行い、構造と活性の相関の検討を行った (Table 2)。

トリテルペン類の 3 位に炭素数 5 までのジカルボン酸をエステル結合で導入し、活性を測定するといずれのトリテルペンも oxalyl (C₂), malonyl (C₃), succinyl (C₄), glutaryl (C₅) と炭素数が増えるに従って阻害活性も強くなった。最も強い glutaryl hemiester (33, 42, 49) の IC₅₀ 値はいずれのトリテ

Table 2. Inhibitory Effects of Triterpene Derivatives on HIV-1 Protease



R ¹	R ²	Ursene type	IC ₅₀ (μM)	Oleanene type	IC ₅₀ (μM)	Lupene type	IC ₅₀ (μM)
H	CH ₃	α-Amyrin (29)	80	β-Amyrin (35)	>100		
H	COOH	Ursolic acid (26)	8	Oleanolic acid (36)	8	Betulinic acid (44)	9
H	COOCH ₃	30	14	37	20	45	>25
COCH ₃	COOH	27	13	38	9		
COCOOH	COOH	31	7	39	20	46	7
COCH ₂ COOH	COOH	28	6	40	8	47	6
CO(CH ₂) ₂ COOH	COOH	32	6	41	4	48	6
CO(CH ₂) ₃ COOH	COOH	33	4	42	4	49	4
CO(CH ₂) ₂ COOCH ₃	COOCH ₃					50	40
CO(CH ₂) ₃ COOCH ₃	COOCH ₃	34	>50	43	>50		

ルペンも 4 μM で、元のトリテルペンの約 2 倍の強さであった。これらの carboxyl 基をメチル化する (34, 43, 50) と活性は大きく減少し、トリテルペンの 3 位と 17 位の高極性基が酵素と相互作用していることを示唆している。17 位の carboxyl 基をメチル化した化合物 (30, 37, 45) も活性が顕著に減少した。また、17 位が carboxyl 基ではなく methyl 基の場合 (29, 35) も、活性が著しく消失し、17 位の高極性基は酵素との相互作用の関与することをさらに支持している。

一方、蒙薬「文冠木」の抽出エキスも中程度ながら阻害活性を示した。²⁸⁾ 文冠木は中国内モンゴルに生育するムクロジ科 (Sapindaceae) の低木 *Xanthoceras sorbifolia* の木部で、中国語では“Wen Guan Mu”，モンゴル語では“Shen Deng”と呼び、内モンゴルでは木部をリウマチや通風などに用いる。これまで果実からはいくつかのサポニン類が報告されている^{32,33)} が、木部に関する成分研究はまだ少ない。^{34,35)}

文冠木のメタノールエキスから 24-methylenecycloartan-3-ol (51), 3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid (52), oleanolic acid (36) procyanidin A-2 (54), dihydromyricetin, dihydroquercetin, naringenin, myricetin, epigallocatechin, epicatechin, epiafzelechin とともに新トリテルペン xanthocerasic acid

(53), 新 A-type proanthocyanidin dimer (55) を単離した (Chart 5).⁸⁾ 単離した化合物について HIV-1 PR 阻害活性を測定すると化合物 52, 36, 55 のみに活性が見られ、IC₅₀ 値はそれぞれ 20, 10, 70 μg/ml であった。Oleanolic acid (36) の HIV の増殖とその PR の阻害活性に関しては既に報告されており、^{7,36)} 今回の実験結果と一致している。また、化合物 52 は HIV PR 阻害活性を持つ初めての tirucallane 型のトリテルペンである。

これまで述べてきたように、ある種のトリテルペン類は HIV-1 PR に対して非常に強い阻害効果を有していると思われる。そこでさらに系統的にトリテルペン類の構造変換を行い、その構造と HIV-1 PR 阻害活性の相関関係について検討を行った。⁹⁾ 前述の 3 種のトリテルペン (ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid) の活性に大きな差が見られないこと、また、天然に豊富に存在することを考慮して出発原料として oleanolic acid (36, IC₅₀ = 8 μM) を用いた。

先に 3 位に炭素数 5 までのジカルボン酸ヘミエステル類について阻害効果を検討したが、oleanolic acid についてさらに炭素鎖の長い化合物を合成し、HIV-1 PR 阻害活性を検討した。その結果、炭素数が 6 から 8 のとき最も強く、その IC₅₀ 値は 3 μM であった。さらに炭素鎖が長い化合物ではこれらより

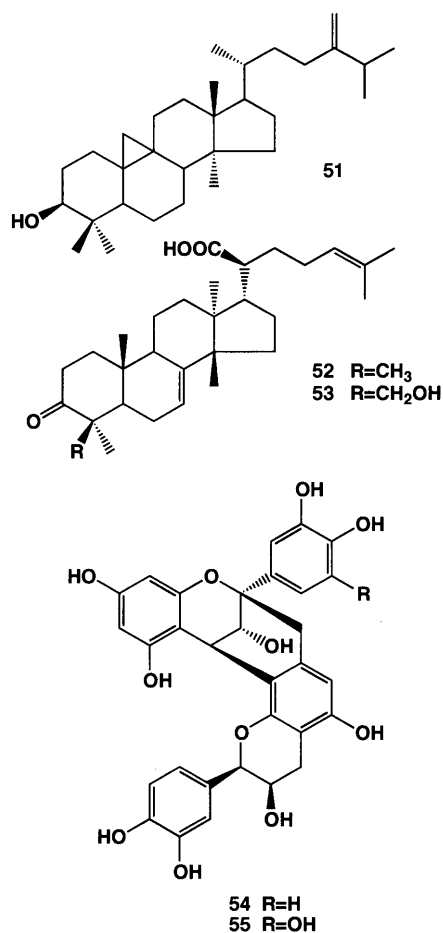


Chart 5.

阻害活性は弱くなった。また、28位又はジカルボン酸ヘミエステルの carboxyl 基をメチル化すると活性は減少した。

次に、3位が水酸基ではなくほかの官能基に代ったときの阻害活性の変化、またそこに前述で最も阻害活性の強かった炭素数6のジカルボン酸を導入したときの阻害活性の変化について検討を行った (Table 3). Oleanolic acid の3位水酸基を ketone 基や hydroxyimino 基に変えた化合物 (57, 59) でも阻害活性は変わらなかった。一方、28-methyl ester 体の3-hydroxyl 基を ketone 基や amino 基に変えても活性は弱いままであった (58, 61, 62) が、hydroxyimino 体 (60) では3-hydroxyl 体 (56) に比べ約2倍強くなった。また、3-hydroxyimino 基や amino 基に炭素数6のジカルボン酸を導入すると28-carboxyl 体 (67, 69) も methyl ester 体 (66, 68, 70) も非常に強い阻害活性を示した。なお、28-carboxyl 基を有する3-acylhydroxyimino 化合物 65 は例外で、acyl 基を持たない化合物 59 の活性とほぼ同じであった。化合物 66 にさらに amide 基を導入すると活性は減少した (71, IC₅₀=6.0 μM)。この化合物の methyl 体 (72) はフリーの carboxyl 基を持たないほかの化合物と同様活性はなかった。二

Table 3. Anti-HIV-1 Protease Activity of Oleanolic Acid Derivatives with Different Bond and Chain Natures at C-3

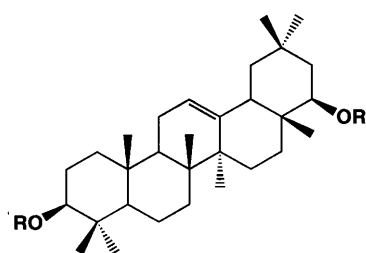
R ¹	R ² =H		R ² =CH ₃	
	Compound	IC ₅₀ (μM)	Compound	IC ₅₀ (μM)
β-OH	36	8	56	20
=O	57	5.5	58	20
=NOH	59	5.5	60	9.5
β-NH ₂			61	>20
α-NH ₂			62	>20
β-OCO(CH ₂) ₄ COOH	63	3.0	64	7.5
=NOCO(CH ₂) ₄ COOH	65	5.5	66	4.0
β-NHCO(CH ₂) ₄ COOH	67	3.0	68	3.0
α-NHCO(CH ₂) ₄ COOH	69	2.1	70	3.5
β-NHCO(CH ₂) ₄ CONH(CH ₂) ₃ COOH			71	6.0
β-NHCO(CH ₂) ₄ CONH(CH ₂) ₃ COOCH ₃			72	>20
β-NHCO(CH ₂) ₄ CONH-β-oleanolic acid 28-R ²	73	3.3	74	>20

量体化合物 (73) は単量体化合物と類似した阻害活性を示した。すなわち、フリーの carboxyl 基を有していない化合物 (74) には活性がなく、2つの carboxyl 基を有する化合物 73 は単量体 67 に匹敵する強い活性を示した。

Oleanolic acid の 3 位に炭素数 6 の酸性側鎖を導入すると強い HIV-1 PR 阻害活性が見られた。そこで、oleanene 骨格にもう 1 つの酸性側鎖の導入を試みた。Sophoradiol (75) は oleanene 型トリテルペンで 3 位と 22 位に 2 つの水酸基を有している。Chem 3D model の解析から、2 つの水酸基の距離は 12.321 Å で oleanolic acid の 3-OH と 17-COOH 基の距離 (12.409 Å) とほぼ同じである。化合物 75 を adipoyl chloride と反応させて 3,22-di-O-adipoyl sophoradiol (76) を得た。化合物 76 は元の 75 より 8 倍以上強い活性を示した (Fig. 1)。

2 つの酸性側鎖を持つ化合物 76 が強い活性を示したことから、oleanolic acid の 3 位と 28 位に 2 個の酸性側鎖を持つ化合物 78 を合成した。HIV-1 PR 阻害活性を測定すると予想したとおり化合物 78 はさらに強い活性を示し、その IC₅₀ は 1.7 μM であった。また、28 位に 1 つだけ酸性側鎖を持っている化合物 77 も 78 と同程度の強い活性を示し、元の oleanolic acid の 4 倍以上の強さであった (Table 4)。この理由として、oleanolic acid では 28 位の carboxyl 基がやや立体障害を受けた状態にあるため、酵素との水素結合又は静電的相互作用が弱いのに対し、28 位に側鎖を持つ 77 では、carboxyl 基と酵素が強く結合できるためと考える。

Computer modeling study ではトリテルペンの 3-hydroxyl 基をジカルボン酸ヘミエステルにすると HIV-1 PR との結合は増強すると予想された。³⁷⁾ 今



Sophoradiol (75) R=H IC₅₀=18.8 μM
76 R=CO(CH₂)₄COOH IC₅₀= 2.3 μM

Fig. 1. Anti-HIV-1 Protease Activity of Oleanene Type Triterpenes with Hydroxyls or Acidic Chain at C-3 and C-22

回の結果はこの予想を実証するとともに、28 位に酸性の側鎖を結合すると 3 位だけの化合物より HIV-1 PR との結合はさらに強くなることを示した (77 IC₅₀=1.7 vs. 63 IC₅₀=3.0 μM)。以上の結果より、oleanene 骨格に酸性の側鎖、特に炭素数 6 の酸性基を導入すると、HIV-1 PR に対する阻害活性が大きく増加することが分かった。

また、今回用いたトリテルペンヘミエステル類のエステル結合は弱アルカリ性条件下、リパーゼに対しても安定であり、これらトリテルペン誘導体は消化酵素にも安定であることが想定された。

ところで、HIV-1 PR はペプチドが二量体を形成して初めて PR 活性を示す。³⁷⁾ そこで、今回のトリテルペン類の PR 阻害作用メカニズムを検討するため、サイズ排除クロマトグラフィーを行ったところ、HIV-1 PR は単量体として溶出され、酵素の活性部位に直接作用して阻害するのではなく酵素の二量体化を阻害していることが示唆された。また、HIV-1 PR と同じ aspartic acid protease に属する pepsin (単量体で活性を示す PR) に対する阻害活性を測定すると、これらトリテルペン類は全く阻害活性を示さず、酵素の二量体化を阻害していることを支持した。

筆者らは 10 年以上に渡り伝統薬物から HIV PR 及び RT 阻害物質の単離を中心に研究を行ってきた。その結果、これまでに数多くの HIV の酵素に阻害効果を示す化合物を得ることができた。しかし、かならずしもそれらの多くが細胞系でのウイル

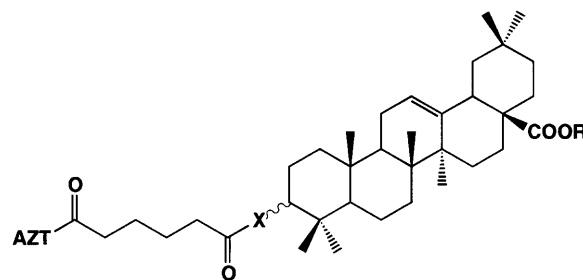
Table 4. Anti-HIV-1 Protease Activity of Oleanolic Acid Derivatives with Acidic Chain(s) at either C-3 or C-28, as well as at Both C-3 and C-28

	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)
36	H	H	8
63	CO(CH ₂) ₄ COOH	H	3.0
77	H	NH(CH ₂) ₅ COOH	1.7
78	CO(CH ₂) ₄ COOH	NH(CH ₂) ₅ COOH	1.7

ス増殖に対しても有効である訳ではなかった。Double-drug という新しい概念があるが、これは単独では1つの酵素しか阻害作用を示さないような2種の阻害物質を化学結合でつなぎ、生物活性を増強させようというものである。これまで述べてきたようにいくつかのトリテルペン類のジカルボン酸ヘミエステルが HIV-1 PR に対して有効であることを見出ししている。しかし、これらの化合物は細胞への透過性が乏しいため抗 HIV 作用を示さない。そこでこれら天然物由来の化合物に double-drug の概念を適用し、oleanolic acid 誘導体とほかの抗 HIV 物質を結合させることを行った。¹⁰⁾ 抗 HIV 物質として AZT を用いた。AZT は臨床に用いられている核酸系の RT 阻害物質で AZT 自身は PR 阻害作用を全く示さない。合成した化合物 (63a—70a, Chart 6) について検定を行ったところ、多くの triterpene-AZT 結合体は強い PR 阻害活性を示した (Table 5)。特に 28 位にフリーのカルボン酸を有する結合体はそれらのジカルボン酸ヘミエステル体より強い効果が見られた。最も強い結合体は 67a でその IC₅₀ 値は 1.2 μM であった。この測定条件下では、結合体の加水分解は起こらず、結合体に効果があると言える。67a のサイズ排除クロマトグラフィーからこれらの化合物も PR の二量化を阻害していることが分かった。PR 阻害活性は強くなっているので、PR の二量化の阻害に結合体の全体構造がより適しているのかもしれないと思われる。また、AZT より相対的に弱いながらもすべての結合体が抗 HIV 作用を示した。それらは、28-methyl ester 体より 28-carboxyl 体の方が強かった。3 位の結合に関しては、3-ester 体は弱く、70a を除き 3-imide 体より 3-amide 体が特に強い抗 HIV 作用を示した。最も強い抗 HIV 作用を示した 69a の IC₁₀₀ 値は 0.47 μM で、AZT の約 8 分の 1 の強さであった。これらの結合体の抗 HIV 作用は AZT そのものより弱い、AZT 抵抗性ウイルスに対して PR 阻害作用が有効となるかもしれない。現在この増殖抑制メカニズムについて検討を行っている。

4. おわりに

以上今回ホルポールエステル類の抗 HIV 作用とトリテルペン類の HIV-1 PR 阻害活性について述べた。今回述べてきた研究は天然物化学の立場から行ったものであり、幸いにもいくつかの有効物質へ



- 63a R=H X=β-O-
 64a R=CH₃ X=β-O-
 65a R=H X=α-N-O-
 66a R=CH₃ X=α-N-O-
 67a R=H X=β-NH
 68a R=CH₃ X=β-NH
 69a R=H X=α-NH
 70a R=CH₃ X=α-NH

Chart 6.

Table 5. Anti-HIV-1 Protease and Anti-HIV Activity of Triterpene Derivatives

Compound	vs. PR	vs. HIV	
	IC ₅₀ (μM)	IC ₁₀₀ (μM)	CC ₀ (μM)
63a	3.2	3.78	15.0
64a	4.0	18.4	148
65a	1.9	1.84	29.6
66a	16	4.53	145
67a	1.2	0.589	120
68a	20	0.370	73.9
69a	1.9	0.469	120
70a	8.0	7.39	>118

と導くことができた。しかし、実際に抗ウイルス薬として臨床の場で用いられるにはまだまだ克服しなければならない問題点が数多くあると思われる。最初にも述べたがエイズ治療薬は最も開発が待ち望まれている薬の1つである。伝統薬物から実的に用いられる治療薬が開発されることを願って、今後もさらに有効な物質の探索を進めていく予定である。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、有益なご助言、ご助力を賜りました富山医科薬科大学和漢薬研究所 服部征雄教授に厚く御礼申し上げます。また、抗 HIV 作用は大阪府立公衆衛生研究所 大竹徹博士、川畑拓也博士に測定していただいたもので、この場を借りて感謝の意を申し上げます。最後に、本研究は S. El-Mekawy 博士、M. R. Meselhy 博士、馬 超美博士らを始めとする研究室在籍者の

協力によるものであり、ここに深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) UNAIDS/WHO, "AIDS Epidemic Update," December 2003.
- 2) Pakyz A., Israel D., *J. Am. Pharm. Assoc. (Wash.)*, **NS37**, 543–551 (1997).
- 3) Lori F., Foli A., Lisziewicz J., *J. Antimicrob. Chemother.*, **50**, 55–60 (2002).
- 4) El-Mekkawy S., Meselhy M. R., Nakamura N., Hattori M., Kawahata T., Otake T., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1346–1347 (1999).
- 5) El-Mekkawy S., Meselhy M. R., Nakamura N., Hattori M., Kawahata T., Otake T., *Phytochemistry*, **53**, 457–464 (2000).
- 6) El-Mekkawy S., Meselhy M. R., Abdel-Hazef A. A., Nakamura N., Hattori M., Kawahata T., Otake T., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 523–529 (2002).
- 7) Ma C.-M., Nakamura N., Miyashiro H., Hattori M., Shimotohno K., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 141–145 (1999).
- 8) Ma C.-M., Nakamura N., Hattori M., Kaku-da H., Qiao J.-C., Yu H.-I., *J. Nat. Prod.*, **63**, 238–242 (2000).
- 9) Ma C.-M., Nakamura N., Hattori M., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1681–1688 (2000).
- 10) Ma C.-M., Nakamura N., Hattori M., Kawahata T., Otake T., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 877–880 (2002).
- 11) Lim Y. A., Kojima S., Nakamura N., Miyashiro H., Fushimi H., Komatsu K., Hattori M., Shimotohno K., Gupta M. P., Correa M., *Phytother. Res.*, **11**, 490–495 (1997).
- 12) Ma C.-M., Nakamura N., Hattori M., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 915–917 (2001).
- 13) Min B.-S., Nakamura N., Miyashiro H., Bae K.-W., Hattori M., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1607–1612 (1998).
- 14) Hussein G., Miyashiro H., Nakamura N., Hattori M., Kawahata T., Otake T., Kakiuchi N., Shimotohno K., *Phytother. Res.*, **13**, 31–36 (1999).
- 15) Tewtrakul S., Nakamura N., Hattori M., Fujiwara T., Supavita T., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 630–635 (2002).
- 16) Kawahata T., Otake T., Mori H., Morimoto M., Ueba N., Kusumoto I. T., El-Mekkawy S., Hattori M., Namba T., *J. Trad. Med.*, **13**, 59–65 (1996).
- 17) Evans F. J., Taylor S. E., "Progress in The Organic Chemistry of Natural Products," Vol. 44, eds. by Herz W., Grisebach H., Kirby G. W., Springer-Verlag, New York, 1983, pp. 1–99.
- 18) Evans F. J., Soper C. J., *J. Nat. Prod.*, **41**, 193–233 (1978).
- 19) Hecker E., "Carcinogenesis," Vol. 2, eds. by Slaga T. J., Sivak A., Boutwell R. K., Raven Press, New York, 1978, pp. 11–48.
- 20) Blumberg P. M., *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **8**, 153–197 (1980).
- 21) Blumberg P. M., *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **9**, 199–234 (1981).
- 22) Blumberg P. M., *Cancer Res.*, **48**, 1–8 (1988).
- 23) Kupchan S. M., Uchida I., Branfman A. R., Daily R. G., Yu-Fei Jr. B., *Science*, **191**, 571–572 (1976).
- 24) Gustafson K. R., Cardellina J. H. II., McMahon J. B., Gulakowski R. J., Ishitoya J., Szalasi Z., Lewin N. E., Blumberg P. M., Weislow O. S., Beutler J. A., Buckheit Jr. R. W., Cragg G. M., Cox P. A., Bader J. P., Boyd M. R., *J. Med. Chem.*, **35**, 1978–1986 (1992).
- 25) Gschwendt M., Hecker E., *Z. Krebsforsch.*, **81**, 193 (1974).
- 26) Nishizuka Y., *Nature*, **308**, 693–698 (1984).
- 27) Chowdhury M. I. H., Koyanagi Y., Kobayashi S., Hamamoto Y., Yoshiyama H., Yoshida T., Yamamoto N., *Virology*, **176**, 126–132 (1990).
- 28) Ma C.-M., Miyashiro H., Hattori M., Shimotohno K., *J. Trad. Med.*, **12**, 418–419 (1995).
- 29) New Medical College of Jangsu (ed.), "Dictionary of Chinese Materia Medica," Shanghai Scientific and Technological Publishing Co., Shanghai, 1977, p. 2395.
- 30) Ma C.-M., Jia S.-S., Sun T., Zhang Y.-W., *Acta Pharm. Sinica*, **28**, 152–155 (1993).
- 31) Zhang S.-T., Zhang S.-Y., *China J. Chinese Materia Medica*, **15**, 39–41 (1990).
- 32) Chen Y.-J., Takeda T., Ogihara Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3378–3383 (1984).
- 33) Chen Y.-J., Takeda T., Ogihara Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 127–134 (1985).
- 34) Huang Y.-F., Feng X.-Z., *Zhongcaoyao*, **18**,

- 199-200 (1987).
- 35) Cui C.-B., Chen Y.-J., Yao X.-S., Qu G.-X., Xian Y.-L., *Zhongcaoyao*, **18**, 297-298 (1987).
- 36) Kashiwada Y., Wang H. K., Nagao T., Kitanaka S., Yasuda I., Fujioka T., Yamagishi T., Cosentino L. M., Kozuka M., Okabe H., Ikeshira Y., Hu C. Q., Yeh E., Lee K. H., *J. Nat. Prod.*, **61**, 1090-1095 (1998).
- 37) Quere L., Wenger T., Schramm H. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **227**, 484-488 (1996).