

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 24 日現在

機関番号：34414

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 年度～2012 年度

課題番号：21700772

研究課題名（和文） 薬物治療をサポートするフラボノイドの臨床応用

研究課題名（英文） Clinical application of flavonoids as a support for pharmacotherapy

研究代表者

三浦 健（MIURA TAKESHI）

大阪大谷大学 薬学部 助教

研究者番号：60434809

研究成果の概要（和文）：アントラサイクリン系抗がん薬の代謝に寄与する CBR1・AKR1A1、CBR1 の類縁酵素 CBR3 の大腸菌発現系・精製系を確立し、CBR1 に対する強力な阻害活性を示す果物・野菜抽出液を見出した。また、CBR1 と AKR1A1 に対する阻害を検討できる細胞系を確立し、上記と同様の結果を得た。さらに、食品添加物の一種が CBR1 の転写制御に関与することを見出し、その制御には転写因子 Nrf2 が関与することを明らかにした。CBR1 の基質であるイサチンが腎障害を悪化させることを明らかにし、CBR1 の機能制御が新規薬物標的となることを示した。

研究成果の概要（英文）：Bacterial expression and purification of CBR1, CBR3 and AKR1A1 fused with 6xHis cluster was successfully carried out. Kinetic analyses revealed that some extracts from fruit or vegetable strongly inhibit the enzymatic activities of CBR1 with IC₅₀ of approximately 0.03% (v/v). Furthermore, the inhibitory effects were detected in cells. One of food additives, BHA, was found to enhance the transcriptional activity of *CBR1* gene through the activation of transcription factor, Nrf2. Isatin, a substrate of CBR1, was found to exacerbate kidney ischemia/reperfusion injury in rats, suggesting that CBR1 is a novel potential target for pharmacotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：食生活学

科研費の分科・細目：特殊栄養

キーワード：特殊栄養、フラボノイド、薬物治療、相互作用

1. 研究開始当初の背景

Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily に属する Carbonyl reductase 1 (CBR1)は、NADP(H)を補酵素とした単量体還元酵素である。SDR

superfamily の新命名法によると、ヒトでは、CBR1 は SDR21C1 と呼ばれ、SDR superfamily のクラシカルタイプに属する。

本酵素は、多様な基質を還元・不活性化させることにより生理学的な機能を発揮すると考えられている。基質の一つとして、アン

トラスライクリン系抗がん薬があげられる。アントラサイクリン系抗がん薬は、わが国において、ファルモルピシン®（一般名：エピルピシン；ファイザー株式会社）やダウノマイシン®（一般名：ダウノルピシン；明治製薬株式会社）、アドリアシン®（一般名：ドキソルピシン；協和発酵キリン株式会社）イダマイシン®（一般名：イダルピシン；ファイザー株式会社）などが上市されている。これらの薬剤は、添付文書によると、副作用としては高い割合（5%前後）で、心電図上での異常を引き起こす。この心臓機能の異常は、しばしば、抗がん剤治療を中止させるほどに重篤なものであり、時には致死的ですらある。そのため、この心臓への作用は、上述の薬剤を使用する際に最も注意しなければならない重篤な副作用の一つである。

研究開始当初の研究によると、上述した薬剤は CBR1 によって、13 位のケト基がアルコール基へ還元されたアントラサイクリンへ変換される。この代謝産物は抗がん作用が弱く、心臓に蓄積し、筋小胞体に局在し Ca^{++} の uptake に寄与する Ca^{++} -ATPase を阻害することにより、アントラサイクリン系抗がん薬特有の重篤な心毒性を発現し、抗がん剤治療を妨げる。

CBR1 を阻害することにより、副作用誘発性代謝産物を減少させ、抗がん作用を増強させることができると考えられる。CBR1 は、ルチンやケルセチンをはじめとする多くのフラボノイドにより、強力に阻害される (Ki 値: 数 10~0.1 μ M)。ラットにおいて、ルチンがこの心毒性を軽減することが報告されている。また、近年欧米においてアントラサイクリン系抗がん剤の心毒性予防薬として、臨床試験が行われている monoHER は、フラボン骨格を有し、CBR1 を阻害することが最近明らかにされた。これらの主要な機序は、CBR1 の酵素活性阻害であると予想される。つまり、CBR1 の酵素活性やタンパク質量を制御する物質は、アントラサイクリン系抗がん剤による心毒性を軽減させると考えられる。

2. 研究の目的

食品や漢方の中には、フラボノイドなどの多くの生理活性物質が含まれているものがある。これらは、通常、長い歴史における食・利用経験を持ち、比較的マイルドな作用発現を示すことから、新規に開発された薬物よりも安全性が高いと考えられる。これらの食品などを、既存の薬物治療と組み合わせることによって、より有効かつ副作用の少ない薬物療法が開発できると予測される。また、これらを薬物治療へ応用することは、新規薬物の

開発経費などの開発コストや、臨床に即効性を持って応用することができる点などについて、新規薬物を開発することに比べて、大いに有利である。

「研究開始当初の背景」で記述したとおり、CBR1 の酵素活性やタンパク質量を制御することにより、アントラサイクリン系抗がん剤が引き起こす心毒性を軽減させることができると考えられる。研究代表者は、食品中などにこのような活性を有しているものを見出し臨床応用への基盤を確立することを目的とし本研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌による His タグ融合 human CBR1 の大量発現系と精製

pET-28a ベクターの NdeI-EcoRI サイトへ、human CBR1 などの cDNA を in-frame に導入したベクター (pET-hCBR1) を構築した。そのベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysE へ導入し、LB 培地 5 mL にて 37°C 一晚振盪培養した。その後、500 mL の LB 培地へ植え替え、3 時間の培養ののち、IPTG を 0.2 mM となるように加え、さらに 3 時間の培養を行った。集菌後、大腸菌を 20 mM sodium-phosphate buffer に懸濁、超音波破碎し、遠心により可溶性タンパク質溶液を得た。

Ni⁺⁺カラムへアプライ後、elution buffer (50 mM potassium-phosphate, pH 8.0, 300 mM KCl, 250 mM imidazole) で His タグ融合 human CBR1 を溶出した。その後、ゲルろ過カラムにより、20 mM sodium-phosphate buffer へ緩衝液を置換し、終濃度 5 mM となるように DTT を加え実験に供するまで保存した。溶出したタンパク質は、SDS-PAGE 上で予想分子量にシングルバンドとして検出され、anti-CBR1 抗体を用いたウエスタンブロッティングにおいても反応性が見られたことから、His タグ融合 human CBR1 が均一にまで精製されたと判断した。

(2) 酵素活性の測定

本酵素は、NADPH 依存的に基質を還元する。NADPH の減少量を指標に酵素活性を測定した。NADPH は 340 nm に吸収波長をもつため、NADPH が減少すると 340 nm の吸収量が減少する。

100 mM sodium-phosphate buffer, pH6.5, 130 μ M NADPH, 適量の酵素および、基質をよく混和後、25°C において 340 nm の吸収波長を測定した。この値から、Michaelis-Menten 式へ非線形回帰し k_{cat} 値と K_m 値を求めた。

(3) 細胞培養およびルシフェラーゼアッセイ

乳がん由来細胞 MCF-7 細胞と肝がん由来細胞 HepG2 細胞は、10% FCS 含有 DMEM にて 5% CO₂

下で 37°Cにおいて培養を行った。

ルシフェラーゼアッセイは、Luciferase reporter assay system (Promega Co.)により行った。プラスミドの細胞への導入効率を標準化するために、 β -Galactosidase enzyme assay system (Promega Co.)を用いて、ルシフェラーゼ発現ベクターと共導入した β -Galactosidase 発現ベクターの導入効率を求めた。

(4) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Fluorescein 標識した相補なオリゴヌクレオチドを混和後、熱処理し、ゆるやかに冷却することにより、アニーリングさせた。anti-Nrf2 抗体とオリゴヌクレオチドと混和後、HepG2 細胞の粗核抽出液 5 μ g を加え PAGE により、転写因子-オリゴヌクレオチド複合体を分離した。蛍光分析器によりこれらを検出した。

4. 研究成果

(1) CBR1 と同一性の高い新規還元酵素 CBR3 の酵素科学的同定

CBR1 と非常に同一性の高い還元酵素 CBR3 が発見されていたが、その酵素科学的性質や CBR1 との機能的同一性について検討されていなかった。CBR1 の特異的な制御の修飾を目指すためには、同一性の高い CBR3 の酵素科学的同定や機能的同一性・差異性について検討することが必須であった。そのため、CBR3 について酵素化学的性質を検討するとともに、CBR1 との機能的同一性・差異性についても検討した。

Fig. 1 に示した各種キメラ酵素遺伝子を作成し、His タグ融合タンパク質として精製した。それらについてテスト基質である menadione や 4-benzoylpyridine について、酵素科学的解析を行った。

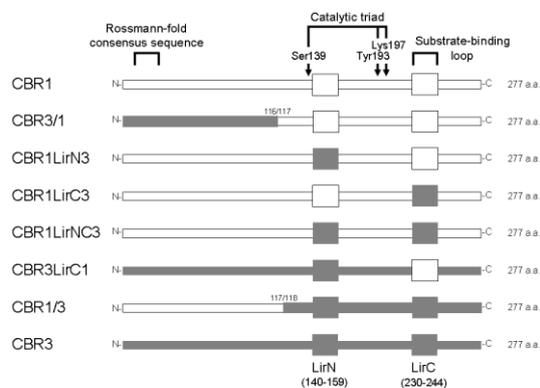


Fig. 1 各種キメラ酵素のアミノ酸配列の模式図

その結果、CBR3 は CBR1 に比べてテスト基質に対する酵素活性が低いことが明らかとなった。さらに、基質結合ループ領域(LirC)に依存して酵素活性が CBR1 型、CBR3 型となることから、基質結合ループ領域がそれぞれのユニークな酵素活性に重要であることを明らかにした (Table 1)。

	menadione			4-benzoylpyridine			NADPH	
	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_m	K_g
CBR1	30	410	14	360	400	1.1	6.2	1.2
CBR3/1	49	110	2.2	400	270	0.68	5.3	0.21
CBR1LirN3	34	41	1.2	380	140	0.37	7.4	5.7
CBR1LirC3	49	0.079	0.0016	470	0.37	0.00079	16	7.1
CBR1LirNC3	42	0.053	0.0013	420	0.20	0.00048	19	7.3
CBR3LirC1	45	59	1.3	450	64	0.14	5.8	0.66
CBR1/3	65	0.88	0.014	360	1.2	0.0033	32	21
CBR3	54	0.32	0.0059	300	0.70	0.0023	26	7.5

Table 1 各種キメラ酵素の酵素科学的性質

以上より、基質結合ループ領域を標的とすることにより、高い同一性を示す CBR1 と CBR3 の酵素活性阻害を選択的に行うことができることが示唆された。また、阻害物質のメカニズムを探索するツールとして、上述の各種キメラ酵素は、有用であると考えられる。

いくつかの果物や野菜抽出液を作成し、human CBR1 への阻害効果を検討したところ、そのうちの複数の抽出液において、 IC_{50} が 0.03% (v/v) という極めて強力な阻害作用を検出した。これらの抽出液は human CBR1 に対して極めて強力な阻害活性を有する物質を含んでいると考えられる。

(2) AKR1A1 の精製と MCF-7 を用いた細胞アッセイ系の確立

本研究を開始した後、Aldo-keto reductase (AKR) family に属する AKR1A1 がアントラサイクリン系抗がん剤であるダウノルビシンの心臓における代謝に関与しているとの報告があった。そこで、AKR1A1 のタンパク質精製系を確立するとともに、CBR1 と AKR1A1 に対する阻害活性を測定する細胞系の構築を行った。

AKR family は、融合するタグのアミノ酸配列長に依存して酵素活性が低下することが知られている。タグを最小限にしつつ、タンパク質精製系を簡便なものにするために、eXact システムを用いた。本システムは eXact 融合タンパク質によりアフィニティー精製し、その後オンカラムにてタグを切断した。Fig. 2 に示したとおり、オンカラム切断は高効率で行われ、精製後のタンパク質は SDS-PAGE 後の CBB 染色で単一のバンドを示したことから、AKR1A1 を均一にまで精製するアフィニティー精製系を確立できた。

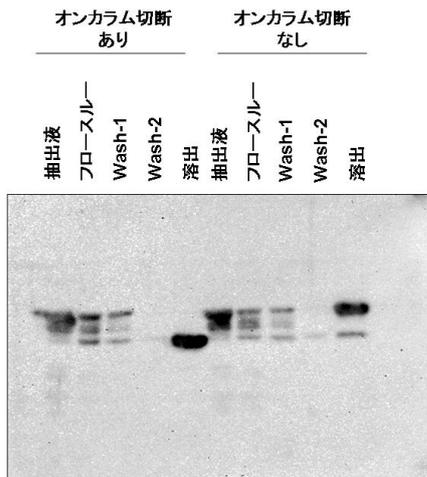


Fig. 2 AKR1A1の精製

さらに、細胞アッセイ系を確立するために、CBR1 と AKR1A1 の安定発現 MCF-7 細胞株を樹立した。それぞれの cDNA を pEB-Hyg ヘクローニングし、それぞれを MCF-7 へ導入後、ヒグロマイシンで選択した。pEB-Hyg は、Episomal 型発現ベクターであるため、薬剤選択後のポリクローナルな細胞集団を安定発現細胞株とした。上記細胞株を樹立後、ウエスタンブロッディングにより発現を確認した。

それぞれの安定発現細胞株に対して、ドキシソルビシンを処理すると、親細胞株 (MCF-7) に比較して有意に細胞死に対する抵抗性を示した。これは、CBR1 と AKR1A1 によってドキシソルビシンが代謝されることにより、ドキシソルビシンによる細胞死誘導に対して抵抗性を獲得したと考えられる。つまり、ドキシソルビシンに対する細胞死の程度を指標に、これらの酵素活性をアッセイする細胞系を確立することができたと考えられる。

(3) CBR1 遺伝子の転写調節機構

CBR1 の転写調節機構の解明のために、-2062 bp までの転写調節領域をルシフェラーゼアッセイに供した。いくつかの食品・薬物由来物質による、CBR1 の転写活性への影響をルシフェラーゼアッセイにより検討したところ、酸化防止剤である BHA (Butylated hydroxyanisole) が CBR1 の転写活性を促進することを見出した。BHA は、転写因子 Nrf2 を活性化させることにより、遺伝子制御を行うことが知られている。そこで、Nrf2 が CBR1 の遺伝子発現制御に関与しているのかを検討した。Nrf2 の DNA 結合配列である ARE (antioxidant-responsive element) は、-2062 bp 中に 3 つ見出された。それらの配列の変異導入によるルシフェラーゼアッセイの結果 (Fig. 3)、転写開始点にもっとも近い

ARE1 が機能的であることが明らかとなった。また、この結果は EMSA によっても支持された。

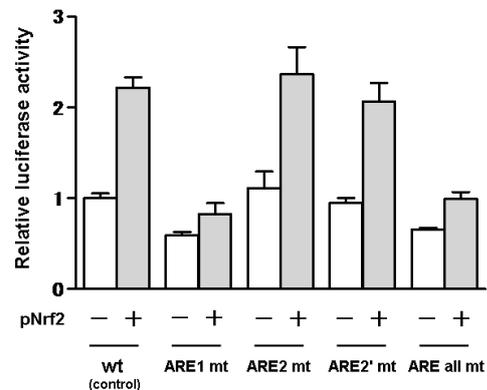


Fig. 3 転写因子 Nrf2 による CBR1 の転写活性化

(4) CBR1 の病態への関与

CBR1 の基質の一つであるイサチンは、生体内に数 μM の濃度で存在し、MAO (Monoamine oxidase) の阻害活性を有する。イサチンの生体内における生理的意義は明らかではない。研究代表者らは、ラット腎虚血再灌流モデルにおいてイサチン投与が腎障害をより悪化させることを見出した。これは生体内イサチンが腎障害に対して悪化させる役割を有していることを示唆している。CBR1 はイサチンを代謝・不活性化させるので、種々の腎障害に対して CBR1 の活性制御が治療標的となりうるかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1, Takeshi Miura, Ayako Taketomi, Toru Nishinaka, Tomoyuki Terada
Regulation of human carbonyl reductase 1 (CBR1, SDR21C1) gene by transcription factor Nrf2.

Chemico-Biological Interactions, 202(1-3): 126-135, 2013 年 2 月発行、査読有

2, Toru Nishinaka, Takeshi Miura, Manami Okumura, Fumika Nakao, Haruka Nakamura, Tomoyuki Terada
Regulation of Aldo-keto reductase AKR1B10 gene expression: involvement of transcription factor Nrf2.

Chemico-Biological Interactions, 191(1-3):

185-191, 2011 年 5 月発行、査読有

3, Tomoyuki Terada, Kei-ichi Okamoto, Junichi Nishikawa, **Takeshi Miura**, Toru Nishinaka, Tsutomu Nishihara
Site-directed mutagenesis of rat thioltransferase: effects of essential cysteine residues for the protection against oxidative stress.
Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology, 24(2): 60-65, 2010 年 2 月発行、査読有

4, **Takeshi Miura**, Toru Nishinaka, Tomoyuki Terada
Importance of the substrate-binding loop region of human monomeric carbonyl reductases in catalysis and coenzyme binding.
Life Sciences, 85(7-8): 303-308, 2009 年 8 月発行、査読有

5, **Takeshi Miura**, Toru Nishinaka, Tomoyuki Terada, Kazuya Yonezawa
Relationship between aging and dosage of warfarin: the current status of warfarin anticoagulation therapy for Japanese outpatients in a department of cardiovascular medicine.
Journal of Cardiology, 53: 355-360, 2009 年 8 月発行、査読有

[学会発表] (計 7 件)

1, 筒居秀伸 **三浦健**ら
シスプラチン誘発性腎障害に対する alpha2 受容体遮断薬の効果について
第 133 回 日本薬学会年会 2013 年発表、横浜

2, Ayako Taketomi, **Takeshi Miura** et al.
Regulation of human carbonyl reductase 1 (CBR1, SDR21C1) gene by transcription factor Nrf2.
16th International workshop on Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 2012 年発表、ドイツ

3, 武富彩子 **三浦健**ら
転写因子 Nrf2 による、ヒト単量体カルボニル還元酵素 1(CBR1)遺伝子の転写制御
第 132 回 日本薬学会年会 2012 年発表、札幌

4, 武富彩子 **三浦健**ら
ヒト単量体カルボニル還元酵素(CBR1)は、転写因子 Nrf2 によって制御される

第 62 回 日本薬学会近畿支部総会・大会
2012 年発表、西宮

5, **三浦健** 筒居秀伸ら
ラット腎虚血再灌流障害に対する内因性モノアミノオキシダーゼ阻害物質イサチンの効果
第 130 回 日本薬学会年会 2010 年発表、岡山

6, Hidenobu Tsutsui, **Takeshi Miura** et al.
The effect of monoamine oxidase inhibitor on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in rats.
第 83 回 日本薬理学会年会 2010 年発表、大阪

7, **Takeshi Miura** et al.
Potential targeting region for the specific inhibition of human monomeric carbonyl reductases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily.
3rd Asian Pacific ISSX Regional Meeting 2009 年発表、タイ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 健 (MIURA TAKESHI)
大阪大谷大学 薬学部 助教
研究者番号: 60434809

(2) 研究協力者

- ① 筒居 秀伸 (TSUTSUI HIDENOBU)
大阪大谷大学 薬学部 助教
研究者番号: 30434806
- ② 武富 彩子 (TAKETOMI AYAKO)
大阪大谷大学 薬学部 学生