

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24年 6月10日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590102

研究課題名(和文) 癌マーカーのアルド-ケト還元酵素を標的とする制癌剤の開発

研究課題名(英文) DEVELOPMENT OF ANTITUMOR DRUGS TARGETING TUMOR MARKER ALDO-KETO REDUCTASES

研究代表者

原 明 (HARA AKIRA)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号:00094334

研究成果の概要（和文）：癌マーカーとして注目される以下の5種のアルド-ケト還元酵素（AKR）の選択的阻害剤を検討した。(1) AKR1C1阻害剤：酵素-阻害剤複合体の結晶構造に基づき特異的で強いサリチル酸誘導体阻害剤を創製し、本酵素の阻害選択性部位も明らかにした。(2) AKR1C3阻害剤：強い阻害剤としてトルフェナム酸、高選択的阻害剤としてバックカリンを見出し、さらに強い阻害を示すバックカリン誘導体を合成した。(3) AKR1C21阻害剤：選択的で強い阻害剤としてコラン酸誘導体を見出した。(4) AKR1B1阻害剤：レトシニンをリードとして選択的阻害剤を創製した。(5) AKR1B10阻害剤：薬物のメフェナム酸や天然物（マンゴスチン、オレアノール酸及びカフェ酸フェネチルエステル）が選択的な阻害剤であった。AKR1B10の阻害選択性決定部位を明らかにし、より特異的かつ強力な阻害能を持つカフェ酸誘導体を設計・合成した。

研究成果の概要（英文）：Five aldo-keto reductases (AKR1C1, AKR1C3, AKR1C21, AKR1B1 and AKR1B10) are regarded as both diagnostic markers and therapeutic targets in the treatment of several types of cancer. We searched inhibitors of the enzymes, investigated selectivity determinants of the inhibitor-binding to the enzymes, and synthesized potent and selective inhibitors. (1) AKR1C1 inhibitor: Potent salicylic acid-based inhibitors were synthesized based on the crystal structure of the enzyme. (2) AKR1C3 inhibitor: Among the inhibitors found, tolfenamic acid and baccharin were the most potent and selective inhibitors, respectively. A baccharin derivative with high inhibitory potency and selectivity was synthesized. (3) AKR1C21 inhibitor: Cholanolic acid and its derivatives were found to be potent inhibitors. (4) AKR1B1 inhibitor: A selective and potent inhibitor was synthesized based on the structure of an alkaloid rhetsinine. (4) AKR1B10 inhibitor: Some drugs (such as mefenamic acid) and natural products (mangostin, oleanolic acid, caffeic acid phenethyl ester) were found to be selective inhibitors. A caffeic acid phenethyl ester derivative with high inhibitory potency and selectivity was synthesized.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学・医薬分子設計

1. 研究開始当初の背景

上記5種の酵素は AKR ファミリーに属し、各酵素について本研究に關係する背景を以下に示す。

(1) AKR1C1 は黄体ホルモンの不活性化及び GABA_A 受容体を正に調節する神経ステロイドの分解に關与する 20 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (HSD) であり、我々は新規妊娠維持薬及び抗不安・精神安定薬の開発を目指して、バーチャルスクリーニングにより 20 α -HSD 阻害剤を探索後、強い阻害剤 (サリチル酸誘導体) を創製、その酵素複合体の結晶解析を行うなど、本酵素阻害剤については先駆的な成果を挙げつつあった。しかし、AKR1C1 と 7 アミノ酸残基が異なる AKR1C2 (3 α -HSD2 型) に対する阻害選択性が問題として残されていた。一方、本酵素は肺癌・乳癌・子宮体癌などの癌細胞で発現上昇し、また抗癌剤耐性への關与も示唆されていた。

(2) AKR1C3 は、男性及び女性ホルモンの合成に働く 17 β -HSD5 型であり、ホルモン依存性の前立腺癌や乳癌で発現上昇し、新しい創薬標的として注目されていた (Penning & Byrns, *Ann. N Y Acad. Sci.* 1155 卷 33-42 頁 2009 年)。しかし、選択的で強い阻害剤は報告されていなかった。

(3) AKR1C21 は、エピテストステロンを生成する 17 α -HSD であり、マウスにおいてディーゼル排ガス成分と多環状芳香族炭化水素による皮膚癌で 17 倍に上昇する癌マーカーであることが報告されていた。本酵素の阻害剤の研究はほとんどない状況で、我々は本酵素の結晶構造を解明、バーチャルスクリーニングにより阻害化合物を見出していた。

(4) AKR1B1 はヒトのアルドース還元酵素であり、その阻害剤は糖尿病合併症治療薬として研究されてきたが、副作用が問題であり、構造類似の AKR1A1 (アルデヒド還元酵素) の阻害がその原因の一つと考えられていた。我々は、阻害剤結合酵素の高次構造比較により、両酵素間の阻害剤に対する選択性決定部位を研究していた。AKR1B1 は、いくつかの癌で発現上昇し、抗癌剤ダウノルビシン耐性への關与が示唆され、その特異的阻害剤は制癌剤開発に繋がる可能性もあった。

(5) AKR1B10 は、AKR1B1 に構造が類似する酵素であるが、様々な臓器の癌化に伴って高発現し、特に肝癌や喫煙者肺癌の有用なマーカーとされている。したがって、糖尿病合併症治療薬として適用される AKR1B1 阻害剤の副作用防止に加えて、新規抗癌剤開発の観点から、AKR1B10 と AKR1B1 それぞれに選択的な阻害剤が望まれる。AKR1B1 より AKR1B10 を選択的に強く阻害するクルクミノイドに關する我々の研究を除き、AKR1B10 特異的阻害剤は報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、癌部位及び癌細胞で発現上昇する癌マーカーとして注目される、5 種のアルド-ケト還元酵素 (AKR1C1、AKR1C3、AKR1C21、AKR1B1、AKR1B10) について、これらの酵素を標的とした新規な制癌剤の開発を最終目的として、各酵素の高次構造に基づき選択的かつ強力な阻害剤を探索・創製し、その制癌作用を癌細胞と担癌動物で検証する。また、これらの阻害剤は、各酵素の発現上昇が原因となる、既存の抗癌剤耐性を抑制することを明らかにする。

3. 研究の方法

各酵素は cDNA から発現・精製したリコンビナント酵素を用い、その活性は、pH 7.4、25 $^{\circ}$ C における補酵素 NADPH の酸化または生成速度により測定した。

阻害化合物のバーチャルスクリーニング (プログラム ICM ver. 3.0)、阻害剤と酵素のドッキングモデル作成 (プログラム Glide ver. 5)、ならびに酵素と阻害剤複合体の結晶化と結晶構造解析は我々の以前の報告にしたがって行った。

阻害化合物の合成は、Manash 大学薬学部及び富山大学工学部の協力により行った。

各酵素を過剰発現させた癌細胞及び血管内皮細胞の作製、ならびに細胞の代謝や生存率の測定は既報に従って行った。

抗癌剤耐性細胞は抗癌剤濃度の段階的上昇により選択調製し、耐性化に伴う各酵素の発現変化は、RT-PCR 及び特異抗体を用いた Western 分析に調べた。

4. 研究成果

(1) AKR1C1 阻害剤：これまでに本酵素の結晶構造を用いたバーチャルスクリーニングによりヒットしたハロゲン化サリチル酸に基づき強い阻害剤 3-bromo-5-phenyl-salicylic acid を合成していた。この阻害剤結合酵素の結晶構造を解析し、これに基づいて比較的特異的で強力で選択的な阻害 ($K_i=0.86$ nM, AKR1C2 に対して 24 倍の選択性) を示すサリチル酸誘導体を創製した (発表論文⑫)。この阻害剤との本酵素結晶構造解析と部位特異的のアミノ酸置換により、AKR1C1 に阻害選択性をもたらすアミノ酸も明らかにしたが、阻害剤結合部位で 1 残基しか異ならない AKR1C2 に対するさらなる阻害選択性の向上は困難であると考えられた (発表論文⑦)。以上の結果と国内外の AKR1C1 阻害剤研究は総説として発表した (発表論文⑧)。この阻害剤は AKR1C1 の細胞内機能研究に有用であり、実際にこの阻害剤を用いて大腸癌細胞のシスプラチン耐性に AKR1C1 が關与することも証明できた (発表論文④)。

(2) AKR1C3 阻害剤:本酵素の強い阻害剤として抗炎症剤の1種トルフェナム酸を見出し、細胞レベルでもその有効性を確認した(発表論文⑨)。しかし、選択性に欠けていたので、抗腫瘍作用が報告されているプロポリス成分を調べた結果、主成分の1つのバックリンが他の構造類似 AKR と対比して AKR1C3 を高選択的に阻害し、細胞レベルでも 0.2 μM から阻害効果を示した。AKR1C3 が乳癌や前立腺癌の進行に関与することが注目されている昨今、伝承的に服用され、安全性の高いプロポリスは、バックリンによるこの阻害作用で乳癌や前立腺癌の予防や予後に効果を示す可能性が示唆された(発表論文③)。バックリンの AKR1C3 へのドッキングモデルに基づき、バックリンより 10 倍強い阻害を示すシンナム酸誘導体を合成し、この阻害をもたらす相互作用も部位特異的アミノ酸置換により明らかにした(論文として発表予定)。この阻害剤は、現在報告されている AKR1C3 阻害剤の最強で最も高選択的なものに匹敵する(図書①)。

(3) AKR1C21 阻害剤:本酵素の結晶構造を用いたバーチャルスクリーニングによりヒットした化合物は本酵素に対する阻害選択性に欠け、後述のようにその2つは AKR1B10 をより強く阻害した。本酵素は 17α -HSD であるが、胆汁酸の 3α -水酸基も効率良く脱水素し、 3α -水酸基がない胆汁酸誘導体 (5β -コラン酸とそのグリシン抱合体) が nM レベルの K_i 値で阻害することが判明した。基質胆汁酸と阻害剤 5β -コラン酸の本酵素結合様式の違いは分子モデリングと部位特異的アミノ酸置換により検討した。これらの結果は、論文として発表予定である。また、他の阻害化合物を検討した結果、4-ヒドロキシシンナム酸 2'-ヒドロキシフェネチルエステルが強い阻害剤 ($K_i=9$ nM) であることも見出したので、この化合物をリードにして選択的阻害剤の創製が可能となった。

(4) AKR1B1 阻害剤: AKR1B1 阻害剤の副作用の一因がアルデヒド還元酵素であるので、両酵素の阻害剤選択性決定部位の違いに関する総説を発表した(図書②)。最近、AKR1B1 と構造類似な AKR1B10 も AKR1B1 阻害剤開発には考慮すべきとされてきた。実際、これまでの AKR1B1 阻害剤の多くが AKR1B10 を阻害した(発表論文⑬)。そこで、アルデヒド還元酵素と AKR1B10 を阻害しない新規な AKR1B1 選択的阻害剤の創製を企図して、従来弱い AKR1B1 阻害作用があることが知られていたアルカロイドのレトシニンの構造を基本にして、種々の構造類縁体を合成した結果、アルデヒド還元酵素と AKR1B10 に比べて 250 倍選択的で強い阻害化合物が得られた(発表論文⑤)。

(5) AKR1B10 阻害剤: 発癌リスク低減作用が示唆されている非ステロイド性抗炎症薬の AKR1B10 の阻害を構造類似酵素の AKR1B1 阻害と対比して検討した結果、トルフェナム酸を除く *N*-フェニルアントラニル酸系薬物が約 50 倍選択的に AKR1B10 を μM オーダーで阻害することを見出し、メフェナム酸の本酵素へのドッキングモデル作成や部位特異的アミノ酸置換法によりその選択性をもたらす構造要因を示唆した(発表論文⑬)。抗癌作用が報告されている植物成分について、AKR1B1 阻害と対比して AKR1B10 阻害効果を検討した結果、キサントンでは γ -マンゴスチン(発表論文②)、トリテルペノイドではオレアノール酸(発表論文⑪)が本酵素に選択的な拮抗阻害剤であることを見出した。このうち、オレアノール酸は、国内外で報告の中で最も高い AKR1B10 阻害選択性を示し、細胞レベルにおいても 1 μM の濃度から AKR1B10 を阻害し、マイトマイシン C 耐性大腸癌 HT29 癌細胞やシスプラチン耐性肺癌 A549 細胞の増殖も抑制した。また、プロポリス成分のカフェ酸フェネチルエステル比較的選択的で強い AKR1B10 であることを見出し、この成分をリードとして現時点で最強で、オレアノール酸に匹敵する選択性を有する誘導体を合成した(発表論文①)。さらに、2種のジフェニル化合物(AKR1C21 バーチャルスクリーニングによりヒットした化合物)が AKR1B10 を nM レベルの K_i 値で阻害し、両化合物との複合体の本酵素結晶構造が解明できた(論文として発表予定)。現在、この高次構造に基づき、より高選択性の阻害誘導体の合成を進めている。これらの阻害剤と AKR1B10 との結合モデルと結晶構造及び部位特異的アミノ酸置換により、AKR1B1 と異なる5残基(Gln114、Lys125、Val301、Gln303 及び Ser304)で形成される領域が AKR1B10 に対する阻害選択性決定部位であることが明らかになった。

以上の知見は、これらの薬物、植物成分による抗癌作用の一機序に AKR1B10 阻害が含まれることを示唆するとともに、今後の AKR1B10 を標的とする抗癌剤の開発に寄与するものと考えられる。

なお、上記の AKR1C1, AKR1C3 及び AKR1B10 の合成阻害剤の *in vivo* における作用は、副作用も含めて、担癌動物で検証中である。また、本研究の過程で、5種の酵素のうち AKR1C3 と AKR1B10 はイソプレノイドを代謝して低分子量 G タンパクのプレニル化を促進することにより癌細胞増殖に関与する新機序も見出し(発表論文⑥、⑨)、この機序を支持する報告も他の研究者によって発表されている(図書①)。

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 13 件)

- ① Soda M, Hu D, Endo S, 他 11 名中 10 番目. Design, synthesis and evaluation of caffeic acid phenethyl ester-based inhibitors targeting a selectivity pocket in the active site of human aldo-keto reductase 1B10. *Eur. J. Med. Chem.* 査読有、Vol 48、2012、pp. 321-329, DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.12.034.
 - ② Soda M, Endo S, 他 6 名中 6 番目. Inhibition of human aldose reductase-like protein (AKR1B10) by α - and γ -mangostins, major components of pericarps of mangosteen. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有、Vol 35、2012、pp. 2075-2080. Doi:10.1248/bpb.b12-00538
 - ③ Endo S, Matsunaga T, 他 8 名中 8 番目. Selective inhibition of human type-5 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) by baccharin, a component of Brazilian propolis. *J. Nat. Prod.* 査読有、Vol 75、2012、pp. 716-721. Doi: 10.1021/np201002x.
 - ④ Matsunaga T, Hojo A, Yamane Y, Endo S, El-Kabbani O, Hara A. Pathophysiological roles of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) in development of cisplatin resistance in human colon cancers. *Chem. Biol. Interact.* 査読有、Vol 202、2012、pp. 234-242. Doi: 10.1016/j.cbi.2012.09.024.
 - ⑤ Minehira D, Takeda D, 他 14 名中 10 番目. Design, synthesis, and biological evaluation of novel (1-thioxo-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-9-yl)acetic acids as selective inhibitors for AKR1B1. *Bioorg. Med. Chem.* 査読有、Vol 20、2012、pp. 356-367. Doi: 10.1016/j.bmc.2011.10.073
 - ⑥ Matsunaga T, Wada Y, Endo S, Soda M, El-Kabbani O, Hara A. Aldo-keto reductase 1B10 and its role in proliferation capacity of drug-resistant cancers. *Front. Pharmacol.* 査読有、Vol 3、2012、p 5 (総ページ数 11). Doi: 10.3389/fphar.2012.00005
 - ⑦ El-Kabbani O, Dhagat U, Soda M, Endo S, Matsunaga T, Hara A. Probing the inhibitor selectivity pocket of human 20α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) with X-ray crystallography and site-directed mutagenesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有、Vol 21、2011、pp. 2564-2567. Doi: 10.1016/j.bmcl.2011.01.076
 - ⑧ El-Kabbani O, Dhagat U, Hara A. Inhibitors of human 20α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 査読有、Vol 125、2011、pp. 105-111. Doi: 10.1016/j.jsmb.2010.10.006
 - ⑨ Endo S, Matsunaga T, 他 8 名中 8 番目. Roles of rat and human aldo-keto reductases in metabolism of farnesol and geranylgeraniol. *Chem. Biol. Interact.* 査読有、Vol 191、2011、pp. 261-268. Doi: 10.1016/j.cbi.2010.12.017
 - ⑩ Matsunaga T, Yamane Y, 他 5 名中 5 番目. Involvement of the aldo-keto reductase, AKR1B10, in mitomycin-c resistance through reactive oxygen species-dependent mechanisms. *Anticancer Drugs.* 査読有、Vol 22、2011、pp. 402-408. Doi: 10.1097/CAD.0b013e3283448df0.
 - ⑪ Takemura M, Endo S, 他 7 名中 7 番目. Selective inhibition of the tumor marker aldo-keto reductase family member 1B10 by oleanolic acid. *J. Nat. Prod.* 査読有、Vol 74、2011、pp. 1201-1206. Doi: 10.1021/np200118q.
 - ⑫ El-Kabbani O, Scammells PJ, 他 6 名中 6 番目. Structure-based optimization and biological evaluation of human 20α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) salicylic acid-based inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 査読有、Vol 45、2010、pp. 5309-5317. Doi: 10.1016/j.ejmech.2010.08.052
 - ⑬ Endo S, Matsunaga T, 他 5 名中 5 番目. Selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by antiinflammatory N-phenylanthranilic acids and glycyrrhetic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有、Vol 33、2010、pp. 886-890. Doi: 10.1248/bpb.33.886
- [学会発表] (計 4 件)
- ① 高橋 潤子, 他 4 名. 3(17) α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 (AKR1C21) の胆汁酸及び非ステロイド化合物に対する基質特異性. 第 76 回日本生化学会中部支部例会、2012 年 5 月 25 日、岡崎.
 - ② 大辻 陽子, 他 5 名. プロポリス成分 baccharin による前立腺・乳癌治療の創薬標的 AKR1C3 の選択的阻害. 第 76 回生化学会中部支部例会、2012 年 5 月 25 日 岡崎.
 - ③ 金森 綾野, 他 4 名. アルドケト還元酵素 AKR1C3 の脂肪族アルデヒドに対する

特異性と選択的阻害剤. 第84回日本生化学会大会、2011年9月4日、京都.

- ④ 竹村麻祐子、他7名. Oleanolic acid is a potent and selective inhibitor of the tumor marker AKR1B10、第83回日本生化学会大会、2010年12月8日、神戸.

[図書] (計2件)

- ① Matsunaga T, El-Kabbani O, Hara A, Springer, Aldo-keto reductases as new therapeutic targets for colon cancer chemoresistance. Molecular Mechanisms of Tumor Cell Chemotherapy, 2013, pp. 109-134.
- ② Carbone V, Hara A, El-Kabbani O. RESEARCH SIGNPOST Publisher, Aldehyde reductase structures complexed with aldose reductase inhibitors: Implications for inhibitor selectivity. Advances in Molecular Mechanisms and Pharmacology of Diabetic Complications, 2010, pp. 247-261.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0件)
○取得状況 (計 0件)

[その他]

該当するもの無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 明 (HARA AKIRA)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00094334

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

遠藤 智史 (ENDO SATOSHI)
岐阜薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：60433207

(3) 研究協力者

豊岡 尚樹 (TOYOOKA NAOKI)
富山大学・工学部・教授

加藤 敦 (KATO ATSUSHI)
富山大学・医学部・准教授

EL-KABBANI, OSSAMA
Monash 大学・薬学部・准教授

松永 俊之 (MATSUNAGA TOSHIYUKI)
岐阜薬科大学・薬学部・准教授