

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460149

研究課題名(和文) 癌細胞の生存戦略破綻を作用点とする抗癌剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel anticancer agents targeting survival strategy of cancer cells

研究代表者

遠藤 智史 (Endo, Satoshi)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60433207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、酸化ストレス防御機構の中核を担うNrf2誘導性のaldo-keto reductase (AKR) の機能を制御する新規阻害剤の探索研究を実施し、現時点で最も理想的なAKR1B10阻害剤の創製に成功した。本化合物は抗癌活性に加えて、抗癌剤耐性細胞株の抗癌剤感受性に対する回復効果を示したため、耐性克服を可能にする画期的アジュバント薬になると期待される。また、AKRが神経細胞において酸化ストレスに対して保護的に作用することに加えて、筋萎縮性側索硬化症患者のエキソーム解析から細胞レベルでの不活性変異体を見出し、その不活性化機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for novel inhibitors of Nrf2-inducible aldo-keto reductase (AKR), which is the core of oxidative stress defense mechanisms, and succeeded in development of the potent and selective AKR1B10 inhibitors at the present time. Since the AKR1B10 inhibitors exhibit both inhibitory effects on proliferation in lung cancer cells and overcoming resistance to chemotherapy in anticancer drug-resistant cells, they are expected to become adjuvant anticancer drugs enabling to overcome tolerance. Furthermore, we found inactive mutants of AKR which protects nerve cells against oxidative stress and elucidated the mechanism of the inactivation.

研究分野：創薬科学

キーワード：アルドケト還元酵素 抗癌剤 SNP

## 1. 研究開始当初の背景

炎症、放射線、紫外線、喫煙などによる慢性的な酸化ストレスの暴露は、発癌と密接に関係している。癌細胞は自身が発生する原因となった酸化ストレス環境に適応するため、細胞が備え持つ防御機能を流用し、さらなる増殖・転移能や抗癌剤耐性を獲得することで、自ら生存しやすい環境を作り上げている。このような癌の生存戦略の一つに Nrf2 シグナルがある。癌細胞は Nrf2 シグナルを活性化 (変異、発現レベル上昇など) させることで、酸化ストレスから細胞を防御する。従って、癌の生存戦略を破綻させる薬剤は、新規抗癌剤、もしくは既存の抗癌剤の作用を増強させる抗癌剤併用薬になりえると考えられる。しかし、生体防御機構として重要である Nrf2 を直接標的とする薬剤は、副作用の観点からも開発が難しいと思われる。そこで、本研究では、Nrf2 下流に位置し、癌の生存戦略に直接関わる AKR を制御ターゲットとして活用することに着目した。

AKR は、正常細胞での発現レベルが低いが、癌化に伴い発現亢進する。そのため、AKR 阻害剤の正常細胞へ与える影響 (副作用) は小さいことが予想される。また、右図の機序の他にもレチノイド、イソプレノイドの還元代謝を介して癌細胞増殖に関与し、AKR の発現抑制は癌細胞増殖を抑制する。そのため、AKR 阻害剤は癌細胞の生存戦略破綻を作用点とする抗癌剤になりえると考えられる。

これまでに申請者らは、AKR の癌制御ターゲットとしての有用性にいち早く着目し、強力な AKR 阻害剤を複数見出してきた。その中でも強力な阻害化合物 (阻害定数  $K_i = 2.7$  nM) は、培養癌細胞に対して有意な増殖抑制効果を示し、さらには既存の抗癌剤に対して耐性を獲得した癌細胞に対する抗癌剤感受性を有意に増強させた。これらの結果は、申請者が開発した AKR 阻害剤の有望性を既に示唆しており、本課題における細胞レベル、*in vivo* レベルでの試験を通して、AKR 阻害剤の実用化を目指すとともに、癌における AKR の役割を明示できると考える。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床応用可能な抗癌剤、既存の抗癌剤の作用を増強する抗癌剤併用薬の開発である。

今日の医学の発展に伴い、有効な抗癌剤が増えているが、長期投与による薬剤耐性化や一塩基多型 (SNP) による薬剤抵抗性などの原因もあり、がんの根治は未だ難しいのが現状である。また、新たに市場導入されている抗癌剤の大多数は高額な抗体医薬品であり、経済的理由により治療中断する例も少なくない。そのため、患者の生活の質 (QOL) の向上のためには、新たな抗癌剤の開発に加えて、既存の抗癌剤を効果的かつ長期的に利用できる方法の確立が重要である。

本研究では、抗癌剤の作用低下や耐性化の

原因となる、「癌細胞の生存戦略」に関わる還元酵素に着目し、その阻害剤を開発することで、目的の達成を目指す。目的を達成するためには、既知の AKR 阻害剤の構造上の問題、AKR の生物種差の問題、AKR の一塩基多型 (SNP) の問題の 3 つの課題を解決する必要がある。

## 3. 研究の方法

これまでに得られた AKR1B10 阻害活性を有するクロメン誘導体の構造活性相関を基に阻害選択性を向上させる分子設計を行い、誘導体を合成した。さらに構造最適化を行うため、Glide を用いて、得られた化合物と AKR1B10 結晶構造とのドッキングモデルを構築した。AKR1B10 阻害剤の肺癌細胞に対する増殖抑制作用や抗癌剤感受性に及ぼす影響については WST-1 を用いた生細胞数測定、遊走能や浸潤能に対する抑制作用については創傷治癒アッセイ、ポイデンチャンパー法を用いた。また、SNP の解析では、AKR1C3 野生型 (WT) と Cys154Tyr 変異体 (C154Y)、Lys159Val 変異体 (L159V) を大腸菌の系で発現・精製し、タンパク質安定性は酵素活性測定に加えて、示差走査蛍光定量法 (DSF) 分析、円偏光二色性 (CD) 分析および 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate (ANS) 蛍光分析によって評価した。

## 4. 研究成果

### (1) AKR の特異的阻害剤の創製

これまでに見出してきた AKR1B10 阻害剤の構造情報と阻害強度及び阻害選択性の情報を基に、新たな誘導体を設計、評価した。具体的には、これまでで最も強力な AKR1B10 阻害活性を示すが、構造類似酵素である AKR1B1 に対する選択性が低いクロメン誘導体の構造をベースとし、阻害活性と阻害活性は共に高いが、細胞内安定性に問題があるカフェ酸エステル誘導体の構造的特徴をハイブリッドさせることで、新規誘導体 12 種を合成した。これら誘導体はいずれも AKR1B10 に対する  $IC_{50}$  値が 12 nM 以下の強力な阻害剤であり、これらの中で最も強力な阻害剤は過去に報告した最も強力な阻害剤 KO79 よりも強力であった。また、これまでのクロメン誘導体では AKR1B1 に対して 5 倍程度の選択性しか得られなかったが、今回合成した誘導体はすべて 20 倍以上の選択性を示し、最も強力な阻害活性を示した化合物の選択性は約 80 倍であり、現時点で最も理想的な AKR1B10 阻害剤であると考えられた。本化合物の強力かつ選択的な AKR1B10 阻害活性の構造的要因を明らかにするために最も強い阻害活性を示した化合物の酵素補酵素複合体への分子モデリングを行った。構造活性相関から必須であることが示唆されていたクロメン環 7 位の水酸基は AKR1B10 の触媒残基である His111 と水素結合可能な位置にあり、この相互作用は過去

に報告した強力な AKR1B10 阻害剤でみられたものと同じであった。また、もう一つの水酸基は選択性に重要であることが知られる Lys125 に隣接する Pro124 の主鎖カルボニル基と水素結合することが予想された。

また、本化合物はその他の AKR 酵素 (AKR1C1-4) に対しても高い選択性を示した。さらに、本化合物の細胞レベルでの有用性を評価したところ、AKR1B10 による細胞内代謝を有意に阻害し、創傷治癒アッセイや増殖試験によって肺癌 A549 細胞の遊走能や増殖能に対しても阻害効果を示すことを明らかにした。さらに、本化合物のさらなる有用性を提示するために、肺癌治療に用いられるシスプラチン (CDDP) に耐性をもつ肺癌細胞株を樹立した。本化合物は CDDP 耐性肺癌細胞の CDDP 感受性を有意に回復させた。また、親細胞株は増殖しないが、耐性細胞では細胞増殖する低濃度の CDDP 添加時において、本化合物は耐性細胞の細胞増殖を抑制したことから、CDDP 耐性に対して克服効果を示すことも明らかとなった。

In vivo での AKR1B10 阻害剤の有効性を腫瘍尾静脈投与による肺転移モデルを用いて評価した。Vehicle のみで 48 時間刺激したルシフェラーゼ発現 A549 (A549-Luc2) 細胞を注入した群での肺転移形成を比べて、AKR1B10 阻害剤で 24 時間刺激した A549-Luc2 細胞を投与した群では顕著に肺転移形成は抑制された。

## (2) AKR の一塩基多型 (SNP)

家族性筋萎縮性側索硬化症患者の whole exome sequencing によりこれまでに ExAC データベースに登録されていない AKR1C3 の新たな遺伝子変異 C154Y、L159V を見出した。C154 および L159 は本酵素の活性部位ポケットではなく、 $\alpha$ -ヘリックス上に位置する。そのため、酵素活性ではなく、構造安定性に影響を与えることが予想された。そこで、これら変異を導入したりコンビナント酵素を調製し、安定性に及ぼす影響を検討した。C154Y 変異体は尿素や塩酸グアニジンのような変性剤や熱に対して WT や L159V 変異体よりも有意に高い感受性を示し、37、30 分のインキュベーションで酵素活性は 90% 低下した。熱処理による C154Y の失活はグリセロール、補酵素 NADPH や拮抗阻害剤の添加で抑制され、DSF 分析からこれらの添加剤が C154Y との物理的な相互作用を介して、構造安定性を向上させたことが明らかとなった。さらに Cys154 をフェニルアラニンとセリンにそれぞれ置換した変異体 C154F と C154S を調製したところ、C154F のみで C154Y と同程度の失活が認められた。円偏光二色性分析と ANS 蛍光分析から Cys154 の嵩高い芳香族アミノ酸への置換が  $\alpha$ -ヘリックスの崩壊に伴い全体的な二次構造変化をもたらしたと推測された。また、C154Y 変異が与える影響について細胞レベルで検討した。

AKR1C3 は酸化ストレス時に生成される 4-oxo-2-nonenal (ONE) などの毒性アルデヒドを解毒代謝する。AKR1C3 WT の HEK293 細胞での過剰発現は ONE 毒性を有意に軽減したが、C154Y の過剰発現は ONE 毒性に対して防御効果を示さなかった。従って、C154Y 変異体は細胞レベルで不活性変異体であることが示唆された。

## 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)

Hara, A., Endo, S., Matsunaga, T., El-Kabbani, O., Miura, T., Nishinaka T. and Terada, T., Fatty Acids and CoA Derivatives as Inhibitors of Human Carbonyl Reductase 1, **Biochem. Pharmacol.**, 査読有、in press

doi: 10.1016/j.bcp.2017.04.023.

Endo, S., Takada, S., Honda, R.P., Müller, K., Weishaupt, J.H., Andersend, P.M., Ludolph, A.C., Kamatari, Y.O., Matsunaga, T., Kuwata, K., El-Kabbani, O. and Ikari, A., Instability of C154Y variant of aldo-keto reductase 1C3, **Chem. Biol. Interact.**, 査読有、in press

doi: 10.1016/j.cbi.2016.12.018.

Endo, S., Noda, M., Ikari, A., El-Kabbani, O., Hara A. and Matsunaga T., Characterization of hamster NAD<sup>+</sup>-dependent 3(17) $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase belonging to the aldo-keto reductase 1C subfamily. **J. Biochem.**, 査読有、158, 425-434. (2015)

doi: 10.1093/jb/mvv057.

Hu, D., Miyagi, N., Arai, Y., Oguri, H., Miura, T., Nishinaka, T., Terada, T., Gouda, H., El-Kabbani, O., Xia, S., Toyooka, N., Hara, A., Matsunaga, T., Ikari, A. and Endo, S., Synthesis of 8-hydroxy-2-iminochromene derivatives as selective and potent inhibitors of human carbonyl reductase 1. **Org. Biomol. Chem.**, 査読有、13, 7487-7499. (2015)

doi: 10.1039/c5ob00847f.

Arai, Y., Endo, S., Miyagi, N., Abe, N., Miura, T., Nishinaka, T., Terada, T., Oyama, M., Goda, H., El-Kabbani, O., Hara, A., Matsunaga, T. and Ikari, A., Structure-activity relationships of flavonoids for carbonyl reductase 1 (CBR1) inhibition, **Fitoterapia**, 査読有、

101, 51-56. (2015)  
doi: 10.1016/j.fitote.2014.12.010.

〔学会発表〕(計 7 件)

遠藤 智史、耐性克服効果を併せ持つ新規抗がん剤開発を指向した選択的 AKR1B10 阻害剤の創製、第 6 回 岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム (岐阜)、2017.03.14

Satoshi Endo, Sayaka Takada, Ryo Honda, Kathrin Müller, Yuji O. Kamatari, Toshiyuki Matsunaga, Kazuo Kuwata, Jochen Weishaupt, Akira Ikari、Instability of C154Y variant of aldo-keto reductase 1C3 found in familial amyotrophic lateral sclerosis, 18th International Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism (Costa Brava, Spain)、2016.07.12-17

遠藤 智史、高田 明香、本田 諒、Kathrin Müller、鎌足 雄司、松永 俊之、桑田 一夫、Jochen Weishaupt、五十里 彰、家族性筋萎縮性側索硬化症患者から見出されたアルドケト還元酵素 1C3 の新規遺伝子変異の性状解析、第 62 回 日本薬学会東海支部大会 (名古屋)、2016.07.09

遠藤 智史、Aldo-keto reductases as targets for drug development、第 30 回 日本薬物動態学会年会 (東京)、2015.11.13

遠藤 智史、アンドロゲン合成酵素を標的とした去勢抵抗性前立腺癌治療薬の創製研究、第 4 回 岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム (岐阜)、2015.03.05

遠藤 智史、胡 大イ、松永 俊之、大辻 陽子、Ossama EI-Kabbani、Mahmoud Kandeel、五十里 彰、原 明、北出 幸夫、豊岡 尚樹、Aldo-keto reductase1C3(AKR1C3) 選択的阻害活性を有する baccharin 非プレニル誘導体の合成、第 32 回メディスナルシンポジウム (神戸) 2014.11.26-28  
陶山 美穂、遠藤 智史、松永 俊之、五十里 彰、胡 大イ、豊岡 尚樹、AKR1B10 を標的とする抗癌剤開発を指向した構造活性相関研究、78 回日本生化学会中部支部例会 (名古屋)、2014.05.24

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : AKR1B10 阻害に基づく肺癌治療薬  
発明者 : 遠藤 智史、豊岡 尚樹、早川 芳弘、松永 俊之、五十里 彰

権利者 : 岐阜市、富山大学  
種類 : 特願  
番号 : 2016-159316  
出願年月日 : 2016.08.15  
国内外の別 : 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/seika/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

(3)連携研究者

豊岡 直樹 (TOYOOKA, Naoki)  
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授  
研究者番号 : 10217565

合田 浩明 (GODA, Hiroaki)  
昭和大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 60276160

田中 信忠 (TANAKA, Nobutada)  
昭和大学・薬学部・准教授  
研究者番号 : 00286866

桑田 一夫 (KUWATA, Kazuo)  
岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究科・教授  
研究者番号 : 00170142