

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 4 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790245

研究課題名（和文） プレノイド代謝酵素を標的とする制癌薬の開発

研究課題名（英文） Development of antitumor agents targeting for prenyl-metabolizing enzymes

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

研究成果の概要（和文）：

癌細胞の異常増殖や転移の原因の一つにプレニル化された G タンパクの増加が挙げられる。今回、我々はプレノイドの新規代謝経路及びその経路を触媒するプレニルアルデヒド還元酵素を見出した。本酵素は様々な癌で高発現することが知られており、癌細胞増殖との関連性も示唆されている。また、3 種のプレニルアルデヒド還元酵素の阻害剤の創製研究を行い、3 種の酵素全てについて強力かつ高い選択性を示す阻害剤の開発に成功した。またこれら阻害剤によるプレニルアルデヒド還元酵素の阻害は癌細胞の増殖を有意に抑制した。以上のことから、プレニルアルデヒド還元酵素は癌細胞特異的に作用する新規癌標的分子であり、その選択的阻害剤は新規制癌薬として期待される。

研究成果の概要（英文）：

Increment of prenylated small G proteins is a possible cause of abnormal growth and metastasis of carcinomas. Here, we found a novel metabolic pathway of prenylmetabolizing enzymes and identified three human prenyl aldehyde reductases as enzymes that involve the pathway. The enzymes highly express in a variety of carcinomas and have been suggested to be promoted to cancer cell proliferation. We succeeded development of the inhibitors that show potent and selective inhibitory effect against each enzymes by structure-based drug design. Moreover, the inhibitors significantly suppressed proliferation of cancer cells. Therefore, prenyl aldehyde reductases are novel tumor-targeting molecules and their selective inhibitors are expected to be novel anticancer drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：酵素

1. 研究開始当初の背景

低分子量 G タンパクを含む細胞内タンパクの約 2% が geranylgeraniol (GGOH) と farnesol (FOH)によりプレニル化され、プレニル化は細胞分化・増殖、並びに細胞骨格形成のシグナリングに重要なステップの一つである。癌細胞では、プレニル化された G タンパクの増加がその異常増殖や転移をもたらす要因と考えられている。実際、このプレニル化を直接触媒するトランスフェラーゼの阻害剤は、すでに前臨床段階で制癌効果が認められている。しかし、治験段階では副作用に加え、FOH と GGOH を転移する 2 種類のトランスフェラーゼやアイソザイムの存在による制癌効果不良も指摘され、また癌細胞におけるこれらトランスフェラーゼの発現が変動しないこともこの制癌剤開発の問題点とされている。

これまでにラットを用いた代謝検討から、FOH と GGOH の代謝及び関与酵素を明らかにし、ラットのアルデヒド体 (FAL と GGAL) の還元酵素に対応するヒトの酵素が 20⁻-HSD、17⁻-HSD5 型および AKR1B10 であることを見出してきた。これら酵素は、癌の種類によって異なるが、ヒトの癌細胞で発現増強する癌マーカーであることが最近認識され、新しい創薬標的として注目されてきた。20⁻-HSD は、黄体ホルモンの不活性化および神経ステロイドの分解に関与する。応募者は、新規妊娠維持薬および抗不安・精神安定薬の開発を目指して、阻害定数 9 nM の強力な 20⁻-HSD 阻害剤の候補化合物を見出し、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る。17⁻-HSD5 型は白血病や前立腺癌の進展に関与し、その阻害剤研究は世界的に激化している。癌化に伴って上昇するアルドース還元酵素類似酵素として同定された AKR1B10 は、最近、ビタミン A アルデヒドを還元することやその高次構造が報告されたばかりで、その阻害剤研究は少ない。また、癌細胞でこれらの 3 種の酵素が発現上昇する機作および癌細胞増殖における各酵素の役割は依然未解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、3 種のプレニルアルデヒド還元酵素 (20⁻-HSD, 17⁻-HSD および AKR1B10) が、プレニル化の促進により癌細胞の増殖と転移・浸潤に関与することを実証し、各酵素の高次構造に基づく特異的阻害剤と遺伝子発現調節物質を探索、創製することである。

3. 研究の方法

H21 年度

(1) 代謝酵素の分離・分析

ラットの代謝酵素の同定と組織分布：「GGOH と FOH アルデヒド体 カルボン酸」及び「アルデヒド体 GGOH と FOH」の各代謝段階に関与する酵素について、胃、肺、肝及び大腸から分離精製（可溶性酵素はクロマトグラフィー分離分析、膜結合酵素は可溶化精製）し、その性質分析を行った。予測される酵素のリコンビナント酵素を調製し、性状解析し、組織の酵素と性質が一致することを確認した。

ヒトの酵素の同定及びヒト培養細胞における分布：ラットの「アルデヒド体を GGOH と FOH に還元する酵素」に相当するヒトの 20⁻-HSD、17⁻-HSD5 型、AKR1B10 とともに、それぞれに相同性の高い酵素のリコンビナント酵素も調製し、アルデヒド体に対する反応速度定数を測定比較した。RT-PCR 法および特異抗体を用いた Western blot 法により、肺、乳腺、肝、胃、大腸及び前立腺癌由来の培養細胞を分析し、各酵素の発現量を検討した。

(2) 培養細胞を用いた代謝・増殖解析

各酵素の発現が少ない細胞に 20⁻-HSD、17⁻-HSD5 型、AKR1B10 それぞれの cDNA を導入することにより過剰発現細胞を作製した。これらの細胞および各酵素阻害剤添加時における [1-¹⁴C] FOH の代謝を分析比較した。正常細胞、過剰発現および発現抑制細胞に低濃度の GGOH と FOH を添加し、各増殖能を測定比較した。

(3) ステロイドとプレノイドの代謝相互作用の解析

上記 3 種の酵素の GGOH と FOH のアルデヒド還元活性に対するステロイドとその代謝物の影響を調べ、20⁻-HSD と 17⁻-HSD5 型についてはケトステロイド還元活性に対するプレノイド (GGOH、FOH その代謝物) の影響を調べた。また、前項 (2) の細胞における GGOH と FOH 代謝ならびにステロイド代謝 (LC/MS 測定) に及ぼす影響も検討した。AKR1B10 に対して強力な阻害効果を示したステロイドについては、阻害様式の解析、その結合酵素モデルの作成により、阻害機構および結合部位を明らかにした。

H22 年度以降

(1) 阻害剤の探索

20⁻-HSD の阻害剤

すでに見出したリード化合物 (3,5-dichlorosalicylic acid) とその結合複合体の結晶構造から、本酵素の結合部位内の疎水性スペースにより相互作用しやすい

と推定される 3,5-位の塩素の芳香環あるいはシクロヘキサン環で置換した化合物を合成した。本酵素、その結合部位アミノ酸の変異酵素、ならびに本酵素と構造類縁の HSD やアルドケト還元酵素 (5 種) を用いて、合成化合物の阻害度および速度論的阻害機構を調べ、阻害剤としての効果と特異性を比較した。また、前年度確立した培養細胞の評価系を用いて FOH の代謝、および癌細胞の増殖に対する影響を解析し、最も強い阻害化合物を決定した。

17 β -HSD5 型の阻害剤

化合物データベースから、毒性・溶解性・細胞内移行性・既知阻害剤の化学特性などを考慮してデータマイニング後、モデリングプログラム (ICM) を用いて、本酵素の活性部位に配位結合すると予測される化合物を選択した。それらによる各酵素の阻害度を測定した後、強力な阻害剤は得ることができなかった。そのため、これまでに抗腫瘍効果が報告されている化合物について、本酵素活性阻害により抗腫瘍効果を発揮するという仮定のもと阻害効果を検討した。高い阻害効果を示した化合物については、同様に培養細胞を用いて癌細胞増殖に及ぼす影響を検討した。

AKR1B10 の阻害剤

と同様に抗腫瘍効果が報告されている化合物の中から、本酵素阻害効果を示す化合物を探索し、得られた強力な阻害剤については細胞レベルでの効果を検討するとともに、分子ドッキングを用いて阻害剤結合様式を明らかにし、高次構造に基づいた分子設計によりより強力かつ選択的な誘導体を創製した。

(2) 遺伝子発現調節物質の探索

培養細胞における、20 α -HSD、17 β -HSD5 型、AKR1B10 の mRNA 発現の促進または抑制する化合物 (既存の薬物や既知化合物) を RT-PCR 法により探索した。

4 . 研究成果

(1) 代謝酵素の分離・分析

ラットの組織、リコンビナント酵素及び細胞を用いて、以下の 3 つの代謝経路における主酵素を検討した。その結果、「 Farnesol (FOH) と geranylgeraniol (GGOH) からアルデヒド体への脱水素」にアルコール脱水素酵素 (ADH) が関与し、肝では ADH1、胃では ADH7 の関与が示唆された。また、「 アルデヒド体から FOH と GGOH への還元」と「 アルデヒド体からカルボン酸体への酸化」にアルドケト還元酵素 (AKR) 1C15 とミクロソーム局在型アルデヒド脱水素酵素 3A2 がそれぞれ関与することが示唆された。さらにヒトにおいては、アルデヒド体の還元代謝に、20

-HSD、17 β -HSD5 型、AKR1B10 が関与することが示唆された。

(2) ステロイドとプレノイドの代謝相互作用の解析

AKR1B10 はその他の酵素と異なり、ステロイドホルモン、胆汁酸とそれらの代謝物によって、強力に阻害された。この阻害様式はアルコール基質に対して拮抗阻害を示し、本酵素過剰発現細胞における「アルデヒド体から FOH への還元」への阻害効果は、既知の強力な阻害剤である tolrestat と同程度であった。

(3) プレノイド代謝酵素の阻害剤の探索

20 α -HSD 阻害剤

これまでに見出した 20 α -HSD の阻害剤 3,5-dichlorosalicylic acid の結合複合体の結晶構造を元に、さらに強力かつ選択的な阻害剤 3-bromo-5-phenylsalicylic acid (K_i 値 4 nM) を見出した (Figure 1)。3 位と 5 位の置換基をそれぞれ変えた誘導体を新たに合成し、現時点で最も強力な阻害剤 3-chloro-5-phenylsalicylic acid (K_i 値 0.86 nM) を創製し、その 20 α -HSD との複合体の結晶構造を解析し (PDB code, 3NTY)、結合様式を明らかにした。

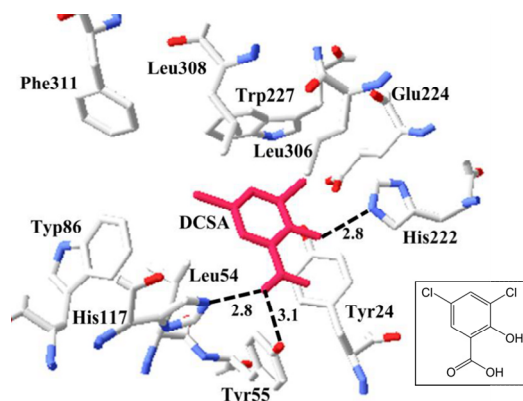


Figure 1. DCSA bound in the active site of 20 α -HSD in the crystal structure

17 β -HSD5 型阻害剤

ブラジル産プロポリス含有成分で抗腫瘍活性が報告されているケイヒ酸誘導体 (baccharin, artepillin C, drupanin など) について、17 β -HSD5 型に対する阻害効果を検討したところ、baccharin が最も強力に 17 β -HSD5 型を阻害し、他の類似酵素をほとんど阻害しないことを見出した。Baccharin はアルコール基質に対して拮抗阻害を示し、 K_i 値は 56 nM であった。また、分子ドッキングにより AKR1C3 に特有な残基 Ser118 と Met120、阻害剤結合による誘導適合で最も影響を受けるとされている Phe311 が baccharin の阻害強度と選択性を決定する上で重要であることを明らかにした。これまでに 17 β -HSD5 型阻害剤として indomethacin や flufenamic

acid といった非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) が知られている。そこで、その他の NSAIDs について阻害効果を検討したところ、強力 (K_i 値 8 nM) かつ高い選択性を示す tolfenamic acid を見出した。

AKR1B10 阻害剤

抗腫瘍活性を示す化合物の中から bisdemethoxycurcumin、magnolol、honokiol、resveratrol、カフェ酸フェネチルエステル (CAPE) を、バーチャルスクリーニングから chromene-3-carboxamide (クロメン) 誘導体を、AKR1B10 の強力な拮抗阻害剤として見出した。これら化合物の AKR1B10 ドッキングモデルを作成し、得られた結合情報を基に CAPE 及びクロメン誘導体を設計し、阻害選択性及び阻害強度が向上した新規化合物の創製に成功した (Figure 2)。また、近年抗腫瘍活性が報告されている NSAIDs による AKR1B10 阻害活性を検討した。その結果、NSAIDs の中でも flufenamic acid や diclofenac は AKR1B10 を構造類似酵素であるアルドース還元酵素よりも約 50 倍強力で阻害し、その阻害定数 K_i 値はこれら薬剤の臨床投与時の血中濃度より約 10 倍低く、NSAIDs によって報告されている抗腫瘍作用の一序として、AKR1B10 阻害活性が含まれる可能性が示唆された。

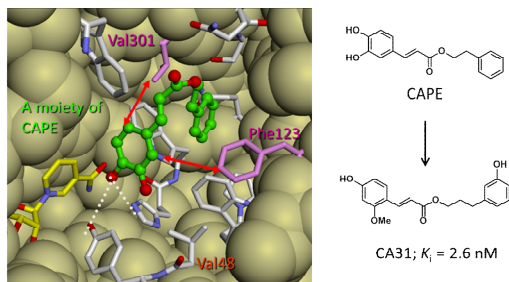


Figure 2. Design, synthesis and evaluation of caffeic acid phenethyl ester-based inhibitors

(4) 培養細胞を用いたプレノイド代謝酵素阻害剤の効果

ヒト乳癌 MCF7 細胞において、20 α -HSD、17 β -HSD5 型が高発現している一方で AKR1B10 の発現量は低い。そこで MCF7 細胞における farnesal 還元反応に及ぼすプレノイド代謝酵素阻害剤の効果を検討したところ、PGFS 阻害剤の濃度依存的な阻害効果が確認された。その中でも 17 β -HSD5 型の強力かつ特異的阻害剤である tolfenamic acid は 20 μ M の濃度において、farnesal 還元反応を約 50%阻害した。20 α -HSD 及び AKR1B10 の阻害剤ではほとんど阻害効果が認められなかったことから、17 β -HSD5 型が MCF7 細胞における farnesal 還元反応の主酵素であることが示唆された。

血管内皮細胞への AKR1B10 の一過性過剰発

現細胞及び前立腺癌細胞への 17 β -HSD5 型の一過性過剰発現細胞を作製し、細胞増殖試験を行ったところ、両細胞の細胞増殖はベクターのみを導入したコントロール細胞よりも亢進しており、前項目にて見出した両酵素の阻害剤添加によってその増殖亢進は有意に抑制された (Figure 3)。また、大腸癌細胞における AKR1B10 発現上昇及び FOH 及び FAL の添加は MAP キナーゼ系を亢進させることから、癌細胞増殖へのプレニル代謝酵素の関与が示された。

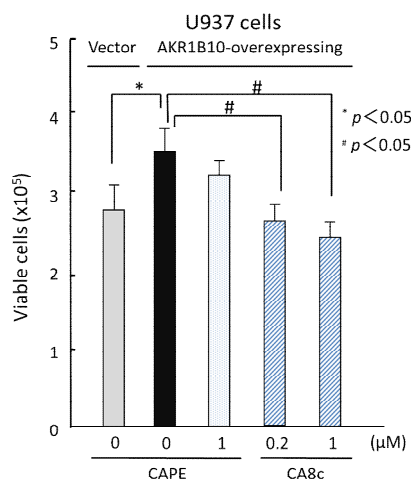


Figure 3. Effect of CA31 and CAPE on proliferation of AKR1B10-expressed U937 cells.

(5) 遺伝子発現調節物質の探索

AKR1B10 の発現誘導物質として、抗酸化剤として知られる tert-butylquinone 及びその代謝体 6-tert-butyl-2,3-epoxy-4-benzoquinone を見出した。発現誘導機序の詳細は明らかではないが、プレニル代謝酵素の発現調節に関与することが知られる酸化ストレス応答性シグナルを介さない可能性が示唆された。

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 11 件)

Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Ayano Kanamori, Youko Otsuji, Hiroko Nagai, Kriethika Sundaram, Ossama El-Kabbani, Naoki Toyooka, Shozo Ohta and Akira, Selective inhibition of human type-5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) by baccharin, a component of brazilian propolis, J. Nat. Prod., 査読有、75巻、2012、716-721、DOI: 10.1021/np201002x
Midori Soda, Dawei Hu, Satoshi Endo,

Mayuko Takemura, Jie Li, Ryogo Wada, Syohei Ifuku, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Shozo Ohta, Keiko Yamamura, Naoki Toyooka, Akira Hara, and Toshiyuki Matsunaga, 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、48巻、2012、321-329、DOI:10.1016/j.ejmech.2011.12.034
Mayuko Takemura, Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Midori Soda, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Kazuo Tajima, Munekazu Iimura, and Akira Hara, Selective Inhibition of the Tumor Marker Aldo-keto Reductase Family Member 1B10 by Oleanolic Acid, *J. Nat. Prod.*, 査読有、74巻、2011、1201-1206、DOI:10.1021/np200118q
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Chisato Ohta, Midori Soda, Ayano Kanamori, Yukio Kitade, Satoshi Ohno, Kazuo Tajima, Ossama El-Kabbani and Akira Hara, Roles of rat and human aldo-keto reductases in metabolism of farnesol and geranylgeraniol, *Chem. Biol. Interact.*, 査読有、191巻、2011、261-268、DOI:10.1016/j.cbi.2010.12.017
Ossama El-Kabbani, Urmi Dhagat, Midori Soda, Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga and Akira Hara, Probing the Inhibitor Selectivity Pocket of Human 20 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (AKR1C1) with X-Ray Crystallography and Site-Directed Mutagenesis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、21巻、2011、2564-2567、DOI:10.1016/j.bmcl.2011.01.076
Hi-Tai Zhao, Midori Soda, Satoshi Endo, Akira Hara, Ossama El-Kabbani, Selectivity Determinants of Inhibitor Binding to the Tumor Marker Human Aldose Reductase-Like Protein (AKR1B10) Discovered from Molecular Docking and Database Screening, *Eur. J. Med. Chem.*, 査読有、45巻、2010、4354-4357、DOI:10.1016/j.ejmech.2010.05.032
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Midori Soda, Kazuo Tajima, Hi-Tai Zhao, Ossama El-Kabbani and Akira Hara, Selective Inhibition of the Tumor Marker AKR1B10 by Anti-inflammatory N-Phenylanthranilic Acids and Glycyrrhetic Acid, *Biol. Pharm. Bull.*,

査読有、33巻、2010、886-890、DOI:doi:10.1248/bpb.33.886
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Kazuo Kuwata, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Yukio Kitade and Akira Hara, Chromene-3-carboxamide derivatives discovered from virtual screening as potent inhibitors of the tumour maker, AKR1B10, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、18巻、2010、2485-2490、DOI:10.1016/j.bmc.2010.02.050
Toshiyuki Matsunaga, Satoshi Endo, Midori Soda, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Kazuo Tajima, Akira Hara, Potent and selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by bisdemethoxycurcumin: Probing the active site of the enzyme with molecular modeling and site-directed mutagenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、389巻、2009、128-132、DOI:doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.107
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Hiroaki Mamiya, Chisato Ohta, Midori Soda, Yukio Kitade, Kazuo Tajima, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Akira Hara, Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductase-like protein: Endogenous substrates and inhibition by steroids, *Arch. Biochem. Biophys.*, 査読有、487巻、2009、1-9、DOI:doi:10.1016/j.abb.2009.05.009
Ossama El-Kabbani, Peter J. Scammells, Joshua Gosling, Urmi Dhagat, Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Midori Soda and Akira Hara, Structure-Guided Design, Synthesis and Evaluation of Salicylic Acid-Based Inhibitors Targeting a Selectivity Pocket in the Active Site of Human 20 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (AKR1C1), *J. Med. Chem.*, 査読有、52巻、2009、3259-3264、DOI:10.1021/jm9001633

[学会発表](計9件)

遠藤 智史, 高次構造に基づいた癌マーカー-AKR1B10の強力かつ選択的な阻害剤の創製、第1回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム、2012.02.23、岐阜

Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Midori Soda, Mayuko Takemura, Dawei Hu, Jie Li, Ryogo Wada, Syohei Ifuku, Naoki Toyooka, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani and Akira, Design, Synthesis and Evaluation of Caffeic Acid

Phenethyl Ester-Based Inhibitors Targeting a Selectivity Pocket in the Active Site of Human Aldo-Keto Reductase (AKR) 1B10、8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS11)、2011.11.30、東京
金森 綾野、遠藤 智史、松永 俊之、原明、Ossama El-Kabbani、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、2010.09.22、京都

Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Chisato Ohta, Midori Soda, Ayano Kanamori, Yukio Kitade, Satoshi Ohno, Kazuo Tajima, Ossama El-Kabbani, Akira Hara, Roles of rat and human aldo-keto reductases in metabolism of farnesol and geranylgeraniol、ENZYMOLGY AND MOLECULAR BIOLOGY OF CARBONYL METABOLISM FIFTEENTH INTERNATIONAL MEETING、2010.07.09-10、LEXINGTON, KENTUCKY

遠藤 智史、松永 俊之、曾田 翠、田島和男、Ossama El-Kabbani、原 明 非ステロイド性抗炎症薬による癌マーカー AKR1B10 の阻害、第 56 回日本薬学会東海支部総会・大会、2010.07.03、岐阜

遠藤 智史、松永 俊之、桑田 一夫、Ossama El-Kabbani、北出 幸夫、原 明 パーチャルスクリーニングを用いた癌マーカー酵素 AKR1B10 の強力な阻害剤の探索、74 回日本生化学会中部支部例会、2010.05.29、名古屋

遠藤 智史、松永 俊之、曾田 翠、原 明、田島 和男、癌マーカー AKR1B10 によるイソプレニルアルデヒド還元代謝、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.22、神戸

遠藤 智史、松永 俊之、北出 幸夫、田島 和男、Ossama El-Kabbani、原 明、ヒトの新規カルボニル還元酵素遺伝子産物 (CBR4) の機能解析

曾田 翠、遠藤 智史、松永 俊之、原 明、Ossama El-Kabbani、高次構造に基づく 20 -ヒドロキシステロイド脱水素酵素阻害剤の合成・評価、73 回日本生化学会中部支部例会、2009.05.23、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：

国内外の別：

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://www.gifu-pu.ac.jp/lab/seika/index.html>

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

なし

(3) 連携研究者

なし