

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790114

研究課題名(和文)酸化ストレス誘導性タンパク質の機能と発現の二極面的制御に基づく新規制癌薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel anticancer drugs targeting for controlling the function and expression of oxidative stress-induced protein

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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000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NF-E2 related factor 2(Nrf2)誘導性のaldo-keto reductases(AKR)の機能及び発現を制御する新規制癌薬候補物質を探索した。これまでに報告された中で最も強力な阻害剤を含めた優れた阻害剤の探索及び創製に成功した。また、AKR安定発現癌細胞株の作製にも成功した。これらの研究成果は、癌の新規標的分子として注目され始めているAKRを標的とした癌治療薬の開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Aldo-keto reductases(AKR) which are induced by oxidative stress via Keap1/Nrf2 pathway are suggested to involve in proliferation and survival of cancer cells. Then, we searched novel AKR inhibitors for anticancer therapeutic development and have succeeded the development of the most potent and high selective AKR inhibitors and construction of AKR stably expressing cancer cells. These results would facilitate the development of novel anticancer drugs targeting for AKR.

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：aldo-keto reductases 抗癌剤 抗癌剤耐性抑制薬

1. 研究開始当初の背景

生体は細胞内酸化還元状態を一定に維持して機能し、このバランスの歪みが様々な疾患を誘発することが知られる。酸化ストレス誘導性の転写因子 Nrf2 は正常細胞ではその抑制タンパク質 Keap1 に制御され、細胞内活性酸素量を調節しているが、癌においては恒常的に活性化し、活性酸素種の無毒化を介して腫瘍発生を促進することが報告され (DeNicola et al., Nature 475 巻 106-109 頁 2011 年)、Nrf2-Keap1 制御系は創薬標的として注目されている。その機序は Nrf2 によるヘムオキシゲナーゼや NAD(P)H キノン還元酵素などの酸化ストレス防御遺伝子群の発現亢進であるが、最近、AKR 酵素も Nrf2 によって発現調節されることが報告された (Nishinaka et al., Chem Biol Interact 30 巻 185-191 頁 2011 年)。

AKR 酵素 (1B10, 1C1, 1C2, 1C3) は、4-hydroxy-2-nonenal, isocaproaldehyde など脂質過酸化由来反応性アルデヒドを解毒代謝する酸化ストレス防御酵素であり、申請者らは 1B10 による反応性アルデヒドの解毒が大腸癌細胞における抗癌剤マイトマイシン C 耐性化の一因であることを明らかにしてきた。AKR 酵素は癌の種類は異なるものの、様々な癌での発現上昇が報告され、詳細は未解明であるが、上記反応性アルデヒドの解毒に加えて、図 1 に示す複数の代謝経路を介して癌の生存戦略に利用されていることが明らかにされつつある。

現在、開発が進められている Nrf2 活性化抑制剤は正常細胞における酸化ストレス防御酵素の発現低下をまねき、種々のストレスに対する感受性を上昇させる可能性が考えられる。そのため、本研究では Nrf2 シグナル伝達経路の下流に位置し、癌特異的に発現する AKR 酵素に焦点を当て、機能と発現という二極面から、その制御を可能にする薬剤の開発研究を実施する。

このような背景の下、申請者らは Nrf2 誘導性の 3 種の AKR 酵素 (1B10, 1C1, 1C3) の選択的阻害剤の開発研究に取り組み、見出した酵素阻害剤が癌増殖及び既存の抗癌剤耐性化に対して抑制効果を示すことを明らかにしてきた。各 AKR 酵素阻害剤が新規制癌薬の候補となる学術背景と申請者の研究経過を以下に示す。

肺癌、乳癌や子宮体癌で高発現する 1C1 は、黄体ホルモンの不活化及び PGE2 からの PGF2 α 産生反応を触媒する。1C1 によるプロゲステロンの不活化は相対的エストロゲン濃度の上昇をもたらす、プロスタノイド受容体のリガンドである PGF2 α の産生は MAPK-NF κ B 経路を活性化する。申請者らは、in silico スクリーニングにより、1C1 に高選択性で強力な阻害剤を見出し、酵素複合体の結晶構造解析から得られた知見を基に、現時点で最も強力な選択的阻害剤 (3-chloro-5-phenylsalicylic acid) の創製に成功

している。

1C3 は前立腺癌、乳癌で高発現し、男性ホルモンの活性化に關する他、PGD2 還元代謝による PPAR γ リガンド産生低下によって、癌細胞増殖に關与することが報告されている。これまでに、抗炎症薬トルフェナム酸が強力な阻害活性 (阻害定数 9 nM) を示すことや、その他の AKR 酵素に極めて高い特異性を示す桂皮酸誘導体を見出している。一方で、1C2 はステロイド代謝においては男性ホルモンを不活化するが、1C1 よりも強力な PGF2 α 合成能を有し、細胞増殖に關与することが知られる。最近、メラノーマなどの癌において発現低下する miRNA (miR-193b) による本酵素遺伝子の発現調節が報告されるなど、癌との関連性が明らかにされつつある。

1B10 は肝癌や喫煙者肺癌で高発現し、本酵素の発現抑制により実験移植肝癌が抑制されることから、癌との強い関連性が注目されている。その機序として本酵素のレチナル還元によるレチノイン酸量の低下が考えられていたが、申請者らはイソプレニルアルデヒドの効率的還元によるプレニル化の促進が關与することを提唱してきた。また、反応性アルデヒド代謝が抗癌剤マイトマイシン C の耐性化に關与することも明らかにしてきた。1B10 阻害剤としては in silico スクリーニングにより見出した現時点で最も強力なクロメン環化合物 (阻害定数 2.7 nM) に加えて、高い選択性を示すテルペノイドや桂皮酸誘導体を新たに見出している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、酸化ストレス防御機構の中核を担う NF-E2 related factor 2 (Nrf2) 誘導性の 4 種の aldo-keto reductases (AKR) の機能及び発現を制御する新規制癌薬候補物質の探索である。

そこで、本研究では、各酵素に高選択的かつ強力な阻害効果を示す新規阻害剤の創製、酵素遺伝子発現調節分子の探索を目的とする。

3. 研究の方法

3 種の AKR 酵素 (1B10, 1C1, 1C3) については、申請者が既に見出している阻害定数が nM オーダーの強力な阻害剤もしくは阻害効果は少し劣るが高い特異性を示す阻害剤をリード化合物とした。各酵素結晶構造へのドッキングモデル、また、結合に關するアミノ酸残基の部位特異的変異酵素を作製した。これまでに確立した培養細胞の評価系を用いて、3 種の AKR 各酵素阻害剤によるイソプレノイドやステロイドの代謝及び癌細胞の増殖・浸潤能に対する影響を解析した。また、阻害剤の安定性についても LC/MS を用いた代謝分析によって検討した。さらに、AKR 酵素安定発現癌細胞株を構築した。また、発現調節物質の探索を試みた。

4. 研究成果

AKR 酵素の特異的阻害剤の創製

(1) AKR1B10 阻害剤：リード化合物として得ていた化合物 C1 (chromene-3-carboxamide 誘導体) のドッキングモデルを元に誘導体 97 種を合成し、その阻害効果を評価した。中でも KO79 は阻害定数 K_i 値が 1.3 nM とこれまでに報告されている中で最も強力な AKR1B10 阻害効果を示した。本化合物は細胞レベルでも AKR1B10 の還元活性を有意に阻害し、肺癌 A549 細胞の増殖能を抑制した。一方で、構造類似酵素であるアルドース還元酵素 (AR) との選択性は 5 倍程度までしか上昇せず、さらなる検討が必要である。現在、これまでに見出してきた AKR1B10 特異的阻害剤の構造的特徴を参考にし、新たな誘導体の創製に取り掛かっている。また、天然物由来成分の中からキサントン骨格を有する γ -マンゴスチンが本酵素の強力な阻害剤であることを見出し、学術誌 Biol. Pharm. Bull. に発表した。

(2) AKR1C3 阻害剤：AKR1C3 阻害剤としてこれまでに見出している baccharin は高い選択性を持つことが特徴である。そのドッキングモデルに基づき誘導体を合成した。その結果、高い選択性を維持したまま、活性を約 4 倍向上させた化合物 BA43 の創製に成功した。BA43 は A549 細胞における androsterone の代謝を有意に抑制し、その効果は baccharin よりも強かった。AKR1C3 の良い基質である 4-oxo-2-nonenal (ONE) は強い細胞毒性を示すが、その還元体の毒性は低い。そこで、ONE 感受性の変動を指標に細胞内 ONE 代謝に及ぼす BA43 の効果を検討した。その結果、BA43 は baccharin よりも強力に濃度依存的に ONE 代謝を阻害していることが示された。また、AKR1C3 を安定発現した前立腺癌 PC3 細胞を構築し、この細胞を用いて、BA43 の癌細胞増殖抑制効果を検討した。AKR1C3 の過剰発現によって、PC3 細胞の増殖能は有意に亢進し、BA43 の添加によってその増殖能は抑制された。同様の結果は、白血病 U937 細胞においても確認された。従って、BA43 は AKR1C3 によるアンドロゲン合成のみならず、増殖抑制系プロスタグランジン類や反応性アルデヒドの生成抑制効果の阻害効果を介して、癌相棒の増殖や生存を制御すると考えられた。

発現調節物質の探索

AKR1B10 は食品添加物質である tert-butylhydroquinone のキノン代謝体である 2-tert-butyl-1,4-benzoquinone (TBQ) 及び 6-tert-butyl-2,3-epoxy-4-benzoquinone (TBE) によって発現誘導されることを見出した。両キノンは高い細胞毒性を示すが、その毒性発現機序については不明であった。その作用機序には酸化ストレスや小胞体ストレスがほとんど関与しなかったが、グルタチオンと高い反応性を示すことを見出した。従って、

生体内タンパク質への修飾を介して毒性発現に關与する可能性が示唆された。その一方で、これら両キノンはオートファジーを誘導した。オートファジー阻害剤の併用によりキノンの毒性は増強されたことから、オートファジー性細胞死ではなく細胞防御的オートファジーが誘導されていることが示唆された。また、構築した AKR1B10 過剰発現細胞では両キノンの細胞毒性が軽減された。以上のことから、両キノンの細胞毒性に対応すべく、生体は AKR1B10 とオートファジーを誘導してい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7件)

Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Yuki Arai, Kazuo Tajima, Ossama El-Kabbani, Shigeru Yamano, Yasuo Bunai, Akira Hara, Yukio Kitade, Cloning and characterization of four rabbit aldo-keto reductases featuring broad substrate specificity for xenobiotic and endogenous carbonyl compounds: Their relationship with multiple forms of drug ketone reductases, Drug Metab. Dispos., 査読有、Vol.42, No.4, 2014, pp. 803-812, DOI:10.1124/dmd.113.056044

Satoshi Endo, Dawei Hu, Miho Suyama, Toshiyuki Matsunaga, Kenji Sugimoto, Yuji Matsuya, Ossama El-Kabbani, Kazuo Kuwata, Akira Hara, Yukio Kitade, Naoki Toyooka, Synthesis and structure-activity relationship of 2-phenylimino chromene derivatives as inhibitors for aldo-keto reductase (AKR) 1B10, Bioorg. Med. Chem., 査読有、Vol.21, 2014, pp. 6378-6384, DOI:10.1016/j.bmc.2013.08.059

Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Atsuko Matsumoto, Yuki Arai, Satoshi Ohno, Ossama El-Kabbani, Kazuo Tajima, Yukio Kitade, Yasuo Bunai, Shigeru Yamano, and Akira Hara, Rabbit 3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase is a NADPH-preferring reductase with broad substrate specificity for ketosteroids, prostaglandin D2, and other endogenous and xenobiotic carbonyl compounds, Biochem. Pharmacol., 査読有、Vol.86, No.9, 2013, pp. 1366-1375, DOI:10.1016/j.bcp.2013.08.024

Satoshi Endo, Airi Fujimoto, Sho Kumada, Toshiyuki Matsunaga, Satoshi Ohno, Jun'ichi Mano, Kazuo Tajima, Ossama El-Kabbani, and Akira Hara, Modulation of activity and inhibitor sensitivity of rabbit aldose reductase-like protein by oxidized glutathione and SH-reagents, Chem. Biol. Interact., 査読有、Vol. 202, No.1-3, 2013,

pp. 146-152
DOI:10.1016/j.cbi.2012.11.026
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Airi Fujimoto, Sho Kumada, Yuki Arai, Yoko Miura, Hiroshige Mikamo, Ossama El-Kabbani, Shigeru Yamano, Munekazu Iinuma, Akira Hara, Characterization of a rabbit morphine 6-dehydrogenase and its two isoforms which function as NAD⁺-dependent 3 α (17 β)- hydroxysteroid dehydrogenases, Arch. Biochem. Biophys., 査読有、Vol.529, No.2, 2012, pp. 131-139, DOI: 10.1016/j.abb.2012.11.013
Midori Soda, Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Munekazu Iinuma, Keiko Yamamura, and Akira Hara, 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, No.11, 2012, pp. 2075-2080
Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Sho Kumada, Airi Fujimoto, Satoshi Ohno, Ossama El-Kabbani, Naoki Toyooka, Jun'ichi Mano, Kazuo Tajima, Akira Hara, Arch. Biochem. Biophys., 査読有、Vol.527, No.1, 2012, pp. 23-30, DOI:10.1016/j.abb.2012.11.013

〔学会発表〕(計3件)

陶山 美穂、遠藤 智史、松永 俊之、胡大イ、杉本 健士、松谷 裕二、豊岡 尚樹、桑田 一夫、原 明、2-Phenyliminochromene 誘導体の癌マーカーAKR1B10 阻害活性に関する構造活性相関、第41回構造活性相関シンポジウム(兵庫)、2013.11.07

原 明、遠藤 智史、山野 茂、松本 淳子、荒井 裕貴、松永 俊之、ウサギの3-hydroxyhexobarbital dehydrogenase は ketosteroids、prostaglandin D₂、その他のカルボニル化合物に広い特異性を示す還元酵素である、第85回日本生化学会大会(横浜)、2013.09.13

Satoshi Endo, Sho Kumada, Airi Fujimoto, Toshiyuki Matsunaga, Satoshi Ohno, Jun'ichi Mano, Kazuo Tajima, Ossama El-Kabbani, and Akira Hara, Modulation of activity and inhibitor sensitivity of rabbit aldose reductase-like protein by oxidized glutathione and SH-reagents, ENZYMOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY OF CARBONYL METABOLISM SIXTEENTH INTERNATIONAL MEETING (Plön, GERMANY), 2012.07.14 ~ 2012.07.15

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：AKR1C3 阻害剤
発明者：遠藤 智史、松永 俊之、豊岡 尚樹
権利者：岐阜市
種類：特許
番号：特願 2013-149089
出願年月日：2013年7月18日
国内外の別：国内

〔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・生命薬学大講座・生化学研究室・助教
研究者番号：60433207