

岐阜薬科大学博士 (薬学) 学位論文
癌マーカーアルドケト還元酵素 **1B10** の
選択的阻害剤に関する研究

曾田 翠

2013 年

目次

緒論	1
第1章 非ステロイド性抗炎症薬による AKR1B10 の選択的阻害	
第1節 緒言	7
第2節 実験材料および実験方法	7
1. 実験材料	
2. リコンビナント酵素の発現と精製	
3. タンパク質定量	
4. 電気泳動	
5. 酵素活性測定	
第3節 結果	9
1. AR 阻害剤による AKR1B10 の阻害	
2. NSAIDs による AKR1B10 の阻害	
第4節 考察	13
第2章 植物成分による AKR1B10 の阻害	
第1節 緒言	16
第2節 実験材料および実験方法	17
1. 植物成分	
2. その他の実験材料	
3. リコンビナント酵素の発現と精製	
4. タンパク質定量	
5. 酵素活性測定	
6. 細胞培養実験	
第3節 結果	20
1. キサントンによる AKR1B10 の阻害	
2. クルクミノイドによる AKR1B10 の阻害	
3. トリテルペノイドによる AKR1B10 の阻害	

第4節 考察	28
第3章 AKR1B10の阻害選択性決定部位	
第1節 緒言	32
第2節 実験材料および実験方法	34
1. 実験材料	
2. 阻害剤ドッキングモデルの作製	
3. 部位特異的変異導入	
4. リコンビナント酵素の発現と精製	
5. タンパク質定量および酵素活性測定	
第3節 結果	36
1. NSAIDsの結合様式	
2. キサントンの結合様式	
3. クルクミノイドの結合様式	
4. トリテルペノイドの結合様式	
第4節 考察	46
総括	49
謝辞	52
参考文献	53
略語表	62
論文目録	64

緒論

悪性新生物（癌）は、1981年に日本における死亡原因の第1位となって以来、その順位を独占し続け、2011年の死亡者数は約35万7千名にも上っている¹⁾。癌の治療方針はその種類によって異なり、胃癌などでは外科療法がその大半を占める一方で、肺癌、乳癌、直腸癌などでは外科療法に、放射線療法や抗癌剤を用いた薬物療法などを組み合わせた治療が行われている。癌は主に制御不能の増殖を繰り返す病態と考えられたため、従来の抗癌剤にはアルキル化剤、抗腫瘍性抗生物質、代謝拮抗剤、白金製剤など細胞分裂を阻害するものが多い²⁾。これらの薬剤の標的はDNAとの相互作用であるため、癌細胞だけでなく正常細胞にも作用して多くの薬物有害反応が生じた。近年の分子生物学の急速な進歩により、癌細胞だけが持つ特徴を標的とする分子標的薬の開発が進んでおり、最近の臨床現場で汎用される分子標的薬は抗体医薬品と tyrosine kinase 標的型低分子医薬品に大別される。抗体医薬品は標的分子に対するモノクローナル抗体であり、主な薬剤として、ヒト癌遺伝子 HER2/neu (c-erbB-2) の遺伝子産物を標的とする trastuzumab、上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) を標的とする cetuximab および panitumumab、血管内皮細胞増殖因子を標的とする bevacizumab などが知られる。それに対して、癌細胞増殖に関わる主要なシグナル伝達因子 tyrosine kinase を阻害標的とした tyrosine kinase 標的型低分子医薬品には、非小細胞性肺癌に適応される gefitinib、慢性骨髄性白血病やフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病に適応される imatinib などが挙げられる。その他にも proteasome 阻害薬や腫瘍壊死因子産生抑制薬などが臨床で使用され、効果が認められている。しかし、抗癌剤使用時には骨髄抑制、嘔吐、間質性肺炎などの副作用もさることながら頻回投与による抗癌剤耐性化も誘起され、それらが治療効果（抗癌剤奏効率）を激減させる重大な障害となるため、耐性化のメカニズム解明に加えて、新規な作用点をもち、かつ、副作用の少ない抗癌剤の開発が望まれている。

Aldo-keto reductase (AKR) スーパーファミリーは、主に NAD(H)または NADP(H)を補酵素として様々な基質 (脂肪族や芳香族アルデヒド・ケトン類、プロスタグランジン、ステロイド、糖類、異物など) のカルボニル基を可逆的にアルコール基に還元する酵素で構成されるタンパク質ファミリーである³⁾。このスーパーファミリーに属する 150 種以上のタンパク質は、アミノ酸配列の類似性から 15 ファミリー (AKR1~AKR15) に分類され、各ファミリーはさらに 60%以上のアミノ酸配列一致率を示すサブファミリーに細分されて体系的に命名されている³⁾。最も大きい AKR1 ファミリーは、6つのサブファミリー (AKR1A、AKR1B、AKR1C、AKR1D、AKR1E、AKR1G) に細分され、各サブファミリーに属するタンパク質は登録順に番号が付される。例えば、AKR1B サブファミリーに属するヒト、ウサギ、マウスの aldose reductase (AR) は、それぞれ AKR1B1、AKR1B2 および AKR1B3 と命名されている。ヒトでは、14 種の AKR スーパーファミリータンパク質が存在し、そのうち 9 種が AKR1 ファミリーに属す⁴⁾。ヒトの AKR スーパーファミリータンパク質の中で酵素学的にも病態生理学的にも最も研究されているのは、糖尿病合併症の発症に関与する AR である⁵⁾。最近、AR と 71%のアミノ酸配列一致率を示し、AKR1B サブファミリーで 10 番目に登録された NADPH 依存性還元酵素、AKR1B10 の癌進展への関与が明らかにされてきた。本酵素は当初肝癌細胞で高発現する AR 類似タンパク質 1 として同定され⁶⁾、その後肝癌だけでなく⁶⁻⁸⁾、肺癌^{9,10)}、子宮癌¹¹⁾、胆管癌⁸⁾、膵癌¹²⁾、乳癌¹³⁾ の癌部位でも高発現し、特に喫煙者の非小細胞肺癌で高頻度に誘導されることから、その診断マーカーとして注目されている⁹⁾。また、AKR1B10 遺伝子の発現抑制によりいくつかの癌細胞および実験的移植肝癌の増殖は抑制され^{7,12-15)}、逆に本酵素の過剰発現により癌細胞の増殖は促進される¹⁶⁾。これらの報告は AKR1B10 が癌マーカーだけでなく、癌細胞の増殖にも関与することを示している。AKR1B10 の基質特異性および他のタンパク質との相互作用の研究から、以下の 4 つの癌増殖における本酵素の役割が提唱されている。① 細胞分化促進因子のレチノイン酸の生成抑制 (**Fig. 1A**) : 9-*cis*-および

all-trans-retinoic acid は、ビタミン A アルコール体 (レチノール類) からそのアルデヒド体 (レチナール類) を経て生成され、核内受容体の retinoic acid receptor (RAR) および retinoid X receptor (RXR) に結合して細胞分化を促進する。AKR1B10 はヒトの AR に比べて著しく高い触媒効率でレチナール類をレチノール類に還元することにより、細胞内レチノイン酸量を減少させ、レチノイドホメオスタシスに關与する¹⁷⁾。それ故、上記の癌部位における AKR1B10 の高発現はレチノイン酸生成低下を介して癌細胞を増殖・生存に向けると考えられている。

② 低分子量 G タンパク質のプレニル化の促進 (Fig. 1B) : 細胞内タンパク質の約 2% が farnesol (FOH) および geranylgeraniol (GGOH) のピロリン酸化体からプレニル基の転移によりプレニル化され、Ras や Raf などの細胞増殖を促進する低分子量 G タンパク質の機能発現にはプレニル化が必須のイベントである。一方、FOH と GGOH のピロリン酸化体は、脱リン酸された後、farnesal (FAL) および geranylgeranial (GGAL) を経てカルボン酸体に代謝される。AKR1B10 は FAL と GGAL を高い触媒効率でそれぞれ FOH と GGOH に還元するので¹⁸⁾、癌細胞における AKR1B10 の発現上昇は FOH と GGOH の異化を抑制し、プレニル化材料の FOH と GGOH のピロリン酸化体の再生を促進して細胞増殖に寄与すると示唆されている¹⁶⁾。

③ 細胞毒性カルボニル化合物の解毒 : 癌細胞では低酸素状態にも拘わらず、電子伝達系の異常などにより活性酸素が生成し¹⁹⁾、これに伴う脂質過酸化を介して 4-hydroxy-2-nonenal、4-oxo-2-nonenal、acrolein などの細胞毒性アルデヒドが生成される²⁰⁾。AKR1B10 はこれらの細胞毒性アルデヒド類を毒性の少ないアルコール体に還元する^{14,21-24)} ため、癌細胞における AKR1B10 の高発現は、細胞毒性アルデヒドの解毒を介して酸化ストレスに起因するアポトーシスを抑制すると考えられている^{13-15,24)}。

④ 脂肪酸生合成の促進 : 癌細胞において高発現する AKR1B10 は、脂肪酸生合成の律速酵素の acetyl-CoA carboxylase と複合体を形成し、acetyl-CoA carboxylase のユビキチン依存的分解を抑制する¹⁵⁾。この acetyl-CoA carboxylase との相互作用が癌細胞増殖時に亢進する脂質生合成¹⁹⁾ に寄与すると示唆されている。さら

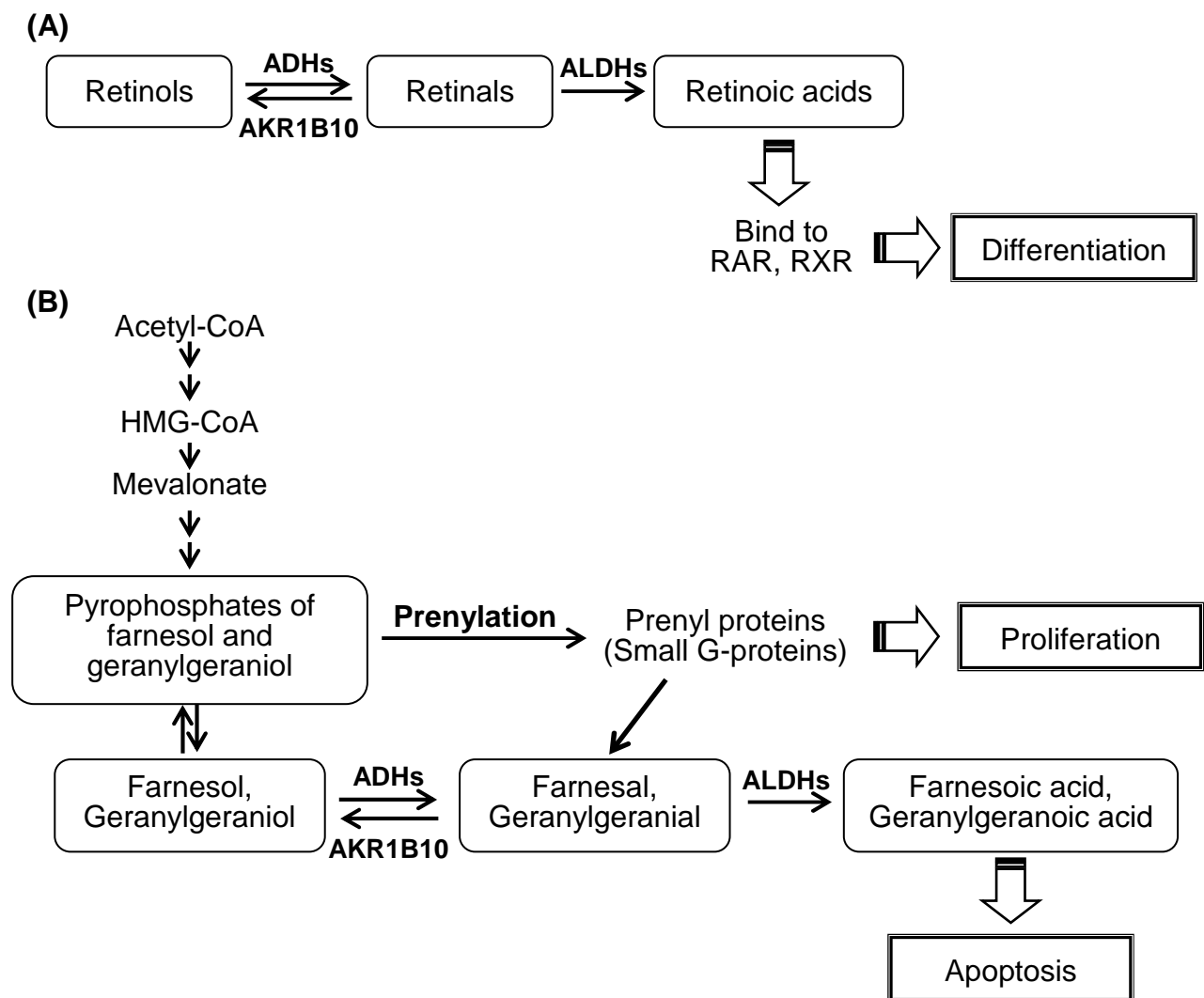


Fig. 1 Metabolism of retinoids (A) and isoprenoids (B).

(A) All-*trans*-retinol, 13-*cis*-retinol and 9-*cis*-retinol are oxidized to the corresponding retinoic acids through their retinals by alcohol dehydrogenases (ADHs) and aldehyde dehydrogenases (ALDHs). Retinoic acids regulate cell function including differentiation through binding to RAR and RXR. AKR1B10 effectively reduces retinals into retinols, and is considered to promote cell proliferation by inhibiting the retinoic acid formation. (B) Farnesyl pyrophosphate, an isoprenoid intermediate of the mevalonate pathway, is converted by its dephosphorylation into farnesol, which is further oxidized into farnesal and farnesoic acid by ADHs and ALDHs, respectively. Geranylgeranyl pyrophosphate is similarly metabolized. The two isoprenyl pyrophosphates are used in the prenylation of small G-proteins such as Ras, leading to activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade and resultant increase in proliferation potential of cells. Farnesal and geranylgeraniol are produced by degradation of the prenylated proteins, which are about 2% of cellular proteins. AKR1B10 efficiently reduces farnesal and geranylgeraniol to farnesol and geranylgeraniol, respectively, which are phosphorylated into the pyrophosphates. Up-regulation of AKR1B10 in carcinomas and chemoresistant cancer cells may increase the cellular levels of the two isoprenyl alcohols by reducing back their aldehyde metabolites, and then promote proliferation of the cells.

に、AKR1B10 は daunorubicin や idarubicin などの抗癌剤を還元代謝すること²⁵⁾、ならびに本酵素の発現上昇が mitomycin C²⁶⁾、oxaliplatin¹⁶⁾ や cyclophosphamide²⁷⁾ 等に対して耐性化した癌細胞および carboplatin と gemcitabine の併用投与による膀胱癌部位²⁸⁾ において認められていることから、これら抗癌剤に対する耐性獲得への本酵素の関与が示唆されている。

上述のように、AKR1B10 は癌診断におけるバイオマーカーとしてだけでなく、癌の予防や治療における標的分子として重要であり、AKR1B10 阻害剤は新規抗癌剤および抗癌剤耐性克服のための補助治療薬として有用であると考えられている。AKR1B10 と構造が類似する AR は、様々なアルデヒド類の代謝に加えて、終末糖化産物 (AGE) の前駆体を還元して AGE により誘起される活性酸素種の産生、血管透過性の亢進、炎症増大などからの防御²⁹⁾、prostaglandin F_{2α} の合成³⁰⁾ などの多様な生理機能に関与している。したがって、AKR1B10 を標的とする抗癌剤および抗癌剤耐性克服薬の開発には、AR を阻害せず AKR1B10 に対して選択的に阻害する化合物が求められる。

AKR1B10 に阻害効果を示す化合物として、AR 阻害剤の tolrestat¹⁷⁾、フィブラート系薬物³¹⁾、生体成分のステロイドや胆汁酸^{18,23)}、9-methyl-2,3,7-trihydroxy-6-fluorone³²⁾ および chromene-3-carboxamide 誘導体³³⁾ が報告されている。しかし、これら阻害剤の選択性について検討されているものは少なく、強い AKR1B10 阻害効果を示す tolrestat と chromene-3-carboxamide 誘導体は AR も同程度に阻害するため、未だ AR と比べて AKR1B10 に高い選択性を示す阻害剤は報告がない。また、AKR1B10 の補酵素・阻害剤三者複合体の結晶構造が解析されている阻害剤は tolrestat のみであり³⁴⁾、AKR1B10 阻害選択性をもたらす構造については明らかでない。

本研究では、AKR1B10 が癌細胞増殖に関与することを踏まえて、新規な構造の AKR1B10 選択的阻害剤を見出すため、抗癌作用・癌細胞増殖抑制作用を有すると報告されている薬物および植物成分の AKR1B10 阻害効果を AR 阻害と対比して検討し

た。また、AKR1B10 選択的阻害作用を示した化合物については部位特異的アミノ酸置換法および分子モデリング法を用いて AKR1B10 の阻害選択性決定部位を解析した。第 1 章では、臨床で使用され、最近抗腫瘍作用あるいは癌リスク軽減作用を有することが報告されてきた非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) および glycyrrhetic acid (GA) について検討し、*N*-フェニルアントラニール酸誘導体に分類される NSAIDs と GA が AKR1B10 に対して選択的な阻害を示すことを見出した。第 2 章では、抗癌作用を有する植物成分 (キサントン、クルクミノイド、トリテルペノイド) について AKR1B10 選択的阻害効果を評価し、トリテルペノイドの oleanolic acid (OA) が最も高い選択性を示すことを見出した。第 3 章では、本研究で見出した強力かつ選択的阻害化合物の結合様式を部位特異的アミノ酸置換法および分子モデリング法を用いて検討し、各阻害剤の結合に関与するアミノ酸残基および AKR1B10 選択的阻害を決定する部位を明らかにした。

第1章 非ステロイド性抗炎症薬による AKR1B10 の選択的阻害

第1節 緒言

緒論に述べたように、AKR1B10 は癌マーカーであるとともに癌治療に向けた新しい創薬標的である。既報の AKR1B10 阻害化合物の中では、AR 阻害剤の tolrestat が AKR1B10 も強く阻害する^{17,18)}。糖尿病合併症治療薬の開発に向けて様々な構造の AR 阻害剤が報告されてきたが、副作用などにより本邦では epalrestat のみが糖尿病神経障害治療薬として臨床使用されているのが現状である。その副作用の一因として低い阻害選択性が挙げられ、その選択性を評価するための比較対照酵素として aldehyde reductase (AKR1A1) が研究されてきた³⁵⁾。AKR1B10 は AR と構造が類似しているため、AR 阻害剤は AKR1B10 を阻害する可能性があるが、AKR1B10 に対する阻害効果については未だ検討されていない。

そこで本章では、代表的な AR 阻害剤の AR および AKR1B10 の還元活性に対する阻害を比較検討した。また、臨床的に使用されている医薬品から AKR1B10 の選択的阻害剤を見出すため、抗腫瘍作用が報告されている NSAIDs^{36,37)} と GA^{38,39)} の AKR1B10 および AR に対する阻害効果を調べた。

第2節 実験材料および実験方法

1. 実験材料

Ni-Sepharose 6 Fast Flow は GE ヘルスケア・ジャパン、isopropyl- β -D-galactopyranoside (IPTG) と 2-mercaptoethanol (2ME) は和光純薬工業より購入した。AKR1B10 cDNA を組込んだ pCold I ベクターにより形質転換された AKR1B10 発現用大腸菌 BL21 (DE3) pLysS¹⁸⁾ は岐阜薬科大学 遠藤智史博士から供与され、合成 AR 阻害剤はネブラスカ大学医療センター Peter F. Kador 博士およびモナシュ大学 Ossama El-Kabbani 博士より恵与された。その他の試薬は特級または生化学用として市販されているものを用いた。

2. リコンビナント酵素の発現と精製

AKR1B10 発現用大腸菌を 50 µg/mL アンピシリン含有 LB 培養液 1 L にて 37 °C で OD₆₀₀ が 0.4 – 0.6 に達するまで培養した後、終濃度 0.2 mM の IPTG を添加し、さらに 15 °C で 24 時間培養してリコンビナント酵素の発現を誘導した。大腸菌は 4 °C にて 12,000 x g、15 分間の遠心分離操作により集菌し、緩衝液 A (0.5 M NaCl を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.4) 50 mL に懸濁した。この懸濁液を超音波処理 (150 W、5 分間) し、遠心分離 (12,000 x g、15 分間) した上清を大腸菌抽出液とした。

この大腸菌抽出液を緩衝液 A で平衡化した Ni-Sepharose 6 Fast Flow カラム (10 mL) に添加し、カラムを緩衝液 A で洗浄後、吸着酵素を 0 – 0.3 M imidazole 勾配により溶出した。酵素活性画分を限外濾過濃縮後、緩衝液 B (0.5 mM EDTA、5 mM 2ME および 20% グリセロールを含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 8.0) に対して透析し、最終精製酵素標品とした。また、ヒト AR のリコンビナント酵素は、Iino ら⁴⁰⁾ の方法に従って、その cDNA を組み込んだ pCR T7/TOPO 発現ベクターにより形質転換した大腸菌で発現、精製した。なお、酵素の精製操作はすべて 4 °C 以下で行った。

3. タンパク質定量

タンパク質は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Bradford⁴¹⁾ の方法に従って定量した。

4. 電気泳動

Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli⁴²⁾ の方法に従い、12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。泳動後、タンパク質を Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色し、ゲルは脱色液 (methanol: acetate: H₂O = 3: 1: 6) を用いて脱色した。

5. 酵素活性測定

各酵素の酸化還元活性は、以下の反応系における補酵素 NADPH の減少および生成速度を分光学的 (340 nm) あるいは蛍光分光学的 (Ex 340 nm、Em 455 nm) に測定した。還元活性は 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.1 mM NADPH、0.2 mM pyridine-3-aldehyde および酵素を含む全量 2.0 mL の反応系にて測定した。また、酸化活性は 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、0.25 mM NADP⁺、1 mM geraniol および酵素を含む全量 2.0 mL の反応系にて測定した。酵素活性 1 unit (U) は、25 °Cにおいて 1 分間に 1 μ mol の NADPH を減少または生成する酵素量とし、モル吸光係数 ($\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) を用いて算出した。

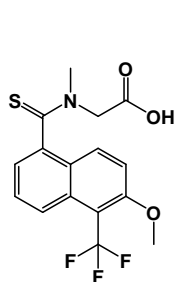
酵素反応の速度論的定数は、飽和濃度の補酵素存在下、少なくとも 5 点の異なる基質濃度において測定した。その反応速度を Lineweaver-Burk プロットにより解析し、種々の基質に対する K_m 値および V_{max} 値を算出した。種々の阻害剤に対する IC_{50} 値 (酵素活性を 50% 阻害するために要する阻害剤濃度) は、5 点の異なる濃度の阻害剤を標準反応系に添加して算出した。また、阻害定数 K_{is} 値 (勾配から求められる阻害定数) および K_{ii} 値 (Y 切片から求められる阻害定数) は、3 点の異なる濃度の阻害剤濃度から得られた反応速度の Dixon プロットまたは Cornish-Bowden プロット⁴³⁾ より求めた。これらの阻害定数は少なくとも 3 回の測定の平均値 \pm 標準偏差で表した。なお、阻害剤は methanol に溶解し、methanol の終濃度が 2.5% 以下になるように反応系に加えた。

第 3 節 結果

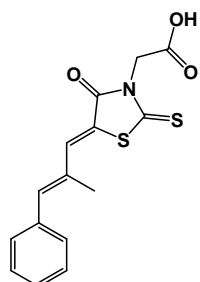
1. AR 阻害剤による AKR1B10 の阻害

本章で使用した AR 阻害剤は、カルボン酸誘導体、カルボキシル基を有しない環状イミド体および植物由来のフラボノイドの 3 種に分類され、その化学構造を **Fig. 2** に示す。また、これらの AKR1B10 および AR の還元活性に対する阻害度を **Table 1** に要

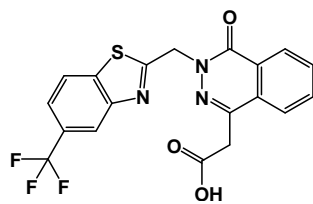
(A) Carboxylic acids



Tolrestat

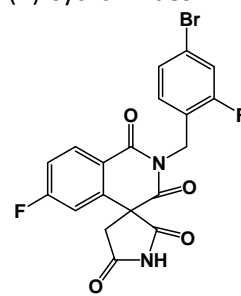


Epalrestat

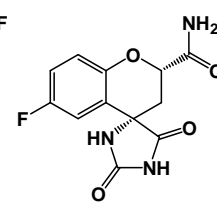


Zopolrestat

(B) Cyclic imides

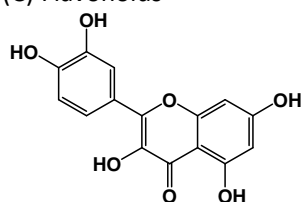


Minalrestat

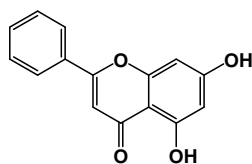


Fidarestat

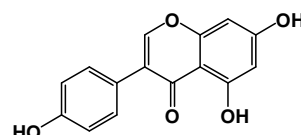
(C) Flavonoids



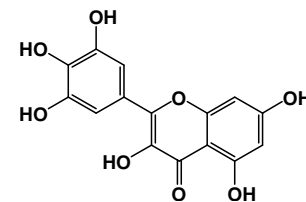
Quercetin



Chrysin



Genistein



Myricetin

Fig. 2 Structures of AR inhibitors evaluated in this study.**Table 1. Effects of AR inhibitors on reductase activities of AKR1B10 and AR.**

Inhibitor	IC ₅₀ (μM)		Selectivity ^{a)}
	AKR1B10	AR	AR / 1B10
<i>Carboxylic acids</i>			
Tolrestat	0.054	0.014	0.30
Epalrestat	0.33	0.021	0.06
Zopolrestat	0.62	0.018	0.03
<i>Cyclic imides</i>			
Minalrestat	0.74	0.025	0.03
Fidarestat	24	0.007	0.0003
<i>Flavonoids</i>			
Quercetin	1.9	0.23	0.1
Chrysin	2.1	0.29	0.1
Genistein	5.5	0.55	0.1
Myricetin	6.8	0.61	0.09

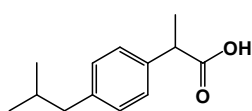
^{a)} Selectivity is expressed as a ratio of AR/AKR1B10.

約した。本実験に用いた 3 種のカルボン酸誘導体のうち、tolrestat が AKR1B10 の還元活性を最も強く阻害し、その IC₅₀ 値は他に比べ 6~10 倍低かった。環状イミド体に分類される fidarestat は、検討した AR 阻害剤の中で最も高い IC₅₀ 値を示した。フラボノイドでは quercetin > chrysin > genistein > myricetin の順に AKR1B10 を阻害し、フラボン骨格の 3',4'-ジヒドロキシフェニル基が阻害に関係することが示された。しかしながら、5'位への水酸基導入により阻害効果が弱くなったことから、5'位水酸基が 3',4'-ジヒドロキシフェニル基と AKR1B10 との相互作用に干渉すると考えられた。また、いずれの AR 阻害剤も阻害の程度は異なるが、AKR1B10 より AR を強く阻害し、その中で fidarestat が AR に最も高い阻害選択性を示した。Tolrestat はその AKR1B10 複合体の結晶構造から基質結合部位に結合し³⁴⁾、速度論的には還元反応では基質に対して非拮抗阻害、逆反応の geraniol 酸化反応では基質に対して拮抗阻害を示すことが報告されている^{17,18)}。そこで、epalrestat と quercetin について AKR1B10 による geraniol 酸化反応での阻害様式を検討した結果、両化合物とも基質 geraniol に対して拮抗阻害を示し、K_{is} 値はそれぞれ 0.11 ± 0.01 μM、0.90 ± 0.06 μM と算出された。

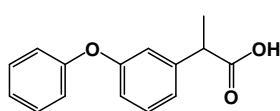
2. NSAIDs による AKR1B10 の阻害

AKR1B10 の還元活性を阻害した 12 種の NSAIDs は、化学構造からアリルプロピオン酸誘導体、*N*-フェニルアントラニール酸誘導体、フェニル酢酸誘導体、インドール酢酸誘導体およびこれら以外の構造の GA に分類され (Fig. 3)、これらの AR に対する阻害度も対比して Table 2 に要約した。その他の NSAIDs (phenylbutazone および aspirin) やステロイド性抗炎症薬 (dexamethasone および betamethasone) は、50 μM でも AKR1B10 の還元活性を 50%阻害するに至らなかった (結果未掲載)。アリルプロピオン酸誘導体に分類される ibuprofen、fenoprofen、flurbiprofen および loxoprofen の AKR1B10 に対する阻害作用は弱く、その阻害選択性も低かった。インドール酢酸誘導体に分類される sulindac は、AKR1B10 を最も強く阻害したが、AR も同程度に阻害

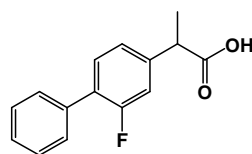
(A) Arylpropionic acids



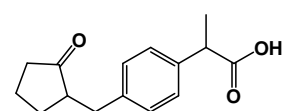
Ibuprofen



Fenoprofen

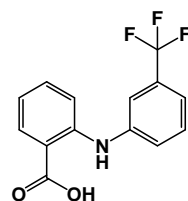


Flurbiprofen

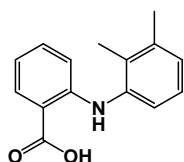


Loxoprofen

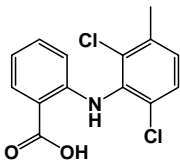
(B) *N*-Phenylanthranilic acids



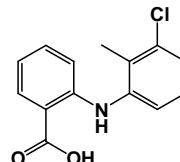
Flufenamic acid



Mefenamic acid

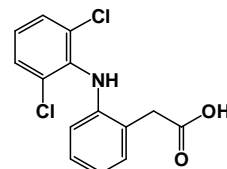


Meclofenamic acid



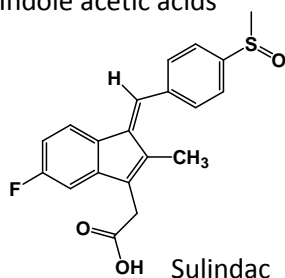
Tolfenamic acid

(C) Phenylacetic acid

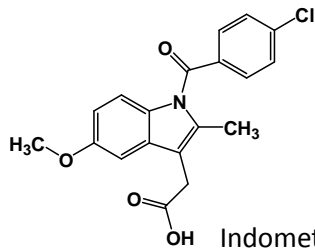


Diclofenac

(D) Indole acetic acids

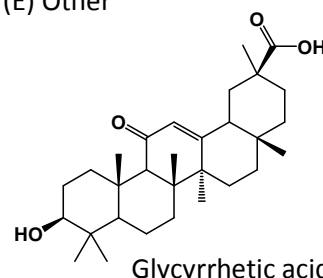


Sulindac



Indomethacin

(E) Other



Glycyrrhetic acid

Fig. 3 Structures of NSAIDs evaluated in this study.

した。一方、 tolfenamic acid および meclofenamic acid 以外の *N*-フェニルアントラニール酸誘導体 (flufenamic acid および mefenamic acid)、diclofenac ならびに GA は、AKR1B10 を AR より強く阻害し、48 倍以上の阻害選択性 (AR/AKR1B10 比) を示した。なお、フェニル基に置換基のない *N*-phenylanthranilic acid も tolfenamic acid と同様に AKR1B10 および AR を阻害しなかった (結果未掲載)。

AKR1B10 による geraniol 酸化反応における flufenamic acid、mefenamic acid、meclofenamic acid、diclofenac、sulindac および GA の阻害様式を検討した結果、いずれの薬物も基質 geraniol に対して拮抗阻害を示した。Diclofenac と GA を除き、これら薬物の阻害定数 (K_{is}) は $1 \mu\text{M}$ 以下であった (Table 2)。

Table 2. Effects of NSAIDs on reductase activities of AKR1B10 and AR.

Inhibitor	IC ₅₀ (μM)		Selectivity ^{a)}	K _{is} (μM)
	AKR1B10	AR	AR / 1B10	
<i>Arylpropionic acids</i>				
Ibuprofen	14	47	3	—
Fenoprofen	21	49	2	—
Flurbiprofen	36	35	1	—
Loxoprofen	41	>100	>2	—
<i>N-Phenylanthranilic acids</i>				
Flufenamic acid	0.76	41	54	0.35 ± 0.04
Mefenamic acid	1.6	77	48	0.58 ± 0.03
Meclofenamic acid	9.8	>100	>10	0.66 ± 0.07
Tolfenamic acid	13	>100	>8	—
<i>Phenylacetic acid</i>				
Diclofenac	1.9	>100	>52	1.0 ± 0.1
<i>Indole acetic acids</i>				
Sulindac	0.35	0.21	0.6	0.27 ± 0.02
Indomethacin	24	26	1	—
<i>Other</i>				
GA	4.9	280	57	2.9 ± 0.1

^{a)} Selectivity is expressed as a ratio of AR/AKR1B10.

第4節 考察

AR 阻害剤の tolrestat が AR と同等に強く AKR1B10 を阻害したことは、活性測定条件は異なっているものの、これまでの報告と一致する¹⁷⁾。Tolrestat の阻害選択性の欠如とは対照的に、他の AR 阻害剤は AR に対して高い阻害選択性を示した。Tolrestat と同じカルボン酸誘導体である epalrestat と zopolrestat では AKR1B10 の阻害が著しく弱く、また環状イミド体の2種 (minalrestat と fidarestat) 間では AR に対しては同程度の強い阻害を示したのに対して AKR1B10 阻害度が 30 倍以上異なった。Epalrestat と quercetin が基質に対して拮抗阻害を示したことは、tolrestat と同様に AR 阻害剤の多くが AKR1B10 の基質結合部位またはその近傍に結合することを示唆する。したがっ

て、tolrestat を除く AR 阻害剤の AKR1B10 阻害度の大きな差異は、それらの化学構造の違いに起因し、阻害剤結合部位内に AR と AKR1B10 間で構造の異なる部位が存在することを意味する。この部位は阻害剤に対する選択性決定部位であり、この部位の立体構造と阻害剤との相互作用の詳細が解明できれば、AR だけでなく AKR1B10 にもより選択的な阻害剤が創製できると推察される。現在臨床で使用されている epalrestat に加え、治験段階にある fidarestat の高い AR 阻害選択性は、副作用の少ない糖尿病合併症治療薬に関連すると考えられる。

NSAIDs のうち、アシルプロピオン酸誘導体とインドール酢酸誘導体は AKR1B10 と AR をほぼ同程度に阻害したのに対して、tolfenamic acid および meclofenamic acid を除く *N*-フェニルアントラニール酸誘導体、diclofenac および GA はより強く AKR1B10 を阻害することを見出した。これらの NSAIDs の AKR1B10 阻害選択性は既報の AKR1B10 阻害剤^{18,32,33)} よりも高い。これらの薬物は基質に対して拮抗阻害を示したことから、AKR1B10 の基質結合部位に結合すると示唆される。この点から、*N*-フェニルアントラニール酸誘導体間での AKR1B10 に対する阻害度の違いは、*N*-フェニルアントラニール酸のフェニル基の置換基の位置と種類に起因し、この阻害剤部分と相互作用する本酵素の基質結合部位あるいはその近傍のアミノ酸残基が AKR1B10 阻害剤の選択性決定部位であると考えられる。

NSAIDs は乳癌、前立腺癌、肺癌、大腸癌などに対する増殖抑制作用をもつため^{37,38)}、長期使用は上記癌のリスク軽減に効果があると知られている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。また、GA 投与は肝細胞腫瘍化と増殖を阻害することが報告されている^{38,39)}。これらの有益な効果は、主に cyclooxygenase (COX) -2 の阻害に起因すると考えられているが、COX に依存しない他の標的タンパク質を介した機序も提唱され^{37,38,47)}、その一つとして、AKR スーパーファミリーに属する AKR1C3 が報告された。AKR1C3 はステロイドホルモン受容体やプロスタグランジン受容体のリガンドを代謝することにより乳癌細胞の増殖を促進するため、本酵素の阻害が細胞増殖抑制効果につながると考えられている^{48,49)}。

AKR1C3 は sulindac、diclofenac および *N*-フェニルアントラニール酸誘導体によって阻害されるが⁵⁰⁻⁵³⁾、その IC₅₀ 値および K_{is} 値は AKR1B10 に対する値と同程度か、あるいはそれより大きい。また、GA は AKR1C3 を弱く阻害したのに対して AKR1B10 をより強く阻害した。さらに、次の NSAIDs を括弧内に示す投与量で経口投与した場合の最大血中濃度は、flufenamic acid (200 – 600 mg) で 14 – 42 μM⁵⁴⁾、mefenamic acid (250 – 500 mg) で 21 – 41 μM⁵⁴⁾、meclofenamic acid (100 mg) で 6 μM⁵⁵⁾、diclofenac (50 mg) で 12 μM⁵⁶⁾ であり、各薬物の AKR1B10 に対する K_{is} 値より高かった。したがって、NSAIDs は抗炎症治療の有効濃度域において十分な AKR1B10 阻害効果を発現すると考えられるため、NSAIDs による治療は AKR1B10 が発現上昇する癌種においては、AKR1B10 阻害を介して増殖抑制効果に寄与することが推察される。

第2章 植物成分による AKR1B10 の阻害

第1節 緒言

いくつかの植物は経験的な奏効率の高さに基づいて古来より種々の疾病治療に用いられ、薬草または薬用植物と呼ばれている。こうした植物に含まれる成分の様々な生理作用の機序は未だ解明されていないものが多い。第1章において、抗癌作用が報告されている NSAIDs に加えて、甘草の薬効成分 GA にも AKR1B10 の選択的阻害作用があることを見出し、抗癌作用に AKR1B10 阻害の関与が示唆された。GA 以外にも抗癌作用あるいは癌細胞増殖抑制作用が認められている植物成分は多い。本章では、これらの作用と AKR1B10 阻害の関連をさらに検討するとともに、AKR1B10 に対してより選択的かつ強力な阻害を示す新規構造の化合物を見出すため、以下の植物成分について AKR1B10 に対する阻害効果を検討した。①キサントン：マンゴスチン (*Garcinia mangostana*) に含まれるキサントンは、AKR1B10 阻害剤としてすでに報告されている三環系化合物 9-methyl-2,3,7-trihydroxy-6-fluorone³²⁾ に類似した構造であり、抗酸化作用、抗癌作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗菌作用など様々な薬理学的作用を示す⁵⁷⁾。その抗癌作用は、癌細胞の細胞周期の停止、増殖抑制、アポトーシスと分化の誘導、接着・浸潤・転移の阻害などによると報告されている^{57,58)}。②ポリフェノール：ウコン (*Curcuma longa*) に含まれる curcumin (Cur) は、種々の炎症性サイトカイン受容体のダウンレギュレーション、癌細胞の生存機序抑制、癌抑制遺伝子 p53 を介したアポトーシス誘導、EGFR 活性化の阻害などを示し⁵⁹⁾、その誘導体も抗癌作用を示すため癌治療効果が期待されている⁶⁰⁾。また、Cur を含めた magnolol、resveratrol などの植物由来ポリフェノールは、細胞癌化に関与する転写因子 Stat-3 (signal transducer and activator of transcription 3) の抑制に関与し⁶¹⁾、中国の伝統的ハーブに含まれる honokiol は、大腸癌細胞、肺癌細胞、白血病細胞などの癌細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導に関与する⁶²⁾ など、ポリフェノールの抗癌作用については多くの報告がある。③トリテルペノイド：第1章において AKR1B10 に比較的高い阻害

選択性を見出した GA を含めて、トリテルペノイドの ursolic acid (UA) と oleanolic acid (OA) は、固形腫瘍形成や腫瘍進展の抑制^{63,64)}、caspase-3 および caspase-9 の活性化を介したアポトーシス誘導^{65,66)}などの抗癌作用を示すと報告されている。以上の植物成分について、ヒト AR と対比して AKR1B10 の阻害効果・阻害選択性を評価し、AKR1B10 選択性の高かった植物成分について細胞レベルでの AKR1B10 による代謝と増殖への影響を検討した。

第 2 節 実験材料および実験方法

1. 植物成分

α -Mangostin、 γ -mangostin、mangostinone、1,5-dihydroxy-2-isopropyl-3-methoxyxanthone (1,5-DIMX) および 1,7-dihydroxy-2-isopropyl-3-methoxyxanthone (1,7-DIMX) は Asai ら⁶⁷⁾の方法に従ってマンゴスチン (*Garcinia mangostana*) 果皮より単離し、また OA と betulinic acid は柿 (*Diospyros kaki*) の蒂から Matsuura と Iimuma⁶⁸⁾の方法に従って単離した。Asiatic acid は岐阜薬科大学前教授 飯沼宗和博士から供与された。Bisdemethoxycurcumin (BDMC) と demethoxycurcumin (DMC) は長良サイエンス、erythrodiol は Cayman Chemical から購入した。その他の植物成分は和光純薬工業、東京化成工業および Sigma-Aldrich から入手した。

2. その他の実験材料

ヒト子宮頸癌 HeLa 細胞と大腸癌 HT29 細胞は American Type Culture Collection から入手した。培地の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は Sigma-Aldrich、ペニシリン G カリウムは萬有製薬、硫酸ストレプトマイシンはナカライテスクより購入した。Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) は日水製薬、非働化ウシ血清 (FBS) と Opti-MEM は GIBCO Laboratories、Lipofectamine 2000 は Invitrogen、2-(4-iodophenyl)-3-

(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt (WST-1) は同仁化学、 $[1-^{14}\text{C}]$ FOH は American Radiolabeled Chemicals から購入した。Mitomycin C は協和発酵化学から入手した。AKR1B10 真核細胞発現用ベクター (AKR1B10 cDNA を組み込んだ pGW1 ベクター)¹⁸⁾ は岐阜薬科大学 遠藤智史博士から供与された。その他、第 1 章 第 2 節に記載した実験材料に加え、特級または生化学用として市販されている試薬を用いた。

3. リコンビナント酵素の発現と精製

リコンビナント AKR1B10 およびヒト AR は、第 1 章 第 2 節に記載した方法に従って、発現・精製した。AKR1A1 は Iino ら⁴⁰⁾ の方法に従って、その cDNA を組み込んだ pCR T7/TOPO 発現ベクターを用いて大腸菌の系で発現、精製した。いずれの酵素も SDS-PAGE 分析により均一に精製されていることを確認した。

4. タンパク質定量

タンパク質定量は、第 1 章 第 2 節に記載した方法で行った。

5. 酵素活性測定

AKR1B10 とヒト AR の酸化還元活性および阻害剤による阻害度は、第 1 章 第 2 節に記載した方法で測定した。AKR1A1 の活性は、上記の酵素と同じ反応系で 10 mM D-glucuronate を基質として測定した。

6. 細胞培養実験

6-1. 細胞培養

HeLa 細胞および HT29 細胞は、37 °C、5% CO₂ 条件下の CO₂ インキュベーター中で培養し、その培地として、10% FBS、100 µg/mL 硫酸ストレプトマイシンおよび 100

U/mL ペニシリン G カリウムを含む DMEM (pH 7.4) を用いた。細胞の剥離には 0.25% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含む DPBS (pH 7.4) を用いた。

6-2. AKR1B10 過剰発現細胞の作製

Endo ら¹⁸⁾の方法に従って、Lipofectamine 2000 を用いて AKR1B10 真核細胞発現用ベクターを HeLa 細胞に導入することにより、AKR1B10 過剰発現細胞を調製した。これらの細胞の抽出液の本酵素抗体を用いた Western blot 分析および FAL 還元活性測定¹⁸⁾により、AKR1B10 の発現量はベクターだけで形質転換されたコントロール細胞に比べて約 8 倍増加していることを確認した。

6-3. FAL 代謝実験

AKR1B10 過剰発現細胞あるいはコントロール細胞が 60 mm ディッシュ中で 90% コンフルエントに達したところで、培地を 2% FBS 培地に置換して 2 時間培養した。阻害剤を培地に添加してさらに 2 時間培養後、終濃度 20 μ M の[1-¹⁴C] FOH を培地に添加し、6 時間培養を継続した。その培地を遠心分離 (1,500 x g、10 分間) により回収し、FOH およびその代謝物を 3 倍量の ethyl acetate に抽出し、有機溶媒層を乾固させた残渣を薄層クロマトグラフィー (Thin-Layer Chromatography; TLC) で分析した¹⁸⁾。TLC では試料を標品とともに展開後、FOH およびその代謝物をヨウ素によって可視化し、そのアイソトープ量は、48 時間 TLC プレートを[¹⁴C]-Imaging Plate に感光させた後、BASTM system (BAS-1500, Fuji Photo Film, Tokyo) によって測定した。

6-4. 細胞生存率の測定

培地に懸濁した細胞 200 μ L を 96 穴マルチプレート中に 2×10^4 cells ずつ播種し、一晩培養した後、培地中に阻害剤を添加してさらに 24 時間培養した。細胞生存率は WST-1 を用いた色素法⁶⁹⁾により算出した。

6-5. Mitomycin C 耐性 HT29 細胞の作製

Mitomycin C 耐性 HT29 細胞は、Matsunaga ら²⁶⁾の方法に従い、HT29 細胞を継続的

に mitomycin C 処理することにより調製した。処理に用いた mitomycin C 濃度は3継代毎に段階的 (0.01 – 0.5 μM) に増加させ、0.5 μM で生存する細胞を mitomycin C 耐性細胞とした。得られた耐性細胞は、コントロール細胞と比較して 2.5 倍高い mitomycin C に対する LD₅₀ 値 (50%致死量) を示した。その後の培養においては、48 穴プレートに 1×10^5 cells/well ずつ播種し、0.5 μM mitomycin C を含む培地で培養した。

6-6. 細胞増殖能の測定

Mitomycin C 耐性 HT29 細胞を 24 穴プレートに 5×10^4 cells/mL ずつ播種し、阻害剤存在下において 96 時間培養した。阻害剤添加後、0、48、96 時間経過後の生細胞数をトリパンブルー色素排除試験法⁷⁰⁾により計測した。

第3節 結果

1. キサントンによる AKR1B10 の阻害

5 種のキサントン (**Fig. 4**) による AKR1B10、AR および AKR1A1 の還元活性の阻害度を **Table 3** に要約した。AKR1B10 の還元活性に対して、キサントン骨格の 7 位が水酸基の γ -mangostin による阻害が最も強く ($\text{IC}_{50} = 0.018 \mu\text{M}$)、次いで 7 位がメトキシ基の α -mangostin が強い阻害を示した ($\text{IC}_{50} = 0.16 \mu\text{M}$)。キサントン骨格の 8 位にイソプレニル基を有していない mangostinone、1,5-DIMX および 1,7-DIMX の AKR1B10 阻害効果は低かった。1 位と 7 位に水酸基を持つ 1,7-DIMX は 1 μM 以下の IC_{50} 値を示したが、1 位と 5 位に水酸基を持つ 1,5-DIMX は 10 μM でもほとんど阻害を示さなかった。これらのキサントンの構造活性相関から 7 位水酸基が酵素との結合に重要であることが示唆された。AKR1B10、AR および AKR1A1 に対する阻害選択性を比較すると、1,5-DIMX はいずれの酵素に対しても阻害が弱かったが、それ以外の化合物は AKR1B10 をより強く阻害した。中でも α -mangostin は AR と AKR1A1 のいずれと比較しても AKR1B10 に対して最も高い阻害選択性を示した。

α -Mangostin および γ -mangostin は、既報の AKR1B10 阻害化合物^{18,32,33)}と同様に、AKR1B10 の還元反応において基質 pyridine-3-aldehyde に対して非拮抗阻害を、geraniol 酸化反応において基質に対して拮抗阻害を示した。酸化反応における α -mangostin と γ -mangostin の K_{is} 値はそれぞれ 80 ± 11 nM、 5.6 ± 0.7 nM と算出された。これらの阻害様式は tolrestat と同様であったこと¹⁸⁾から、 α -mangostin および γ -mangostin は AKR1B10-補酵素複合体の活性部位の基質と同じ位置もしくはオーバーラップする位置に結合することが示された。

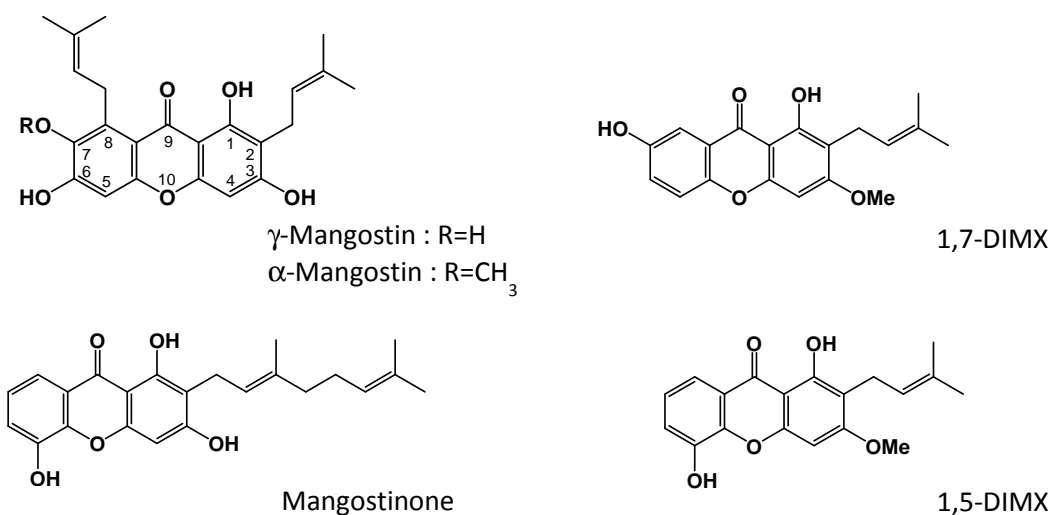


Fig. 4 Structures of xanthenes evaluated in this study.

Table 3. Effects of xanthenes on reductase activities of AKR1B10, AR and AKR1A1.

Inhibitor	IC ₅₀ (μ M)			Selectivity ^{a)}	
	AKR1B10	AR	AKR1A1	AR / 1B10	1A1 / 1B10
γ -Mangostin	0.018 ± 0.003	0.29 ± 0.03	1.7 ± 0.1	16	94
α -Mangostin	0.16 ± 0.01	4.1 ± 0.6	>10 ^{b)}	25	>63
Mangostinone	0.29 ± 0.01	3.3 ± 0.2	7.9 ± 0.5	11	27
1,7-DIMX	0.85 ± 0.05	3.8 ± 0.2	6.5 ± 0.1	4	8
1,5-DIMX	>10 ^{b)}	>10 ^{b)}	>10 ^{b)}	--	--

^{a)} Selectivity is expressed as a ratio of AR/AKR1B10 or AKR1A1/AKR1B10.

^{b)} Inhibition percentages are less than 20% at 10 μ M.

2. クルクミノイドによる AKR1B10 の阻害

2-1. 植物由来ポリフェノールの AKR1B10 阻害と選択性

検討した植物由来ポリフェノールの構造を **Fig. 5** に示す。クルクミノイドでは、芳香環の R_1 、 R_2 がともにメトキシ基の Cur、 R_1 が脱メトキシ化された DMC、両方が脱メトキシ化された BDMC の 3 種のウコン成分、ならびにジフェニル構造の honokiol、magnolol および resveratrol について、AKR1B10 と AR 阻害を評価し、その阻害度を **Table 4** に要約した。BDMC は AKR1B10 を最も低い IC_{50} 値 ($0.060 \mu\text{M}$) で阻害し、AR に対比して最も高い阻害選択性を示した。BDMC の芳香環にメトキシ基を 1 つないしは 2 つ有する DMC と Cur では、AKR1B10 の阻害効果および選択性はともに低かつ

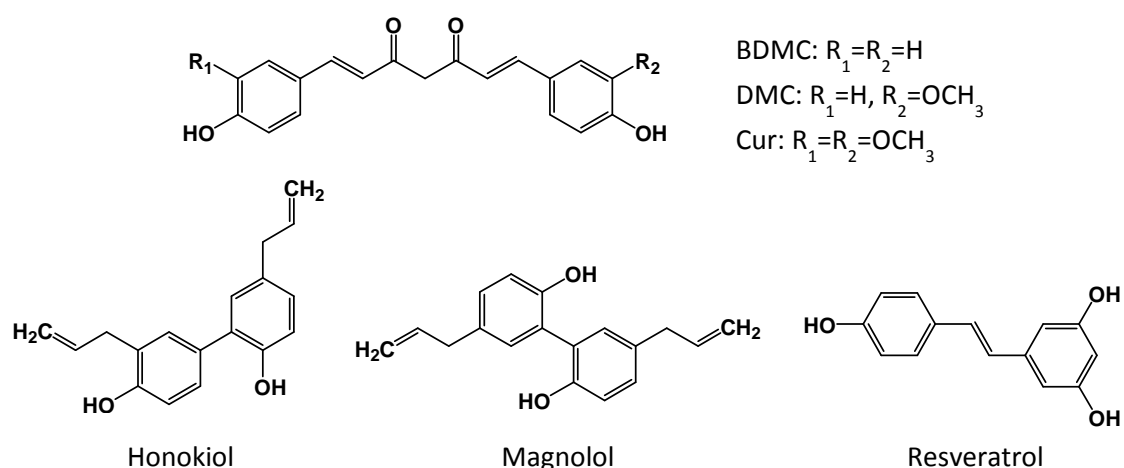


Fig. 5 Structures of plant polyphenols evaluated in this study.

Table 4. Effects of plant polyphenols on reductase activities of AKR1B10 and AR.

Inhibitor	IC_{50} (μM)		Selectivity ^{a)}
	AKR1B10	AR	AR / 1B10
BDMC	0.060 ± 0.009	5.1 ± 0.2	85
DMC	0.18 ± 0.01	1.2 ± 0.1	7
Cur	0.38 ± 0.05	7.3 ± 0.2	20
Magnolol	3.6 ± 0.2	28 ± 3	8
Honokiol	3.8 ± 0.1	36 ± 3	9
Resveratrol	5.0 ± 0.6	73 ± 5	12

^{a)} Selectivity is expressed as a ratio of AR/AKR1B10.

た。他のポリフェノールでは、AKR1B10 に対する阻害選択性は DMC とほぼ同程度であったが、AKR1B10 および AR に対する阻害効果はクルクミノイドより弱かった。なお、いずれの化合物も AKR1A1 を全く阻害しなかった (結果未掲載)。

BDMC は、前述の mangostin と同様に、AKR1B10 による pyridine-3-aldehyde 還元および geraniol 酸化反応において、それぞれの基質に対して非拮抗的および拮抗的に阻害した。同様に、DMC、Cur および honokiol も geraniol 酸化反応において基質に対して拮抗阻害を示した。BDMC、DMC、Cur および honokiol の K_{is} 値は、それぞれ 22 ± 4 nM、 60 ± 5 nM、 170 ± 30 nM および 1.9 ± 0.1 μ M と算出された。

2-2. 細胞における AKR1B10 による代謝の阻害

植物由来ポリフェノールの細胞レベルでの AKR1B10 阻害効果を評価するため、AKR1B10 を一過性に過剰発現させた HeLa 細胞において植物由来ポリフェノールの FAL 代謝に対する阻害効果を検討した (Fig. 6)。HeLa 細胞では、FOH を添加するとそのアルデヒド代謝物 FAL を経てカルボン酸代謝物 FA に代謝されるが、FAL は速やかに FA へ変換されるため、ほとんど検出することができない¹⁸⁾。ベクターだけで形質転換したコントロール細胞および過剰発現細胞を用いた本実験においても同様に、FOH の減少に伴い化学量論的にその代謝物として FA だけが増加した。AKR1B10 過剰発現細胞においてはコントロール細胞と比べて FA 生成量が減少し、この要因として AKR1B10 による FAL から FOH への還元反応の進行とそれに伴う FA への代謝速度の減少が考えられた。それに対し、AKR1B10 過剰発現細胞に AR 阻害剤 tolrestat の添加は、阻害剤無添加細胞に比べて FA 生成量が増加した。さらに、BDMC、Cur および honokiol でも同様の検討を行った結果、BDMC と Cur ではそれぞれ 1 μ M および 10 μ M から濃度依存的に FA 生成量の上昇がみられた。この FA から FOH の代謝阻害の IC_{50} 値は、tolrestat で 6 μ M、BDMC で 11 μ M、Cur で 61 μ M と算出された。Honokiol による阻害は Cur と同程度であったが、25 μ M 以上の濃度で細胞毒性を示したため

IC₅₀ 値は算出できなかった。

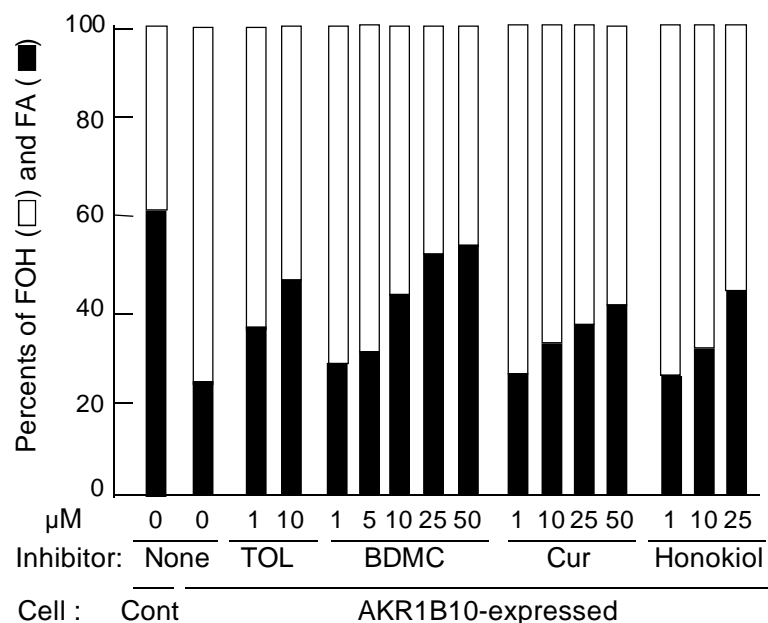


Fig. 6 Effects of plant polyphenols on the cellular FAL metabolism.

The control (Cont) and AKR1B10-expressed cells were pretreated with the indicated concentrations of tolrestat (TOL), BDMC, Cur and honokiol for 2 h, and then incubated with 20 μM [¹⁴C]FOH for 6 h. The radioactivities of FOH and FA in the media of duplicate experiments were measured, and are expressed as the mean percentages, relative to their sum.

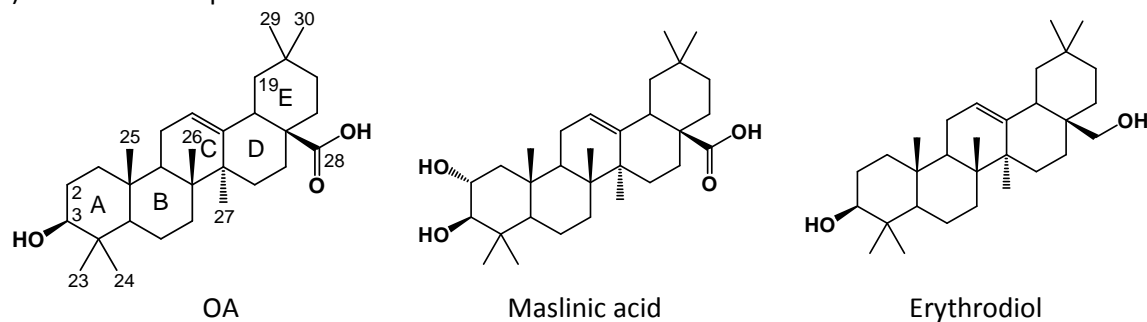
3. トリテルペノイドによる AKR1B10 の阻害

3-1. AKR1B10 阻害と選択性

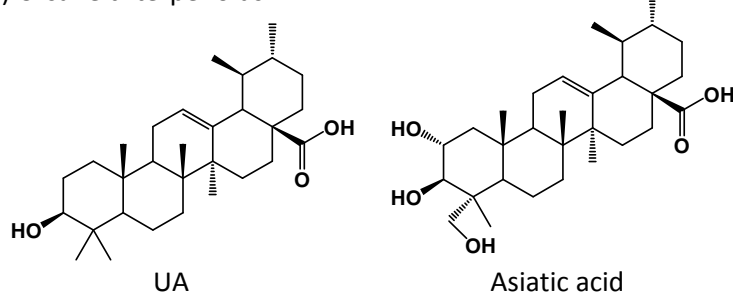
Fig. 7 に示す oleanane triterpenoid 3 種、ursane triterpenoid 2 種および lupane triterpenoid 1 種のトリテルペノイドによる AKR1B10 および AR の還元活性に対する阻害度を **Table 5** に要約した。AKR1B10 の還元活性に対して OA が最も低い IC₅₀ 値 (90 nM) を示し、AR に比べて約 1370 倍高い AKR1B10 阻害選択性を示した。この選択性は、これまでに報告されている AKR1B10 阻害剤の中で最も高い阻害選択性を示す isolithocholic acid (AR 阻害の約 255 倍)¹⁸⁾ より高かった。OA の水酸化誘導体である maslinic acid と erythrodiol では AKR1B10 に対する阻害効果は弱く、OA への 2α-水酸基の導入あるいは 28 位カルボキシ基の欠如が本酵素との結合に影響することが示唆された。Oleanane triterpenoid と異なる基本骨格を有する betulinic acid、UA および asiatic

acid では AKR1B10 に対する阻害効果は弱くなったことから、29 位および 30 位のメチル基と 28 位カルボキシ基が本酵素との結合に重要であることが示唆された。

(A) Oleanane triterpenoids



(B) Ursane triterpenoids



(C) Lupane triterpenoid

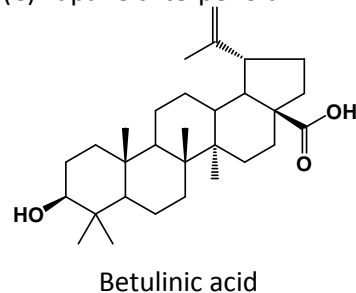


Fig. 7 Structures of pentacyclic triterpenoids evaluated in this study.

Table 5. Effects of pentacyclic triterpenoids on reductase activities of AKR1B10 and AR.

Inhibitor	IC ₅₀ (μM)		Selectivity ^{a)} AR / 1B10
	AKR1B10	AR	
<i>Oleanane triterpenoids</i>			
OA	0.090 ± 0.009	124 ± 25	1370
Maslinic acid	0.63 ± 0.05	72 ± 14	114
Erythrodiol	30 ± 3	84 ± 20	3
<i>Ursane triterpenoids</i>			
UA	4.0 ± 0.8	41 ± 1	10
Asiatic acid	5.9 ± 0.3	34 ± 5	6
<i>Lupane triterpenoid</i>			
Betulinic acid	2.0 ± 0.2	11 ± 2	6

^{a)} Selectivity is expressed as a ratio of AR/AKR1B10.

OA と UA の阻害様式を検討した結果、ともに AKR1B10 の pyridine-3-aldehyde 還元反応において基質に対して非拮抗阻害、geraniol 酸化反応では基質に対して拮抗阻害を示した。OA と UA の K_{is} 値はそれぞれ $0.072 \pm 0.12 \mu\text{M}$ と $2.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$ であった。

3-2. AKR1B10 過剰発現細胞における FAL 還元代謝の阻害

植物由来ポリフェノールの AKR1B10 阻害評価で作製した AKR1B10 過剰発現 HeLa 細胞を用いて、トリテルペノイドによる細胞レベルでの AKR1B10 阻害効果を検討した。添加する OA 濃度は細胞生存率が 80%以上を維持できる $30 \mu\text{M}$ を上限とした。OA 添加による FAL 代謝に対する阻害効果は $1 \mu\text{M}$ 以上の濃度において認められ、OA の IC_{50} 値は $4 \mu\text{M}$ と、tolrestat ($6 \mu\text{M}$) や前述のクルクミノイド ($11 - 61 \mu\text{M}$) より低い値を示した (Fig. 8)。さらに、第 1 章で検討したトリテルペノイドの GA についても同様に代謝阻害を比較した結果、FAL 代謝を $30 \mu\text{M}$ の終濃度において約 60%阻害したものの、OA より代謝阻害効果は弱かった。このように、細胞レベルにおいても OA が AKR1B10 を強く阻害することが示された。

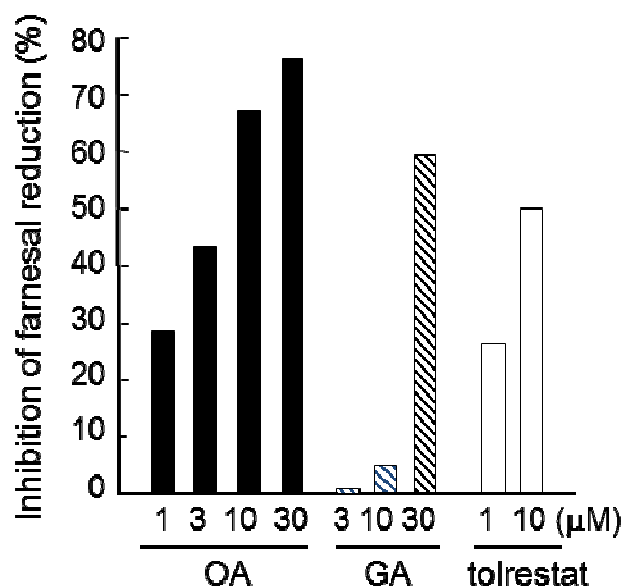


Fig. 8 Effects of pentacyclic triterpenoids on the cellular FAL metabolism.

The AKR1B10-expressed HeLa cells were pretreated with the indicated concentrations of OA, GA and tolrestat for 2 h, and then incubated with $20 \mu\text{M}$ $[1-^{14}\text{C}]\text{FOH}$ for 6 h. The inhibition percentages of the farnesal reduction by the inhibitors are expressed as the mean of duplicate experiments.

3-3. 抗癌剤耐性細胞の増殖阻害

ヒト大腸癌 HT29 細胞の mitomycin C 処理に対する耐性化に伴って AKR1B10 の発現が上昇することから、本抗癌剤毒性に対する耐性獲得への AKR1B10 の関与が示唆されている¹⁸⁾。そこで、mitomycin C 耐性 HT29 細胞の増殖に対する OA 添加の影響を検討した。AKR1B10 阻害化合物を添加しないコントロール細胞では指数関数的な増殖が認められたのに対して、OA は濃度依存的に細胞増殖を抑制し、その効果は 10 μM 以上において顕著であった。また、終濃度 30 μM の OA の阻害効果は同濃度の tolrestat とほぼ同程度であった (Fig. 9)。

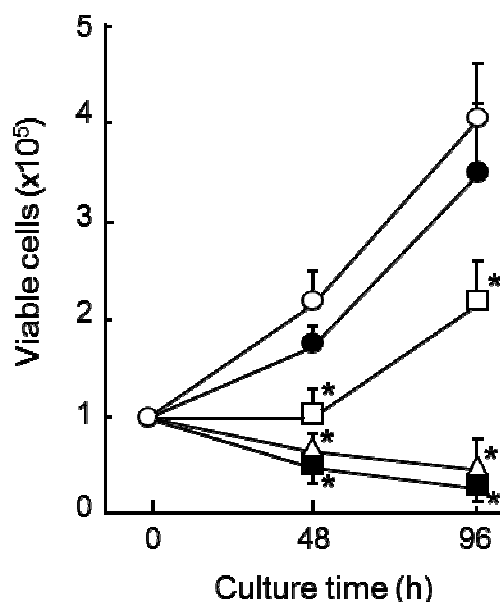


Fig. 9 Effect of OA on reversal of mitomycin C-resistant HT29 cells.

The cells were cultured in the medium containing 0.5 μM mitomycin C, and the viable cell numbers were estimated at the indicated times after the addition of the inhibitors. Inhibitors: 3 μM OA (●), 10 μM OA (□), 30 μM OA (■), and 30 μM tolrestat (Δ). *Significant difference from the control cells (without inhibitor: ○), $p < 0.05$ (by statistical evaluation using the unpaired Student's t -test).

第4節 考察

1. Mangostin による AKR1B10 の阻害

5種のキサントンによる阻害活性の違いから、AKR1B10阻害に必要な構造要因は以下のように考えられる。① 7位水酸基が遊離している γ -mangostinが最も強くAKR1B10を阻害し、この水酸基がメチル化された α -mangostinおよびこの水酸基がないmangostinoneの阻害は著しく低下した。また、1,7-DIMXによる中程度の阻害に対し、7位水酸基がない1,5-DIMXでは阻害作用がほとんど認められなかった。したがって、7位水酸基がAKR1B10の強力な阻害に最も重要であることが示唆された。② 8位イソプレニル基を有する α -mangostinと γ -mangostinは他の化合物よりAKR1B10の阻害選択性が比較的高かったことから、8位イソプレニル基は阻害の強さとともに選択性に寄与することが示唆された。

α -Mangostinと γ -mangostinには、抗癌作用に加えて、種々の標的タンパク質の活性と発現を調節することにより抗酸化作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、抗菌作用、抗ウイルス作用など多岐にわたる作用が知られている⁷¹⁾。このような標的タンパク質には、fatty acid synthase⁷²⁾、いくつかのcytochrome P450s⁷³⁾、12-lipoxygenase⁷⁴⁾、acidic sphingomyelinase⁷⁵⁾、Ca²⁺-ATPase⁷⁶⁾、aromatase⁷⁷⁾、HIV-1 protease⁷⁸⁾、Ca²⁺-およびcAMP-依存性 protein kinases⁷⁹⁾、inhibitor- κ B kinase⁸⁰⁾、COX-1およびCOX-2⁸¹⁾が含まれる。これら既知の標的酵素に対する α -mangostinと γ -mangostinのIC₅₀値は0.58 – 33 μ M⁷²⁻⁸¹⁾であり、本章で明らかにしたAKR1B10に対するIC₅₀値より高かった。著者が知るところでは、AKR1B10に対する γ -mangostinのIC₅₀値(0.018 μ M)は、今までに報告されている他の酵素に対する α -および γ -mangostinのIC₅₀値と比べて最も低い。 α -および γ -mangostinは様々なメカニズムを介して抗癌作用を示すことが報告されている^{57,58)}が、AKR1B10高発現が認められる癌においては、 γ -mangostinはAKR1B10の強力な阻害効果を介して抗癌作用に寄与することが推察された。

2. クルクミノイドによる AKR1B10 の阻害

検討した植物由来ポリフェノールのうち、クルクミノイド 3 種が AKR1B10 に対して強い阻害を示した。その阻害の強さは、**BDMC**>**DMC**>**Cur** の順であり、2 つの芳香環 3 位にメトキシ基が付加される程低くなった。このことは、クルクミノイドの芳香環の 3 位置換基が本酵素との結合に重要な構造要因であり、基質結合部位またはその近傍のアミノ酸と相互作用することを示唆する。また、クルクミノイドの阻害は **magnolol**、**honokiol** および **resveratrol** と比べて強かったので、2 つの芳香環の間にある程度の長さでかつ可動的なアルキル基は本酵素に結合しやすい構造要因の一つであることも示唆された。

植物由来ポリフェノールの細胞内 FAL 代謝に対する阻害効果は、細胞膜透過性などで IC_{50} 値に差異が認められたが、試験管内測定で得られた各化合物の阻害度とほぼ相関した。**BDMC**、**DMC** および **Cur** は、薬用植物 *Curcuma longa* や他の *Curcuma* 種の根茎に含まれる主なクルクミノイドである⁶⁰⁾。これらは香辛料のターメリックとして広く知られており、消化不良、肝炎、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、細菌性感染症などの治療に長年使用されてきた。さらにクルクミノイドは、多様な細胞内の標的タンパク質やシグナル経路を調節することにより増殖抑制作用、浸潤抑制作用、血管新生抑制作用なども示すと報告されている⁵⁹⁻⁶¹⁾。このような標的タンパク質には **COX**、**5-lipoxygenase**⁸²⁾、**farnesyl protein transferase**⁸³⁾、**glyoxalase I**⁸⁴⁾ や **proteasome**⁸⁵⁾ が含まれ、**Cur** によるこれらのタンパク質阻害がその抗癌作用に関係すると考えられている。これらの標的タンパク質に対する IC_{50} 値は本章で明らかにした **AKR1B10** に対する **Cur** の IC_{50} 値より高かった。また、**BDMC** および **DMC** の阻害効果については **farnesyl protein transferase**⁸³⁾ を除いてほとんど検討されていないが、**AKR1B10** に対する **BDMC** および **DMC** の阻害効果は **Cur** より強かった。以上より、**BDMC** および **DMC** などのクルクミノイドは非常に低濃度において **AKR1B10** を選択的阻害し、癌増殖や抗癌剤耐性化を抑制する有効な治療薬になりうることが推測された。

3. トリテルペノイドによる AKR1B10 の阻害

検討したトリテルペノイドのうち、OA が最も強力かつ選択的に AKR1B10 を阻害した。OA の 2 位に水酸基を置換した maslinic acid では阻害効果が低かったこと、およびその 2 位と 23 位が水酸基である asiatic acid では UA に比べてさらに阻害が弱くなったことから、2 α -水酸基はトリテルペノイドの他の部位 (第 3 章で述べる 3 β -水酸基) と本酵素阻害剤結合部位との相互作用に影響することが示唆された。28 位にカルボキシ基を有する他のトリテルペノイドに比べて、水酸基に置換された erythrodiol の阻害は最も弱かったので、28 位カルボキシ基も本酵素との結合に重要な構造要因である。28 位カルボキシ基を有するトリテルペノイドのうち、E 環がイソプロペニル基置換の 5 員環である betulinic acid は最も阻害が弱かったので、E 環がシクロヘキサン環であることも AKR1B10 阻害に必要な構造要因かもしれない。さらに、oleanane triterpenoid と ursane triterpenoid を比較すると、erythrodiol を除く oleanane triterpenoid の方が強い阻害を示したことから、両群化合物の違いである 29 位および 30 位のメチル基が酵素との結合に関与していると考えられた。

OA による AKR1B10 阻害の IC₅₀ 値は tolrestat および BDMC による値より大きい、細胞レベルでは同等もしくはより強く AKR1B10 を阻害することを明らかにした。これは、OA の方が tolrestat や BDMC より細胞内への移行性が良いことによるのかもしれない。また、AKR1B10 に対して選択性の高い OA は、AR と AKR1B10 をともに阻害する chromene-3-carboxamide 誘導体³³⁾ とほぼ同等に、mitomycin C 耐性 HT29 細胞の増殖も抑制した。OA は HT29 細胞に対して本研究で用いた終濃度 30 μ M においてもほとんど毒性を示さず、その LD₅₀ 値は 180 μ M と報告されている⁸⁶⁾ ので、耐性細胞の細胞増殖抑制は OA 自身の毒性によるものではないと考えられる。また、HT29 細胞の OA 処理によって AKR1B10 の mRNA 発現量は変化しなかった (結果未掲載)。したがって、OA による mitomycin C 耐性細胞の増殖抑制は主に AKR1B10 の活性阻害によるものと考えられる。AKR1B10 は mitomycin C 耐性獲得時においては酸化ストレ

スにより生成する細胞毒性アルデヒドを解毒し²⁶⁾、oxaliplatin 耐性においてはプレニル化を促進する¹⁶⁾と示唆されている。本研究で見出した AKR1B10 特異的阻害剤の OA は抗癌剤耐性化における AKR1B10 の役割の解明に貢献すると考えられる。

他のトリテルペノイドと同様に、OA は多様な細胞内の標的タンパク質やシグナル経路を調節することにより、抗炎症作用、抗 HIV 作用、抗悪性腫作用、細胞毒性作用、肝保護作用、血糖降下作用など多岐にわたる作用を示す⁶³⁻⁶⁶⁾。これらの標的酵素には COX⁸⁷⁾、DNA polymerase β ⁸⁸⁾、DNA ligase⁸⁹⁾、topoisomerase⁹⁰⁾、protein kinases⁹¹⁾、cytochrome P450s⁹²⁾、HIV-1 protease⁹³⁾、glycogen phosphorylase⁹⁴⁾、 α -glucosidase⁹⁵⁾、phospholipase A₂⁹⁶⁾ や protein tyrosine phosphatase 1B⁹⁷⁾ が含まれる。これらの酵素のうち、OA に対して最も阻害感受性が高い DNA polymerase β および phospholipase A₂ に対する IC₅₀ 値は 3 – 8.5 μ M^{88,96)} と、AKR1B10 に対する IC₅₀ 値 (0.090 μ M) よりも 30 倍以上高く、他の酵素に対する IC₅₀ 値は AKR1B10 より 100 倍以上高かった。したがって、AKR1B10 は現時点で OA に対して最も感受性が高いタンパク質である。このことは抗炎症作用や抗 HIV 作用など上述の OA の有益な効果に対する AKR1B10 の関与を示唆するため、これらの解明については今後の検討に期待したい。

第3章 AKR1B10の阻害選択性決定部位

第1節 緒言

AKR1B サブファミリーに属する AKR1B10 と AR は、アミノ酸配列が 71%一致するだけでなく (Fig. 10)、高次構造も類似する。両酵素を含み、AKR スーパーファミリーに属する酵素 20 種以上の結晶構造が解明され、その高次構造は 8 つの α ヘリックスと β シートから成る α/β バレルと呼ばれるコア構造と比較的大きな 3 つのループ (A、B および C) から形成されている (Fig. 11)^{5,98)}。ループ A、B および C は、AKR1B10 分子中のそれぞれ 110~138 番目、210~231 番目、297~307 番目のアミノ酸により構成される。ループ B を構成するアミノ酸は AKR1B サブファミリーに属する酵素間で保存されて補酵素の結合に関与するのに対し、ループ A と C には各酵素間で異なるアミノ酸が含まれ、これらのアミノ酸は各酵素に特徴的な基質認識において重要な役割を果たす。AKR スーパーファミリー酵素の活性部位はループ A と C に囲まれた α/β バレル構造の上部に位置し、酸または塩基触媒として働くアミノ酸は Tyr49 と His111 である。AKR1B10 では、唯一 NADP⁺ と tolrestat との複合体の結晶構造が解析され、その構造では tolrestat は上記の触媒残基に加え、Trp21、Val48、Trp80、Trp112、Phe116、Phe123、Trp220、His222、Cys299、Val301 および Gln303 に囲まれている³⁴⁾。Tolrestat は AKR1B10 と AR を同程度に阻害するので、両酵素の阻害選択性に関与するアミノ酸残基は不明である。これに対して、AR に比べて AKR1B10 に約 250 倍高い阻害選択性を示す isolithocholic acid の分子モデリング研究¹⁸⁾ から AR と異なる AKR1B10 の 3 つのアミノ酸残基 (Lys125、Gln114 および Ser304) が、また AR に比べて AKR1B10 を約 4 倍強く阻害する 9-methyl-2,3,7-trihydroxy-6-fluorone の分子モデリング研究³²⁾ では Lys125 と Gln303 がこの阻害特異性に重要であると推定されている。しかしながら、これらの研究では、AKR1B10 のアミノ酸置換による阻害特異性の変化などの解析による分子モデリングの精度は検討されていない。

AR	MASRLLLNNGAKMPILGLGT ²¹ WKSPPGQVTEAVKVAIDVGYRHIDCAH ⁴⁹ VYQNEVEVGVAIQ ⁶⁰
AKR1B10	--TFVE-STK-----V-----L-K-K-----A-----Y-----H---E---
AR	EKLREQVVKREELFIVSKL ⁸⁰ WCTYHEKGLVKGACQKTLSDLKLDYLDLYLI ¹¹¹ HWPT ¹¹⁴ GFKPGK ¹²⁰
AKR1B10	--IQ-KA----D-----P-FF-RP--RK-FE---K---S---V-----Q---S-D
AR	EF ¹²³ F ¹²⁵ LD ¹²⁵ ESGNVVPSTNILD ¹²⁵ TWAAMEELVDEGLVKAIGISNFNHLQVEMILNKPGLKYK ¹⁸⁰
AKR1B10	DL--K-DK--AIGGKATF--A-E-----V---S-F-I-KLL-----
AR	AVNQIECHPYLTQEKL ²²⁰ IQYCSKGI ²²⁰ VVTAYSPLGSPDRP ²²⁰ WAKPEDPSLLEDPRIKAIAAK ²⁴⁰
AKR1B10	VT--V-----H---T-----K--E----
AR	HNKTTAQVLIRFPMQRNLVVIPKSVTPERIAENFKVDFELSSQDMTLLSYN ³⁰⁰ RNRVCA ³⁰⁰
AKR1B10	-K--A-----HI---VI-----A--V--IQ---K--DEE-A-I--F-----A-N
AR	³⁰¹ LL ³⁰⁴ SCT ³¹⁶ SHKDYPFHEEF
AKR1B10	V-QSSHLE----NA-Y

Fig. 10 Alignment of amino acid sequences of human AR and AKR1B10.

Sequences of AR and AKR1B10 were aligned with ClustalW program. Residues interacting with the inhibitors are shown in red. The numbers of amino acids are taken from those of AKR1B10 residues.

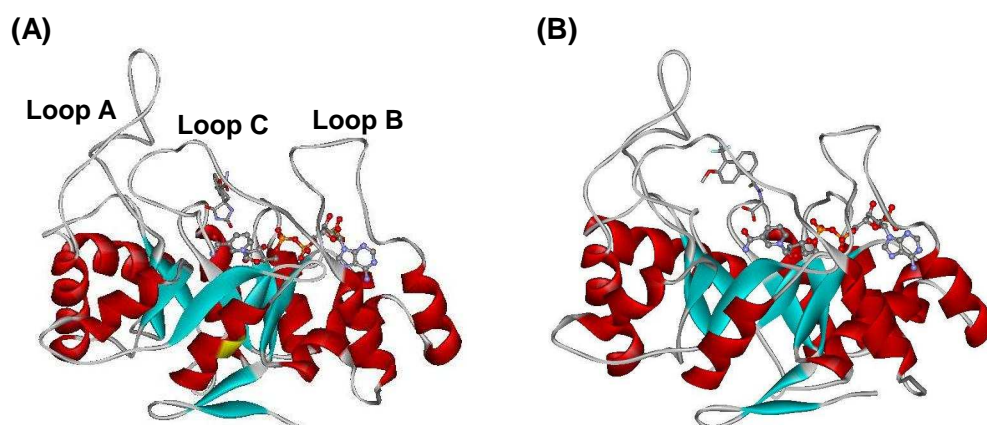


Fig. 11 Tertiary structures of human AR and AKR1B10.

(A) Human AR-NADP⁺-fidarestat complex (PDB code: 1PWM). (B) AKR1B10-NADP⁺-tolrestat complex (PDB code: 1ZUA). The bound AR inhibitor and NADP⁺ are displayed as stick style and scaled ball and stick style, respectively.

前章において、これまでに報告されている AKR1B10 阻害剤^{17,18,23,31-34)} よりも選択的に AKR1B10 を阻害する NSAIDs、キサントン、クルクミノイドおよびトリテルペノイドを明らかにした。これらの化合物群のうち、基本構造が同じであるにも拘わらず、置換基などの違いにより AKR1B10 に対する阻害の強さや選択性が大きく異なることが判明したので、このような阻害化合物の構造上の違いと本酵素のアミノ酸残基との相互作用を明らかにすれば、AKR1B10 の阻害選択性に重要な部位 (阻害選択性決定部位) を解明でき、より強力かつ選択的阻害剤の開発に寄与すると考えられる。そこで、本章では、AKR1B10 における各阻害剤の結合様式および阻害選択性決定部位を明らかにするため、AKR1B10-NADP⁺-tolrestat 三者複合体の結晶構造³⁴⁾ を基に各阻害剤の AKR1B10-補酵素複合体とのドッキングモデルを構築した。さらに、このドッキングモデルから示唆されるアミノ酸残基の阻害剤との相互作用を確認するため、部位特異的アミノ酸置換法を用いて AKR1B10 の残基をヒト AR の残基に置換した酵素を作製し、阻害効果へ与える影響を検討した。

第 2 節 実験材料および実験方法

1. 実験材料

QuickChange site-directed mutagenesis kit は Stratagene 社より購入した。その他の材料および試薬は第 1 章 第 2 節で使用したものと同一ものを用いた。

2. 阻害剤ドッキングモデルの作製

AKR1B10 とヒト AR の結晶の構造座標 (それぞれの PDB code は 1ZUA³⁴⁾ と 1PWM⁹⁹⁾) は、RCSB Protein Data Bank より入手した。AKR1B10 への阻害剤ドッキングモデルの構築は、Endo ら¹⁸⁾ の方法に従い、ドッキング解析プログラム Glide version 5.0¹⁰⁰⁾ および Maestro software package Version 8.5 (Schrödinger) を用いて行った。複数

得られた阻害剤結合モデルから、エネルギー的に最小の構造で、視覚的に活性部位およびその近傍のアミノ酸残基と相互作用が多く、かつ部位特異的変異導入の結果からも支持されるモデルを選択した。分子モデルの作図には PyMOL (DeLano Scientific) を用いた。

3. 部位特異的変異導入

部位特異的変異導入は、pCold I ベクターに組み込まれた AKR1B10 cDNA¹⁸⁾ を鋳型として、QuickChange site-directed mutagenesis kit を用いて Stratagene から提供されたプロトコールに従って実施した。AKR1B10 のアミノ酸 1 つまたは 2 つを目的とするアミノ酸に変異するためのプライマーの塩基配列を **Table 6** に示す。変異導入操作をした AKR1B10 cDNA に目的とする変異が導入され、それ以外には変異がないことを Beckman CEQ2000XL DNA シーケンサーを用いた塩基配列分析により確認した。

変異の標的としたアミノ酸は、分子モデリングにより阻害剤と相互作用すると示唆されたアミノ酸のうち、AKR1B10 と AR 間で保存されていないアミノ酸残基および相互作用の重要性が示唆された両酵素に共通なアミノ酸とした。具体的には、AKR1B10 の Gln114、Lys125、Val301 および Gln303 を、それぞれ AR に対応するアミノ酸 (**Fig. 10**) に置換し、Ser304 と Phe123 は Ala に置換した。また、両酵素間で保存されている Trp112 および Trp220 は、それぞれ小さな芳香環をもつ Phe および Tyr に置換した。

4. リコンビナント酵素の発現と精製

野生型 AKR1B10 およびその変異導入酵素の大腸菌の系における発現および精製は、第 1 章 第 2 節に記載した方法に従って行った。いずれの酵素も SDS-PAGE 分析により均一に精製されていることを確認した。

Table 6. Sequences of primers used for site-directed mutagenesis.

Mutation	Primer	Nucleotide sequence ^a
Trp112Phe	Forward	5'- CTATCTTATTCACT TTCC CACAGGGATTCA-3' (29)
	Reverse	5'- TGAATCCCTGTGG AAAGT GAATAAGATAG-3' (29)
Gln114Thr	Forward	5'- ATTCACTGGCCAAC CGGG ATTCAAGTCTG -3' (28)
	Reverse	5'- CAGACTTGAAT CCCGTT GGCCAGTGAAT-3' (28)
Phe123Ala	Forward	5'- AGTCTGGGGATGACCTT GCCCC CAAAGATGATAAAGG-3' (37)
	Reverse	5'- CCTTTATCATCTTTGGGG G CAAGGTCATCCCCAGACT-3' (37)
Lys125Leu	Forward	5'- GACCTTTTCC CTT AGATGATAAAGG-3' (26)
	Reverse	5'- CCTTTATCATCT TAAGGGG AAAAGGAC-3' (26)
Trp220Tyr	Forward	5'- TCCGGATAGACCT TAC GCCAAGCCAGAA-3' (28)
	Reverse	5'- TTCTGGCTTGGCG TAAGGT CTATCCGGA-3' (28)
Val301Leu	Forward	5'- AGGGCCTGTAAC CTGTT GCAATCCT-3' (25)
	Reverse	5'- AGGATTGCAAC AGGTT ACAGGCCCT-3' (25)
Gln303Ser	Forward	5'- CCTGTAACGTGTT GT CATCCTCTCAT-3' (26)
	Reverse	5'- ATGAGAGGAT GACA ACACGTTACAGG-3' (26)
Ser304Ala	Forward	5'- AACGTGTTGCAAG CCT CTCATTTGGAAG-3' (28)
	Reverse	5'- CTCCAAATGAGAG GCTT GCAACACGTT-3' (28)
Val301Leu/ Gln303Ser	Forward	5'- CCTGTAAC CTGTT GT CAT CCTCTCAT-3' (26)
	Reverse	5'- ATGAGAGGAT GACA ACAGGTTACAGG-3' (26)

^a) Mutated codons are indicated with bold letters, and total bases are shown in parentheses.

5. タンパク質定量および酵素活性測定

精製酵素のタンパク質量と酸化還元活性の測定、速度定数の算出および阻害度の測定は、第1章 第2節に記載した方法に従って行った。

第3節 結果

1. NSAIDs の結合様式

第1章で見出した比較的高い阻害選択性を示す NSAIDs のうち、*N*-フェニルアントラニール酸誘導体の mefenamic acid とトリテルペノイドの GA の結合様式を調べるため、AKR1B10-NADP⁺複合体とのドッキングモデルを構築した (Fig. 12A, 12B)。また、

両阻害剤の高い阻害選択性の構造的要因を明らかにするため、両ドッキングモデルを AR と AKR1B10 を阻害する tolrestat の AKR1B10-NADP⁺複合体結晶構造と比較した (Fig. 12C)。いずれの阻害剤も基質結合部位に結合し、その置換基 (mefenamic acid と tolrestat ではカルボキシ基、GA では 3β-水酸基) が AKR1B10 の触媒残基である Tyr49 および His111 の方向へ配向していた。一方、mefenamic acid のフェニル基の基質結合部位への配向は GA のオレアナン骨格、tolrestat のナフタレン環のいずれとも明確に違っていた (Fig. 12C)。Mefenamic acid ドッキングモデルでは、そのジメチルフェニル基と相互作用する残基は Trp80、Trp112 および Val301 の 3 残基であったのに対して (Fig. 12A)、GA のオレアナン骨格部は 6 つの残基 (Trp21、Trp112、Phe123、Lys125、Trp220 および Val301) に囲まれていた (Fig. 12B)。Lys125 は GA の 29 位カルボキシル基と静電的に結合し、Trp21、Phe123 および Trp220 はそのオレアナン骨格部と疎水的に相互作用した。両阻害剤の共通の結合残基である Val301 は、疎水性相互作用に重要であり、その主鎖のカルボニル基は Ser304 側鎖を介して Gln114 側鎖と水素結合ネットワークを形成していた。

ドッキングモデルで示された阻害剤との結合に関わる AKR1B10 のアミノ酸残基のうち、Gln114、Lys125、Val301、Gln303 および Ser304 はヒト AR の対応する残基 (それぞれ Thr、Leu、Leu、Ser および Cys) と異なる。Mefenamic acid および GA の AKR1B10 との結合と阻害選択性におけるこれらのアミノ酸の役割を検証するため、部位特異的変異導入法により各アミノ酸を AR の対応アミノ酸に置換した。ただし、Ser304 は AR では Cys であるが、ドッキングモデルで示された水素結合ネットワークを除去する目的も兼ね合わせて、Ala に置換した Ser304Ala 変異酵素を作製した。Mefenamic acid と GA に対する K_{is} 値に及ぼすこれらの変異導入の影響を Table 7 に示した。 K_{is} 値は阻害剤の本酵素への結合における解離定数であり、阻害親和性の程度を示す。Lys125Leu と Gln303Ser 変異を除き、他の変異導入は両阻害剤の親和性を WT と比較して 1.7 倍以上に低下させた。中でも Val301Leu 変異による両阻害剤の親和性の低下

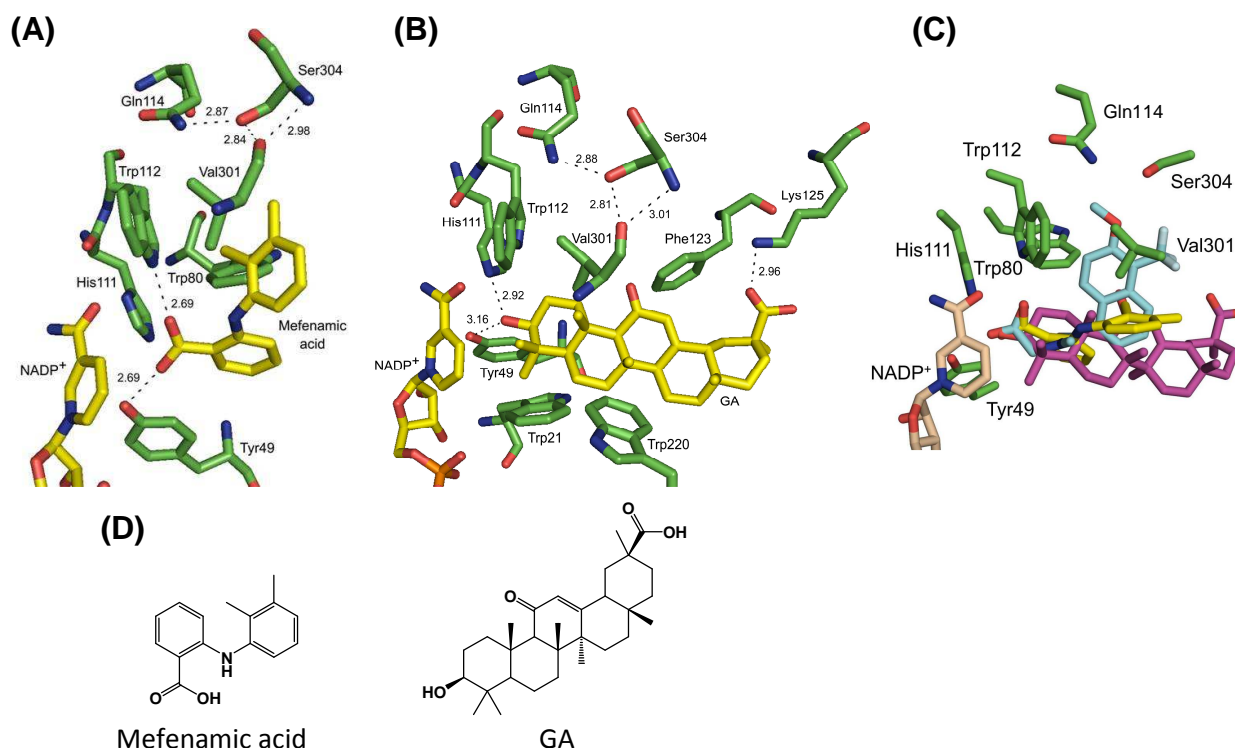


Fig. 12 AKR1B10 models docked with mefenamic acid and GA in the enzyme- NADP⁺ complex.

(A) Mefenamic acid-docked model. (B) GA-docked model. In addition to the portion of NADP⁺, residues within 3.5 Å from the inhibitor and those (Gln114 and Ser304) involved in the hydrogen-bond networks are depicted with possible hydrogen-bonds and electrostatic interactions (dotted line), whose distances are given in Å. (C) Comparison of the binding modes among mefenamic acid, GA and tolrestat (TOL). The structures of GA (purple) in the model B and TOL (sky-blue) in its AKR1B10 complex³⁴) were superimposed with the mefenamic acid (yellow)-docked model, in which only side-chains of the amino acids (green) are depicted. (D) Structures of mefenamic acid and GA.

Table 7. Effects of mutations of AKR1B10 on K_{is} values for NSAIDs.

Enzyme	Mefenamic acid ^{a)}		GA ^{a)}	
	K_{is} (μM)	Mu/Wt	K_{is} (μM)	Mu/Wt
Wild type	0.58	--	2.9	--
Gln114Thr	1.4 ± 0.2	2.4	15 ± 1	5.2
Lys125Leu	0.72 ± 0.12	1.2	8.9 ± 0.6	3.1
Val301Leu	2.1 ± 0.2	3.6	11 ± 0.4	3.8
Gln303Ser	0.38 ± 0.02	0.7	3.8 ± 0.7	1.3
Ser304Ala	1.0 ± 0.1	1.7	14 ± 2	4.8

^{a)} The inhibition patterns of the NSAIDs in the NADP⁺-linked geraniol dehydrogenase were all competitive with respect to the substrate. Mu/Wt represents the ratio of the K_{is} value for the mutant enzyme to that for wild type enzyme.

は大きく、WTと比較して3倍以上となった。ドッキングモデルでは直接相互作用が認められなかった Gln114 の Thr への置換も両阻害剤の親和性を低下させたことは、このアミノ酸残基が Val301 や Ser304 との水素結合ネットワークに重要であることを支持する。Lys125Leu 変異は mefenamic acid に対する K_{is} 値には影響を及ぼさなかったのに対し、GA に対する K_{is} 値を約3倍上昇させたことから、ドッキングモデルから推測された Lys125 の塩基性側鎖と GA の 29 位カルボニル基との静電的相互作用の存在が支持された。このように、Val301 による疎水性相互作用とともに、この Lys125 との静電的相互作用が GA による AKR1B10 選択性に寄与していることが示唆された。

2. キサントンの結合様式

第2章において、キサントンの α -および γ -mangostin は上記の NSAIDs よりも強く AKR1B10 を阻害し、また両者の構造の違いが単に7位の置換基 (α -mangostin ではメトキシ基に対して γ -mangostin では水酸基) であるにも拘わらず、阻害度が約9倍異なることを明らかにした。この強力な阻害をもたらす結合様式および両 mangostin 間における阻害度の差異をもたらす理由を明らかにするため、 α -mangostin (Fig. 13A) と γ -mangostin (Fig. 13B) の AKR1B10 へのドッキングモデルを構築した。両 mangostin はともに基質結合部位に位置し、7位置換基は触媒残基 (Tyr49) と Trp112 に向かって配向し、8位イソプレニル基は疎水性残基である Trp80、Trp112、Phe116 と Val301 に囲まれ、9位カルボニル基および1位水酸基は Gln303 の側鎖と水素結合が可能な距離 (3.0 – 3.3 Å) に近接していた。両 mangostin 間の明確な違いはキサントンの骨格と6位水酸基との相互作用に認められた。 α -Mangostin のキサントンの骨格は Phe123 の側鎖と疎水性相互作用しているのに対して、 γ -mangostin のキサントンの骨格は Phe123 に加えて Trp220 とも疎水性相互作用していた。6位水酸基は、 α -mangostin では Trp21 のインドール環の窒素原子と水素結合を形成しているのに対して、 γ -mangostin では His111

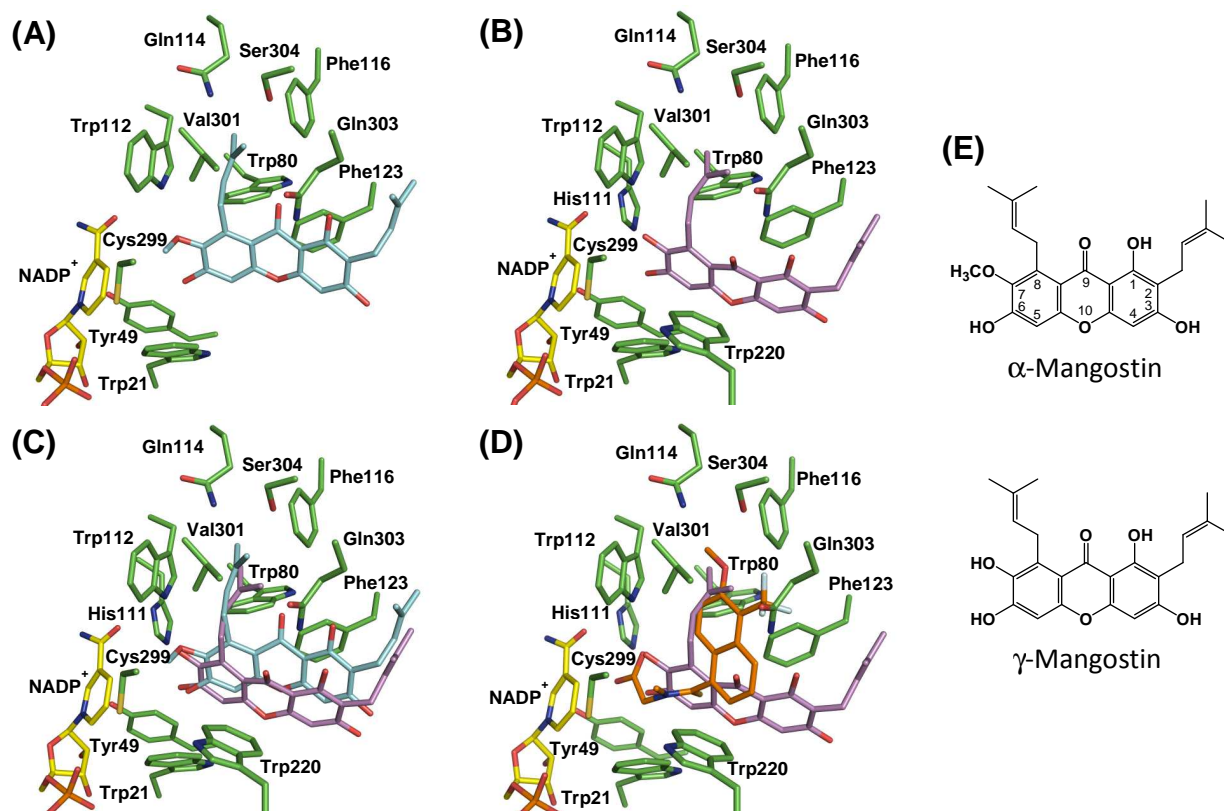


Fig. 13 Binding models of α -mangostin and γ -mangostin in the NADP⁺ complex of AKR1B10.

(A) α -Mangostin (sky-blue)-docked model. (B) γ -Mangostin (pink)-docked model. (C) Difference in orientations of α -mangostin and γ -mangostin, in which α -mangostin was superimposed onto the γ -mangostin-docked model. (D) Comparison of the binding modes between γ -mangostin and tolrestat. Tolrestat (orange) in the crystal structure of AKR1B10³⁴ was superimposed onto the γ -mangostin-docked model. The nicotinamide ribose portion of NADP⁺ (yellow) is depicted with the residues within 4.0 Å from the mangostins, of which Lys125 and Gly129 are not shown for clarity. (E) Structures of the mangostins.

Table 8. Effects of mutations of AKR1B10 on K_{is} values for α -mangostin and γ -mangostin.

Enzyme	α -Mangostin ^{a)}		γ -Mangostin ^{a)}	
	K_{is} (nM)	Mu/Wt	K_{is} (nM)	Mu/Wt
Wild type	80 ± 11	--	5.6 ± 0.7	--
Trp112Phe	57 ± 6	0.7	4.4 ± 0.4	0.8
Gln114Thr	120 ± 7	1.5	15 ± 2.7	2.6
Phe123Ala	349 ± 19	4.4	51 ± 5.8	9.1
Lys125Leu	169 ± 21	2.1	6.2 ± 1.5	1.1
Trp220Tyr	52 ± 3	0.7	17 ± 2.0	3.0
Val301Leu	68 ± 7	0.9	23 ± 5.9	4.2
Gln303Ser	99 ± 13	1.2	6.0 ± 0.4	1.1
Ser304Ala	123 ± 14	1.5	5.7 ± 0.7	1.0
Val301Leu/Gln303Ser	176 ± 14	2.2	38 ± 1.7	6.8

^{a)} The inhibition patterns of the two mangostins in the NADP⁺-linked geraniol dehydrogenase activity were all competitive with respect to the substrate. Mu/Wt represents the ratio of the K_{is} value for the mutant enzyme to that for the wild-type enzyme.

と相互作用し、その 10 位の酸素原子は Trp21 のインドール環の窒素原子と水素結合しうる距離に存在していた。 α -Mangostin と γ -mangostin のドッキングモデルをスーパーインポーズした **Fig. 13C** から明らかなように、 γ -mangostin のキサントン骨格は α -mangostin よりも Trp220 に接近していたため、この配向は γ -mangostin の 7 位置換基が α -mangostin のメトキシ基より小さい水酸基であることに起因すると示唆された。なお、AKR1B10 に結合した γ -mangostin と AKR1B10 複合体結晶構造の tolrestat のスーパーインポーズ図 (**Fig. 13D**) に示すように、両 mangostin の配向は、tolrestat とは異なり、むしろ前項に記載した GA とほぼ同じ部位に結合していた。

ドッキングモデルにおいて α -および γ -mangostin との結合に関与することが示されたアミノ酸残基のうち、変異導入により本酵素活性に大きな影響を及ぼさない 8 種のアミノ酸を **Table 8** に示すアミノ酸に置換した。AKR1B10 の Trp112 と Trp220 はインドール環より小さく窒素を含まない芳香環側鎖の Phe および Tyr に、また Phe123 は疎水性相互作用が少ない Ala に置換された。その他の残基は対応する AR の残基に置換し、Val301 と Gln303 については協調的な相互作用の可能性も考えてダブル変異酵素 Val301Leu/Gln303Ser も作製し、阻害に及ぼすそれらの影響を検討した。 α -および γ -mangostin に対する K_{is} 値は、Phe123Ala および Val301Leu/Gln303Ser の変異によって大きく上昇し、このことは少なくともドッキングモデルで示された Phe123 とキサントン骨格との相互作用を支持した。また、Val301Leu/Gln303Ser 変異、すなわち AKR1B10 の両残基の AR 残基への同時変異は、それぞれの残基のシングル変異に比べて大きく阻害が低下したため、両酵素間でのこの 2 つの残基の違いが mangostin の AKR1B10 選択性に関与すると示唆された。一方、Trp112Phe、Gln303Ser および Ser304Ala のシングル変異では影響がほとんど見られなかった。この 3 種の変異導入を除く他の変異導入は、 α -mangostin よりも γ -mangostin に対する K_{is} 値に大きな影響を及ぼし、Trp220Tyr と Val301Leu の変異によって γ -mangostin に対する K_{is} 値だけが 3 倍以上高くなった。この結果も AKR1B10 の阻害剤結合部位における両 mangostin の配

向の違いと一致した。

3. クルクミノイドの結合様式

植物由来ポリフェノールのうち、AKR1B10を強力かつ選択的に阻害したBDMCとAKR1B10に対する選択性が低かったCurについて、AKR1B10とのドッキングモデルを構築して両化合物の結合の違いを比較検討した (Fig. 14A, 14B)。本酵素の基質結合部位において、両クルクミノイドとも、一方のフェニル環の水酸基を触媒残基 (Tyr49 および His111) と補酵素のニコチンアミド部分に向け、ジケトン部で屈曲し、もう一方のフェニル環は本酵素との結晶構造のtolrestatのナフタレン環 (Fig. 14C) と類似し、ループ C 領域に向いていた。BDMC と Cur ドッキングモデル間では、二つのフェニル環水酸基と相互作用するアミノ酸残基が異なった。活性部位に入り込んだフェニル環の4位水酸基は、BDMCのモデル (Fig. 14A) では Tyr49 および His111 と水素結合したが、Curのモデル (Fig. 14B) では His111 のみが水素結合に関わっていた。また、もう一方のフェニル環の4位水酸基は、BDMCのモデル (Fig. 14A) では、Gln114 と Ser304 の側鎖と水素結合を形成したが、Curのモデル (Fig. 14B) では両残基との相互作用はなく、代わりに3位メトキシ基が Gln303 の側鎖とファンデルワールス相互作用できる位置に配向していた。両クルクミノイドの配向の違いはスーパーインポーズ図 (Fig. 14D) からも明らかなように、フェニル環の3位メトキシ基の有無でフェニル環の配向が変わり、触媒部位近傍とループ C の2領域において相互作用が異なることが示された。なお、BDMC と Cur の AKR1B10 への配向は阻害選択性のない tolrestat と類似しているが、上述の Gln114、Ser304 あるいは Gln303 との相互作用に加えて、tolrestat 結合モデル (Fig. 14C) には認められない Val301 および Trp220 との疎水性相互作用が両クルクミノイドの AKR1B10 選択性に関与していることが示唆された。

ドッキングモデルで阻害剤結合への関与が示された Gln114、Trp220、Val301 および Gln303 の変異酵素を用いて、BDMC、DMC および Cur の阻害効果に与えるそれらア

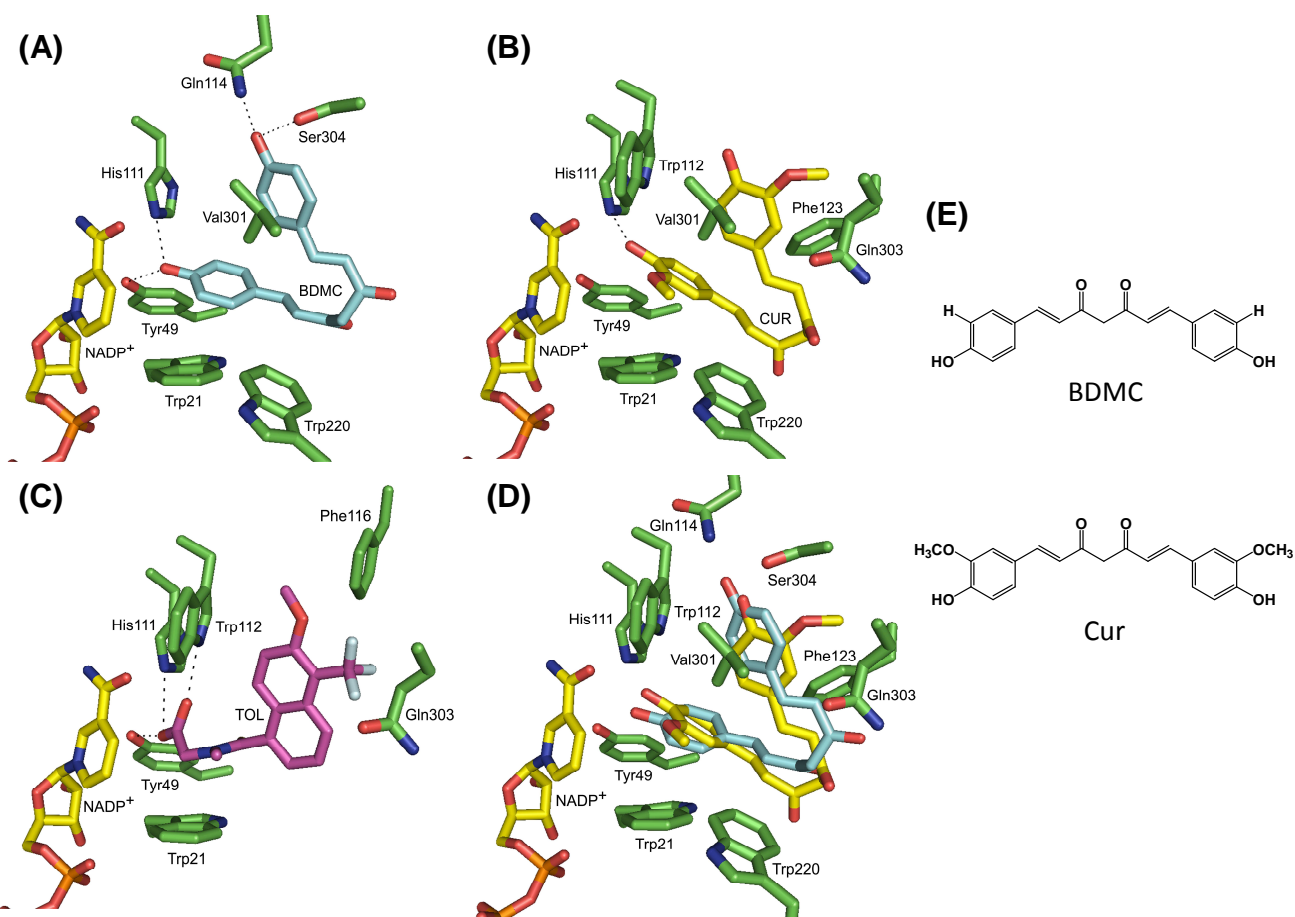


Fig. 14 The binding site of the AKR1B10 model docked with BDMC (A) and Cur (B) and that of tolrestat (TOL) in the crystal structure of its ternary complex (C).

(D) The structures of BDMC (sky-blue) and Cur (yellow) are superimposed. The nicotinamide nucleotide portion of NADP⁺ and residues within 3.5 Å from the curcuminoids and tolrestat are depicted with possible H-bonds. (E) Structures of BDMC and Cur.

Table 9. Effects of mutations of AKR1B10 on K_{is} values for curcuminoids.

Enzyme	BDMC ^{a)}		DMC ^{a)}		Cur ^{a)}	
	K_{is} (nM)	Mu/Wt	K_{is} (nM)	Mu/Wt	K_{is} (nM)	Mu/Wt
Wild type	22	--	65	--	170	--
Gln114Thr	65 ± 2	3.0	87 ± 9	1.4	290 ± 12	1.7
Trp220Tyr	440 ± 20	20	390 ± 30	6.0	500 ± 10	2.9
Val301Leu	110 ± 9	5.0	270 ± 11	4.2	1300 ± 100	7.6
Gln303Ser	70 ± 28	3.2	90 ± 8	1.4	670 ± 30	3.9
Ser304Ala	29 ± 2	1.5	54 ± 4	0.8	210 ± 10	1.2
Val301Leu /Gln303Ser	150 ± 22	6.8	470 ± 21	7.2	1500 ± 100	8.8

^{a)} The inhibition patterns of the two mangostins in the NADP⁺-linked geraniol dehydrogenase activity were all competitive with respect to the substrate. Mu/Wt represents the ratio of the K_{is} value for the mutant enzyme to that for the wild-type enzyme.

ミノ酸の影響を比較した (Table 9)。Val301Leu 変異により 3 つのクルクミノイドの K_{is} 値は WT と比較して 4.2~7.6 倍高い値となったことから、Val301 の側鎖との相互作用が結合に重要であることが判明した。Trp220Tyr 変異によって BDMC の K_{is} 値は最も大きく影響を受けて WT の約 20 倍高値となり、Cur や DMC の K_{is} 値も、BDMC の変化には及ばないが、それぞれ WT の 6.0 倍、2.9 倍高くなった。また、Gln114Thr 変異によって Cur の K_{is} 値はほとんど変化しなかったのに対して、BDMC の K_{is} 値は約 3 倍に上昇し、この結果はドッキングモデルから推測された BDMC と Cur の配向の違いと一致した。

4. トリテルペノイドの結合様式

OA と UA は E 環のメチル基の付加位置が異なるだけにも拘らず、geraniol 酸化反応における OA の K_{is} 値は UA より約 28 倍高かった。この違いをもたらす構造的要因を解明するため、OA、UA それぞれについて AKR1B10-補酵素複合体とのドッキングモデルを構築した (Fig.15A, 15B)。両トリテルペノイドは GA のドッキングモデルと同様に (Fig. 12B)、A 環から活性部位ポケットに入り、A 環の 3 β -水酸基が触媒残基 (Tyr49 および His111) と水素結合を形成していたが、両者間で環状構造部分の配向の違いがみられた。OA のモデルでは 28 位カルボキシ基と Gln303 が水素結合を形成するのに対し、UA のモデルでは Lys125 と水素結合を形成した。また、Trp220 の側鎖は OA の B 環および D 環と疎水性相互作用の形成が可能な距離 (3.2 – 4.1 Å)、また Val301 は OA の 25 位および 26 位のメチル基と近い距離 (それぞれ 4.1 Å および 4.1 Å) に位置したが、UA の該当部分は Trp220 および Val301 から遠く (> 4.6 Å)、相互作用は認められなかった。両者の配向の違いは OA と UA のスーパーインポーズ図 (Fig. 15C) から明らかなように、OA の方が UA より基質結合部位深部にまで入り込んでいた。OA は AR と比べて AKR1B10 に対して非常に高い阻害選択性を示した (約 1370 倍) ので、AR に対する低阻害の構造的理由を調べるため OA の AR ドッキングモデ

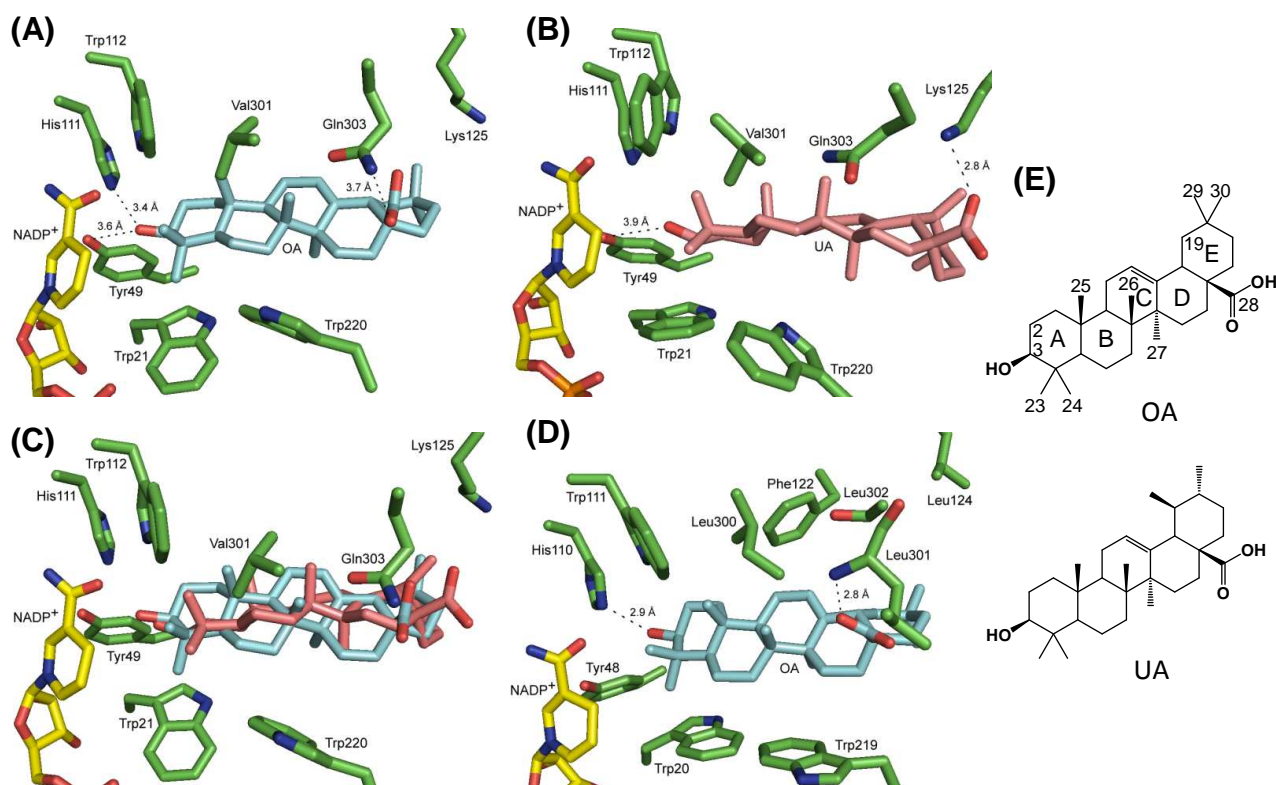


Fig. 15 Binding models of OA and UA in the NADP⁺ complexes of AKR1B10 and AR.

(A) OA-docked AKR1B10 model. (B) UA-docked AKR1B10 model. (C) Difference in orientation of OA (sky-blue) and UA (purple-pink), in which UA was superimposed onto the OA-docked AKR1B10 model. (D) OA-docked AR model, in which its amino acid numbers correspond to those + 1 of AKR1B10. The nicotinamide portion of NADP⁺ (yellow) and residues interacting with the triterpenoids are depicted with possible hydrogen bonds. Among the residues within 4.0 Å from the triterpenoids, some residues of AKR1B10 (Val48, Trp80, Phe123 and Cys299) and those of AR (Val47, Trp79, Phe218, Cys298 and Ala299) are not shown. (E) Structures of OA and UA.

Table 10. Effects of mutations of AKR1B10 on K_{is} values for OA and UA.

Enzyme	OA ^{a)}		UA ^{a)}	
	K_{is} (nM)	Mu/Wt	K_{is} (μM)	Mu/Wt
Wild type	72 ± 12	--	2.0 ± 0.2	--
Lys125Leu	160 ± 21	2	2.8 ± 0.3	1.4
Trp220Tyr	3560 ± 240	49	6.0 ± 0.5	3.0
Val301Leu	940 ± 100	13	2.1 ± 0.2	1.1
Gln303Ser	660 ± 40	9	3.7 ± 0.5	1.9

^{a)} The inhibition patterns of the triterpenoids in the NADP⁺-linked geraniol dehydrogenase activity were all competitive with respect to the substrate. Mu/Wt represents the ratio of the K_{is} value for the mutant enzyme to that for the wild-type enzyme.

ルを構築した (Fig. 15D)。AR のアミノ酸番号は AKR1B10 と 1 残基ずれるので、Fig. 15D 中のアミノ酸番号に 1 を加えた番号が AKR1B10 の対応するアミノ酸となる。そのドッキングモデルでは、AKR1B10 と同様に、OA の 3 β -水酸基が AR の触媒残基の His110 (AKR1B10 で His111 に相当) と水素結合を形成し、オレアナン骨格が Trp219 (AKR1B10 で Trp220 に相当) と疎水性相互作用を形成することが示された。しかし、以下の 3 点で AKR1B10 とのドッキングモデルとの違いがみられた。① OA の 3 β -水酸基と AR の Tyr48 (AKR1B10 で Tyr49 に相当) の距離は遠く水素結合を形成しないこと、② OA の 28 位カルボキシ基は AR の Leu301 主鎖の窒素原子と水素結合を形成すること (AKR1B10 では Leu302 に相当するが、この相互作用はない)、ならびに、③ この Leu301 の側鎖は OA の 25 位および 26 位のメチル基と相互作用することである。なお、OA の AKR1B10 への配向は、前項のドッキングモデルで示した tolrestat、mefenamic acid、mangostin およびクルクミノイドと異なり、GA の配向に類似した。

上述のドッキングモデルで OA との結合への関与が示された AKR1B10 の Lys125、Trp220、Val301 および Gln303 について、それぞれの変異酵素を用いて OA および UA の阻害効果に与える影響を検討した (Table 10)。OA に対する K_{is} 値は、Lys125Leu を除き、他の 3 つの変異導入によって WT と比較して 9 倍以上に上昇し、特に Trp220Tyr と Val301Leu 変異ではそれぞれ WT の 49 倍と 13 倍高値を示した。これに対して、これらの変異導入の UA に対する K_{is} 値への影響は小さかった。ドッキングモデルで OA と類似の配向を示した GA に対する K_{is} 値の変化 (Table 7) と比べると、Val301Leu と Gln303Ser 変異は OA の K_{is} 値を大きく上昇させたのに対し、Lys125Leu 変異による K_{is} 値への影響は GA の方が大きかった。

第 4 節 考察

本章で見出した阻害剤のドッキングモデルにおける結合様式およびアミノ酸変異

による阻害効果への影響の比較から、AKR1B10の基質結合ポケットの7残基 (Gln114、Phe123、Lys125、Trp220、Val301、Gln303 および Ser304) が阻害剤との結合に関与することが明らかとなった。これらのうち、AR と異なる5残基 (Gln114、Lys125、Val301、Gln303 および Ser304) が、阻害剤の構造によって相互作用する残基の種類と数が異なるが、AKR1B10 阻害選択性の決定に重要であり、これらの残基で形成される基質結合ポケットの外側の部位が阻害剤選択性決定部位と考えられた。このことは、これら残基の AR の対応する残基への置換により、AKR1B10 も AR も同程度に阻害する tolrestat³⁴⁾ や chromene-3-carboxamide 誘導体³³⁾ では阻害度への影響がなく、AKR1B10 阻害選択性の isolithocholic acid¹⁸⁾ や 9-methyl-2,3,7-trihydroxy-6-fluorone³²⁾ では阻害を低下させる報告からも支持される。また、本研究においても AKR1B10 阻害選択性の低い γ -mangostin に比べて、より高選択的な mefenamic acid、BDMC および OA では上記の7残基の多くと相互作用が観察された。残りの2残基 (Phe123 および Trp220) は AR にも保存されているにも拘わらず、本研究で見出した阻害剤の結合に重要であるが、非特異的な tolrestat との結合には関与していない³⁴⁾。したがって、Phe123 および Trp220 は tolrestat と化学構造上異なる γ -mangostin、BDMC および OA の結合残基であり、この相互作用が上記の阻害剤選択性決定残基に対するこれら阻害剤の適切な配向を補助する役割を果たすと考えられた。このように、AKR1B10 に対して高選択的な阻害剤には、触媒残基 (Tyr49 および His111) に近接に配向あるいは相互作用が可能な官能基に加えて、① Phe123 および Trp220 と疎水的相互作用可能な芳香環あるいは疎水基を有し、② 阻害剤選択性決定部位のより多くの残基とより強い相互作用を形成できる構造であることが重要であると考えられる。著者らは、以上の AKR1B10 阻害剤選択性決定部位に関する知見を踏まえて、さらに強力かつ高選択的な AKR1B10 阻害剤を創製できた¹⁰¹⁾。したがって、本章で明らかにした AKR1B10 阻害剤選択性に関する構造知見は今後の AKR1B10 阻害剤の探索・創製研究につながるものと期待される。

AKR1B10 は、上述のように細胞の癌化に伴って発現上昇し、肝臓癌や肺癌などい

くつかの癌種において特異的に増加する⁶⁻¹³⁾ため、本酵素の特異的阻害剤は副作用が少なく、AKR1B10が高発現する癌種特異的な治療を可能にする。また、その阻害剤は mitomycin C などの抗癌剤に対する耐性を克服する補助化学療法剤としても有用であると予測されている^{16,25-28)}ため、本研究を通して得られた知見とそれに基づく AKR1B10 の強力かつ選択的阻害剤の更なる開発は、新規癌治療ストラテジーの提案と癌悪性難治化機序研究の進展に貢献できるものと考えられる。

総括

現行の癌化学療法において汎用される従来の細胞障害型抗癌剤は、骨髄抑制、嘔吐、臓器毒性などの重篤な副作用や連続投与による抗癌剤耐性化を誘起するため、多剤併用療法や緻密な薬物濃度モニタリングが必要となるなど医学的かつ医療経済的な負担が急増している。また、近年の癌治療研究の急速な進歩により、異常増殖や周辺組織への浸潤・転移など癌細胞特有の機能を標的とした分子標的薬の開発が進んでいるが、新たな副作用の出現や煩雑な使用制限などクリアしなければならない課題は山積しているのが現状である。それ故、副作用低減と耐性獲得抑制に加えて、最近の治療ニーズの一つでもある臓器特異的治療を可能にする新規作用点を標的とした画期的な分子標的薬の開発が切望されている。最近、AKR スーパーファミリーに属する AKR1B10 は肺癌や肝臓癌で高発現し、癌細胞の増殖・進展、抗癌剤耐性獲得に密接に関わることが示唆されている。したがって、AKR1B10 は新規抗癌剤のみならず、抗癌剤耐性克服のための補助治療薬の開発における新しい標的であると考えられる。そこで本研究では、新規な構造をもつ AKR1B10 選択的阻害剤を見出すため、発癌リスク軽減作用あるいは抗癌作用が報告されている多様な薬物および植物成分について AKR1B10 阻害効果をその構造類似酵素 AR と対比して検討した。また、見出した AKR1B10 選択的阻害剤について部位特異的アミノ酸置換法と分子モデリング法を用いて AKR1B10 の阻害選択性決定部位の解析を行い、以下の知見を得た。

1. NSAIDs による AKR1B10 の選択的阻害

発癌リスク軽減作用が報告されている種々の NSAIDs による AKR1B10 阻害を検討した結果、tolfenamic acid および meclufenamic acid を除く *N*-フェニルアントラニール酸誘導体 (flufenamic acid および mefenamic acid) が AR に比べて 48 倍以上選択的に AKR1B10 を拮抗阻害 ($K_i = 0.35 - 0.58 \mu\text{M}$) した。これら薬物間で構造の異なるフェニ

ル基の置換基部分と相互作用する本酵素部位が阻害選択性に関係することが示唆された。

2. 植物成分による AKR1B10 の阻害

癌抑制作用が報告されている植物成分による AKR1B10 阻害を検討した結果、キサントンでは γ -mangostin ($IC_{50} = 18 \text{ nM}$)、クルクミンでは BDMC ($IC_{50} = 60 \text{ nM}$) およびトリテルペノイドでは OA ($IC_{50} = 90 \text{ nM}$) が最も強く AKR1B10 を阻害し、阻害様式はいずれも基質に対して拮抗型となった。 γ -Mangostin、BDMC および OA は AR と比べてそれぞれ 16、85 および 1370 倍高い AKR1B10 阻害選択性を示した。また、OA は細胞レベルにおいても $1 \mu\text{M}$ の濃度から AKR1B10 による代謝を阻害し、mitomycin C 耐性化による AKR1B10 発現上昇に伴う癌細胞の増殖を抑制した。

3. AKR1B10 の阻害選択性決定部位

Mefenamic acid、 γ -mangostin、BDMC および OA の AKR1B10 とのドッキングモデルの構築ならびに部位特異的アミノ酸置換による阻害度への影響を検討した結果、阻害剤結合に関与する部位として本酵素基質結合部位の 7 アミノ酸残基 (Gln114、Phe123、Lys125、Trp220、Val301、Gln303 および Ser304) を同定した。これらのうち、AR と異なる 5 アミノ酸残基 (Gln114、Lys125、Val301、Gln303 および Ser304) が選択的阻害剤との相互作用に重要であることが示された。また、AKR1B10 と AR 間で保存されている 2 アミノ酸残基 (Phe123 および Trp220) は、阻害剤が阻害選択性決定部位に対して適切な配向をとるために補助的な役割を果たすアミノ酸であると考えられた。

以上、本研究では、選択的 AKR1B10 阻害剤として NSAIDs や植物成分を見出し、本酵素の阻害選択性決定部位を明らかにした。最も強力かつ高選択的に AKR1B10 を

阻害した OA は、培養癌細胞を用いた検討において AKR1B10 阻害効果を実証できたことから、AKR1B10 を高発現する癌種に対する新規抗癌剤や抗癌剤耐性克服薬として有用であると考えられた。本研究で得られた知見は、これらの薬物と植物成分による抗癌作用の新機序を示唆するとともに、今後の AKR1B10 阻害剤の創製研究に寄与するものと考えられる。

謝辞

本稿を終わるに臨み、本研究に終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学前教授 原明 博士ならびに岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室准教授 松永俊之博士に深甚なる謝意を表します。

本論文の御校閲を頂きました岐阜薬科大学生命薬学大講座衛生学研究室教授 永瀬久光博士、医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室教授 足立哲夫博士および機能分子学大講座薬理学研究室教授 稲垣直樹博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行う環境と機会を与えて頂きました愛知学院大学薬学部臨床薬剤学講座教授 山村恵子博士に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多岐にわたる御指導および御助言を賜りました岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室助教 遠藤智史博士に深く感謝致します。

また、共同研究を御快諾いただき、有益なる御助言および御指導を賜りました Monash 大学 Ossama El-Kabbani 准教授、岐阜薬科大学前教授 飯沼宗和博士ならびに富山大学工学部生命工学科生体機能性分子工学研究室教授 豊岡尚樹博士に深謝致します。

最後に、様々な面で惜しみない御協力を頂きました岐阜薬科大学生化学研究室内の諸氏に心より感謝致します。

参考文献

- 1) 厚生労働省大臣官房統計情報部編, 人口動態統計 (2012).
- 2) 横田千津子, 池田宇一, 大越教夫 監修・編集, 薬局, **61**, 1994–1999 (2010).
- 3) Jez J.M., Flynn T.G., Penning T.M. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 639–647 (1997).
- 4) Mindnich R.D., Penning T.M. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. *Hum. Genomics.*, **3**, 362–370 (2009).
- 5) Barski O.A., Tipparaju S.M., Bhatnagar A. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab. Rev.*, **40**, 553–624 (2008).
- 6) Cao D., Fan S.T., Chung S.S. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J. Biol. Chem.*, **273**, 11429–11435 (1998).
- 7) Satow R., Shitashige M., Kanai Y., Takeshita F., Ojima H., Jigami T., Honda K., Kosuge T., Ochiya T., Hirohashi S., Yamada T. Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 2518–2528 (2010).
- 8) Heringlake S., Hofdmann M., Fiebeler A., Manns M.P., Schmiegel W., Tannapfel A. Identification and expression analysis of the aldo-ketoreductase1-B10 gene in primary malignant liver tumours. *J. Hepatol.*, **52**, 220–227 (2010).
- 9) Fukumoto S., Yamauchi N., Moriguchi H., Hippo Y., Watanabe A., Shibahara J., Taniguchi H., Ishikawa S., Ito H., Yamamoto S., Iwanari H., Hironaka M., Ishikawa Y., Niki T., Sohara Y., Kodama T., Nishimura M., Fukayama M., Dosaka-Akita H., Aburatani H. Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **11**, 1776–1785 (2005).
- 10) Li C.P., Goto A., Watanabe A., Murata K., Ota S., Niki T., Aburatani H., Fukayama M. AKR1B10 in usual interstitial pneumonia: expression in squamous metaplasia in association with smoking and lung cancer. *Pathol. Res. Pract.*, **204**, 295–304 (2008).
- 11) Yoshitake H., Takahashi M., Ishikawa H., Nojima M., Iwanari H., Watanabe A., Aburatani H., Yoshida K., Ishi K., Takamori K., Ogawa H., Hamakubo T., Kodama T., Araki Y. Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, **17**, 1300–1306 (2007).
- 12) Chung Y.T., Matkowskyj K.A., Li H., Bai H., Zhang W., Tsao M.S., Liao J., Yang G.Y. Overexpression and oncogenic function of aldo-keto reductase family 1B10

- (AKR1B10) in pancreatic carcinoma. *Mod. Pathol.*, **25**, 758–766 (2012).
- 13) Ma J., Luo D.X., Huang C., Shen Y., Bu Y., Markwell S., Gao J., Liu J., Zu X., Cao Z., Gao Z., Lu F., Liao D.F., Cao D. AKR1B10 overexpression in breast cancer: Association with tumor size, lymph node metastasis and patient survival and its potential as a novel serum marker. *Int. J. Cancer.*, **131**, E862–871 (2012).
 - 14) Yan R., Zu X., Ma J., Liu Z., Adeyanju M., Cao D. Aldo-keto reductase family 1B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: implication for cancer intervention. *Int. J. Cancer*, **121**, 2301–2306 (2007).
 - 15) Wang C., Yan R., Luo D., Watabe K., Liao D.F., Cao D. Aldo-keto reductase family 1 member B10 promotes cell survival by regulating lipid synthesis and eliminating carbonyls. *J. Biol. Chem.*, **284**, 26742–26748 (2009).
 - 16) Matsunaga T., Wada Y., Endo S., Soda M., El-Kabbani O., Hara A. Aldo-keto reductase 1B10 and its role in the development of anticancer drug-resistance. *Front. Pharmacol.*, **3**, 5 (2012).
 - 17) Crosas B., Hyndman D.J., Gallego O., Martras S., Parés X., Flynn T.G., Farrés J. Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem. J.*, **373**, 973–979 (2003).
 - 18) Endo S., Matsunaga T., Mamiya H., Ohta C., Soda M., Kitade Y., Tajima K., Zhao H.T., El-Kabbani O., Hara A. Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductase-like protein: Endogenous substrates and inhibition by steroids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **487**, 1–9 (2009).
 - 19) 曾我朋義, 江角浩安・編, がんと代謝, 実験医学増刊, **30**, (2012).
 - 20) Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol.*, **2012**, 137289 (2012).
 - 21) Martin H.J., Maser E. Role of human aldo-keto-reductase AKR1B10 in the protection against toxic aldehydes. *Chem. Biol. Interact.*, **178**, 145–150 (2009).
 - 22) Zhong L., Liu Z., Yan R., Johnson S., Fang X., Cao D. Aldo-Keto Reductase Family 1 B10 Protein Detoxifies Dietary and Lipid-Derived Alpha, Beta-Unsaturated Carbonyls at Physiological Levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **387**, 245–250.
 - 23) Martin H.J., Breyer-Pfaff U., Wsol V., Venz S., Block S., Maser E. Purification and characterization of AKR1B10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 464–470 (2006).
 - 24) Shen Y., Zhong L., Johnson S., Cao D. Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: a comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. *Chem. Biol. Interact.*, **191**, 192–198 (2011).

- 25) Zhong L., Shen H., Huang C., Jing H., Cao D. AKR1B10 induces cell resistance to daunorubicin and idarubicin by reducing C13 ketonic group. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **255**, 40–47 (2011).
- 26) Matsunaga T., Yamane Y., Iida K., Endo S., El-Kabbani O., Banno Y., Hara A. Involvement of the aldo-keto reductase, AKR1B10, in mitomycin-c resistance through reactive oxygen species-dependent mechanisms. *Anticancer Drugs*, **22**, 402–408 (2011).
- 27) Bacolod M.D., Lin S.M., Johnson S.P., Bullock N.S., Colvin M., Bigner D D., Friedman H.S. The gene expression profiles of medulloblastoma cell lines resistant to preactivated cyclophosphamide. *Curr. Cancer Drug Targets*, **8**, 172–179 (2008).
- 28) Hashimoto Y., Imanishi K., Tokui N., Okamoto T., Okamoto A., Hatakeyama S., Yoneyama T., Koie T., Kamimura N., Ohyama C. Carboplatin-gemcitabine combination chemotherapy upregulates AKR1B10 expression in bladder cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, **18**, 177–182 (2013).
- 29) Baba S.P., Barski O.A., Ahmed Y., O'Toole T.E., Conklin D.J., Bhatnagar A., Srivastava S. Reductive metabolism of AGE precursors: a metabolic route for preventing AGE accumulation in cardiovascular tissue. *Diabetes*, **58**, 2486–2497 (2009).
- 30) Nagata N., Kusakari Y., Fukunishi Y., Inoue T., Urade Y. Catalytic mechanism of the primary human prostaglandin F_{2α} synthase, aldo-keto reductase 1B1-prostaglandin D₂ synthase activity in the absence of NADP(H). *FEBS J.*, **278**, 1288–1298 (2011).
- 31) Verma M., Martin H.J., Haq W., O'Connor T.R., Maser E., Balendiran G.K. Inhibiting wild-type and C299S mutant AKR1B10; a homologue of aldose reductase upregulated in cancers. *Eur. J. Pharmacol.*, **584**, 213–221 (2008).
- 32) Zhao H.T., Soda M., Endo S., Hara A., El-Kabbani O. Selectivity determinants of inhibitor binding to the tumour marker human aldose reductase-like protein (AKR1B10) discovered from molecular docking and database screening. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 4354–4357 (2010).
- 33) Endo S., Matsunaga T., Kuwata K., Zhao H.T., El-Kabbani O., Kitade Y., Hara A. Chromene-3-carboxamide derivatives discovered from virtual screening as potent inhibitors of the tumour marker, AKR1B10. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 2485–2490 (2010).
- 34) Gallego O., Ruiz F.X., Ardèvol A., Domínguez M., Alvarez R., de Lera A.R., Rovira C., Farrés J., Fita I., Parés X. Structural basis for the high all-*trans*-retinaldehyde reductase activity of the tumor marker AKR1B10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 20764–20769 (2007).
- 35) El-Kabbani O., Podjarny A. Selectivity determinants of the aldose and aldehyde reductase inhibitor-binding sites. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 1970–1978 (2007).

- 36) Thun M.J., Henley S.J., Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.*, **94**, 252–266 (2002).
- 37) Rao C.V., Reddy B.S. NSAIDs and chemoprevention. *Curr. Cancer Drug Targets*, **4**, 29–42 (2004).
- 38) Kelloff G.J., Boone C.W., Crowell J.A., Steele V.E., Lubet R., Sigman C.C. Chemopreventive drug development: perspectives and progress. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **3**, 85–98 (1994).
- 39) Hibasami H., Iwase H., Yoshioka K., Takahashi H. Glycyrrhetic acid (a metabolic substance and aglycon of glycyrrhizin) induces apoptosis in human hepatoma, promyelotic leukemia and stomach cancer cells. *Int. J. Mol. Med.*, **17**, 215–219 (2006).
- 40) Iino T., Tabata M., Takikawa S., Sawada H., Shintaku H., Ishikura S., Hara A. Tetrahydrobiopterin is synthesized from 6-pyruvoyltetrahydropterin by the human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Arch. Biochem. Biophys.*, **416**, 180–187 (2003).
- 41) Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, **72**, 248–254.
- 42) Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature (London)*, **227**, 680–685 (1970).
- 43) Cornish-Bowden A. in *Principles of Enzyme Kinetics*. Butter-Worths, London. pp. 57–60 (1976).
- 44) Moran E.M. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **21**, 193–201 (2002).
- 45) Slatore C.G., Au D.H., Littman A.J., Satia J.A., White E. Association of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with lung cancer: results from a large cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **18**, 1203–1207 (2009).
- 46) Jafari S., Etminan M., Afshar K. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Can. Urol. Assoc. J.*, **3**, 323–330 (2009).
- 47) Kashfi K., Rigas B. Non-COX-2 targets and cancer: expanding the molecular target repertoire of chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 969–986 (2005)
- 48) Desmond J.C., Mountford J.C., Drayson M.T., Walker E.A., Hewison M., Ride J.P., Luong Q.T., Hayden R.E., Vanin E.F., Bunce C.M. The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the

- non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res.*, **63**, 505–512 (2003).
- 49) Penning T.M., Byrns M.C. Steroid Hormone Transforming Aldo-Keto Reductases and Cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1155**, 33–42 (2009).
 - 50) Bauman D.R., Rudnick S.I., Szewczuk L.M., Jin.Y., Gopishetty S., Penning T.M. Development of nonsteroidal anti-inflammatory drug analogs and steroid carboxylates selective for human aldo-keto reductase isoforms: potential antineoplastic agents that work independently of cyclooxygenase isozymes. *Mol. Pharmacol.*, **67**, 60–68 (2005).
 - 51) Gobec S., Brozic P., Rizner T.L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their analogues as inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3: new lead compounds for the development of anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 5170–5175 (2005).
 - 52) Byrns M.C., Steckelbroeck S., Penning T.M. An indomethacin analogue, N-(4-chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective inhibitor of aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3alpha-HSD, type 5 17beta-HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies. *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 484–493 (2008).
 - 53) Higaki Y., Usami N., Shintani S., Ishikura S., El-Kabbani O., Hara A. Selective and potent inhibitors of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) that metabolizes neurosteroids derived from progesterone. *Chem. Biol. Interact.*, **143–144**, 503–513 (2003).
 - 54) Aly F.A., Al-Tamimi S.A., Alwarthan, A.A. Determination of flufenamic acid and mefenamic acid in pharmaceutical preparations and biological fluids using flow injection analysis with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium (II) chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta*, **416**, 87–96 (2000).
 - 55) Koup J.R., Thomas D., Tucker E., Black A., Ruderman M., Dixon J.A., Kinkel A. Plasma and synovial fluid meclofenamic acid concentrations in patients with rheumatoid arthritis of the knee. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **35**, 199–202 (1988).
 - 56) Mukherjee B., Mahapatra S., Das S., Roy G., Dey, S. HPLC detection of plasma concentrations of diclofenac in human volunteers administered with povidone-ethylcellulose-based experimental transdermal matrix-type patches. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **28**, 301–306 (2006).
 - 57) Akao Y., Nakagawa Y., Iinuma M., Nozawa Y. Anti-cancer effects of xanthenes from pericarps of mangosteen. *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 355–370 (2008).
 - 58) Shan T., Ma Q., Guo K., Liu J., Li W., Wang F., Wu E. Xanthenes from mangosteen extracts as natural chemopreventive agents: potential anticancer drugs. *Curr. Mol. Med.*,

- 11**, 666–677 (2011).
- 59) Sa G., Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div.*, **3**, 14 (2008).
- 60) Itokawa H., Shi Q., Akiyama T., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin. Med.*, **3**, 11 (2008).
- 61) Aggarwal B.B, Sethi G., Ahn K.S., Sandur S.K., Pandey M.K., Kunnumakkara A.B., Sung B, Ichikawa H. Targeting signal-transducer- and-activator-of-transcription-3 for prevention and therapy of cancer: modern target but ancient solution. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1091**, 151–169 (2006).
- 62) Liu H., Zang C., Emde A., Planas-Silva M.D., Rosche M., Kuhn A., Schulz C.O., Elstner E., Possinger K., Eucker J. Anti-tumor effect of honokiol alone and in combination with other anti-cancer agents in breast cancer. *Eur. J. Pharmacol.*, **591**, 43–51 (2008).
- 63) Ovesná Z., Vachálková A., Horváthová K., Tóthová D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. Minireview. *Neoplasma*, **51**, 327–333 (2004).
- 64) Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.*, **49**, 57–68 (1995).
- 65) Laszczyk M.N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med.*, **75**, 1549–1560 (2009).
- 66) Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 394–411 (2006).
- 67) Asai F., Tosa H., Tanaka T., Iinuma M. A xanthone from pericarps of *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry*, **39**, 943–944 (1995).
- 68) Matsuura S., Iinuma M. Studies on the constituents of the useful plants. IV. The constituents of calyx of *Diospyros kaki*. *Yakugaku Zasshi*, **97**, 452–455 (1977).
- 69) Usui S., Matsunaga T., Ukai S., Kiho T. Growth suppressing activity for endothelial cells induced from macrophages by carboxymethylated curdlam. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1924–1925 (1997).
- 70) Bardon S., Vignon F., Montcourrier P., Rochefort H. Steroid receptor-mediated cytotoxicity of an antiestrogen and an antiprogesterin in breast cancer cells. *Cancer Res.*, **47**, 1441–1448 (1987).
- 71) Pedraza-Chaverri J., Cárdenas-Rodríguez N., Orozco-Ibarra M., Pérez-Rojas J.M. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem. Toxicol.*, **46**,

- 3227–3239 (2008).
- 72) Jiang H.Z., Quan X.F., Tian W.X., Hu J.M., Wang P.C., Huang S.Z., Cheng Z.Q., Liang W.J., Zhou J., Ma X.F., Zhao Y.X. Fatty acid synthase inhibitors of phenolic constituents isolated from *Garcinia mangostana*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 6045–6047 (2010).
 - 73) Foti R.S., Pearson J.T., Rock D.A., Wahlstrom J.L., Wienkers L.C. In vitro inhibition of multiple cytochrome P450 isoforms by xanthone derivatives from mangosteen extract. *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 1848–1855 (2009).
 - 74) Deschamps J.D., Gautschi J.T., Whitman S., Johnson T.A., Gassner N.C., Crews P., Holman T.R. Discovery of platelet-type 12-human lipoxygenase selective inhibitors by high-throughput screening of structurally diverse libraries. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 6900–6908 (2007).
 - 75) Okudaira C., Ikeda Y., Kondo S., Furuya S., Hirabayashi Y., Koyano T., Saito Y., Umezawa K. Inhibition of acidic sphingomyelinase by xanthone compounds isolated from *Garcinia speciosa*. *J. Enzyme Inhib.*, **15**, 129–138 (2000).
 - 76) Furukawa K., Shibusawa K., Chairungsilerd N., Ohta T., Nozoe S., Ohizumi Y. The mode of inhibitory action of α -mangostin, a novel inhibitor, on the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pumping ATPase from rabbit skeletal muscle. *Jpn. J. Pharmacol.*, **71**, 337–340 (1996).
 - 77) Balunas M.J., Su B., Brueggemeier R.W., Kinghorn A.D. Xanthones from the botanical dietary supplement mangosteen (*Garcinia mangostana*) with aromatase inhibitory activity. *J. Nat. Prod.*, **71**, 1161–1166 (2008).
 - 78) Chen S.X., Wan M., Loh B.N. Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Med.*, **62**, 381–382 (1996).
 - 79) Jinsart W., Ternai B., Buddhasukh D., Polya G.M. Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and other kinases by mangostin and γ -mangostin. *Phytochemistry*, **31**, 3711–3713 (1992).
 - 80) Nakatani K., Yamakuni T., Kondo N., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Inoue H., Ohizumi Y. γ -Mangostin inhibits inhibitor- κ B kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells. *Mol. Pharmacol.*, **66**, 667–674 (2004).
 - 81) Nakatani K., Nakahata N., Arakawa T., Yasuda H., Ohizumi Y. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E_2 synthesis by γ -mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 73–79 (2002).
 - 82) Hong J., Bose M., Ju J., Ryu J.H., Chen X., Sang S., Lee M.J., Yang C.S. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects

- on cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis*, **25**, 1671–1679 (2004).
- 83) Kang H.M., Son K.H., Yang D.C., Han D.C., Kim J.H., Baek N.I., Kwon B.M. Inhibitory activity of diarylheptanoids on farnesyl protein transferase. *Nat. Prod. Res.*, **18**, 295–299 (2004).
- 84) Santel T., Pflug G., Hemdan N.Y., Schäfer A., Hollenbach M., Buchold M., Hintersdorf A., Lindner I., Otto A., Bigl M., Oerlecke I., Hutschenreuther A., Sack U., Huse K., Groth M., Birkemeyer C., Schellenberger W., Gebhardt R., Platzer M., Weiss T., Vijayalakshmi M.A., Krüger M., Birkenmeier G. Curcumin inhibits glyoxalase 1: a possible link to its anti-inflammatory and anti-tumor activity. *PLoS One*, **3**, e3508 (2008).
- 85) Milacic V., Banerjee S., Landis-Piwowar K.R., Sarkar F.H., Majumdar A.P., Dou Q.P. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, **68**, 7283–7292 (2008).
- 86) Juan M.E., Planas J.M., Ruiz-Gutierrez V., Daniel H., Wenzel U. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *Br. J. Nutr.*, **100**, 36–43 (2008).
- 87) Ringbom T., Segura L., Noreen Y., Perera P., Bohlin L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *J. Nat. Prod.*, **61**, 1212–1215 (1998).
- 88) Deng J.Z., Starck S.R., Hecht S.M. DNA polymerase beta inhibitors from *Baeckea gunniana*. *J. Nat. Prod.*, **62**, 1624–1626 (1999).
- 89) Tan G.T., Lee S., Lee I.S., Chen J., Leitner P., Besterman J.M., Kinghorn A.D., Pezzuto J.M. Natural-product inhibitors of human DNA ligase I. *Biochem. J.*, **314**, 993–1000 (1996).
- 90) Syrovets T., Büchele B., Gedig E., Slupsky J.R., Simmet T. Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and IIalpha. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 71–81 (2000).
- 91) Wang B.H., Polya G.M. Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by amphiphilic triterpenoids and related compounds. *Phytochemistry*, **41**, 55–63 (1996).
- 92) Kim K.A., Lee J.S., Park H.J., Kim J.W., Kim C.J., Shim I.S., Kim N.J., Han S.M., Lim S. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. *Life Sci.*, **74**, 2769–2779 (2004).
- 93) Ma C., Nakamura N., Hattori M., Kakuda H., Qiao J., Yu H. Inhibitory effects on HIV-1 protease of constituents from the wood of *Xanthoceras sorbifolia*. *J. Nat. Prod.*, **63**,

- 238–242 (2000).
- 94) Chen J., Liu J., Zhang L., Wu G., Hua W., Wu X., Sun H. Pentacyclic triterpenes. Part 3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 2915–2919 (2006).
 - 95) Ali M.S., Jahangir M., Hussan S.S., Choudhary M.I. Inhibition of alpha-glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. *Phytochemistry*, **60**, 295–299 (2002).
 - 96) Dharmappa K.K., Kumar R.V., Nataraju A., Mohamed R., Shivaprasad H.V., Vishwanath B.S. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid by inhibition of secretory phospholipase A2. *Planta Med.*, **75**, 211–215 (2009).
 - 97) Li Y.F., Hu L.H., Lou F.C., Li J., Shen Q. PTP1B inhibitors from *Ardisia japonica*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **7**, 13–18 (2005).
 - 98) Ruiz F.X., Moro A., Gallego O., Ardèvol A., Rovira C., Petrash J.M., Parés X., Farrés J. Human and rodent aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily and their specificity with retinaldehyde. *Chem. Biol. Interact.*, **191**, 199–205 (2011).
 - 99) El-Kabbani O., Darmanin C., Schneider T.R., Hazemann I., Ruiz F., Oka M., Joachimiak A., Schulze-Briese C., Tomizaki T., Mitschler A., Podjarny A. Ultrahigh resolution drug design. II. Atomic resolution structures of human aldose reductase holoenzyme complexed with Fidarestat and Minalrestat: implications for the binding of cyclic imide inhibitors. *Proteins*, **55**, 805–813 (2004).
 - 100) Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., Halgren T.A., Klicic J.J., Mainz D.T., Repasky M.P., Knoll E.H., Shelley M., Perry J.K., Shaw D.E., Francis P., Shenkin P.S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.*, **47**, 1739–1749 (2004).
 - 101) Soda M., Hu D., Endo S., Takemura M., Li J., Wada R., Ifuku S., Zhao H.T., El-Kabbani O., Ohta S., Yamamura K., Toyooka N., Hara A., Matsunaga T. 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.*, **48**, 321–329 (2012).

略語表

ADH	Alcohol dehydrogenase
AGE	Advanced glycation end product
AKR	Aldo-keto reductase
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
AR	Aldose reductase
ATP	Adenosine triphosphate
BDMC	Bisdemethoxycurcumin
cDNA	Complimental DNA
COX	Cyclooxygenase
Cur	Curcumin
DIMX	Dihydroxy-2-isopropyl-3-methoxyxanthone
DMC	Demethoxycurcumin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium
dNTP	Deoxy nucleoside 5'-triphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FA	Farnesoic acid
FAL	Farnesal
FBS	Fetal bovine serum
FOH	Farnesol
GA	Glycyrrhetic acid
GGAL	Geranylgeranial
GGOH	Geranylgeraniol
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperadine- <i>N</i> -2-ethanesulfonic acid
HIV	Human immunodeficiency virus

HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
IC ₅₀	50% Inhibitory concentration
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopyranoside
LD ₅₀	50% Lethal dose
MAP	Mitogen-activated protein
1-Methoxy PMS	1-Methoxy-5-methyl-phenaziniummethylsulfate
MTT	Methylthiazole tetrazolium
2ME	2-Mercaptoethanol
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OA	Oleanoic acid
PCR	Polymerase chain reaction
RAR	Retinoic acid receptor
RT	Reverse transcription
RXR	Retinoid X receptor
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering RNA
TLC	Thin-layer chromatography
UA	Ursolic acid
WST-1	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt
WT	Wild type

論文目録

本学位論文内容は、以下の発表論文を総括したものである。

1. Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Midori Soda, Kazuo Tajima, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Akira Hara. Selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by antiinflammatory *N*-phenylanthranilic acids and glycyrrhetic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **33**, 886–890 (2010).
2. 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. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **389**, 128–132 (2009).
3. Mayuko Takemura, Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Midori Soda, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Kazuo Tajima, Munekazu Inuma, Akira Hara. Selective inhibition of the tumor marker aldo-keto reductase family member 1B10 by oleanolic acid. *Journal of Natural Products*, **74**, 1201–1206 (2011).
4. Midori Soda, Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Munekazu Inuma, Keiko Yamamura and Akira Hara. Inhibition of Human Aldose Reductase-like Protein (AKR1B10) by α - and γ -Mangostins, Major Components of Pericarps of Mangosteen. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **35**, 2075–2080 (2012).