

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16501

研究課題名(和文)新規PKA活性制御法による肥満症治療法の開発

研究課題名(英文)Development of AKAPs-PKA disruptors for the treatment of obesity

研究代表者

安藤 史顕(Ando, Fumiaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座助教

研究者番号：80804559

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、我々が発見した新規Protein kinase A(PKA)制御法を用い、治療薬開発に難渋している肥満症の新規治療薬の開発を目指す。申請者は、尿濃縮力を調節するバソプレシン/cAMP/PKA/AQP2水チャネルシグナル伝達系の研究を行っており、PKAとPKAのアンカータンパク(AKAP)との結合を阻害する低分子化合物FMP-API-1/27が、PKAを直接的に活性化することを発見した。FMP-API-1/27と類似構造を持つ低分子化合物は腎臓には効果がなかったが、褐色脂肪のPKAを活性化し、高脂肪食肥満モデルマウスにおいて抗肥満効果と耐糖能異常の改善効果をもたらした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は種々の疾患の危険因子であり早期に治療介入することが望ましいが、一方で汎用可能な治療薬は無いのが現状である。褐色脂肪細胞には、PKAが関わるシグナルとしてカテコラミン/cAMP/PKA/UCP1シグナル伝達系があり、熱産生効果があることから抗肥満の標的となっている。抗肥満薬として β_3 受容体アゴニスト(ミラベグロン)が着目されてきたが、心臓の β_1 受容体にも作用し心拍や血圧を上昇させるため長期服用への障壁となっている。開発した化合物は、ミラベグロンとは対照的に心拍や血圧に影響なく脂肪のPKAを選択的に活性化し、抗肥満効果を発揮することから治療候補薬として有望である。

研究成果の概要(英文): We focused on direct protein kinase A (PKA) activators as a novel therapeutic target for obesity. In kidneys, vasopressin / cAMP / PKA / AQP2 water channels signaling pathway regulates water homeostasis. A low molecular weight compound FMP-API-1/27 dissociates the binding between PKA and its anchoring proteins (AKAPs) and then directly activates PKA in renal collecting ducts. Compounds with similar structures to FMP-API-1/27 did not activate PKA in the kidneys, but they increased the PKA activity in brown adipose tissue. As a result, they had anti-obesity effects and also improved glucose intolerance.

研究分野：腎臓内科

キーワード：protein kinase A AKAPs 肥満症 結合阻害

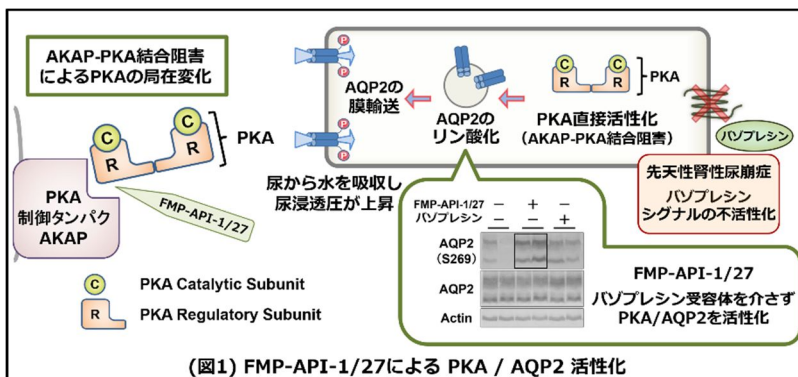
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本をはじめとする先進諸国は飽食の時代を迎え、交通機関の発達など利便性の向上により運動量が減少していることから、容易に肥満や生活習慣病を患う脅威にさらされている。肥満は種々の疾患の危険因子であり早期に治療介入することが望ましいが、一方で汎用可能な治療薬は無いのが現状である。褐色脂肪細胞における protein kinase A (PKA) の活性化は熱産生効果をもたらすことから抗肥満の治療標的となっている。褐色脂肪の PKA を活性化する既存薬としてアドレナリン受容体作動薬(ミラベグロン)が着目されているが、脂肪細胞への特異性の低さから心拍数増加や血圧上昇などの副作用を生じることが臨床応用への課題となっている。PKA はコピキタスに発現しているが、我々は脂肪細胞特異的に PKA 活性を制御可能な化合物を開発できると考えている。本研究では、PKA に直接作用する新しい創薬基盤を構築し、肥満症の治療法開発を目指す。

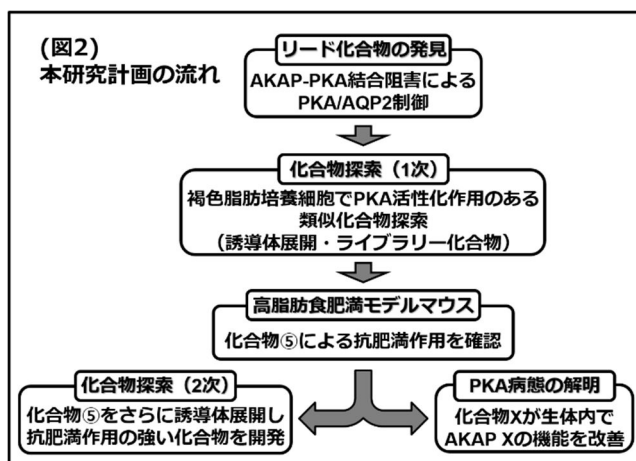
2. 研究の目的

研究代表者は、腎臓集合管における AQP2 水チャネルの制御機構の解明と先天性腎性尿崩症の治療法開発を行ってきた(Nat Commun. 2016)。AQP2 はバソプレシ/cAMP/PKA シグナルにより活性化されるが、最近、cAMP を介さずに PKA/AQP2 を強力に活性化する低分子化合物 FMP-API-1/27 を発見した(図1)。FMP-API-1/27 には PKA のアンカータンパクである AKAPs から PKA を切り離す作用があり PKA 活性を直接的に制御できるため、バソプレシ 2 型受容体の機能が喪失している先天性腎性尿崩症の新たな治療戦略として有望であった (Nat Commun. 2018)。PKA はコピキタスに発現しているが、50 種類以上の AKAPs と 4 種類の PKA サブユニットの結合の組み合わせは臓器・細胞により異なるため、特定の AKAPs-PKA 結合のみを切断することで標的組織特異的に PKA 活性を制御可能な化合物を開発できると考えている。本研究では、この新規 PKA 制御法を活用し、新たなカテゴリーの抗肥満薬を創出することが目的である。



3. 研究の方法 (図2)

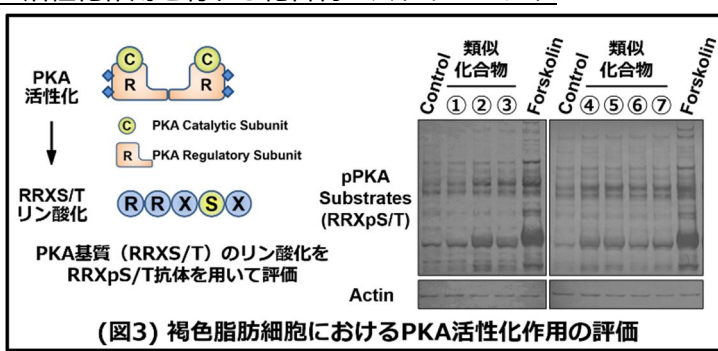
褐色脂肪細胞における PKA の活性化は熱産生効果をもたらすことから肥満症の治療標的となっている。そこで、褐色脂肪培養細胞を用いて、リード化合物 FMP-API-1/27 を誘導体展開した化合物や類似構造を持つ化合物をライブラリーから抽出し、スクリーニングを行った。次に、有望なヒット化合物を、高脂肪食肥満モデルマウスに経口投与しその効果を検証した。抗肥満効果を発揮した化合物が、褐色脂肪細胞において最も影響を与えた PKA 基質を探索し、肥満病態との関連を解析する。



4. 研究成果

1. 褐色脂肪培養細胞において PKA 活性化作用を有する化合物のスクリーニング

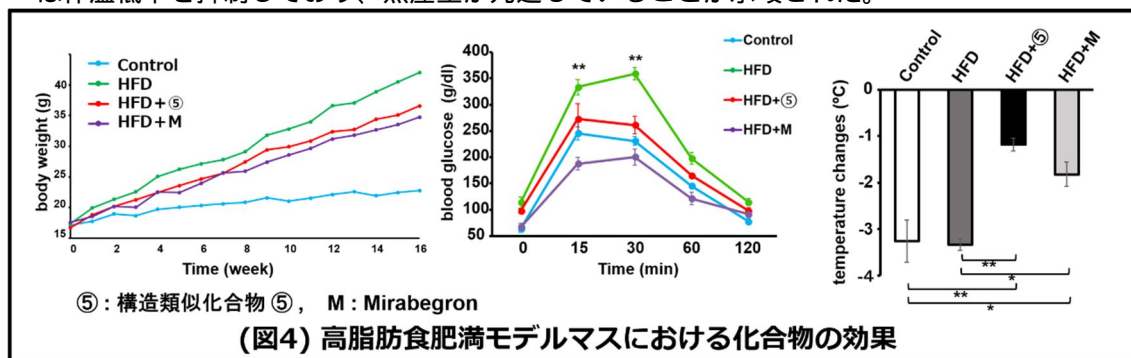
褐色脂肪細胞へ化合物を投与し、1 時間後の PKA 活性の変化を評価した。PKA は、RRXS/T モチーフをリン酸化することから、RRX(pS/T) のリン酸化を認識する抗体を用いて PKA 基質のリン酸化と PKA 活性を解析した(図3)。Forskolin を positive control として比較したところ、FMP-API-1/27 の構造類似化合物、 C_1 、 C_2 は PKA 活性化作用を有する。



用が高く、実際に HSL, Perilipin, CREB などの PKA 基質をリン酸化していることを確認した。特に化合物 ⑤は、褐色脂肪細胞の熱産生に重要な因子である Ucp-1 発現量を増加させる作用を有していた。

2. 化合物 ⑤は高脂肪食肥満モデルマウスの体重増加を抑制した

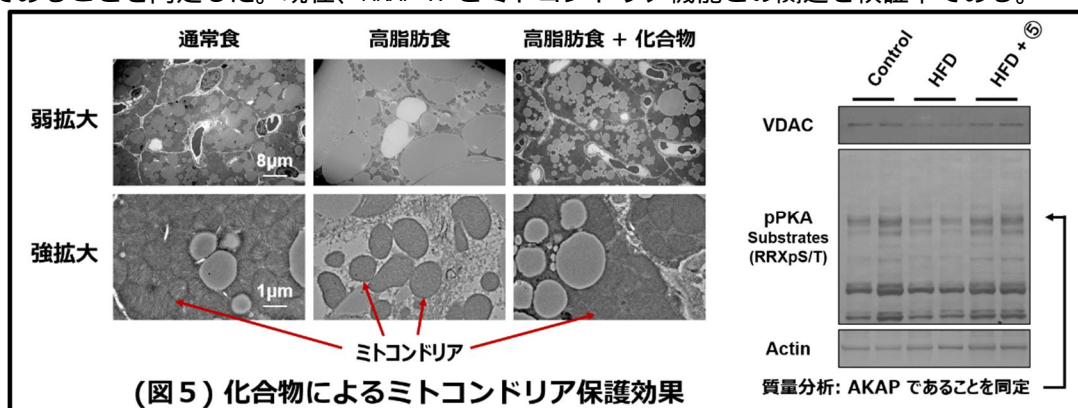
60%ラード配合の高脂肪食 (HFD: High-Fat Diet) を用いた肥満誘導モデルマウスを用いて、in vivo での化合物 ⑤の効果を検証した。化合物 ⑤は体重抑制効果を認めなかったが、化合物 ⑤を 0.05%の割合で餌に混合して 16 週間投与したところ肥満抑制効果を発揮した (図 4)。Positive control として、 β_3 -agonist の Mirabegron (10mg/kg, 1日1回経口投与)を用いた。摂取カロリーに関しては全群で有意差を認めなかったが、化合物 ⑤は、HFD 群と比べて体重増加を抑制し、耐糖能障害を軽減した。化合物 ⑤を通常食に混合して投与しても特に食欲低下や体重減少の効果はなく、Control 群と同じ体重増加の推移を示した。さらに寒冷刺激試験で、化合物 ⑤は体温低下を抑制しており、熱産生が亢進していることが示唆された。



3. 化合物 ⑤による褐色脂肪のミトコンドリア保護効果

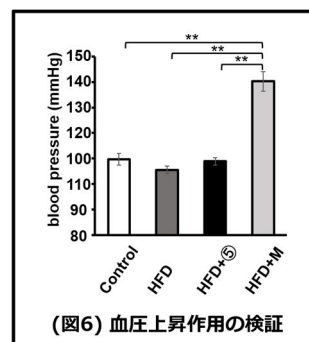
化合物 ⑤による PKA 活性化が褐色脂肪にもたらす影響を解析するため、高脂肪食肥満モデルマウスへ化合物 ⑤を 16 週間投与後に電子顕微鏡を用いて褐色脂肪の形態を評価した。HFD 群では、ミトコンドリアの構造が明らかに破綻しており、膨化や断裂を認めた (図 5)。さらに、ミトコンドリアの量も減少しておりミトコンドリアマーカである VDAC の発現量が低下していた。化合物 ⑤を投与すると褐色脂肪におけるミトコンドリアの保護効果が認められ、その発現量は通常食を与えたマウスと同程度まで改善していた。

次に、PKA 活性化がミトコンドリア機能の改善をもたらす分子機序を解明するため、pPKA Substrates 抗体を用いて PKA 機能を評価した。一部の PKA 基質のリン酸化が、HFD 群では低下しており、化合物 ⑤を投与すると改善していた。そこで、この PKA 基質を解析したところ AKAP X であることを同定した。現在、AKAP X とミトコンドリア機能との関連を検証中である。



4. 化合物 ⑤とミラベグロンの相違

化合物 ⑤はミラベグロンと異なり 16 週間投与後も明らかな副作用を示さず、高脂肪食肥満モデルマウスにおいて、血圧を上昇させることなく抗肥満効果を発揮することができた (図 6)。化合物 ⑤は、従来の PKA 活性化薬である GPCR アゴニストやホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬を、効力と特異性で凌駕する可能性がある。現在、化合物 ⑤を誘導体展開し、さらに活性の高い化合物を探索中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujiki Tamami, Ando Fumiaki, Murakami Kana, Isobe Kiyoshi, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Nomura Naohiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Tolvaptan activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway through PERK phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-45539-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 安藤 史顕、内田 信一	4. 巻 9
2. 論文標題 先天性腎性尿崩症の新規治療薬の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科	6. 最初と最後の頁 457-463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安藤 史顕、内田 信一	4. 巻 62
2. 論文標題 【水電解質】先天性腎性尿崩症の治療薬開発の現状	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本腎臓学会誌	6. 最初と最後の頁 798-802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ando F, Yui N, Mandai S, Isobe K, Mori T, Susa K, Nomura N, Sohara E, Rai T, Uchida S.
2. 発表標題 Derivatives of FMP-API-1/27 Robustly Activate AQP2 Water Channels Independently of Vasopressin
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤 史顕, 内田 信一.
2. 発表標題 先天性腎性尿崩症の新規治療薬の開発
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤 史顕, 磯部 清志, 森 崇寧, 須佐 紘一郎, 野村 尚弘, 蘇原 映誠, 頼 建光, 内田 信一.
2. 発表標題 PKA活性化薬の開発と先天性腎性尿崩症治療への応用
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤 史顕
2. 発表標題 AQP2水チャネルの病態生理機能の解明と先天性腎性尿崩症の治療法開発
3. 学会等名 第30回日本医学会総会 2019中部
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ando F.
2. 発表標題 Identification of Therapeutic Targets for Congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ando F, Uchida S.
2. 発表標題 Development of Novel Therapeutic Strategies for Congenital NDI and Other PKA-Related Diseases
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関