

令和元年5月24日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06656

研究課題名(和文) AKAPs-PKA 結合阻害剤の腎性尿崩症治療薬への応用

研究課題名(英文) The application of AKAPs-PKA disruptors to the treatment of nephrogenic diabetes insipidus

研究代表者

安藤 史顕 (Ando, Fumiaki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80804559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：先天性腎性尿崩症は抗利尿ホルモンであるバゾプレシンの受容体に機能喪失型変異があることから、尿濃縮力が破綻し多尿となる疾患である。尿濃縮にはcAMP/PKA/AQP2水チャネル シグナルの活性化が必要であり、我々はPKAの直接活性化に着目した。PKAの細胞内局在と活性はアンカータンパクであるAKAPsに規定されている。PKAとAKAPsの結合を阻害する低分子化合物は、腎臓集合管のPKA活性を上昇させ、マウス腎臓においてバゾプレシンと同等のAQP2活性化効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昼夜を問わない多尿と脱水症の回避に必要な多量の飲水は、先天性腎性尿崩症患者のQOLを著しく低下させ、社会活動の制限を招く。さらに、多尿は精神発達遅滞や腎機能低下などの重篤な合併症を引き起こす危険性があり、根治的治療法の開発が望まれている。最近では、加齢・薬剤などによる後天性の尿濃縮障害も、脱水・熱中症を引き起こすため解決すべき問題となっている。AKAPs-PKA結合阻害剤によるPKAの直接活性化は新規尿濃縮力改善薬の標的として有望である。

研究成果の概要(英文)：Congenital nephrogenic diabetes insipidus (NDI) is characterized by defective urine concentrating ability. Congenital NDI is mainly caused by loss-of-function mutations in the vasopressin type 2 receptor (V2R), leading to inactivation of cAMP/PKA/AQP2 water channels signaling pathway. We focused on direct activators of PKA as novel therapeutic targets of congenital NDI. The intracellular distribution and substrate specificity of PKA are largely controlled by A-kinase anchoring proteins (AKAPs). Low molecular weight compounds that inhibit AKAPs binding to PKA significantly increased PKA activity in renal collecting ducts and activated AQP2 to the same extent as vasopressin.

研究分野：腎臓

キーワード：先天性腎性尿崩症 AKAPs PKA AQP2水チャネル AKAPs-PKA結合阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

先天性腎性尿崩症は、尿濃縮力が低下し多尿をきたす疾患である。多尿は生活の質を落とすだけでなく、腎不全や精神発達遅滞などの重篤な合併症も引き起こし予後悪化させる。尿濃縮力の改善と尿量の軽減が治療目標となるが根治的治療法は未だ開発されていない。バソプレシン 2 型受容体 (V2R) と AQP2 水チャネルは尿濃縮の主要な因子として知られている。脳下垂体より分泌されたバソプレシンが腎臓集合管の V2R に結合すると cAMP が活性化し、AQP2 がリン酸化される。リン酸化された AQP2 は、尿細管腔側の細胞膜へと輸送され尿からの水の再吸収が増加する(図 1 左)。

先天性腎性尿崩症の原因遺伝子の約 90% を V2R の機能喪失型変異が占めることから、V2R 非依存的に AQP2 を活性化することが治療戦略となる(図 1 右)。今まで、AQP2 活性化の標的として特に cAMP が着目されてきた。cAMP 活性化効果のある G protein-coupled receptors (GPCRs) と AQP2 の関係が研究対象となってきたが、治療薬の実用化には至っていない。先天性腎性尿崩症の治療として実用化させるにはより強力な AQP2 活性化機構の解明が必要である。

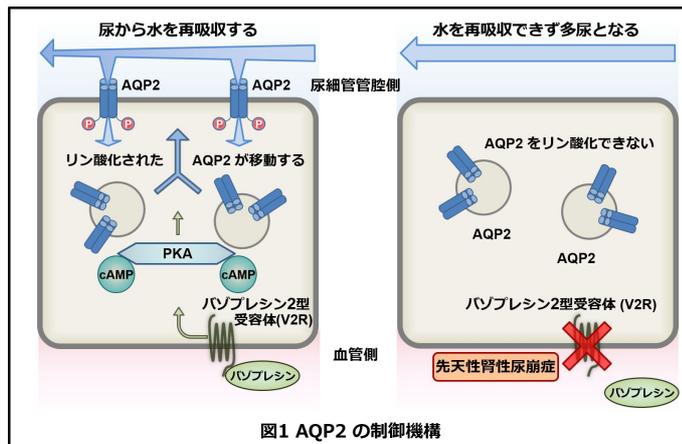


図1 AQP2 の制御機構

### 2. 研究の目的

Protein Kinase A (PKA) は cAMP と AQP2 を仲介する主要な分子と推測されているが、その詳細な役割は明らかでない。PKA 活性化薬が AQP2 に対しより直接的で強力な作用を持つ可能性があると考え、PKA の調節機構に着目した。PKA の細胞内局在と PKA が標的とする substrates への特異性は、アンカータンパクである A-kinase anchoring proteins (AKAPs) によって制御されている。AKAPs は、足場のタンパクとして PKA と substrates を近接した位置に留めており、AQP2 のリン酸化にも関わることを我々は報告している (Kidney Int. 2008)。

PKA は、2 つの regulatory subunit (RI, RII) と 2 つの catalytic subunit で構成されているが、AKAPs から PKA RII を切り離す薬剤として Ht31 が知られている。V2R と AQP2 を内因性に発現している皮質集合管培養細胞 (mpkCCDcl4 cells) に Ht31 を投与すると、PKA の細胞内局在が変化し集合管の PKA 活性が上昇することを発見した。重要なのは Ht31 が、PKA を介し AQP2 に対しバソプレシンと同様の効果を発揮したことである。以上の結果は、AKAPs と PKA の結合を切り離す薬剤 (AKAPs-PKA disruptors) が、新たな腎性尿崩症治療薬の標的となり得ることを示している(図 2)。

Ht31 は、ペプチドであり生体内における安定性や細胞内への移行性の低さが臨床応用へのハードルになる。

そこで、Ht31 と同様に AKAPs-PKA 結合阻害効果を持つ低分子化合物 FMP-API-1 に着目した。本研究では、FMP-API-1 の AQP2 活性化効果を集合管培養細胞、マウス腎臓から単離した尿細管、腎性尿崩症モデルマウスを用いて検証する。

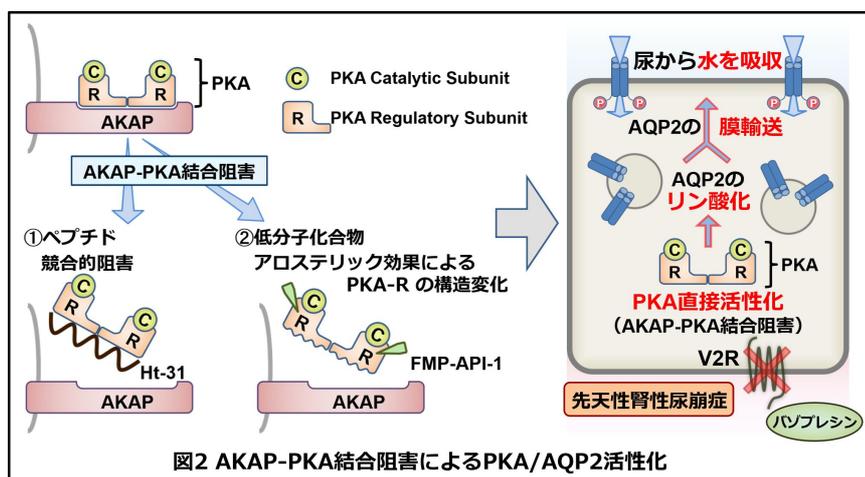


図2 AKAP-PKA結合阻害によるPKA/AQP2活性化

### 3. 研究の方法

腎性尿崩症治療に有効な PKA 活性化候補薬を探索する。AQP2 を内因性に発現する皮質集合管培養細胞へ FMP-API-1 を投与し、PKA の活性、AQP2 のリン酸化・発現量・膜輸送の変化を検証する。次に、マウスの腎臓から集合管を単離し FMP-API-1 投与後の水の透過性の変化を測定する。さらに、V2R アンタゴニストである tolvaptan を投与した腎性尿崩症モデルマウスに FMP-API-1 を投与し尿浸透圧の変化を観察する。

FMP-API-1 は、水溶性が低いことから十分なバイオアベイラビリティを得られない可能性がある。FMP-API-1 の誘導体の中には (CAS 7005-43-8, 61445-49-6)、FMP-API-1 より強力な

AKAPs-PKA 結合阻害作用を持つ化合物があることが報告されている (PMID:21177871)。FMP-API-1 の誘導体の中で、より強力な PKA/AQP2 活性化作用を持ち、水溶性の高い低分子化合物を探索していく。

#### 4. 研究成果

FMP-API-1 は、cAMP を介さずに皮質集合管培養細胞の PKA 活性を直接上昇させ AQP2 のリン酸化 (S269 のリン酸化) や膜輸送を活性化した (図 3)。FMP-API-1 はマウスの腎臓において強力な効果を発揮し、バソプレシンと同程度にマウス腎臓から単離した皮質集合管の水透過性を増加させた。

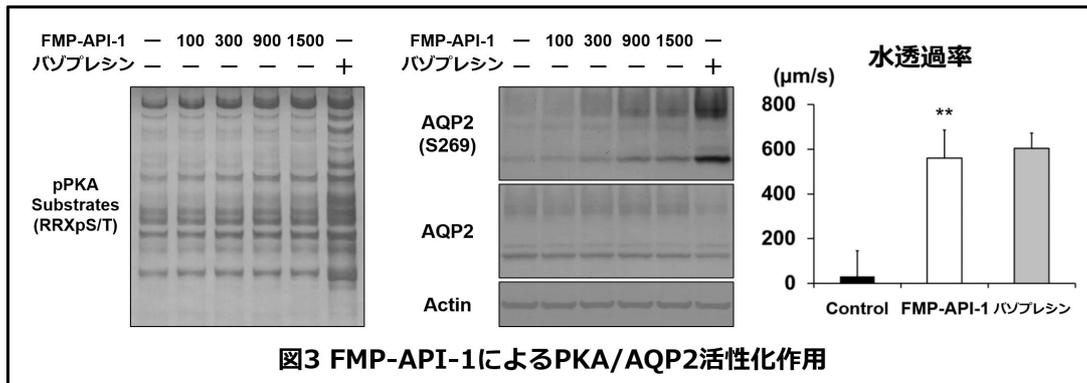


図3 FMP-API-1によるPKA/AQP2活性化作用

次に低分子化合物である FMP-API-1 を誘導体展開しより強力な AQP2 活性化作用を持つ化合物を探索した。FMP-API-1/27 は、集合管培養細胞において FMP-API-1 の約 1/10 の濃度で FMP-API-1 と同等の効果を発揮した。そこで、FMP-API-1/27 を C57BL/6 マウスに腹腔内投与したところ、驚くべきことにバソプレシンよりも強力に AQP2 をリン酸化した (図 4)。FMP-API-1/27 は、皮下投与において 6 時間以上の AQP2 リン酸化効果を持ち、夜間頻尿の軽減に有効であると考えられた。FMP-API-1/27 は腎性尿崩症モデルマウスにおいても有効であり、尿浸透圧を上昇させた。

PKA はユビキタスに発現しており、他臓器における PKA 活性を Phospho-PKA Substrate 抗体を用いて評価したところ、心臓や肺の PKA 活性を変動させないことから副作用を軽減できると考えられた。

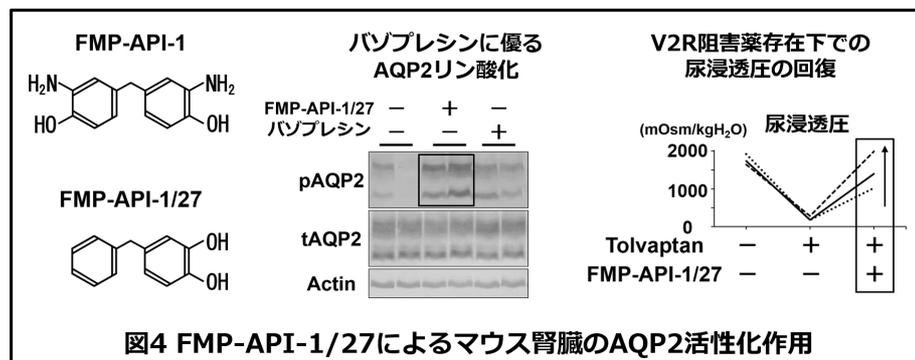


図4 FMP-API-1/27によるマウス腎臓のAQP2活性化作用

現在、我々は FMP-API-1/27 よりもさらに PKA/AQP2 活性化効果が高い化合物を探索している。FMP-API-1/27 を元にした誘導体展開と、類似構造を指標とした in silico のスクリーニングにより新規 AKAPs-PKA 結合阻害剤の探索を行った。その結果、腎臓集合管培養細胞でバソプレシンと同程度の PKA/AQP2 活性化効果を持つ化合物の開発に成功し、治療薬としてポテンシャルが高いことを明らかにした。並行して、ドラッグリポジショニングの観点から FMP-API-1/27 に構造が類似する既存薬を検索し、PKA/AQP2 活性化効果のある化合物がある事も確認している。今後、これらの化合物の尿濃縮作用を検証し、治療薬として効果の高い化合物を同定して行く。

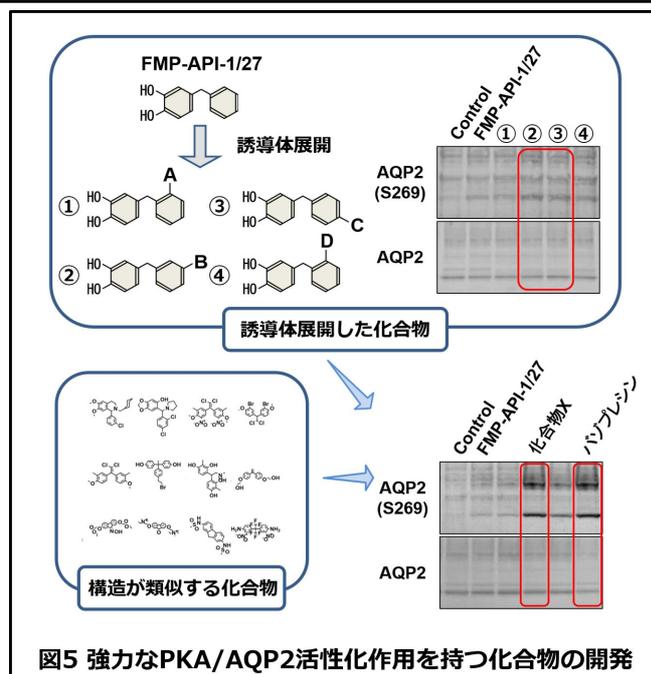


図5 強力なPKA/AQP2活性化作用を持つ化合物の開発

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ando Fumiaki, Mori Shuichi, Yui Naofumi, Morimoto Tetsuji, Nomura Naohiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Sasaki Sei, Kondo Yoshiaki, Kagechika Hiroyuki, Uchida Shinichi. AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus. Nat Commun. 2018; 9: 1411. doi: 10.1038/s41467-018-03771-2. 査読有り.

Ando Fumiaki, Uchida Shinichi. Activation of AQP2 water channels without vasopressin: therapeutic strategies for congenital nephrogenic diabetes insipidus. Clin Exp Nephrol. 2018; 22(3): 501-507. doi: 10.1007/s10157-018-1544-8. 査読有り.

### 〔学会発表〕(計 5 件)

安藤史顕. 先天性腎性尿崩症の新規治療薬の開発. 第 29 回 バゾプレシン研究会, 2019.

Ando F, Yui N, Nomura N, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. AKAPs-PKA Disruptors Robustly Increase AQP2 Activity Independently of Vasopressin. ASN Kidney Week 2018.

安藤史顕, 森修一, 油井直史, 森本哲司, 野村尚弘, 蘇原映誠, 頼建光, 佐々木成, 根東義明, 影近弘之, 内田信一. AKAPs-PKA 結合阻害剤はバゾプレシン非依存性に強力に AQP2 水チャネルを活性化する. 第 9 回分子腎臓フォーラム, 2018 年.

安藤史顕, 油井直史, 森本哲司, 野村尚弘, 蘇原映誠, 頼建光, 佐々木成, 根東義明, 内田信一. FMP-API-1 はバゾプレシンに匹敵する AQP2 水チャネル活性化作用を持つ 新規腎性尿崩症治療薬の開発. 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 2018 年.

安藤史顕. 新規先天性腎性尿崩症治療薬の開発. 第 113 期 東京腎生理集談会, 2018 年.

### 〔図書〕(計 1 件)

安藤史顕. 東京医学社. 腎と透析. 新規先天性腎性尿崩症治療薬の開発. 2018; 105-109.

### 〔産業財産権〕

#### 出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

#### 取得状況 (計 0 件)

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

### 〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学 プレスリリース

[http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20180413\\_1.pdf](http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20180413_1.pdf)

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名: 森 修一

ローマ字氏名: (MORI, shuichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。