

令和元年6月6日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09813

研究課題名(和文) Gタンパク質共役受容体と疾患：シグナルクロストークの制御と創薬展望

研究課題名(英文) G protein-coupled receptors and diseases: signal crosstalk and therapeutics

研究代表者

飯利 太朗 (Iiri, Taroh)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：90313022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役受容体(GPCR：特にGsとGq/13共役GPCR)のシグナルクロストークは生体内のシグナル巧緻制御で重要な役割を果たし、そのアンバランスは疾患原因となると考えられる。本研究では、1)疾患で発見された、GPCR遺伝子変異や自己抗体によるシグナル異常の解析と小分子作動薬によるrescueによる新規治療法に結びつけ、2)GPCR脱感作に關与するGRK2(G protein-coupled receptor kinase 2)をニトロシル化し抑制する小分子化合物アナログを用い新たな脂肪分解作用を解明し、3)蓄積された疾患解析データと構造解析を統合しGPCR作用機構を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPCRとそのクロストークの分子異常に基づく疾患の解析と小分子化合物による制御、in silicoを含めた制御ツール開発は、疾患メカニズム解明とともにGPCR研究における普遍的示唆を与えることが期待され、さらには新たな創薬へと結実することが期待される。

研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptors (GPCRs) and their crosstalks may play an important role in fine-tuning of many signals in our body, and their signal unbalance may underlie many disease states. In this study, 1) we have screened and analyzed molecular defects of GPCRs in diseases and tried to rescue them using small molecules targeting GPCRs in vitro and also in patients. 2) We have also designed analogues of small molecules that nitrosyl ate and thereby inactivate GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2 that plays an essential role in many GPCR desensitization) and analyzed their effects on lipolysis of adipocytes. 3) We have also analyzed molecular action of GPCRs by combining accumulated data based on G protein/GPCR disease analysis and structural information.

研究分野：内分泌学、分子生物学、内科学、薬理学、GPCRシグナル制御と疾患

キーワード：内分泌学 Gタンパク質共役受容体 GPCR クロストーク 疾患解析制御 バイアスアゴニズム

1. 研究開始当初の背景

(1) G タンパク質共役受容体 (GPCR: G protein-coupled receptor) の進化・機能と疾患: GPCR は、ゲノム上最大のファミリーを形成し、感覚、脳神経、内分泌、代謝、循環、免疫、炎症など多彩な役割をはたし、全ての生理機能を担うと言っても過言ではない。GPCR の分子異常は多くの疾患の原因となるとともに、その解析は疾患メカニズムのみならず、生理機能そのものの解明に大きく貢献してきた。また、歴史上人類が手にした薬剤の約 30-40%は GPCR を標的とし、今後も創薬上の重要標的分子であり続けると考えられる。実際 GPCR 研究は 2012 年のノーベル賞受賞分野となっている。

(2) GPCR 活性化調節機構の新しいパラダイム—バイアスアゴニズム:

古典的モデルでは、GPCR は活性型と不活性型との間で平衡状態にあり、各 GPCR 作動薬はその平衡に対する作用で分類されてきた。近年 GPCR の活性化の概念は大きく変化し、GPCR の高次構造には無数の活性型/不活性型が存在することが提唱されている。各 GPCR リガンドは各々の GPCR をユニークな活性型に維持しそれぞれ特異的なシグナルを作動させる。中には、複数の G タンパク質と共役して複数のシグナルを作動させる GPCR を介して、あるシグナルのみを作動させる特異な例も存在する (biased agonism) と推定されている。こうした例の多くは薬剤の作用において発見されてきたが、私共は、疾患のメカニズムの解析の過程で、病態においてではあるが、real world においてバイアスシグナルが作動する例を初めて発見し解析を行ってきた (PNAS 2007, EJ 2014)。創薬においてもこのような概念は、好ましいシグナルのみを作動させることを可能にするパラダイムとして重要性を増して行くと考えられる。

(3) GPCR の細胞内/細胞間シグナルクロストーク:

複雑系シグナルを担う GPCR 高次調節機構の一つであるシグナルクロストークと疾患メカニズムの関連も注目されている。生体で複数の GPCR 系が協調的あるいは拮抗的に作用し、目的的なシグナルの巧緻制御を行っている。典型例の一つが保護的に作用する Gs シグナルと障害的に作用する Gq/G13 シグナルのクロストークである。私共はクロストークポイントである Rho/Rho-GDI のリン酸化による制御を解明してきた (JBC 2012)。

(4) 疾患が語る GPCR/G タンパク質の作用機構と構造解析:

G タンパク質や GPCR の分子異常を基盤とする疾患の解析は、疾患メカニズムの解明とともに G タンパク質/GPCR の作用機構自体の解明をリードしてきた。変異体の詳細な解析データと最近の構造解析を合わせることにより、詳細な分子メカニズムの解明が期待されている。

2. 研究の目的

(1) GPCR の高次調節機構を担う細胞内クロストーク基盤である、Gs、Gq/13 共役受容体の分子異常を発見した疾患のメカニズムとともに解析し、治療基盤をデザインする。

(2) GPCR の脱感作を担う GRK2 のニトロシル化を担う小分子をデザイン合成し、脂肪細胞を中心とする細胞間クロストークの場であるメタボリックシンドローム (METS) モデルへの応用をめざす。

(3) 近年の構造解析進歩と疾患解析による作用機構モデル (Nature 1998, PNAS 1996, 2001, 2007) を統合して、GPCR 作用機構の解明をめざし、新規治療法の開発を展望する。

3. 研究の方法

(1) 疾患において Gs 共役 GPCR の一つである V2 受容体の機能喪失性変異をスクリーニングし、発見した変異体に機能及び局在を培養細胞発現系を用いて検討する。また、低分子作動薬の変異受容体シグナル、局在に対する作用を検討する。効果が見られた場合、臨床研究への応用を展望する。

(2) Gq/i/13 共役 GPCR の一つである Ca 感知受容体に対する自己抗体を疾患でスクリーニングする。発見した抗体のシグナル制御作用を培養細胞系で検討する。さらに calcimimetics との相互作用を検討し、治療法へと展開する。

(3) GPCR の脱感作に関与する GRK2 のニトロシル化による抑制を担う小分子化合物をデザイン合成し、脂肪細胞 (in vitro 分化脂肪細胞) を中心とする系での作用 (特に脂肪分解作用) を検証し、マウスモデルへの検討へ結びつける。

(4) 蓄積された疾患解析データに基づく GPCR 作用機構モデルと構造解析データを合わせて in silico で検討する。

4. 研究成果

本研究は、GPCR シグナル伝達の細胞内/細胞間クロストークを解明し、シグナル制御に基づく治療法開発を展望してきた。

(1) Gs vs. Gq/13 共役受容体のシグナルクロストーク基盤の疾患での解析：本シグナルクロストークは、種々の生理機能の巧緻調節に関与することが明らかとなっている。本研究では、(1)疾患で発見された Gs 共役型 V2 受容体変異を解析することで、腎性尿崩症に至る機能喪失の分子メカニズムを明らかにするとともに、これを rescue する薬理的シャペロンとして機能する V2 受容体小分子作動薬の作用メカニズムを明らかとした (Vitam Horm 2019, JBC 2016, 学会発表多数)。さらに、この知見を応用し、V2 受容体小分子作動薬を用いた新たな治療法開発と実用化を行いつつある。

(2) Gq/i/13 共役型 GPCR の一つである Ca 感知受容体 (CaSR) に対する自己抗体をさらに発見し、CaSR を Gq を活性化するが Gi を活性化しない biased allosteric modulator (BAM) として作動するユニークな作用メカニズムを解明するとともに、CaSR に対する positive allosteric modulator (PAM) として作用する cinacalcet (EJ 2019) により、in vitro で自己抗体の作用を正すことができること、またこれを治療に応用できることを初めて示した (JCI Insight 2019)。現在さらに疾患とその解析データの蓄積を継続している (学会発表多数)。

(2) GRK2 ニトロシル化とメタボリックシンドローム (METS) モデルでのシグナルクロストーク：私共は GPCR の脱感作に関与する GPCR キナーゼの一つである GRK2 (G protein-coupled receptor kinases 2) のニトロシル化による抑制を明らかにし、これを担う NO 供与体として作動するが、NO gas を産生しない小分子の合成に成功してきた (Circulation Research 2013)。本研究では、(1)脂肪細胞を中心とする細胞間シグナルクロストーク解析を基盤に、(2)ニトロシル化誘導化合物アナログによる脂肪分解作用を発見し細胞およびマウス (Cytotherapy 2017 関連) モデルで解析中である (学会発表済み 2017, 2018、特許申請準備中)。

(3) 構造解析の進歩に基づく作用メカニズム解明と制御ツールの展望：GPCR 活性化モデルと疾患変異解析を統合して、GPCR/G protein の作用分子メカニズムの in silico 解析を継続、(経過学会発表済み、2016, 2017, 2018)、解析結果に基づく制御ツール作成を展望している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Makita N, Ando T, Sato J, Manaka K, Mitani K, Kikuchi Y, Niwa T, Ootaki M, Takeba Y, Matsumoto N, Kawakami A, Ogawa T, Nangaku M, Iiri T. Cinacalcet corrects biased allosteric modulation of CaSR by AHH autoantibody. *JCI Insight* (査読有) 4(8): pii 126449, 2019. doi: 10.1172/jci.insight.126449
- ② Manaka K, Sato J, Kinoshita Y, Ito N, Fujita M, Iiri T, Nangaku M, Makita N. Effectiveness and safety of cinacalcet for primary hyperparathyroidism: a single center experience. *Endocr J*. (査読有) in press, 2019. doi: 10.1507/endocrj.EJ19-0034.
- ③ Makita N, Manaka K, Sato J, Mitani K, Nangaku M, Iiri T. Bexarotene-induced hypothyroidism: Characteristics and therapeutic strategies. *Clin Endocrinol*. (査読有) In press, 2019. Doi: 10.1111/cen.13975.
- ④ Makita N, Manaka K, Sato J, Iiri T. V2 vasopressin receptor mutations. VASOPRESSIN, vol110 *Vitam Horm* (査読有) in press 2019. <https://www.elsevier.com/books/vasopressin>
- ⑤ Hara M, Takeba Y, Iiri T, Ohta Y, Ootaki M, Watanabe M, Watanabe D, Koizumi S, Otsubo T, Matsumoto N. Basoactive interstitial peptide increases apoptosis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the cAMP/Bcl-xL pathway. *Cancer Sci*. (査読有) 110(1): 235-244, 2019. Doi: 10.1111.cas.13861.
- ⑥ Takeuchi M, Sato J, Manaka K, Tanaka M, Matui H, Sato Y, Kume H, Fukayama M, Iiri T, Nangaku M, Makita N. Molecular analysis and literature-based hypothesis of an immunonegative prostate small cell carcinoma causing ectopic ACTH syndrome. *Endocr J*. (査読有) in press, 2019. Doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0563.
- ⑦ Ohta Y, Takenaga M, Hamaguchi A, Ootaki M, Takeba Y, Kobayashi T, Watanabe M, Iiri T, Matsumoto N. Isolation of adipose-derived stem/stromal cells from cryopreserved fat tissue and transplantation into rats with spinal cord injury. *Int J Mol Sci*. (査読有) 19(7): pii:E1963, 2018. Doi: 10.3390/ijms19071963.
- ⑧ Oishi A, Makita N, Isowaga A, Iiri T. Continuous glucose monitoring of a runner during five marathons. *Science and Sports*. (査読有) 5(1): 370-374, 2018. Doi: 10.1016/j.scispo.2018.05.001
- ⑨ Ohta Y, Hamaguchi A, Ootaki M, Watanabe M, Takeba Y, Iiri T, Matsumoto N, Takenaga M. Intravenous infusion of adipose-derived stem/stromal cells improves functional recovery of rats with spinal cord injury. *Cytotherapy*. (査読有) 19(7): 839-848, 2017.

Doi: 10.1016/j.cyt.2017.04.002.

- ⑩ Makita N, Sato J, Yajima-Shoji Y, Stao J, Manaka K, Eda-Hashimoto M, Ootaki M, Matsumoto N, Nangaku M, Iiri T. Analysis of the V2 vasopressin receptor (V2R) mutations causing partial nephrogenic diabetes insipidus highlights a sustainable signaling by a non-peptide V2R agonist. *J Biol Chem.* (査読有) 291(43): 22460-22471, 2016. PMID: 27601473.
- ⑪ Sato J, Makita N, Iiri T. Inverse agonism: the classic concept of GPCRs revisited. *Endocr J.* (査読有) 63(6): 507-14, 2016. Doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0084.

[学会発表] (計29件)

- ① 榎田紀子、安藤隆雄、佐藤潤一郎、間中勝則、南学正臣、飯利太朗 後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症で同定されたバイアスアロステリックに作用する自己抗体とシナカルセトによる治療 第15回GPCR研究会 2019.
- ② 榎田紀子、佐藤潤一郎、間中勝則、江田真紀子、安藤隆雄、山崎肇、矢島隆寛、佐藤崇浩、赤羽貴美子、中井一貴、三谷康二、大石篤郎、南学正臣、飯利太朗 後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症で見出されたカルシウム感知受容体の機能解析 第92回日本内分泌学会学術総会 2019.
- ③ 太田有紀、濱口明美、新美純、小林司、武半優子、大滝正訓、渡辺実、飯利太朗、松本直樹 下肢筋萎縮モデルに対する脂肪組織由来幹細胞の効果 第18回日本再生医療学会総会 2019.
- ④ Ootaki M, Ohta Y, Watanabe M, Kobayashi T, Nakamura Y, Watanabe D, Yamamoto M, Takeba Y, Iiri T, Matsumoto N. Molecular dynamics studies of the pH-dependent dynamic structures of VYP2D6. WCP2018 KYOTO, 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY. 2018
- ⑤ 間中勝則、榎田紀子、佐藤潤一郎、飯利太朗、南学正臣 新規変異を認めた先天性腎性尿崩症 日本人類遺伝学会第63回大会 2018
- ⑥ 佐藤潤一郎、榎田紀子、古家美菜絵、間中勝則、飯利太朗、南学正臣 パシレオチドLARによるインスリン分泌低下に対してGLP-1受容体作動薬が著効した一例 第91回日本内分泌学会学術総会 2018.
- ⑦ 佐藤潤一郎、榎田紀子、間中勝則、三谷康二、江田真紀子、大和田智彦、南学正臣、飯利太朗 新規脂肪分解薬の開発と機能解析 第91回日本内分泌学会学術総会 2018.
- ⑧ 飯利太朗、榎田紀子 What diseases tell us about GPCRs and G proteins. Cardio Renal Diabetes 研究会 2018
- ⑨ 大滝正訓、太田有紀、渡辺実、武半優子、飯利太朗、松本直樹 三量体Gタンパク質の構造安定性に関わる相互作用解析 第38回日本臨床薬理学会 2017
- ⑩ 榎田紀子、飯利太朗 V2受容体と腎性尿崩症: 変異解析と新しい治療の可能性 特別シンポジウム「オキシトシンとバゾプレッシン作用の新しい知見—基礎と臨床—」 第32回日本下垂体研究学術集会(招待講演) 2017.
- ⑪ 飯利太朗 Gタンパク質共役受容体: まれな疾患からGPCRの新しいパラダイムへ 第39回埼玉内分泌研究会(招待講演) 2017.
- ⑫ 榎田紀子、三谷康二、間中勝則、佐藤潤一郎、飯利太朗 分子標的薬を含めた新規抗腫瘍薬と甲状腺機能異常 第83回臨床内分泌代謝懇話会(招待講演) 2017.
- ⑬ 榎田紀子、佐藤知彦、間中勝則、佐藤潤一郎、南学正臣、飯利太朗 先天性腎性尿崩症の原因となるV2受容体変異の解析からみえてきたユニークなGPCR制御と疾患治療の可能性 第14回GPCR研究会 2017.
- ⑭ 間中勝則、佐藤潤一郎、三谷康二、藤田恵、伊東伸朗、木下祐加、飯利太朗、榎田紀子 シナカルセトの原発性副甲状腺機能亢進症に対する治療効果 第90回日本内分泌学会学術総会 2017.
- ⑮ 佐藤潤一郎、榎田紀子、間中勝則、三谷康二、江田真紀子、飯利太朗 インバースアゴニズム: GPCRの古典的概念の再評価とARB 第90回日本内分泌学会学術総会 2017.
- ⑯ 榎田紀子、佐藤潤一郎、三谷康二、間中勝則、江田真紀子、大和田智彦、飯利太朗 新規脂肪分解薬の発見と解析 第90回日本内分泌学会学術総会 2017.
- ⑰ 榎田紀子、三谷康二、間中勝則、佐藤潤一郎、飯利太朗 分子標的薬を含めた新規抗腫瘍薬と甲状腺機能異常—メカニズムと対策 第90回日本内分泌学会学術総会(招待講演) 2017.
- ⑱ Makita N, Sato T, Yajima Y, Sato J, Manaka K, Eda M, Ootaki M, Matsumoto N, Nangaku M, Iiri T. Analysis of the V2 vasopressin receptor (V2R) mutations causing partial nephrogenic diabetes insipidus highlights a sustainable signaling by a non-peptide V2R agonist. Gordon Research Conference (Molecular Pharmacology), 2017.
- ⑲ 榎田紀子、飯利太朗 GPCRと疾患—新しい調節機構への示唆 シンポジウム 日本薬学会第137年会(招待講演) 2017.
- ⑳ 榎田紀子、佐藤知彦、矢島由紀、三谷康二、間中勝則、大石篤郎、佐藤潤一郎、南学正臣、

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

- 飯利太朗 部分型尿崩症の新しい変異の機能解析と V2 受容体作動薬のユニークな作用 第 27 回バゾプレシン研究会 2017
- 21 榎田紀子、飯利太朗 Gタンパク質共役受容体と疾患—新しい調節機構への示唆 特別シンポジウム 第 1 回日本臨床薬理学会関東・甲信越地方会 (招待講演) 2016.
- 22 飯利太朗、榎田紀子 Gタンパク質共役受容体: GRK を標的とする制御と創薬戦略 特別講演 第 14 回 GPCR 研究会 (招待講演) 2016.
- 23 飯利太朗、榎田紀子 カルシウム感知受容体: まれな内分泌疾患から GPCR の新しいパラダイムへ 教育講演 第 89 回日本内分泌学会学術総会 (招待講演) 2016.
- 24 太田由紀、土屋聖子、武永美津子、角田智志、大滝正訓、新美純、大石真也、藤井信孝、渡辺実、武半優子、飯利太朗、松本直樹 ヒト乳癌細胞に対する新規 KSP(kinesin spindle protein)阻害薬の効果 第 37 回日本臨床薬理学会 2016.
- 25 大滝正訓、飯利太朗、太田有紀、渡辺実、武半優子、榎田紀子、松本直樹 Gタンパク質 α サブユニット (Gi) の構造安定性に関わる静電相互作用の計算 第 37 回日本臨床薬理学会 2016.
- 26 榎田紀子、石堂雄毅、田中征治、三谷康二、矢島由紀、大石篤郎、間中勝則、佐藤潤一郎、南学正臣、飯利太朗 部分型腎性尿崩症の原因となる V2 受容体変異の機能解析から得られる新たな知見 第 89 回日本内分泌学会学術総会 2016
- 27 佐藤潤一郎、榎田紀子、間中勝則、三谷康二、江田真紀子、飯利太朗 インバースアゴニズム: GPCR の古典的概念の再評価と ARB 第 1 回日本臨床薬理学会関東・甲信越地方会 2016.
- 28 間中勝則、佐藤潤一郎、三谷康二、藤田恵、伊東伸朗、木下祐加、飯利太朗、榎田紀子 シナカルセトの原発性副甲状腺機能亢進症に対する治療効果 第 1 回日本臨床薬理学会関東・甲信越地方会 2016.
- 29 間中勝則、藤田恵、佐藤潤一郎、三谷康二、飯利太朗、榎田紀子 コレスチラミンが著効した抗甲状腺薬抵抗性 Basedow 病の一例 第 1 回日本臨床薬理学会関東・甲信越地方会 2016.

[図書] (計 4 件)

- ① 飯利太朗 ホルモン中的作用機構 (1) 細胞膜受容体 診断と治療社 『内分泌代謝科専門医研修ガイドブック』日本内分泌学会編 pp21-23, 2018.
- ② 榎田紀子、飯利太朗 後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症とバイアスシグナル 特集: 自己免疫の関与する内分泌代謝疾患の最前線 最新医学社 最新医学 73(5): 75-81, 2018.
- ③ 飯利太朗 妊娠と甲状腺疾患のオーバービューと問題点 特集: 甲状腺疾患のすべて 医歯薬出版 医学のあゆみ 260(9): 101-106, 2017.
- ④ 佐藤潤一郎、飯利太朗 男子思春期早発症の分子メカニズム~Gタンパク質/Gタンパク質共役受容体の異常による疾患 特集: 思春期早発症 科学評論社 内分泌・糖尿病・代謝内科 44(1):101-106, 2016.

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 1 件)

名称: Gs 共役受容体に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法
発明者: 飯利太朗、榎田紀子
権利者: 東京大学、飯利太朗、榎田紀子
種類: 特願
番号: 2011-230569
取得年: 平成 28 年 2 月 29 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

http://www.todai-jinnai.com/kenkyu/g_endocrinology/g03_endocrinology

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 榎田 紀子 佐藤 潤一郎 間中 勝則 三谷 康二

ローマ字氏名： (MAKITA, noriko) (SATO, Junichiro) (MANAKA, katsunori) (MITANI, koji)

大滝 正訓 武半 優子 太田 有紀 渡辺 実 松本 直樹
(OOTAKI, masanori) (TAKEBA yuko) (OHTA, yuki) (WATANABE, minoru) (MATSUMOTO, naoki)

大和田 智彦
(OHWADA, tomohiko)

※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。