

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01049

研究課題名(和文) AKAP-PKA結合阻害剤による新規PKA制御法の疾患治療への応用

研究課題名(英文) Application of AKAPs-PKA disruptors in the treatment of PKA-related diseases

研究代表者

内田 信一 (Uchida, Shinichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50262184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓集合管においてバソプレシン/cAMP/protein kinase A (PKA)/AQP2水チャネルシグナル伝達系は尿濃縮力を調節する。最近、バソプレシン2型受容体の異常により発症する先天性腎性尿崩症の治療戦略として、AKAP-PKA結合阻害剤FMP-API-1/27がPKA/AQP2を直接活性化することを発見した。FMP-API-1/27はLRBA-PKA結合を特異的に阻害しており、LRBAをノックアウトしたマウスはAQP2を活性化できず多尿になることを明らかにした。一方で、FMP-API-1/27の誘導体展開を進め、尿濃縮効果が高く経口投与で有効な化合物群を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LRBAは腎臓集合管においてAQP2の膜輸送を制御していた。LRBAはT細胞においてCTLA4受容体の膜輸送を制御することが知られており、免疫と尿濃縮において類似の膜輸送機構が存在すると考えられた。LRBAの機能不全は免疫不全症を引き起こすが、Lrba KOマウスには免疫不全の表現型がないことから生体内のLRBA機能を詳細に解析することが困難である。今後、腎臓におけるLRBA機能を解析することにより膜輸送の新しい基本原理の解明が期待できる。AKAP-PKA結合阻害剤は既存薬には無い新たなカテゴリーのPKA活性制御剤であり、化合物の分子標的を明らかにすることで新規研究分野の開拓が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Vasopressin / cAMP / protein kinase A (PKA) / AQP2 water channels signaling pathway regulates body water homeostasis in kidneys. Loss-of-function mutations in the vasopressin type 2 receptor cause congenital nephrogenic diabetes insipidus (NDI) characterized by defective urine concentration. We focused on direct PKA activators as a novel therapeutic target for congenital NDI. A low molecular weight compound FMP-API-1/27 dissociates interactions between PKA and its anchoring proteins (AKAPs) and then directly activates PKA in renal collecting ducts. Among various AKAP-PKA interactions, FMP-API-1/27 specifically dissociated the LRB-PKA interaction. Lrba knockout mice displayed polyuric phenotype, with severely impaired AQP2 phosphorylation. We next promoted further development of derivatives of FMP-API-1/27 in terms of pharmacological potency. We synthesized compounds that had an antidiuretic effect via oral administration.

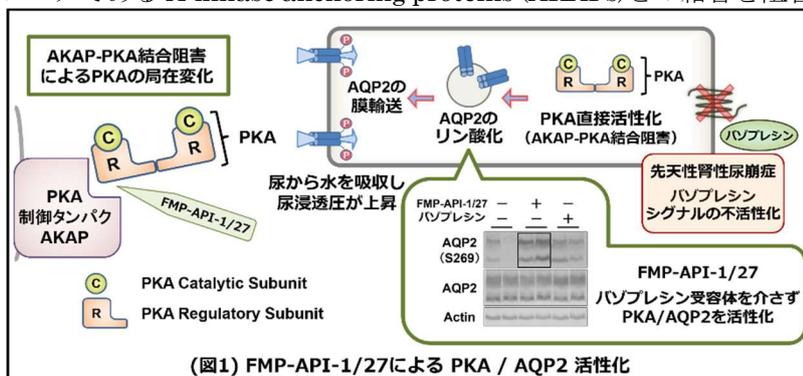
研究分野：腎臓内科学関連

キーワード：protein kinase A AKAPs AKAPs-PKA結合阻害 先天性腎性尿崩症 肥満症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

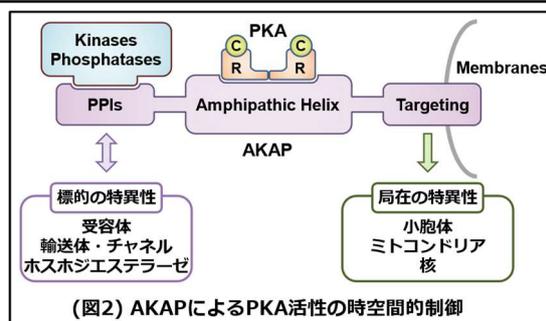
当腎臓内科学教室では、バゾプレシン/cAMP/PKA シグナルが体内の水恒常性維持を担う AQP2 水チャネルを活性化し、尿を濃縮する機構を解明してきた。先天性腎性尿崩症は、バゾプレシン 2 型受容体 (V2R) の機能喪失型変異により尿濃縮機構が破綻し多尿をきたす疾患である。従来の治療戦略は、障害された V2R を介さずに細胞内の cAMP を増加させる方法であり、phosphodiesterase 阻害薬や GPCR アゴニストなどの効果が検証されたが、治療薬の実用化には至っていない。そこで、研究代表者は PKA の直接活性化に着眼し、腎性尿崩症モデルマウスの尿量を劇的に減少させる低分子化合物 FMP-API-1/27 を発見した(図 1)。FMP-API-1/27 は、PKA と PKA のアンカータンパクである A-kinase anchoring proteins (AKAPs) との結合を阻害する作用を有し、既存の化合物には無い高い AQP2 活性化効果を発揮した。本研究では、我々が独自に保有する AKAP-PKA 結合阻害剤を出発点として、まずその詳細な作用機序を解明する事で新たな PKA の制御機構を解明し、同時に PKA が関与する尿崩症を含む多様な疾患の新たな治療戦略(薬)を提示する。



(図1) FMP-API-1/27による PKA / AQP2 活性化

### 2. 研究の目的

AKAP は PKA と結合する一方、PKA の基質となる分子(輸送体やチャネルを含む)や他のシグナル分子および足場蛋白と結合し、基質特異的な細胞内 PKA シグナルの時空間的制御の中心をなす scaffold protein である(図 2)。AKAP として同定されている蛋白は 70 種類を超え、4 種類の PKA サブユニットとの結合の組み合わせは臓器・細胞により異なり、PKA 制御の多様性・特異性を生み出している。FMP-API-1/27 は、PKA ヘアロステリックに作用し AKAP-PKA 結合を阻害する作用を持つ。本研究の目的は、腎臓集合管細胞の PKA/AQP2 を強力に活性化させた FMP-API-1/27 の標的 AKAP を明らかにし、特定の AKAP 周囲の新規 PKA シグナル伝達系を解明するとともに、AQP2 以外の蛋白のリン酸化制御にも、この AKAP-PKA 結合阻害が応用可能であるかを明らかにする事である。



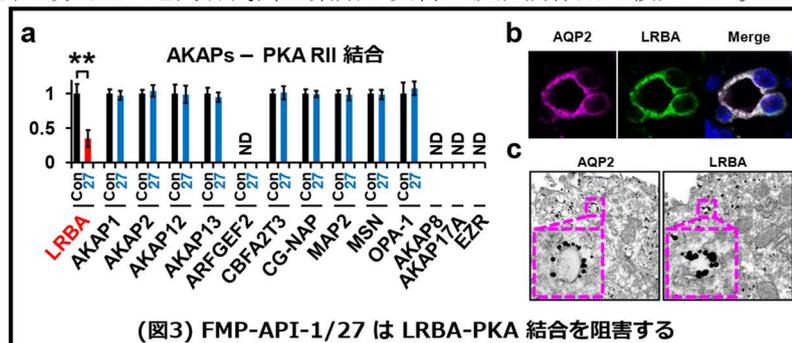
(図2) AKAPによるPKA活性の時空間的制御

### 3. 研究の方法

(1) RNA-Seq やプロテオミクス解析で同定された腎臓に発現する主要な AKAP を HEK293T 細胞に強制発現させ、免疫沈降法を用いて FMP-API-1/27 がどの AKAP-PKA 結合を阻害できるのかを評価した。(2) 化合物が標的としていた AKAP をノックアウトしたマウスを作成し、代謝リックケージを用いて尿浸透圧・尿量・飲水量を測定した。Lrba ノックアウトマウスは尿崩症の表現型を呈していたため V2R agonist, [deamino-Cys1, d-Arg8]-vasopressin (dDAVP) (0.4 μg/kg)を腹腔内投与し多尿の原因を検討した。(3) リード化合物 FMP-API-1/27 の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多数の PKA 活性制御候補薬の開発を進め、尿濃縮効果が高い化合物の開発を進めた。(4) FMP-API-1/27 の構造類似化合物の中には尿濃縮効果がないが、肥満症の治療標的である褐色脂肪細胞の PKA を強力に活性化する化合物 X があった。マウスを通常食群、高脂肪食 (カロリー比 60%脂質含有) 負荷群、化合物 X 添加 (0.05%) 高脂肪食負荷群に分け 16 週間各食餌・薬剤を負荷し抗肥満作用を検証した。

### 4. 研究成果

(1) 先天性腎性尿崩症の病態解明と治療薬開発：  
腎臓集合管に発現する主要な AKAP-PKA 結合の組み合わせを免疫沈降法により評価し、FMP-API-1/27 が LRBA と PKA との結合を特異的に阻害していることを明らかにした(図 3a)。AQP2 は PKA により直接リン酸化されることが知られているが、LRBA-PKA 複合体が AQP2 をリン酸化するた



(図3) FMP-API-1/27 は LRBA-PKA 結合を阻害する

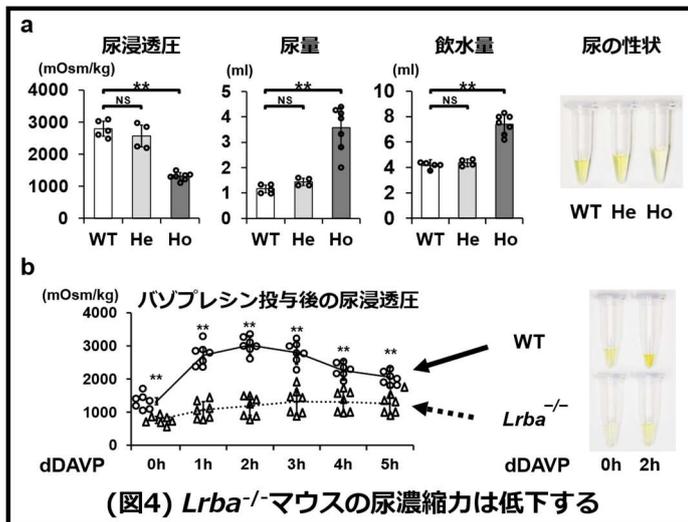
めには両者の局在の一致が必要である。免疫蛍光染色により細胞内局在を評価したところ、AQP2 と LRBA は腎臓集合管において細胞膜直下において共染色されており (図 3b)、電子顕微鏡においては両者とも細胞内小胞に局在していた (図 3c)。

そこで、LRBA の AQP2 活性への影響を評価するために *Lrba* ノックアウトマウスを作成し、尿濃縮能を評価した。*Lrba* ノックアウトマウスの尿浸透圧は低下しており、尿量・飲水量が増加していた (図 4a)。尿浸透圧の低下はバゾプレシンシグナルへの不応性が原因と考えられたため、dDAVP を投与し、尿浸透圧の変化を観察した。WT マウスでは尿浸透圧が上昇したが、*Lrba* ノックアウトマウスでは、尿浸透圧がわずかにしか上昇しなかった (図 4b)。今まで数々の AKAP ノックアウトマウスが作成されてきたが、尿濃縮障害を起こした AKAP は初めてであり、この結果は、LRBA が AKAP-PKA 結合阻害剤である FMP-API-1/27 の標的分子として矛盾しないことを示している。

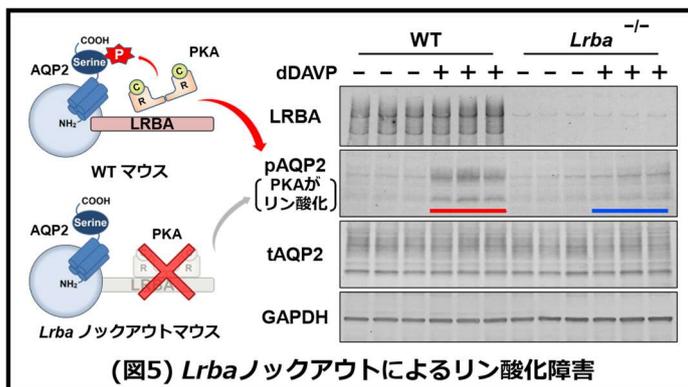
PKA によってリン酸化された AQP2 は細胞膜へと輸送され水透過性が上昇することが知られているが、*Lrba* ノックアウトマウスにおいては、vesicle 周囲に PKA が存在できないため、dDAVP 投与下における AQP2 のリン酸化が高度に障害され、尿濃縮力が低下したと考えられた (図 5)。今まで、AQP2 のリン酸化に関わる PKA が腎臓集合管においてどのように制御されているか不明であったが、PKA 制御を AKAP 単位に分解し、特定の AKAP 周囲の PKA シグナル伝達系に解析の照準を絞り込むことで、既存の方法では到達できなかった病態に直結する PKA シグナル伝達系の解析が可能になった。一方で、尿濃縮効果を発揮したリード化合物 FMP-API-1/27 の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多数の PKA 活性制御候補薬の開発を進め、尿濃縮効果が強く経口投与で有効な化合物群を開発し特許出願 (特願 2020-097124) を行った。

## (2) PKA 関連疾患の治療薬開発:

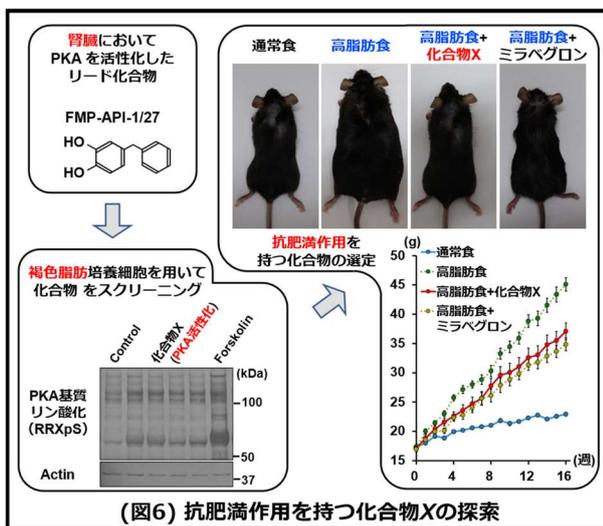
LRBA を同定した我々の解析手法は先天性腎性尿崩症に限らない他の PKA 関連疾患へも応用が可能であり薬剤シーズの創出や新規病態解明が見込める。我々が保有する化合物の一つ (化合物 X) は、腎臓には効果が無かったが褐色脂肪細胞において高い PKA 活性化効果を発揮した。肥満症も PKA 関連疾患の一つとして知られている。肥満は種々の疾患の危険因子であり早期に治療介入することが望ましいが、一方で汎用可能な治療薬は無いのが現状である。褐色脂肪細胞には、PKA が関わるシグナルとしてカテコラミン/cAMP/PKA/UCP1 シグナル伝達系があり、熱産生効果があることから抗肥満の標的となっている。抗肥満薬として  $\beta 3$  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  $\beta 1$  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。化合物 X を高脂肪食肥満モデルマウスに 16 週間経口投与すると、ミラベグロンとは対照的に心拍や血圧に影響なく抗肥満効果を発揮した (図 6)。化合物 X には、褐色脂肪のミトコンドリアを保護する効果があり、ミトコンドリアにおける熱産生作用の改善から抗肥満効果を発揮したと考えられた。化合物 X は、生体内においていくつかの PKA 基質をリン酸化していることをすでに明らかにしており、PKA 基質のリン酸化動態を指標に化合物の標的を絞り込んでいく。



(図4) *Lrba*<sup>-/-</sup>マウスの尿濃縮力は低下する



(図5) *Lrba*ノックアウトによるリン酸化障害



(図6) 抗肥満作用を持つ化合物Xの探索

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakano Yuta, Susa Koichiro, Yanagi Tomoki, Hiraoka Yuichi, Suzuki Takefumi, Mori Takayasu, Ando Fumiaki, Mandai Shintaro, Fujiki Tamami, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 58
2. 論文標題 Generation of NPHP1 knockout human pluripotent stem cells by a practical biallelic gene deletion strategy using CRISPR/Cas9 and ssODN	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 85 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-022-00655-0	査読の有無 有
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 Kobayashi Satoru, Mizuno Nana, Yokoi Kyoko, Mori Takayasu, Sohara Eisei, Uchida Shinichi	4. 巻 101
2. 論文標題 Congenital nephrogenic diabetes insipidus presenting as osmotic demyelination syndrome in infancy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e28552 ~ e28552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000028552	査読の有無 有
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 Fujii Shinya, Kikuchi Eriko, Suzuyama Honoka, Watanabe Yuko, Ishigami Yuasa Mari, Masuno Hiroyuki, Mori Takayasu, Isobe Kiyoshi, Uchida Shinichi, Kagechika Hiroyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Structural Development of Salicylanilide Based SPAK Inhibitors as Candidate Antihypertensive Agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 2817 ~ 2822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.202100273	査読の有無 有
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 Nanamatsu Azuma, Mori Takayasu, Ando Fumiaki, Furusho Taisuke, Mandai Shintaro, Susa Koichiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 77
2. 論文標題 Vasopressin Induces Urinary Uromodulin Secretion By Activating PKA (Protein Kinase A)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 1953 ~ 1963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17127	査読の有無 有
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 Lin Meng-Hsuan, Chen Jen-Chi, Tian Xuejiao, Lee Chia-Ming, Yu I-Shing, Lo Yi-Fen, Uchida Shinichi, Huang Chou-Long, Chen Bi-Chang, Cheng Chih-Jen	4. 巻 6
2. 論文標題 Impairment in renal medulla development underlies salt wasting in Clc-k2 channel deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e151039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.151039	査読の有無 有
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 Ando Fumiaki	4. 巻 25
2. 論文標題 Activation of AQP2 water channels by protein kinase A: therapeutic strategies for congenital nephrogenic diabetes insipidus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1051 ~ 1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02108-6	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 Fujimaru Takuya, Uchida Shinichi, Sohara Eisei et al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Genetic Background and Clinicopathologic Features of Adult-onset Nephronophthisis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2021.02.005	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 原悠, 安藤 史顕, 内田信一	4. 巻 90
2. 論文標題 【水・電解質を科学する】 体液異常の病態と治療 細胞外液量が低下する病態と治療 多尿、尿崩症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 830-834
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 Takahashi Naohiro, Kikuchi Hiroaki, Usui Ayaka, Furusho Taisuke, Fujimaru Takuya, Fujiki Tamami, Yanagi Tomoki, Matsuura Yoshiaki, Asano Kenichi, Yamamoto Kouhei, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Arita Makoto, Sohara Eisei	4. 巻 25
2. 論文標題 Deletion of Alox15 improves kidney dysfunction and inhibits fibrosis by increased PGD2 in the kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 445 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02021-y	査読の有無 有
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 -

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 9245
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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 安藤 史顕, 内田 信一
2. 発表標題 AKAP-PKA結合は尿量調節の創薬標的として有望である
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤木珠美、安藤史顕、萬代新太郎、須佐紘一郎、森崇寧、蘇原映誠、頼建光、内田信一
2. 発表標題 PKA活性化薬は白色脂肪のベージュ化を促進し、高脂肪食負荷マウスで体重増加を抑制する
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤 史顕
2. 発表標題 AQP2水チャネルの制御メカニズムと治療標的としての有用性
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021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

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～2020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～2020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～2020年

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～2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 化合物又はその塩、医薬、抗利尿薬及びプロテインキナーゼA活性化薬	発明者 内田 信一、影近 弘之、安藤 史顕、 森 修一	権利者 国立大学法人東 京医科歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-097124	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------