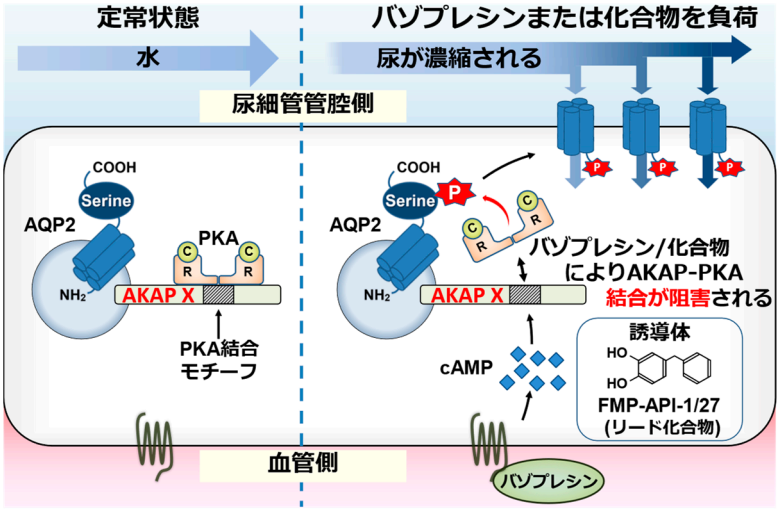
174　PKA関連疾患の病態解明と新規治療法開発研究	安藤　史顕

【目的】本研究では、我々が発見した新規 Protein kinase A（PKA）制御法を用いることで、先天性腎性尿崩症や肥満症などの治療薬開発に難渋している PKA 関連疾患の病態解明と新規治療戦略の提言を目指す。研究代表者は、腎臓集合管において尿濃縮力を調節するバゾプレシン／cAMP／PKA／AQP2 水チャネルシグナル伝達系の研究を行っており、最近 cAMP を介さずに直接的に PKA を活性化し、AQP2 をリン酸化できる低分子化合物 FMP-API-1/27 を発見した。この化合物には、PKA と PKA のアンカー蛋白（AKAP）との結合を阻害する作用が報告されている。そこで、50 種類以上の AKAP の中から、化合物が標的とする AKAP X を同定し、新規尿濃縮病態の解明を進めた。

【方法】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。次に、化合物が標的としていた *AKAP X* をノックアウトしたマウスを作製し、メタボリックケージを用いて尿浸透圧・尿量・飲水量を測定した。*Akap X* 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。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。

【結果】腎臓集合管において AKAP X と AQP2 の局在は一致していた。*Akap X* ノックアウトマウスを解析したところ尿浸透圧が低下し、尿量・飲水量が増加していた。dDAVP を投与しても *Akap X* ノックアウトマウスの AQP2 はリン酸化されず、尿浸透圧が上昇しないことから、AKAP X はバゾプレシンシグナルにおいて AQP2 のリン酸化を仲介する最も重要な AKAP であることが明らかとなった。さらに、リード化合物 FMP-API-1/27 の誘導体展開や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 活性制御薬の開発を進め、尿濃縮薬として有望な化合物の特許を出願した。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 X は、高脂肪食誘発肥満モデルマウスの体重をポジティブコントロールであるミラベグロンと同等に低下させることができた。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。AKAP - PKA 結合阻害剤は新しいカテゴリーの PKA 制御剤であり、治療薬のみならず新規病態機構を解明するためのツールとしても有用であることから、様々な分野のシーズ創出に貢献し得る。

AKAP X は尿濃縮機構に必須の分子である



174. PKA 関連疾患の病態解明と新規治療法開発研究

安藤　史顕

*東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 茨城県腎臓疾患地域医療学講座

Key words：PKA，AKAP，AQP2，腎性尿崩症，肥満症

緒　言

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 を活性化する方法であり、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）[1，2]。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。そこで、この新規化合物を用いることで先天性腎性尿崩症の病態解明研究を進めると同時に治療薬の開発も行った。FMP-API-1/27 が結合を阻害する AKAP - PKA 結合を探索し、AKAP X が標的であることを同定した。*Akap X* ノックアウトマウスにおいては、PKA による AQP2 のリン酸化が高度に障害されており、尿崩症の表現型を呈した。今まで数々の *AKAP* ノックアウトマウスが作製されてきたが、尿濃縮障害を起こした AKAP は初めてであり、AKAP X は腎臓集合管の PKA／AQP2 シグナルを仲介する最も重要な AKAP であることが明らかとなった。

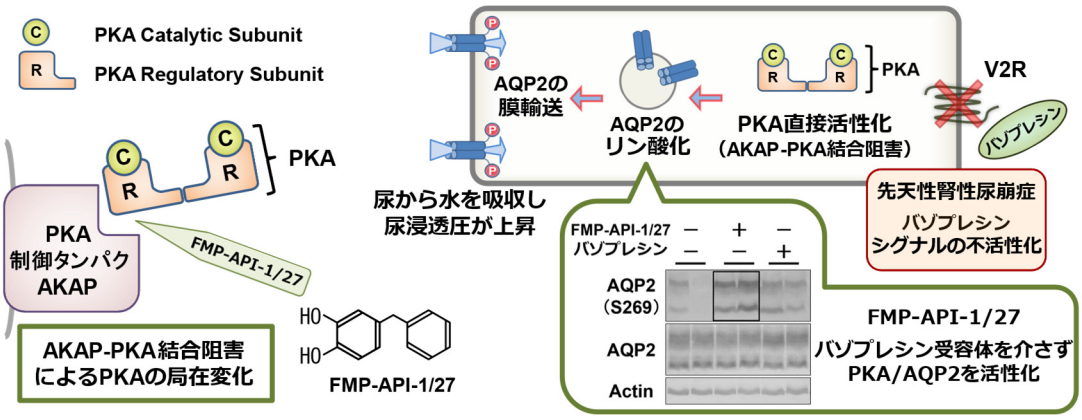


図 1. FMP-API-1/27 による PKA/AQP2 活性化機構

FMP-API-/127 は、腎臓集合管の PKA をバゾプレシン非依存性に活性化し AQP2 をリン酸化することができる。

低分子化合物 FMP-API-1/27 は、25 年以上の AQP2 研究史において生体内の AQP2 を最も強く活性化する効果を持つことから、腎外組織への効果検証にも着手した。肥満症も PKA 関連疾患の一つとして知られている。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

*現在の所属：東京医科歯科大学病院 腎臓内科

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 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。そこで、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化合物ライブラリーから抽出し、それらの PKA 活性化効果を、褐色脂肪培養細胞を用いて検証した。さらに、高脂肪食肥満モデルマウスを用いて、抗肥満作用を有する化合物を絞り込み化合物 X を同定した。

方　法

1. AKAPs - PKA 結合評価

AKAPs は 50 種類以上あり、PKA サブユニットも 4 種類あることから、結合の組み合わせは多様である。そこで、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 AKAPs と PKA を HEK293T 細胞に強制発現させ、FMP-API-1/27 が結合を阻害する AKAP - PKA の組み合わせを、免疫沈降法を用いて評価した。

2. マウスの尿量・尿浸透圧評価

マウスをメタボリックケージで 24 時間飼育した。飼料および水は自由摂取、自由飲水とした。尿浸透圧・尿量・飲水量を測定した。尿浸透圧は Fiske One-ten Osmometer を用いて計測した。

3. デスモプレシン投与試験

V2R agonist : [deamino-Cys1, d-Arg8]-vasopressin（dDAVP）（0.4 μ g/kg）を腹腔内投与した後の尿浸透圧を経時的に測定した。

4. 高脂肪食肥満モデルマウスにおける化合物 X の効果検証

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・薬剤を負荷した。飼料・水は自由摂取、自由飲水とし、週に 2 回体重および食餌摂取量を測定した。

結果および考察

1.　先天性腎性尿崩症の病態解明と治療薬開発

RNA-Seq やプロテオミクス解析で同定された腎臓集合管に発現する全ての 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 AKAP X 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 2a）。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［3］、AKAP X - PKA 複合体が AQP2 をリン酸化するた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 AKAP X 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、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 2b、c）。

そこで、AKAP X の AQP2 活性への影響を評価するために、*Akap X* $^{-/-}$マウスを作製し尿濃縮能が障害されるかを評価した。*Akap X* $^{-/-}$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 3a）。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、バゾプレシン 2 型受容体のアゴニストであるデスモプレシン（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、*Akap X* $^{-/-}$マウスでは、尿浸透圧がわずかにしか上昇しなかった（図 3b）。今まで数々の *AKAP* ノックアウトマウスが作製されてきたが、尿濃縮障害を起こした AKAP は初めてであり、この結果は、AKAP X 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。

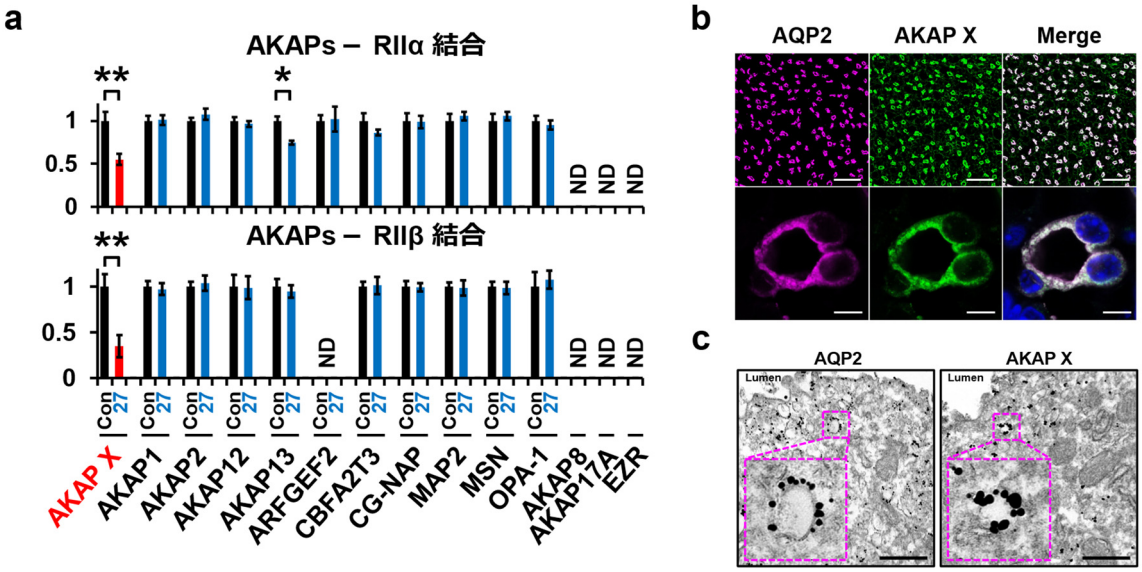


図 2. FMP-API-1/27 は、AKAP X - PKA R II α/β結合を阻害する

a) FMP-API-1/27 は、腎臓集合管に発現する AKAP のうち、AKAP X - LRBA 結合を特異的に阻害した。

b) AQP2 と AKAP X は腎臓集合管において共局在する。上段 : Scale bars は 100 μm、下段 : Scale bars は 10 μm。

c) AQP2 と AKAP X は細胞内小胞に局在する。Scale bars は 500 nM。

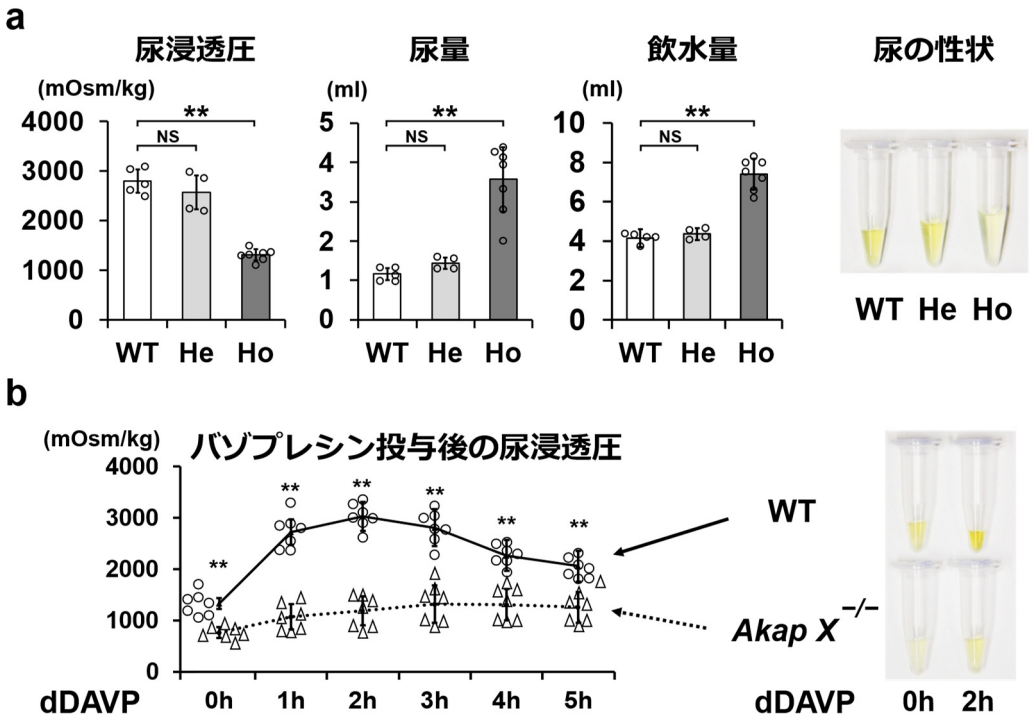


図 3. *Akap X* $^{-/-}$マウスの尿濃縮力は低下する

a) *Akap X* $^{-/-}$マウスの尿浸透圧は低下し、尿量・飲水量が増加する。Dunnett's test、**p＜0.01、NS : not significant。 He : *Lrba* $^{+/-}$、Ho : *Lrba* $^{-/-}$。

b) *Akap X* $^{-/-}$マウスは、バゾプレシン投与下においても尿浸透圧が上昇しない。Two-sided Student's t-test、**p＜0.01。

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。*Akap X* $^{-/-}$ マウスにおいては、vesicle 周囲に PKA が存在できないことから dDAVP 投与下における AQP2 のリン酸化が高度に障害され、AQP2 の活性が低下したと考えられた（図 4）。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、尿濃縮効果が高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。

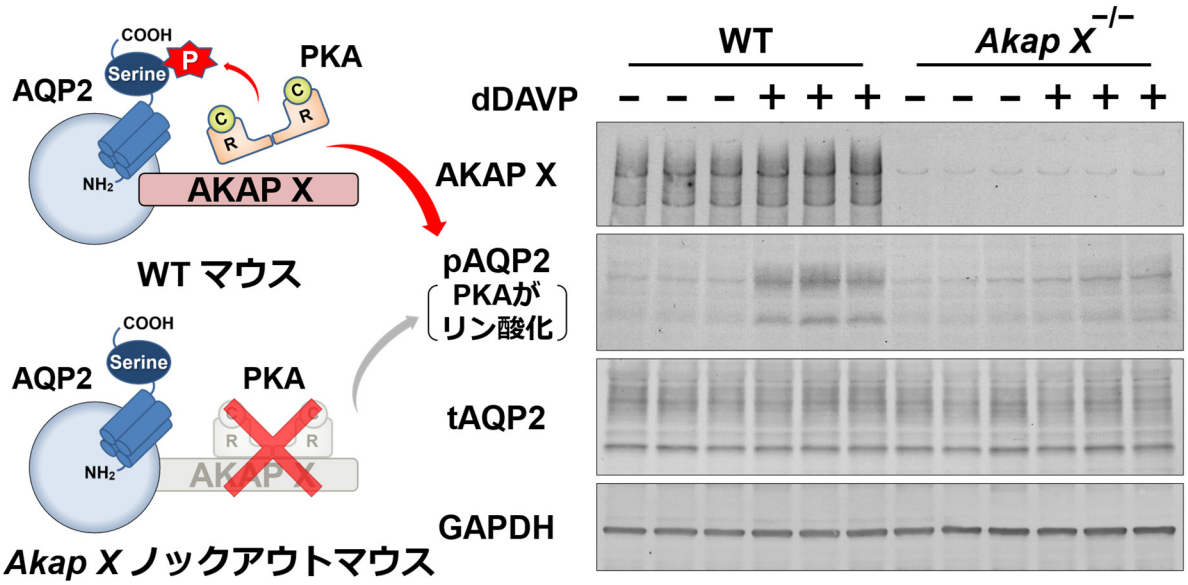


図 4. *Akap X* $^{-/-}$ マウスにおいては AQP2 のリン酸化が高度に障害される
AKAP X をノックアウトすると PKA が AQP2 周囲に局在できなくなりリン酸化が障害される。

AKAP X 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β3 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β1 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 5a）。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（図 5b）。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。

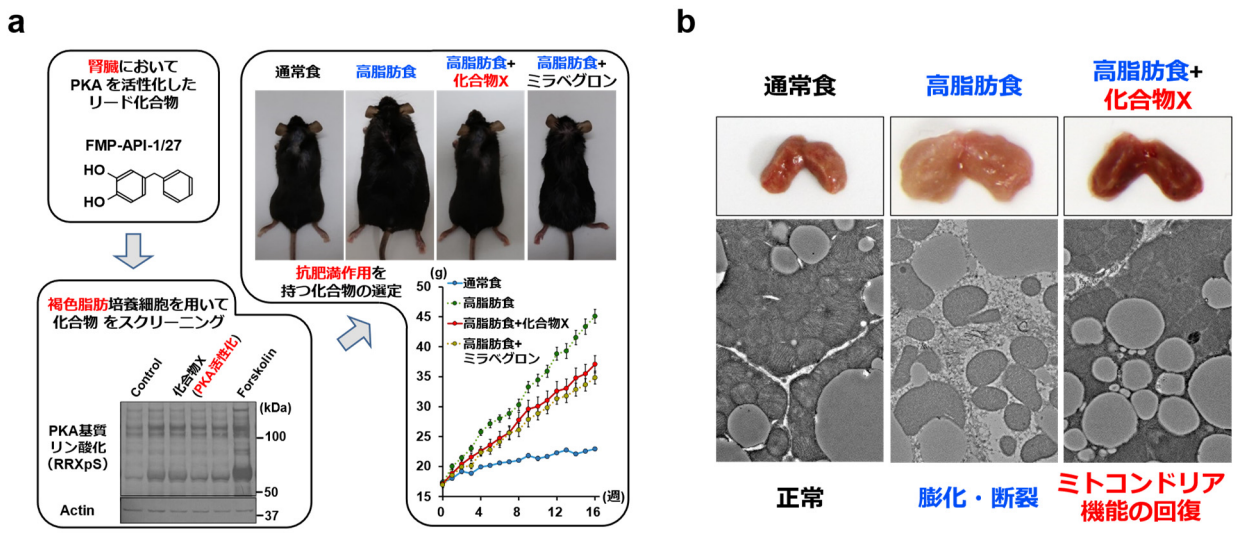


図 5. 抗肥満作用を持つ化合物 X の探索

a) 抗肥満作用を持つ化合物の選定。

b) 化合物によるミトコンドリア保護効果。

我々が独自に保有する PKA 制御化合物には確かな標的特異性と高い活性があり、既存薬とは異なる標的組織の PKA を活性化することができる。先天性腎性尿崩症や肥満症に代表される治療が困難な PKA 関連疾患は数多く残されており、新たなカテゴリーの PKA 活性制御薬がアンメット・メディカル・ニーズを満たす可能性が強い。今後も、PKA 活性作用を有する化合物の開発を進めるとともに、化合物の生理活性と作用機序の同定を突破口として、PKA 関連疾患の病態解明も行う。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は東京医科歯科大学生体材料工学研究所生体機能分子研究部門薬化学の影近弘之教授であり、化合物の誘導体展開を担当して頂いた。この場を借りて感謝申し上げる。

文　献

1) Ando F, Mori S, Yui N, Morimoto T, Nomura N, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Kondo Y, Kagechika H, Uchida S. AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus. Nat Commun. 2018 Apr 12;9(1):1411. doi: 10.1038/s41467-018-03771-2. PMID: 29650969.

2) Ando F. Activation of AQP2 water channels by protein kinase A: therapeutic strategies for congenital nephrogenic diabetes insipidus. Clin Exp Nephrol. 2021 Oct;25(10):1051-1056. doi: 10.1007/s10157-021-02108-6. Epub 2021 Jul 5. PMID: 34224008.

3) Hoffert JD, Fenton RA, Moeller HB, Simons B, Tchapyjnikov D, McDill BW, Yu MJ, Pisitkun T, Chen F, Knepper MA. Vasopressin-stimulated increase in phosphorylation at Ser269 potentiates plasma membrane retention of aquaporin-2. J Biol Chem. 2008 Sep 5;283(36):24617-27. doi: 10.1074/jbc.M803074200. Epub 2008 Jul 7. PMID: 18606813.