

# GPCR シグナル調節機構とその異常による疾患の解明

東京大学 医学部附属病院 腎臓・内分泌内科

槇田 紀子

## 1. はじめに

Gタンパク質共役受容体(GPCR)は、古典的ホルモン作用だけではなく、認知、感覚、代謝、循環調節、免疫などさまざまな細胞外シグナルを細胞内に伝える鍵分子の1つである。具体的には、アゴニストによってGPCRが活性化されると、その構造変化によって細胞内の三量体Gタンパク質が活性化され、Gタンパク質がエフェクターを活性化することでシグナルが細胞内に伝えられる。このGPCRによるGタンパク質の活性化機構は、進化上酵母から哺乳動物まで非常によく保存されている。一方で、進化の過程でシグナルの多様性も獲得してきた。哺乳動物では、約800種類のGPCRが、16種類の $\alpha$ 、6種類の $\beta$ 、12種類の $\gamma$ 、それらの組み合わせを考えると潜在的には約1000種類のGタンパク質を活性化し、約100種類のエフェクターにシグナルを伝えている。GPCRシグナル異常を原因とするさまざまな疾患が明らかとなり、GPCRをターゲットとする多くの薬剤が開発されてきた。このようにシグナルが多様になればなるほど、必然的にシグナルを特異的に制御する仕組みが必要となってくる (*Circ Res.* 112:327-34, 2013;文献1, *J Biol Chem.* 287:38705-15, 2012;文献2)。

当初、アゴニスト、GPCR、Gタンパク質の組み合わせは1対1対応と考えられてきたが、後に1つのGPCRが複数のGタンパク質を活性化する例が徐々に明らかになってきた。そして2000年以降、いくつかのグループが、ある特殊なアゴニスト、allosteric modulatorの存在下では、本来複数のGタンパク質と共役するはずのGPCRが特異的なGタンパク質のみを活性化する事象があるのではないかと主張するようになった。この事象はバイアスのかかった活性化 (biased agonism)、選択的活性化 (selective activation) とよばれている。しかしこの事象は、これまで提唱されてきたtwo state model (GPCRには活性型と不活性型の二つの構造があり、アゴニストは活性型に、インバースアゴニストは不活性型にその平衡状態をシフトさせるという考え) では説明できない。それに代わり、GPCRには複数の活性型・不活性型構造があるとするmultiple state modelが提唱され、それを支持するデータが蓄積してきている。

われわれもこのモデルを支持するユニークな自己抗体を後天性低Ca尿性高Ca血症(AHH)の患者で発見した (*Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5443-8, 2007;文献3)。この自己抗体は、Ca感知受容体 (CaSR) に対するアゴニストの作用をアロステリックに調節し、本来複数のGタンパク質と共役するCaSRを介してGqを活性化、Giは抑制するというユニークな機能選択性を示すことがわかった。薬剤の場面でGPCRのbiased agonism/selective activationを示唆するデータが集積する中、疾患の原因としての自己抗体がallosteric biased modulatorとして作動していることを示した世界初の例である。

## 背景と目的

GPCRシグナル異常による疾患を解析することにより、生理的なGPCRの活性化機構だけではなく、その特異的な制御メカニズムとしてのbiased agonism/selective activationの詳細を解明する。

### ① 後天性低Ca尿性高Ca血症(AHH)における機能選択的自己抗体の解析

原因不明の高カルシウム血症患者の背景には、家族歴や既往歴がなく、臨床的にAHHが疑われる患者が少なからずいる。そのような患者をAHHと診断し、適切な治療につなげていく。また、AHHの原因となっている自己抗体の機能解析により、biased agonism/selective activationに示唆をあたえる事象の解析を行う。

### ② V2 バソプレッシン受容体変異体と作動薬の機能選択的調節

V2受容体の機能喪失性の変異はほとんどが完全型であり、臨床的には完全型先天性腎性尿崩症の原因となる。一方で、部分型先天性腎性尿崩症の原因となる機能喪失性変異の報告はこれまでに10数例しかない。われわれは、部分型の腎性尿崩症 (NDI) の原因となるV2受容体の新たな変異を2つ発見し、解析した (*J Biol Chem.* 2012-1: 文献4)。いずれの変異も膜発現低下をきたし、V2受容体作動薬

がその細胞膜発現を回復させることを示した。さらにある種の V2 受容体作動薬が、作用する相手である V2 受容体変異体によって自らの作用を変化させる protean agonism を可能にすることを発見した。下流のシグナルを選択的に活性化・抑制する biased agonism/selective activation の特殊例といえ、GPCR の特異的な制御メカニズム解明に示唆をあたえるものである。

## 2. 方法

### ①後天性低 Ca 尿性高 Ca 血症 (AHH) における機能選択的自己抗体の解析

#### ◆AHH 患者の新規診断・機能解析：

AHH が疑われる患者血清を用いて、蛍光細胞免疫染色でスクリーニングを行う。抗体の存在が疑われたら、免疫沈降や精製 IgG による機能解析を行う。さらに、合成ペプチドに対する ELISA などの手法を用いて、自己抗体の作用部位を検討する。将来的には、モノクローナル抗体の精製まで進み、CaSR のユニークな活性化フォーム (Gq のみを特異的に活性化) の解明をめざす。

#### ◆特異的治療の開発：

AHH 患者は、自己抗体の力価によっては治療を要する高カルシウム血症をきたしうる。通常の高カルシウム血症に対する治療 (輸液、ビスホスフォネート、ループ利尿剤) に抵抗性で、さらに自己抗体が原因でありながら高容量の副腎皮質ホルモンが奏功しない例も報告されており、メカニズムに基づく治療の開発が必要である。Ca 感知受容体のポジティブアロステリックモジュレーターであるカルシミメティクスの作用が、自己抗体の作用を乗り越えられるかにつき、インビトロの系で検討する。将来的には、重症 AHH 患者でその治療効果を検討する。

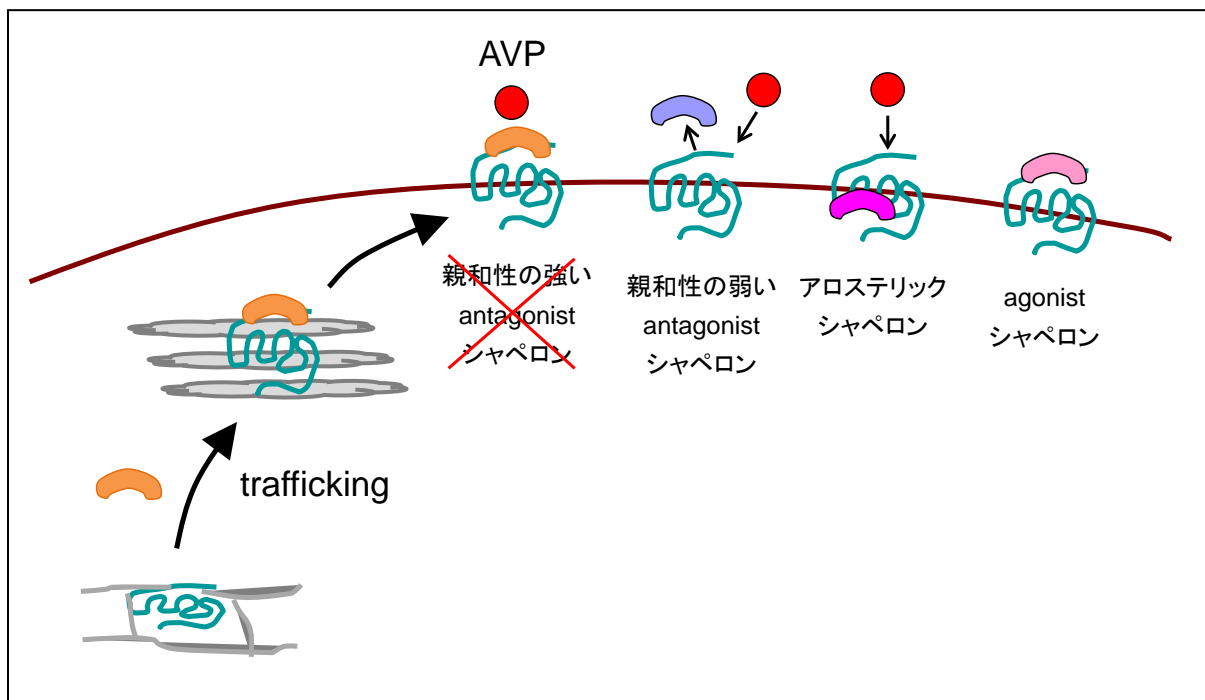
### ② V2 バソプレッシン受容体変異体と作動薬の機能選択的調節

#### ◆部分型 NDI の新たな変異の同定と解析：

臨床的に部分型の機能喪失性変異は、部分型のため機能解析が可能で、生理的な V2 受容体活性化機構を明らかにする上で示唆に富む。心因性多飲と誤診されている部分型 NDI 患者を ADH 基礎値の相対的高値を指標として積極的に発見し、遺伝子診断を行う。われわれは新たな変異を確認しており、その機能喪失の機序を明らかにしたい。具体的には、細胞過剰発現の系で蛍光細胞免疫染色あるいは細胞表面 ELISA で発現量と局在を検討し、アゴニスト結合アッセイ、cAMP アッセイ、ERK1/2 リン酸化を指標として機能を検討する。

#### ◆新たな V2 受容体作動薬の作用機構の解析：

先に報告した V2 受容体作動薬は、膜発現は増加させるが、アンタゴニストであるため NDI の治療に用いがたい。我々はアゴニストとシャペロン作用を併せ持つ新しい作動薬を見出しており、その作用機構を細胞膜への発現量、機能の面から複数の変異体で検討する。



### 3. 結果 研究成果

#### ① 後天性低Ca尿性高Ca血症(AHH)における機能選択的自己抗体の解析

##### ◆AHH患者の新規診断・機能解析:

複数のグループと共同することにより、原因不明の高カルシウム血症を呈する患者から新たに2例のAHH患者を見出した。自己抗体の機能解析も同時進行中である (*Endocr J.* 2014;61(4):303-9;文献5)。われわれは一例目のAHH患者において、Gqは活性化するがGiは抑制するというユニークな自己抗体を同定した。そのユニークなモノクローナル抗体を作成する目的で、患者末梢血からB細胞をソートし、EBウイルス感染による不死化を行った。得られたクローンには、目的の抗体を産生するものは認められなかった。ウイルス感染の有無によるクローン化のバイアスをなくす方法を思案しているところである。

##### ◆特異的治療の開発:

Ca感受受容体のポジティブアロステリックモジュレーターであるカルシミメティクスの作用をインビトロの系で検討したところ、自己抗体の作用を乗り越えることが確認できた。実際、重症AHH患者でカルシミメティクスによる治療効果がみられている。

#### ② V2バソプレッシン受容体変異体と作動薬の機能選択的調節

##### ◆部分型NDIの新たな変異の同定と解析:

複数のグループと共同し、ADH基礎値の相対的高値を指標として新たな部分型NDI患者を発見した。変異体を作成し、細胞への過剰発現の系で蛍光細胞免疫染色、細胞表面ELISAで発現量と局在を検討することにより、発現はするが小胞体に留まるために機能が不十分となることが確認できた。実際にcAMPアッセイ、ERK1/2リン酸化を指標とした部分型の機能低下も確認された。

##### ◆新たなV2受容体作動薬の作用機構の解析:

アゴニストとシャペロン作用を併せ持つ新しい作動薬の作用機構を検討した。興味深いことに、その作動薬はある変異体にはアゴニストとして、別の変異体にはアンタゴニストとして作用していることがわかった。

### 4. 考察 まとめ

われわれがAHH患者で見出したCaSRに対するユニークな自己抗体は、GPCRのbiased agonism/selective activationを支持する自己抗体として世界初であったが、その後日本全国から同様にユニークな作用を持つAHH患者の自己抗体が見つかってきている。その詳細な作用部位・作用機序についてさらに検討を続けていく。

部分型腎性尿崩症の原因となるV2受容体変異体は、現時点でも10数例しか同定されていないが、われわれは新たに数例発見し、その機能解析によりGPCRの特異的制御に示唆をあたえる事象を見出した。完全型腎性尿崩症と異なり診断は困難ではあるが、今後もADH基礎値高値をメルクマールに、潜在している部分型腎性尿崩症患者の同定とその機能解析を続けていく。

GPCRのbiased agonism/selective activationは、これまでわれわれが検討してきた病態や薬剤作用の場面においてばかりではなく、生理的な場面においても作動している可能性を考え、新たな創薬を展望しつつさらなる検討を続けていきたい。

### 5. 発表論文、参考文献

1. **Makita N**, Kabasawa Y, Otani Y, Firman, Sato J, Hashimoto M, Nakaya M, Nishihara H, Nangaku M, Kurose H, Ohwada T, Iiri T. Attenuated desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor by water-soluble N-nitrosamines that induce S-nitrosylation without NO release. *Circ Res.* 112:327-34, 2013
2. Oishi A, **Makita N (corresponding)**, Sato J, Iiri T. Regulation of RhoA signaling by the cAMP-dependent phosphorylation of RhoGDI $\alpha$ . *J Biol Chem.* 287:38705-15, 2012
3. **Makita N**, Sato J, Manaka K, Shoji Y, Oishi A, Hashimoto M, Fujita T, Iiri T. An acquired hypocalciuric hypercalcemia autoantibody induces allosteric transition among active human Ca-sensing receptor conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 5443-8, 2007
4. Takahashi K\*, **Makita N\* (equally contributed and corresponding)**, Manaka K, Hisano M, Akioka Y, Miura K, Takubo N, Iida A, Ueda N, Hashimoto M, Fujita T, Igarashi T, Sekine T, Iiri T. V2 vasopressin receptor (V2R) mutations in partial nephrogenic diabetes insipidus highlight protean agonism of V2R antagonists. *J Biol Chem.* 287:2099-106, 2012
5. **Makita N**, Iiri T. Biased agonism: a novel paradigm in G protein-coupled receptor signaling observed in acquired hypocalciuric hypercalcemia. *Endocr J.* 2014;61(4):303-9.