

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 脳浮腫の新規治療法開発：アクアポリン4の調節機構と創薬基盤研究                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Sub Title        | Development of a new therapy for brain edema: study for regulation of AQP4 as a molecular target                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Author           | 安井, 正人(Yasui, Masato)<br>平野, 秀典( Hirano, Yoshinori)<br>阿部, 陽一郎( Abe, Yoichiro)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Publisher        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Publication year | 2018                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Jtitle           | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2017. )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Abstract         | <p>アクアポリン4(AQP4)は, 脳浮腫の病態に関与していることが明らかになってきた。そこで, 脳浮腫に対する分子標的創薬としてAQP4に注目し, 独自に開発した大規模スクリーニングから絞り込んだヒット化合物を評価した。その結果, 少なくとも1つの化合物がAQP4阻害作用を示した。また, ドッキング研究からその化合物は細胞外側から阻害をしている可能性が示唆された。次にAQP4のエンドサイトーシスのメカニズムを検討した。その結果, 細胞膜への輸送, AQP4タンパク質の安定化, 細胞膜からライソゾームへと輸送されるためのシグナルの存在が示唆された。</p> <p>Aquaporin4 (AQP4) has been shown to be involved in the development of brain edema. We recently developed a high throughput-screening system for AQP4, as a target molecule for the treatment of brain edema. In this project, we identified at least one chemical compound that inhibits AQP4, by using a stopped flow apparatus with AQP4 proteoliposome. Computer based docking study revealed that this chemical may interact with the extracellular domain of AQP4. Next, we examined molecular mechanisms of AQP4 endocytosis to understand the molecular regulation of AQP4. We have identified three signals for ; i) trafficking to the plasma membranes, ii) protein stability and iii) sorting to lysosomes.</p> |
| Notes            | <p>研究種目：基盤研究(B)(一般)</p> <p>研究期間：2015～2017</p> <p>課題番号：15H04688</p> <p>研究分野：医歯薬学</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Genre            | Research Paper                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15H04688seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15H04688seika</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04688

研究課題名(和文)脳浮腫の新規治療法開発：アクアポリン4の調節機構と創薬基盤研究

研究課題名(英文)Development of a new therapy for brain edema: study for regulation of AQP4 as a molecular target

研究代表者

安井 正人 (YASUI, MASATO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：90246637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000 円

研究成果の概要(和文)：アクアポリン4(AQP4)は、脳浮腫の病態に関与していることが明らかになってきた。そこで、脳浮腫に対する分子標的創薬としてAQP4に注目し、独自に開発した大規模スクリーニングから絞り込んだヒット化合物を評価した。その結果、少なくとも1つの化合物がAQP4阻害作用を示した。また、ドッキング研究からその化合物は細胞外側から阻害をしている可能性が示唆された。次にAQP4のエンドサイトーシスのメカニズムを検討した。その結果、細胞膜への輸送、AQP4タンパク質の安定化、細胞膜からライソゾームへと輸送されるためのシグナルの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin4 (AQP4) has been shown to be involved in the development of brain edema. We recently developed a high throughput-screening system for AQP4, as a target molecule for the treatment of brain edema. In this project, we identified at least one chemical compound that inhibits AQP4, by using a stopped flow apparatus with AQP4 proteoliposome. Computer based docking study revealed that this chemical may interact with the extracellular domain of AQP4. Next, we examined molecular mechanisms of AQP4 endocytosis to understand the molecular regulation of AQP4. We have identified three signals for; i) trafficking to the plasma membranes, ii) protein stability and iii) sorting to lysosomes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アクアポリン 脳浮腫 グリア

## 1. 研究開始当初の背景

脳浮腫は脳幹ヘルニアを誘発する可能性が高いため、そのコントロールは臨床極めて重要である。しかしながら、脳浮腫に対する画期的な新薬は未開発のままで、現在なお対症療法に頼らざるを得ない状況が続いている。一方、水分子を選択的に通過させる膜チャネル蛋白、アキュアポリン (AQP) の発見は体内水循環を分子レベルで理解する扉を開いてくれた。哺乳類の脳では、主に AQP4 が発現している。AQP4 は神経細胞ではなく、グリア細胞に局限して発現している。AQP4 が脳浮腫の病態生理に深く関与していることが多くの研究で示されてきた。また、AQP4 は痙攣の病態生理や脳における炎症性サイトカインの発現にも関係していることが解ってきた。最近では躁うつ病患者の脳で AQP4 の発現が増加しているという報告もあり、臨床側からも AQP4 に対する新薬の期待が急速に高まってきている。

これまで AQP 阻害薬に関する研究は行われてきたが、画期的な新薬の開発には至っていない。その原因の一つとして、AQP の水透過性を評価する高感度で特異性の高いハイスループットスクリーニング系が欠如していたことが挙げられる。研究代表者らは AQP4 作用薬の開発に向けた基盤研究を独自に進めてきた。その結果、亜鉛や銅などの重金属が AQP4 のチャネル開閉を制御し、水透過性を抑制することを見出した (Yukutake *et al.* 2009)。更に麻酔薬であり脳浮腫軽減効果も知られているプロポフォールが AQP4 の水透過性を特異的かつ可逆的に抑制することも発見した (Kato *et al.* 2013)。そして、AQP4 に対する大規模スクリーニング系の開発に取り組み、浸透圧変化に対する細胞応答の違いに基づいた独自の方法を編み出した。

一方、AQP4 の調節機構に関しては、チャネル活性やエンドサイトーシスの可能性が示唆されてきたが、いまだ不明な点が多い。我々は、東京大学浜窪研究室と共同で、バキュロウイルスディスプレイ法を用いて AQP4 の細胞外ドメイン立体構造を認識するモノクローナル抗体をいくつか作製し、それらの抗体を用いて免疫組織学的解析を行なった。その結果、従来の抗体で確認されていた細胞形質膜に加え、AQP4 は細胞内にも多く局在していることを発見した。更にトランスフェリンの取り込みとの 2 重染色で、これらの細胞内局在の多くはエンドソームにあることが確認された。また、これらの抗体の結合が AQP4 のエンドサイトーシスを誘導することも見出した。これらの結果から、AQP4 の細胞形質膜発現量がエンドサイトーシスで調節されていることが強く示唆された。

そこで、本研究では AQP4 作用薬に対する大規模スクリーニングから絞り込んだヒット化合物を評価する一方で、AQP4 の調節機構、特にチャネル活性とエンドサイトーシスのメカニズム解明に焦点を絞りながら、AQP4 作

用薬開発の基盤研究を行う。

## 2. 研究の目的

独自に開発した AQP4 作用薬の大規模スクリーニングからいくつかの化合物を絞り込み、動物モデルを用いて脳浮腫抑制効果を評価し、臨床開発に向けたヒット化合物を同定する。また、その作用機序を検討することで、AQP4 調節機構の分子メカニズムを明らかにしていく。具体的には、

### □ AQP4 阻害薬ヒット化合物の同定と評価：

1 次スクリーニングから絞った 40 種類の候補化合物を対象に 2 次スクリーニングを行ない、ヒット化合物を同定すると同時に作用機序も明らかにしていく。

### □ AQP4 チャネル活性機構の解明：

AQP4 活性調節部位をその構造機能相関から明らかにする。更に分子動力学計算を用いてチャネル活性のメカニズムを検討する。

### (3) AQP4 のエンドサイトーシス：

AQP4 のエンドサイトーシスを調節するホルモンや神経伝達物質を明らかにする。AQP4 変異体の解析を行なうことで、エンドサイトーシスの作用機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)ハイスループットスクリーニングで絞ったヒット化合物候補の 2 次スクリーニングとして、AQP4 精製蛋白リポソーム系を用いたストップフロー法による水透過性を測定した。ネガティブコントロールとして、AQP1 精製蛋白リポソームを用いた。

(2)スクリーニングにより見出した化合物と AQP4 の相互作用様式を予測するためにドッキングにより複合体モデルを作成した。タンパク質の構造は結合したリガンドにより、構造が変化することが知られている。そのため、既知の結晶構造に対してドッキングを実行しても、目的としたタンパク質-リガンド間の結合様式を予測することは困難である。そこで、Schrödinger 社の Induced Fit Docking (IFD) プロトコルを用いて、リガンドが結合した際の周囲のアミノ酸残基の構造変化を考慮したドッキングを行った。また、生化学実験の結果から、化合物は細胞外側に結合することが示唆されるため、AQP4 の細胞外部分をリガンド結合部位とし、スコア上位 20 ポーズを観察対象とした。AQP4 の結晶構造は 2D57.pdb を使用した。

(3)AQP4 M1 アイソフォームの C 末端欠損変異体 cDNA は PCR 法により作製した。23 番目のメチオニンをロイシンに置換することにより M23 アイソフォームが発現しないようにし、また N 末端に FLAG タグを付加することによ

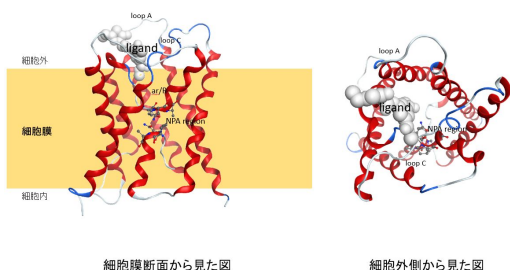
り全ての変異体の発現量を抗 FLAG タグ抗体により定量的に検出可能とした。シーケンスを確認後 pEBmulti puro ベクターに挿入し、リポフェクション方により CHO、HEK293、HeLa 細胞に導入し、ピュロマイシン（10 microg/ml）で薬剤選択を行ったのちウェスタンブロッティング及び蛍光抗体法による染色を行なった。ウェスタンブロッティングでは発現ベクターの AQP4 cDNA の下流に EGFP を IRES により連結したコンストラクトを用いることにより EGFP の発現を指標として導入効率を求めた。タンパク質分解経路を明らかにする目的で、Bafilomycin A1（100 nM）もしくは MG-132（1 microM）で 24 時間処理した。生細胞への抗 AQP4 細胞外ドメイン抗体の取り込みは、抗体を Alexa Fluor555 で標識し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ライソゾームへの局在を観察するため、発現ベクターは AQP4 cDNA の下流にライソゾームのマーカーである Lamp1 と EGFP との融合タンパク質をコードする cDNA を IRES により連結したものをを用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 20 万種の化合物を用いたハイスループットスクリーニングにより阻害作用が見られた 746 化合物について 2 次スクリーニングを行い、最終的に候補として 138 化合物を残し、ストップフロー試験にて阻害作用を確認したところ、1 つの化合物が AQP4 阻害作用を示した。この化合物は AQP1 に対する作用がなく、AQP4 に特異的であること、濃度依存性に効果があること、可逆的作用であることを確認した。しかしながら、その後の実験で十分な再現性を得ることができなかった。現在その原因を確認中である。そのため、残念ながら動物実験による検討を進めるに至らなかった。

(2) 一方、ドッキングの結果、観察対象とした 20 ポーズのすべてで、リガンドが AQP4 のポアの ar/R region より内側には入らずに細胞外から塞ぐ位置にあり、loop A と loop C のアミノ酸残基と相互作用を形成していた。図 1 はスコアの最も良かったリガンドのポーズと AQP4 の構造を示している。このことから、スクリーニングにより見出したリガンドは細胞外側からポアを塞ぐことで AQP4 の機能阻害をしている可能性が示唆された。

図 1



(3) 抗体結合に伴う内在化・細胞内輸送に必要な AQP4 分子内シグナルの同定を行うため、AQP4 の C 末端ドメインの部分欠損変異体を作製し、CHO、HEK293、HeLa 細胞に発現させ、各 AQP4 変異体の局在及び発現量を蛍光抗体法による染色及びウェスタンブロッティングで調べたところ、C 末端 23 残基（Val301-Val323）以上の欠損により発現量の低下が認められた。しかしながら C 末端から 53 残基（Gln271-Val323）の欠損体では発現量の低下は見られなかった。C 末端から 32 残基（Leu292-Val323）欠損した AQP4 の発現量は MG132 で処理することにより増加したことからユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けている可能性が示唆された。C 末端 53 残基の欠損体は細胞外に投与した蛍光標識抗体が取り込まれなかったことから細胞膜への輸送が障害されていると考えられた。一方、C 末端 32 残基の欠損体ではタンパク質発現量としては少ないものの、細胞外に投与した蛍光標識抗体が取り込まれることから細胞膜への輸送は障害されていないと考えられた。また取り込まれた蛍光標識抗体はライソゾームのマーカーである Lamp1 と共存した。一方、AQP4 は細胞外ドメインに結合する抗体により速やかに内在化され、ライソゾームへと輸送されることがわかっていて、Lys259 から Ala270 までを欠損させると抗体結合に伴うライソゾームへの輸送が低下したことから、この領域にライソゾームへの輸送に関与するシグナルがあると予想された。以上のことから細胞膜への輸送に必要なシグナル、AQP4 タンパク質の安定化に関わるシグナル、細胞膜からライソゾームへと輸送されるためのシグナルという少なくとも 3 つのシグナルが存在する可能性が示唆された。現在論文投稿準備中を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Abe Y, Goda W, Ikeshima-Kataoka H, and Yasui M. The Dual Effects of the Astrocyte-Specific Enhancer of the AQP4 M1 Promoter. *FEBS Lett.*, 591(23): 3906-3915. (2017) (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) “Water Biology and Medicine; roles of aquaporins.”, Masato Yasui, “The First International Symposium on Sophisticated Coupling and Integration of Genius+ Kernel Technologies (GKTEC)”, Grenoble(France), (2017)

(2) “Aquaporins in Brain Disorders”, Masato Yasui, “The First

Chinese Microcirculation Week ”，招待講演，(北京)，(2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安井 正人 (YASUI, Masato)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：90246637

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

平野 秀典 (HIRANO, Yoshinori)

国立研究開発法人理化学研究所生命システム研究センター・研究員

研究者番号：50360631

##### (4) 研究協力者

阿部 陽一郎 (ABE, Yoichiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号：10317331