

審査の結果の要旨

氏名 矢嶋 由紀

本研究は先天性部分型腎性尿崩症（nephrogenic diabetes insipidus : NDI）の患者から新たな V2 受容体の不活化変異を同定し、その変異受容体の機能解析を試みたものである。また、他の研究グループが、非ペプチドアゴニスト OPC51803（OPC5）が変異 V2R 受容体を細胞内で活性化すると報告しているが、この OPC5 が新たな変異受容体にどのように機能するか解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 多飲、多尿を呈する 4 歳男児に水制限試験とバソプレシン負荷試験を施行し、臨床的に部分型 NDI と診断した。その後 V2R 遺伝子のミスセンス変異 T273M（3 番目の細胞内ループにある 273 番目のアミノ酸をスレオニンからメチオニンに変える変異）を確認した。部分型 NDI として遺伝子変異まで同定されているケースは非常に稀で、本例は 15 番目のケースで、これまで報告されていない新たな変異であった。
2. Myc tag のついた T273M 変異受容体を COS7 細胞に一過性に発現させて免疫染色と細胞表面 ELISA を施行し、野生型 V2R が細胞膜に局在するのに対し、T273M 変異受容体の一部は細胞膜、一部は小胞体内に存在することを確認した。
3. 次に野生型 V2R、T273M 変異受容体、既に部分型 NDI の原因となることが報告されている Y128S 変異受容体と S333del 変異受容体を COS7 細胞に一過性に発現させ、AVP と OPC5 による cAMP の蓄積を調べた。3 つの変異受容体は AVP 処理、OPC5 処理いずれも野生型 V2R に比べて部分的な cAMP 蓄積しか示さなかったが、各受容体で OPC5 の用量反応曲線は AVP とほぼ同様の用量依存性の cAMP 蓄積を示した。
4. OPC5 による cAMP 蓄積がどこで起こっているかを調べるため、細胞内に移行できないペプチドアンタゴニストを加えて cAMP 蓄積を評価した。ペプチドアンタゴニストは AVP あるいは OPC5 による cAMP 蓄積をほぼ完全に阻害した。これは COS7 細胞に一過性発現させた場合のみならず、既報で使用されている MDCK 細胞に一過性に発現させた場合でも同様だった。また OPC5 は AVP と同様、野生型 V2R や V2 変異体を一過性発現させた COS7 細胞で ERK1/2 をリン酸化させるが、ペプチドアンタゴニストはこれを阻害した。以上の結果から OPC5 が既報とは異なり、細胞膜に発現している V2R 変異体を活性化していることを確認した。
5. 次に OPC5 に pharmacochaperone 効果（細胞内に留まる変異受容体を成熟させて細胞膜への輸送を助ける効果）があるかどうか調べる実験を行った。まず HEK293 細胞に myc tag 付きの V2 受容体（野生型、T273M、Y128S、S333del）を過剰発現させ immunoblotting を行った。野生型 V2R とは異なり、変異受容体では約 50kDa の GPCR の位置に成熟 V2R タ

ンパクと想定されるバンドが検出されないが、OPC5を長時間処理するとこのバンドが有意に増強し、OPC5が少なくともこの3つの変異体の成熟を促進させることを示唆した。

6. 次に OPC5 によって成熟した変異受容体が細胞膜へ輸送された結果、変異受容体の細胞膜での発現が増えるかどうか調べるため、以下の実験を行った。各 V2R 受容体を発現させた COS7 細胞に AVP あるいは OPC5 を長時間処理して細胞表面の ELISA を施行したところ、OPC5 は AVP と同様に脱感作経路を作動させて細胞膜の受容体発現を減少させる一方、細胞膜での受容体発現を増加させる pharmacochaperone 効果を持ち、各受容体で OPC5 の脱感作効果と pharmacochaperone 効果のバランスが異なるという結果を得た。
7. OPC5 の脱感作作用を裏付けるため、COS7 細胞に受容体内在化を阻害することが示されている K44A dynamin (dominant negative dynamin) を WT-V2R や V2R 変異体と共発現させることでアゴニストによる受容体内在化を阻害できるか検討した。K44A dynamin は AVP 処理、OPC5 処理ともに WT-V2R、T273M-V2R、Y128S-V2R の膜での発現減少を部分的に回復させた。これは OPC5 には脱感作作用がありこれらの受容体の内在化をもたらすことを意味している。
8. OPC5 にはアゴニストとしての脱感作効果と pharmacochaperone 効果があることが判明したが、治療の観点からは両者のバランスを考えるのは重要であり、OPC5 を長期間処理した後の cAMP 蓄積を評価した。OPC5 は、Y128S や S333del のような cAMP 蓄積の点で機能の弱い変異体には脱感作効果が少なく相対的に pharmacochaperone 効果が強くなり、その結果持続的な cAMP 産生をもたらした。T273M のように機能の強い変異体には脱感作効果が強く、相対的に pharmacochaperone 効果が弱くなり、cAMP 蓄積が減少した。pharmacochaperone 効果が脱感作効果を相殺すると、V2R 変異体のシグナルが持続可能と言え、NDI 患者の少なくとも一部にとって見込みのある治療オプションになりうる。
9. 野生型 V2 受容体、各変異変異体によって OPC5 の pharmacochaperone 効果、アゴニストとしての脱感作効果の程度が異なっていたが、これは protean agonism の一例である。

以上、本論文は先天性部分型腎性尿崩症の患者から新たな変異 T273M を発見し、V2R アゴニストである OPC5 が既報のように変異 V2R 受容体を細胞内でそのまま活性化するのではなく、細胞膜に発現している V2R 変異体を活性化していることを確認した。また OPC5 はアゴニストとしての脱感作効果のみならず、pharmacochaperone 効果を持ち、pharmacochaperone 効果が脱感作効果を相殺すると変異受容体のシグナルが持続可能となり、腎性尿崩症の少なくとも一部の治療のオプションとなりうることを示した。本研究は对症治疗しかない腎性尿崩症に新たな治療法の可能性をもたらし、学位の授与に値するものと考えられる。