

第13回

In vivo実験医学シンポジウム

アクアポリン研究 の最前線

病態生理の理解から
新たな診断・治療法の開発まで

抄録集

アクアポリン研究の最前線 ～病態生理の理解から新たな診断・治療法の開発まで～

安井 正人先生 慶應義塾大学医学部 薬理学教室

クライオ電子顕微鏡を用いた構造創薬の現状

藤吉 好則先生 東京医科歯科大学高等研究院 卓越研究部門

分子シミュレーションによるアクアポリンの分子透過メカニズムの解明

山本 詠士先生 慶應義塾大学理工学部 システムデザイン工学科

アクアポリンの進化と細胞内局在：小胞体とエクソゾーム

石橋 賢一先生 明治薬科大学 病態生理研究室

アクアポリン4と視神経脊髄炎 (Aquaporin 4 and Neuromyelitis Optica)

藤原 一男先生 福島県立医科大学医学部 多発性硬化症治療学講座
脳神経疾患研究所 多発性硬化症・視神経脊髄炎センター

神経疾患とアクアポリン4 ～アルツハイマー病を中心として～

阿部 陽一郎先生 慶應義塾大学医学部 薬理学教室

炎症性疾患におけるアクアポリン3の役割

竹馬 真理子先生 慶應義塾大学医学部 薬理学教室

2019 **11/27** 水

13:00～17:35 シンポジウム

18:00～19:30 懇親会

会場 学士会館210号室 (千代田区神田錦町3-28)

定員 150名

第13回 In vivo実験医学シンポジウム



オーガナイザー
慶應義塾大学医学部 薬理学教室
安井 正人

ご挨拶

アクアポリンの発見から約30年が過ぎた。その功績に対してノーベル化学賞が授与されたのも2003年に遡る。この発見で、生命にとって不可欠な水制御の分子レベルでの理解が深まったことは間違いない。腎臓における尿濃縮のメカニズムや唾液の分泌、レンズの透明化などもアクアポリンの機能で説明できるようになった。さらに構造生物学や計算機科学の著しい発展により、水分子がいかにしてアクアポリンのポアを選択的に通過することができるのか、その理解も深まった。

一方、アクアポリンの生理的意義や病態生理との関連に関しては、まだまだ未知の分野も多い。最近では、癌との関連や脳リンパ排泄、さらにはアルツハイマー病の病態との関連も指摘されるようになってきた。

本シンポジウムでは、アクアポリンの最先端研究に携わっている先生方のお話を伺うことで、アクアポリンに対する理解をさらに深めていくと同時に、新しい診断法や治療法開発の可能性も議論できればと考えている。

2019年11月27日

アクアポリン研究の最前線

～病態生理の理解から新たな診断・治療法の開発まで～

安井 正人

慶應義塾大学医学部 薬理学教室

体内水分バランスは、生体の恒常性維持機能の最も重要な調節機構である。水分バランスの不均衡は、様々な病態に伴って認められ、その補正が治療上有効となることが多い。水チャネル、アクアポリンの発見は、体内水分バランスや分泌・吸収に対する我々の理解を分子レベルまで深めることとなった。哺乳類では13種類のアクアポリン（AQP0—AQP12）が確認されている。アクアポリンファミリーは、そのアミノ酸配列の相同性と機能から大きく2つのグループに分けられる。水分子のみを通過させるグループ（アクアポリン）とグリセリンなどの小物質を通過させるグループ（グリセロポリン）である。アクアポリンはほぼ全身にわたって分布している。それぞれのアクアポリンはユニークな組織分布を示しており、それぞれに特有の生理的意義が示唆されている。例えば、AQP0とレンズの透過性、AQP2と尿の濃縮、AQP5と唾液の分泌などである。また、AQP4は主に脳に発現しているが、脳のリンパ排泄機構との関与が指摘され、アルツハイマー病との関連も含め、最近特に注目されている。さらには、白内障、尿崩症そして視神経脊髄炎など、疾患との関連も解明されている。一方、グリセロポリン系のAQP3と癌細胞特有の代謝経路との関連が明らかになりつつある。その他、単なる細胞膜の水透過制御では説明がつかないような細胞機能との関連も示唆されており、今後もアクアポリン研究のさらなる発展が望まれている。

本日のシンポジウムでは、アクアポリンの構造機能解析や細胞生物学的な基礎研究から創薬など医学への応用まで、アクアポリンに関する最先端の知見を幅広く紹介できればと考えている。そして、身体の隅々でアクアポリンが機能することで、我々の体内水バランスがいかに巧妙に働いているか、皆様のイメージが膨らめば幸いである。

クライオ電子顕微鏡を用いた 構造創薬の現状

藤吉 好則

東京医科歯科大学高等研究院 卓越研究部門

基礎生物学や医学、薬学などにおいて、膜タンパク質の立体構造情報は重要である。その情報取得には電子顕微鏡が適しているが、電子線損傷が問題で、電子線損傷の温度依存性を測定した結果、8 K以下に試料を冷却すると室温に比べて1/20に電子線損傷を軽減できることが明らかになった。それゆえ、クライオ電子顕微鏡を開発し改良を重ねて¹⁾、結晶学的手法で膜タンパク質の構造解析を行ってきた。しかし、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法が構造生物学を激変させている²⁾。

膜タンパク質の解析例として、水チャネルの速い水透過と高い選択性の機構をAQP1の解析³⁾で提案したが、この解析では水分子は見えていなかった。それで、AQP0の構造解析⁴⁾で水分子の配置を観察した。しかし、この構造はチャネルが閉じた状態であったので、速い水透過能を有するAQP4の構造を解析した⁵⁾。電子線結晶学により構造解析された2.8Å分解能の構造解析によって、チャネル内の8個の水分子が分離して観察されたが、X線結晶学による1.8Å分解能での構造解析⁶⁾では、水分子が分離して解析されなかった。この例は、膜タンパク質の構造を脂質膜の中にある状態で解析する重要性を示している。

近年、直接電子線を計測できる高性能のカメラが開発されて、構造研究分野が激変した。しかし、膜タンパク質の構造を解析するためには、ミセルなどのバックグラウンドを最少にできる方法が必要でGraDeR法を開発した⁷⁾。クライオ電子顕微鏡とGraDeR方を用いて、ギャップ結合チャネルの構造を短期間に、3.3Å分解能で構造解析することに成功した⁸⁾。この様に短期間で高分解能構造解析法が確立したので、クライオ電子顕微鏡法が構造創薬に役立つ時代になった。新しい創薬戦略として、Drug Rescuingを提案している。

1) Y. Fujiyoshi, *Proc., Jpn Acad., Ser. B*, **91**, 447-468 (2015).

2) M. Liao et al., *Nature*, **504**, 107-112 (2013).

3) Y. Murata et al., *Nature*, **407**, 599-605 (2000).

4) T. Gonen et al., *Nature*, **438**, 633-638 (2005).

5) K. Tani et al., *JMB*, **389**, 694-706 (2009).

6) J.D. Ho et al., *PNAS*, **106**, 7437-7442 (2009).

7) F. Hauer et al., *Structure*, **23**, 1769-1775 (2015).

8) A. Oshima et al., *Nature Commun.*, **7**, 13681 (2016).

分子シミュレーションによる アクアポリンの分子透過 メカニズムの解明

山本 詠士

慶應義塾大学理工学部 システムデザイン工学科

アクアポリンは細胞膜中に存在する水チャネルであり、ナノ秒に1個という透過速度で水分子のみを選択的に透過させ、細胞内の圧力を調整している。現在までに哺乳類では13種類のアクアポリンが確認されているが、いくつかのアクアポリンに関する構造解析から、細孔内を水分子が1列で拡散することが明らかになっている。分子動力学シミュレーションは分子挙動をコンピュータ上で可視化できる手法として近年よく細胞膜タンパク質に関する研究に用いられており、これまでアクアポリンを介した水分子透過現象に関する多くの研究がなされてきた。細孔内でのアミノ酸と水分子の相互作用や分子透過ダイナミクスに関する分子レベルでの知見を与えることができる。

我々は、膜近傍における水輸送現象や生体内における水の役割の解明を目指し、分子動力学シミュレーション法を用いた生体膜近傍の水分子挙動に関する研究を行ってきた。特にアクアポリン1に関しては、細孔内において水分子以外の分子透過を阻害するフィルタ部分 (ar/R選択フィルタ) を構成するアミノ酸残基が1/fゆらぎという特異なゆらぎを示し、水分子の透過性に影響を与えることを解明した[E. Yamamoto *et al.*, *Phys. Rev. E* **89**, 022718 (2014)]。また近年は、未だ結晶構造が得られていない、水分子以外の低分子 (アンモニアや過酸化水素、アニオンなど) を透過させる哺乳類のアクアポリンに関する分子動力学シミュレーション研究も行っている。データベースからアミノ酸配列の似た鑄型 (タンパク質立体構造) を参照し、幾つかの特徴量を定義して立体構造を予測する方法であるホモロジーモデリング法を用いて、アクアポリン立体構造を予測した。特に、アニオンチャネルとしての働きで知られるアクアポリン6 [M. Yasui *et al.*, *Nature* **402**, 184 (1999)] に関して、アニオン透過現象の分子レベルでの解析を行っている。シミュレーションと実験結果を相互に比較することで、立体構造モデルやシミュレーションの妥当性を検証するとともに、分子機構の解明を目指している。本講演では、アクアポリンに関する分子動力学シミュレーション研究について紹介する。

アクアポリンの進化と細胞内局在 ：小胞体とエクソゾーム

石橋 賢一

明治薬科大学 病態生理研究室

アクアポリンは構造から3群に分類できる：グリセリンチャネルgAQP、選択的水チャネルwAQPとホモロジーの乏しいスーパーゼンファミリーsAQPである。アクアポリンは細菌からヒトまで普遍的に存在する（ウイルスにも）。この原始的なチャネル蛋白の進化は極めて興味深い。原核生物にはすでにgAQPとwAQPが出現しているが、sAQPはまだない。アクアポリンは最初はグリセリンなどの小分子チャネルgAQPとして出現し、次第に水を選択的に通すwAQPに進化したと考えられる（gAQPはオペロンの構成員としてゲノムに配列するが、wAQPにはオペロンが存在しない）。注意すべきは多くの原核生物にはアクアポリンは存在せず、特に古細菌ではまれである。それが真核生物になると普遍的に存在するのは環境適応にアクアポリンが有利であったと考えられる（細胞内オルガネラよりは細胞膜に存在する）。さらに多細胞生物動物になってsAQPが出現し、細胞内アクアポリンの必要性が示唆される（真の多細胞生物とはいえないカビ・植物にはsAQPは存在しない）。植物と昆虫ではgAQPが失われ、wAQPが機能的にgAQPの役割をしている（進化の過程で偽遺伝子になったアクアポリン（AQP10など）もgAQPに限られる）。

細胞内オルガネラに存在するアクアポリンには植物では液胞に存在するwAQPのTIPが重要であるが、動物ではsAQPのAQP11の研究が進んでいる。AQP11欠損で嚢胞腎になるが、小胞体機能異常でpolycystin-1の膜へのtrafficking異常が原因である。細胞膜のアクアポリンも細胞内に取り込まれてエクソゾームとして細胞外に分泌されることがAQP2で明らかにされている。はじめは機能不全になった細胞膜アクアポリン消去の機序と考えられたが、エクソゾームのAQP2に水チャネルの機能が存在することから尿中での水チャネルとしての役割が示唆されている。細胞内では水H₂Oは自由に移動できるので、H₂O₂やH₂Sのようなシグナル分子の輸送が注目される。進化をさかのぼると、細胞内アクアポリンの役割が明らかになる可能性がある。

これまで細胞膜のアクアポリンの役割に注目されてきたが、ノックアウトマウスにさしたる異常がみられないことからアクアポリン研究は行き詰ってしまった。進化の視点を導入することでアクアポリン研究のブレイクスルーを期待したい。

アクアポリン4と視神経脊髄炎

(Aquaporin 4 and Neuromyelitis Optica)

藤原 一男

福島県立医科大学医学部 多発性硬化症治療学講座

脳神経疾患研究所 多発性硬化症・視神経脊髄炎センター

視神経脊髄炎(Neuromyelitis Optica, NMO)は重症の視神経炎と長い横断性脊髄炎を主徴とする中枢神経の炎症性疾患である。以前は我が国をはじめアジア諸国では、多発性硬化症(Multiple Sclerosis, MS)の亜型として視神経脊髄型MSと呼ばれていた。しかし2004年にNMOに特異な自己抗体NMO-IgGが発見され、翌年にその標的抗原がアクアポリン4(Aquaporin 4, AQP4)であることがわかった。その後AQP4-IgG陽性症例の臨床及び病態解析が世界中で一気に進んだ。その結果、臨床的には、視交叉炎、3椎体以上に及ぶ横断性脊髄炎、また延髄の最後野症候群(難治性吃逆や嘔吐を起こす)などの脳症候群もこの疾患の一部であることが明らかになった。そのため2015年の国際診断基準では、疾患全体を表す名称としてNMO Spectrum Disorders (NMOSD)が用いられた。AQP4-IgG陽性NMOSDの90%は女性で、発症年齢は平均40歳(3歳~90歳)である。臨床的には重篤で、失明や歩行不能を引き起こすこともまれではない。またしばしばシェーグレン症候群など他の自己免疫性疾患を合併する。液性及び細胞性免疫がNMOSDの病態に関与するが、AQP4-IgGは主にIgG1であり、補体を活性化してAQP4を高密度に発現しているアストロサイトを傷害することがNMOSDの基本病態である。したがって、従来NMOSDはMSと同様に脱髄疾患に属すると考えられてきたが、現在はアストロサイト病という新たな疾患概念に位置付けるのが妥当だと思われる。また治療ではMSの治療薬がしばしば無効であり、免疫抑制療法が基本である。最近、インターロイキン6受容体、補体(C5)及びCD19に対するモノクローナル抗体のNMOSDにおける初のランダム化対照試験でその有効性が立証され、わが国でも間もなく承認される見通しである。

なお、NMOSDにはAQP4-IgG陰性例があり、その一部はミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク(Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, MOG)に対する自己抗体が陽性である。MOG-IgG陽性疾患は、AQP4-IgG陽性疾患とは一部異なる疾患スペクトラムを形成している。

本講演では、AQP4-IgG陽性NMOSDの概要を解説し、今後の課題を展望したい。

神経疾患とアクアポリン4

～アルツハイマー病と視神経脊髄炎～

阿部 陽一郎

慶應義塾大学医学部 薬理学教室

アクアポリン4 (AQP4) は中枢神経系で最も発現の高い水チャネルであり、血管周囲や軟膜下のアストロサイトの足突起に高密度に存在し、中枢神経系の恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。

外傷や脳浮腫など中枢神経系に傷害が起こると傷害部位にグリオシス（反応性アストロサイトや活性化ミクログリアの集結）が見られる。グリオシスは傷害部位の修復に寄与する一方で、炎症性サイトカインや活性酸素を産生し（神経炎症）、修復を妨げ傷害の拡大に関与する可能性も指摘されている。AQP4ノックアウトマウスを用いた研究から、AQP4の機能が失われるとグリオシスの誘導が減弱することが報告されている。アルツハイマー病の病理学的特徴である老人斑の周囲にもグリオシスが観察される。老人斑は神経細胞から分泌されたアミロイドβが凝集し、脳実質に沈着したものである。アルツハイマー病においても、特にミクログリアは老人斑の除去に関わる一方、神経炎症を引き起こし、神経変性に関わる可能性も指摘されている。

一方、中枢神経系にはアミロイドβ等の脳内老廃物を除去する機構が存在することが報告されてきた。その排出経路は血管壁の中の空間であり、その排出過程でアミロイドβが沈着したものが脳アミロイド血管症であると考えられている。脳内老廃物の除去機構の詳細は今までの所統一した見解が得られていないが、近年この機構にAQP4の機能が必要であると報告された。

我々はアルツハイマー病におけるAQP4の役割を明らかにするため、現在最も広く用いられているモデルマウスの1つである5xFADとAQP4ノックアウトマウスとを交配し、その表現系を解析した。5xFADは老人斑の形成を促進するアミロイドβ42を高度に産生するマウスであり、2ヶ月齢で老人斑の出現が認められる。AQP4の欠損した5xFADでは老人斑の蓄積、その周囲のグリオシスには影響がなかったが、5ヶ月齢を過ぎると活動量の低下を引き起こし、更にはけいれん発作を起こすことが観察された。5xFADでは4ヶ月齢で既にてんかん様の異常な神経活動が認められ、加齢とともにその発生頻度が高まるが、AQP4を欠損させるとその頻度上昇が極めて短期間に進行した。これらの結果から、AQP4はアルツハイマー病において、アミロイドβの蓄積・神経炎症とは独立に神経保護的機能を担うことが明らかとなった。

炎症性疾患における アクアポリン3の役割

竹馬 真理子

慶應義塾大学医学部 薬理学教室

アクアポリン (Aquaporin : AQP) は、水分子を選択的に透過するチャネル蛋白として発見され、現在までに、低分子化合物を透過するAQP (Aquaglyceroporin) も含め、哺乳類では13種 (AQP0-12) が同定されている。我々はAQP3が上皮細胞、免疫細胞およびガン細胞に発現しており、水や低分子化合物 (グリセロール、過酸化水素;H₂O₂) の輸送を介して細胞増殖・遊走といった細胞機能を制御し、様々な炎症性疾患やガン病態に関与していることを報告してきた。

マウスを用いた種々の炎症性疾患・病態モデルにおいて、AQP3欠損マウスは、化学発ガン発症を抑制する他、アトピー性皮膚炎や乾癬などの炎症性皮膚炎の発症頻度を減少し、肝炎やがん悪性化といった慢性炎症を抑制していた。これらAQP3による疾患制御メカニズムの1つとして、AQP3が担うH₂O₂透過が関与することを明らかにしてきた。外界からの様々な刺激 (ex. EGF, TNF- α ケモカインなど) に応答して、細胞膜のNADPH Oxidaseは細胞外にH₂O₂を産生する。このH₂O₂は、AQP3により迅速に細胞内に取り込まれ、レドックス感受性の細胞シグナルを制御するなど、second messengerとしての役割を発揮する。ガン細胞では、ケモカインやEGF刺激により産生されたH₂O₂がAQP3により細胞内に取り込まれ、レドックスシグナルであるPTENやPTP1Bの酸化的修飾 (酸化、不活性化など) を経て、その下流の細胞シグナル経路 (AKT, MAPKなど) の活性化に関与していた。AQP3欠損ガン細胞では、刺激応答による細胞内H₂O₂増加の抑制、AKT、MAPK活性化の減弱、および細胞の増殖・遊走が抑制されていた。その結果、がん細胞の移植マウスモデルでは、AQP3欠損によりマウス個体での腫瘍組織の成長・転移の減弱と延命が確認された。

もう1つのメカニズムとして、AQP3によるH₂O₂輸送が、細胞・細胞間スペースの酸化ストレスを制御している可能性を見出している。AQP3欠損により、急性・慢性炎症で誘発する酸化ストレスが減弱されており、その結果、炎症病態が軽減することを確認している。

これら実験マウスや細胞実験で得られた知見をもとに、現在、AQP3阻害による炎症性疾患治療方法の開発に着手している。新規に樹立した抗AQP3阻害モノクローナル抗体を用い、創薬に向けての応用研究を進めている。