

2024年5月13日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

カモノハシ由来の改変型受容体を用いた バソプレシン測定法の開発 細胞センサー法による簡便かつ迅速な血中の抗利尿ホルモンの測定

【発表のポイント】

- 多飲や多尿の症状に関与する血中ホルモン、バソプレシンに対して、カモノハシ由来のバソプレシン受容体が高感度に応答することを見出しました。
- カモノハシ由来の受容体から、バソプレシンの応答性を維持しつつ、治療薬には応答しない改変型受容体を作成しました。
- 改変型受容体と cAMP バイオセンサー^(注1)を発現させた培養細胞を用いた血中バソプレシンの測定法（細胞センサー法）を構築しました。
- この測定法は既存の測定法である放射免疫測定法（RIA 法）^(注2)と良好な相関性を示し、さらに測定工程と測定時間を大幅に削減できました。

【概要】

バソプレシン（別名アルギニン-バソプレシン、略称 AVP）^(注3)は、9 アミノ酸からなる環状のペプチドホルモンで、G タンパク質共役型受容体（GPCR）^(注4)である 2 型バソプレシン受容体（V2R）^(注5)を介し、細胞内のサイクリック AMP（cAMP）^(注6)濃度を上昇させることで、様々な生理現象を制御しています。血漿中バソプレシン濃度の測定は、多飲や多尿の症状を示す中枢性尿崩症^(注7)の診断に有用であり、現在は主に放射免疫測定法（RIA 法）によって測定されています。RIA 法による AVP の測定は手順が煩雑で、測定には約 3 日を要するものであり、より簡便な測定法が望まれてきました。

東北大学大学院薬学研究科の土居耕介大学院生（社会人博士課程、ヤマサ醤油株式会社研究員）と井上飛鳥教授らのグループは、血漿中 AVP 濃度の測定に適した改変型 V2R を作成し、cAMP バイオセンサーと組み合わせることで細胞センサー法による新たな血漿 AVP 測定法を開発しました。

細胞センサー法は測定時間が短く操作も簡便であるため、RIA 法に換わる新たな血漿中 AVP 濃度の測定法として今後活用されることが期待されます。

本研究成果は、2024年4月24日に Scientific Reports に掲載されました。

【詳細な説明】

研究の背景

アルギニン-バソプレシン (AVP) は9アミノ酸からなる環状のペプチドホルモンであり、視床下部で合成され、下垂体後葉から放出されます。AVPは2型バソプレシン受容体 (V2R) を介して細胞内サイクリックAMP (cAMP) 濃度を上昇させることで、腎臓での水の再吸収など、様々な生理現象を制御しています。AVPとV2Rが関与する疾患として尿崩症が知られています。尿崩症は多飲や多尿の症状を示す疾患であり、中枢性尿崩症と腎性尿崩症に大別されます。中枢性尿崩症はAVPの分泌不全が原因であり、健康な人に比べて血中のAVP濃度が低下することが知られています。そのため、血漿中のAVPは中枢性尿崩症のバイオマーカーとして有用であることが知られており、現在はRIA法で測定されています。しかしながら、RIA法は測定時間が長い(約3日)、操作が煩雑、放射性同位体を用いるといった欠点があり、より簡単に、より早く測定できる測定法が望まれてきました。

今回の取り組み

土居耕介大学院生と井上飛鳥教授らの研究グループは、AVP濃度の測定方法として、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) であるV2RとcAMPバイオセンサーに着目しました。まず、V2RとcAMPバイオセンサーを発現させた細胞を作製します。この細胞に対して血漿^(注8)を添加すると、その中に含まれるAVPがV2Rに結合して細胞内cAMP濃度が上昇します。このcAMP変化をcAMPバイオセンサーによって発光量を測定することで、間接的にAVP濃度測定ができるものと想定しました(図1)。しかし、血中のAVP濃度を測定するうえで、2つの課題が存在しました。1つ目は、血中のAVP濃度は数pM^(注9)と非常に低い濃度であることから、高感度な測定系が必要とされることです。2つ目は、中枢性尿崩症の治療薬であるDDAVP^(注10)がAVPとよく似た構造をしているため、AVP濃度を正確に測定するためには、V2RはAVPに対する高い選択性が必要とされることです。

まず、研究グループは、AVPを高感度に測定できる受容体の探索を行いました。V2Rのアミノ酸配列に着目し、11種の哺乳類のV2Rから高感度測定に適した受容体を探索した結果、カモノハシのV2R (pV2R) が最も高感度に測定できることを見出しました(図2)。

次に、pV2Rのアミノ酸配列に1アミノ酸置換を導入することで、DDAVPに対する反応性を低下させることを試みました。ヒトのV2RでDDAVPに対する反応性を低下させることが知られているアミノ変異を、pV2Rに導入した改変型受容体 (pV2R D126Y、126番目のアスパラギン酸をチロシンに置換) を作製し、AVPおよびDDAVPに対する反応性を評価したところ、DDAVPに対する反応性が野生型pV2Rのおよそ1/20に低下させることに成功しました(図3)。

最後に、改変型受容体と cAMP バイオセンサーを発現させた細胞を用いて、ヒト血漿中の AVP 濃度の測定を試みたところ、細胞センサー法で血漿中 AVP 濃度が測定できることが示されました。また、現在中枢性尿崩症の診断に臨床的に利用されている RIA 法と比較したところ、よく相関することが示されました（図 4）。

今後の展開

本研究では健常人の血漿を用いて評価したため、細胞センサー法の有用性を評価するために、中枢性尿崩症患者の血漿を用いた臨床試験を実施し、細胞センサー法が中枢性尿崩症の診断に臨床的に有用であることを検討します。本測定は 96 ウェルプレート^(注 11)での計測が可能であり、多検体の測定に適しています。また、操作工程の簡略化や測定系の最適化を行い、検査センターでの運用といった社会実装を目指します。

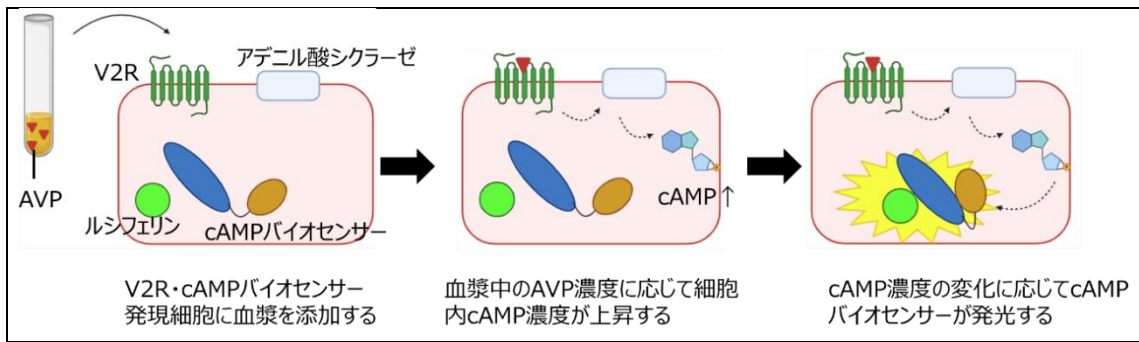


図 1. 細胞センサー法による血漿中 AVP 濃度測定 の原理

V2R と cAMP バイオセンサーを発現させた細胞に、発光基質のルシフェリンを細胞に取り込ませる。この細胞に血漿を添加すると、血漿中の AVP が細胞表面の V2R に結合し、細胞内の cAMP 濃度が上昇する。cAMP バイオセンサーの発光量の変化として測定することで、間接的に血漿中 AVP 濃度を測定することができる。発光量が高いほど、血漿中に含まれる AVP 濃度が高いことを表している。

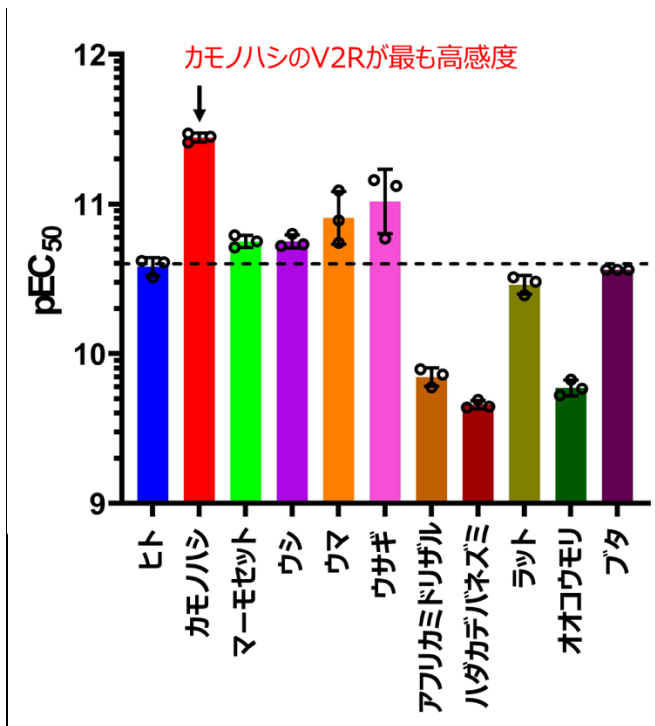


図 2. 11 種の哺乳類 V2R の比較

11 種の哺乳類 V2R を用いて、AVP に対する反応性を比較した結果、カモノハシの V2R が最も高感度であった。横軸は 11 種類の哺乳類を、縦軸は pEC₅₀ (対数値で表す感度の指標、値が大きいほど高感度である) を表す。ヒト V2R と比べて、カモノハシ V2R は約 7 倍高感度であることがわかった。

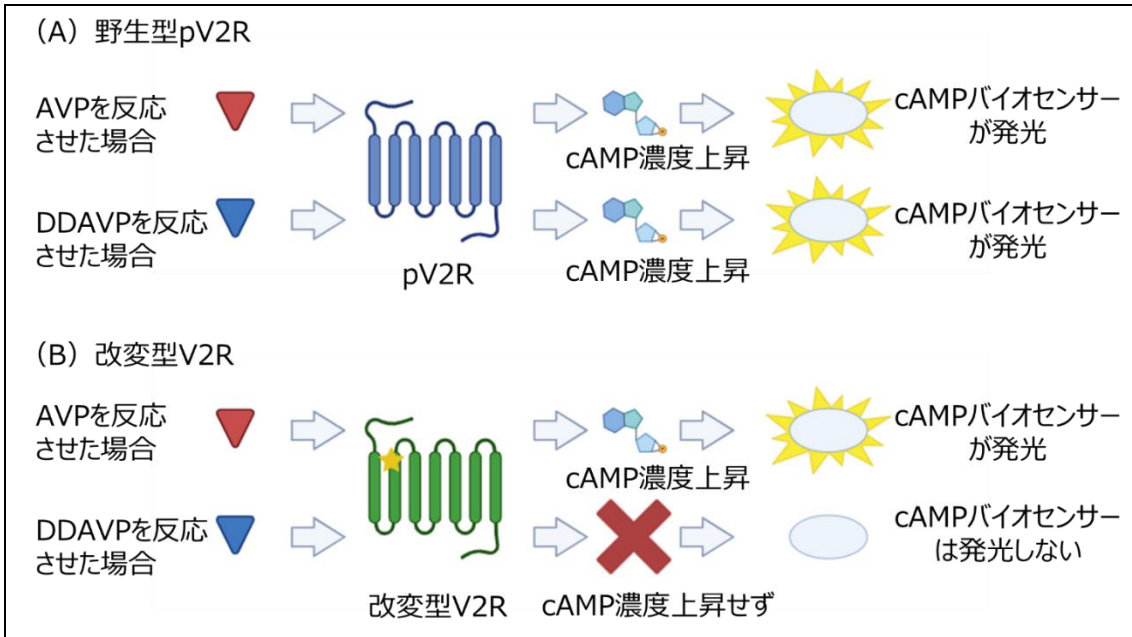


図 3. 受容体の改変による DDAVP に対する交差反応性の低減

野生型の pV2R は AVP を反応させた場合と DDAVP を反応させた場合で同程度の応答を示す。改変型 V2R では、1 アミノ酸の変異の導入（黄色の星印）により DDAVP を反応させた場合の応答にみを大きく低下させることが可能であった。

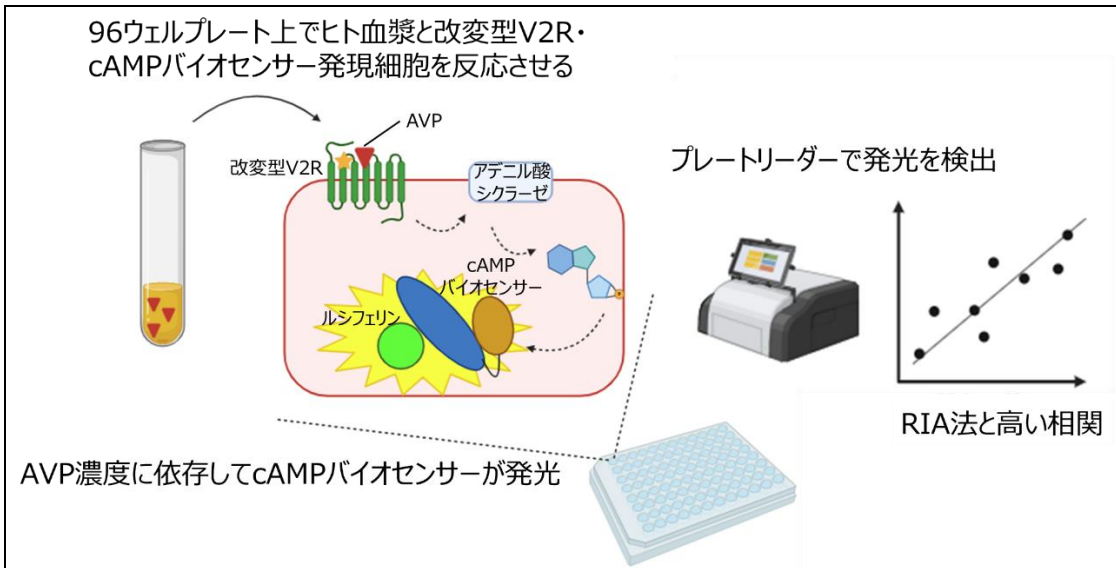


図 4. 開発した細胞センサー法

96 ウェルプレート上で、ヒト血漿と改変型 V2R・cAMP バイオセンサー発現細胞を反応させることで、血漿に含まれる AVP に応じて cAMP バイオセンサーから発光が生じる。その発光をプレートリーダーで検出することで血漿中の AVP 濃度を定量することができる。

【謝辞】

本研究は、「文部科学省科学研究費補助金（課題番号: JP21H04791 JP21H05113、JP21H05037）」、「科学技術振興機構（JST）創発的研究支援事業（課題番号: JPMJFR215T、JPMJMS2023）」、日本医療研究開発機構創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（JP22ama121038、JP22zf0127007）を始めとする様々な研究費支援を受けて実施されました。

【用語説明】

注1. cAMP バイオセンサー

cAMP が結合すると酵素活性を発揮する改変ルシフェラーゼ。細胞内 cAMP 濃度が上昇すると活性型となり、発光物質（ルシフェリン）から光が放出される化学反応を触媒する。本研究では、プロメガ社が開発した GloSensor-22F と呼ばれる cAMP バイオセンサーを利用した。

注2. 放射免疫測定法（RIA 法）

放射性同位元素を利用して、微量な生体成分の量を測定する方法。

注3. バソプレシン（AVP）

抗利尿ホルモンとも呼ばれるペプチドホルモン。腎臓での水の再吸収を促進させることにより、利尿を妨げる働きを持つ。

注4. G タンパク質共役型受容体（GPCR）

細胞膜表面に存在する受容体タンパク質であり、細胞膜を 7 回貫通する特徴的な構造を持つ。細胞外に存在する特定のホルモンと結合することで細胞内に情報伝達を導く。すなわち、細胞外の情報を細胞内へ伝達する際に最も重要な機能を果たす。

注5. 2 型バソプレシン受容体（V2R）

AVP を認識する GPCR の 1 種。腎臓の近位尿細管細胞に発現しており、バソプレシンに結合すると受容体機能がオンとなり、細胞内の三量体 G_s タンパク質を介して、アデニル酸シクラーゼの酵素活性を増強させ、cAMP の産生を誘導する（図 1 参照）。

注6. サイクリック AMP（cAMP）

環状ヌクレオチドの 1 種であり、細胞内情報伝達物質（セカンドメッセンジャー）として働く。

注7. 中枢性尿崩症

バソプレシンが一部もしくはすべて欠乏することにより薄い尿が過度に作られる疾患であり、多飲・多尿などの症状を示す。

注8. 血漿

血液の血球成分（赤血球、白血球、血小板など）以外の成分。試験管に回収した血液を遠心分離すると、血球成分は底に沈殿するため、上澄みが血漿成分として得られる。

注9. pM（ピコモラー）

濃度単位の M（モラー）は mol/L を表し、pM は 10^{-12} mol/L である。AVP の分子量は約 1,000 であるので、血中の濃度である数 pM は数 pg/ml に相当する。血中のタンパク質濃度は約 70 mg/mL と比較すると、バソプレシンの割合は約 10^{10} 分の 1 であり、極めて低値であることがわかる。このように多量に含まれる夾雑物を見分けて血中バソプレシンを高感度に測定することが求められる。

注10. DDAVP

中枢性尿崩症の治療に用いられる AVP の合成誘導体であり、AVP とよく似た構造を持つ。デスマプレシンとも呼ばれる。

注11. 96 ウェルプレート

臨床検査や生化学的分析に用いられる、縦 8 列 × 横 12 列の 96 個のくぼみ（ウェル）がついたプレート。1つのウェル（0.3 ml 程度の溶液を溜められる）を 1本の試験管として利用することができるため、1度に多数の検体を処理することが可能となる。

【論文情報】

タイトル : A cAMP-biosensor-based assay for measuring plasma arginine-vasopressin levels

日本語タイトル : cAMP バイオセンサーを用いたアルギニン-バソプレシンの血漿濃度の測定法開発

著者 : Kosuke Doi^{1,2}, Kouki Kawakami², Tatsuya Ikuta², Asuka Inoue^{2*}

1. ヤマサ醤油株式会社 診断薬事業部 診断薬基礎開発室

2. 東北大学 大学院薬学研究科

*責任著者 : 東北大学 大学院薬学研究科 教授 井上飛鳥

掲載誌 : Scientific Reports

DOI : 10.1038/S41598-024-60035-4

URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-60035-4>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

教授 井上飛鳥

TEL:022-795-6861

Email: iaska@tohoku.ac.jp

東北大学大学院薬学研究科

総務係

TEL: 022-795-6801

Email: ph-som@grp.tohoku.ac.jp