

令和元年6月25日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09301

研究課題名(和文) アクアポリン2の尿中排泄のメカニズムと生理学的役割の解明

研究課題名(英文) Mechanism and physiological role of urinary excretion of aquaporin-2

研究代表者

佐々木 成 (SASAKI, SEI)

明治薬科大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：60170677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アクアポリン2(AQP2)は腎集合管水チャネルで尿濃縮に必須の役割を果たす。AQP2は尿中へ排泄されるが、その生理的役割と分泌メカニズムは不明であった。本研究により、1)尿AQP2の80%はendocytosis-MVB系を介してエクソソームとして排泄される、2)ELISA測定には、エクソソーム膜を破壊することが必要である、3)尿AQP2測定は臨床の水代謝疾患で有用なバイオマーカーである、4)エクソソームに存在するAQP2は水チャネル機能を保持している、5)尿AQP2排泄はバソプレシン反応性が増加し、そのメカニズムは転写活性、トラフッキングとAQP2のリン酸化が関与している、が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的にはエクソソームに存在する膜タンパクが本来の機能を保持していること示したことが注目される。エクソソームの生体での新しい役割が今後明らかになるだろう。
社会的にはAQP2の臨床応用に耐えるELISA測定法の確立は意義深い。今後臨床応用が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin-2 is water channel located in kidney collecting duct, and plays an essential role in urinary concentration. We clarified that 1) urine AQP2 is excreted in exosomes through endocytosis-MVB pathway, 2) disruption of exosome membrane is required for accurate measurement of urine AQP2 by ELISA, 3) urine AQP2 is a useful biomarker for clinical water metabolism disorders, 4) AQP2 in exosome preserves its original water channel function, 5) urinary excretion of AQP2 is responsive to vasopressin and shows long- and short-term regulations mediated by multiple phosphorylation of AQP2.

研究分野：腎臓内科

キーワード：アクアポリン 水代謝 尿濃縮 エクソソーム 腎臓 バソプレシン 膜輸送 水透過性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アクアポリン 2 (AQP2) は我々が分子同定した尿濃縮に必須の腎集合管水チャネルである (Nature 1993、引用文献 1)。我々は更に最初に、AQP2 が尿中へ排泄され、その排泄はバソプレッシンに反応性であることも示した (New Engl J Med 1995、文献 2)。その後多くの研究者によりこの現象は確認され、尿 AQP2 は尿濃縮異常症のバイオマーカーとして脚光を浴びてきている。また尿 AQP2 は細胞外小胞であるエクソソームに含まれていることが示され (文献 3) 更に注目を集めることになった。エクソソームは、後期エンドソームである多胞体 (MVB multiple vesicular body) が細胞形質膜に癒合して、内腔の小胞が細胞外へ放出されたものであり、その内腔に RNA、microRNA、膜蛋白などを含み、新しい情報伝達経路として生物学の多くの分野で注目されている。このような進歩を背景として、尿 AQP2 をエクソソームとして回収、測定することが腎臓・水電解質の臨床の現場で行われ、水利尿不全や尿濃縮障害の患者でのバイオマーカーとしての可能性が検討されていた。

しかし、このような尿 AQP2 の臨床応用の前に明らかにしておかなければならない課題があった。それは、1) 尿 AQP2 の全てがエクソソームの形で排泄されるか、2) バソプレッシンによって尿中排泄量が増えるメカニズムは何か、3) 集合管細胞から AQP2 が尿中へ排泄されることの生理学的な役割、である。これらの基本的な生理学的理解は膜輸送体一般の新たな調節機序を示すことになり波及効果が大きいと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 尿 AQP2 の全てがエクソソームの形で排泄されているか？

尿 AQP2 を測定するには、尿の超遠心画 (エクソソームが含まれる) を集めることにより蛋白濃度を濃くして測定するが、この方法では尿中の AQP2 が全量回収されているかは不明である。我々は最近 AQP2 の高感度のサンドイッチ ELISA 法を開発中なので (文献 4)、この方法を使い定量的に解析する。超遠心前後で沈殿と上清中の AQP2 の量を知ることにより、尿 AQP2 の何%が超遠心画分として回収できるかを明らかにする。

超遠心画分の AQP2 がエクソソームに存在しているかどうかは、この画分に対して抗 AQP2 抗体で免疫沈降を行い、エクソソームに特有な蛋白と共存しているかどうかを Western blot 法で確認する。また免疫沈降した蛋白を網羅的に蛋白質質量分析法で調べる。

(2) バソプレッシンによって尿中 AQP2 排泄量が増えるメカニズム

尿中 AQP2 の排泄量がバソプレッシン刺激で増加することは現象論的には我々の当初の研究からも分かっており (文献 2) またバソプレッシン過剰状態の臨床病態で増加することも示されていた。しかしこの現象にエクソソームとしての排泄がどのように絡むのか不明であり、また尿中排泄増加は、AQP2 を含むアピカル膜の出芽が増したための可能性もある。一方、AQP2 は C-末端に複数のリン酸化部位があり、どのリン酸化が AQP2 排泄増加に重要であるかも不明である。これらについてヒト尿、培養細胞で検討する。

(3) 集合管細胞から AQP2 が尿中へ排泄されることの生理学的な役割

AQP2 は通常状態では、合成され、アピカル膜直下の貯蔵小胞を經由してエクソサイトーシスによりアピカル膜へ運ばれ水チャネルとして働く。その後エンドサイトーシスで細胞内へ再び取り込まれ、初期エンドソームに運ばれる。ここから再びアピカル膜にリサイクルするものと、MVB に移行するものに分かれる。MVB はさらに細胞形質膜と癒合して内包する小胞をエクソソームとして尿中排泄するものと、リソソームと癒合して内容物を分解するものに 2 分される。エクソソームによる尿中排泄は AQP2 蛋白の細胞内からの分解・除去に働いていると推定されるが、リソソームによる分解との相対的役割は不明である。

またエクソソームで排泄された AQP2 が水チャネルとしての機能を保っていれば、エクソソームに存在する膜タンパク質全般の機能を考える上で大切な情報となる。

3. 研究の方法

(1) エクソソームの分離：ヒト尿あるいは細胞培養液上清より段階的超遠心法で分離した。

まず、検体を 3,000g 15min で遠心、上清を 17,000g 15min で遠心し、更に上清を 160,000g 60min 遠心し、最終沈殿をエクソソーム画分とした。ヒト尿は健常男性より、また 1 名の中枢性尿崩症患者から得た。細胞培養液上清は以前に我々が確立した AQP2 永続発現 MDCK 細胞 (文献 5) と内因性に AQP2 を発現する smpkCCD 細胞 (文献 6) より採取した。

(2) AQP2 が存在するエクソソームの分離：上記で得たエクソソーム画分を AQP2 特異的抗体で免疫沈降して分離した。具体的には Dynabeads Co-IP kit (Novex) を用いた。

(3) Western blot 法とヒト尿 ELISA 法：Western blot 法は通常の方法で行い、AQP2 抗体は我々の作成したものを使用し (文献 7)、他の抗体は市販のものを使用した。ELISA は我々が開発し (文献 4) 市販されているキットを使用した (ヒトアクアポリン 2 ELISA キット)。

(4) 網羅的タンパク分析：上記 (2) の AQP2 で免疫沈降されたエクソソームを、トリプシン処理し、LC-MS/MS (Thermo EASY-nLC, Thermo Fusion) で解析した。

(5) エクソソームの水透過性の測定：上記 (1) で得られたエクソソームサンプルに内向きの浸透圧勾配を瞬時にかけ、エクソソームの容積変化を錯乱光の変化として読み取った

(Stopped Flow Rapid Scan Spectroscopy)。サンプル温度を変化させ activation energy、水銀剤への反応も測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト尿 AQP2 の ELISA 法の開発：

我々はヒト尿 AQP2 の ELISA 法の開発を行ってきたが(文献 8)、検体の保存状態によって測定値にばらつきが生じる事を認め検討を行った。分かった事は、エクソソーム膜に存在する AQP2 は抗体認識部位がエクソソームの内側に面しており、抗体が正しく認識するためには、エクソソーム膜を破壊する必要がある事であった(文献 9)。有効な膜破壊操作を電顕で調べたところ、 -25°C とアルカリ処理が有効であることを認めた。このためサンプルを測定前にアルカリで処理する方法を採用し、臨床使用に耐える再現性を確立した(文献 4)。この結果はエクソソーム中のタンパク質を抗体を用いて測定する際の必須の情報となった。

本法を使用して、肝硬変患者におけるバソプレシン阻害薬 tolvaptan の尿中 AQP2 排泄動態を調べ、tolvaptan 服用後 4 時間で尿 AQP2 排泄量が低下することが tolvaptan の臨床的有効性と関連する事を示した(文献 10)。他の水利尿不全疾患においても、本 ELISA 法を使用して尿中 AQP2 の測定が行われ、予後の予測因子としての有用性が示されている。

この ELISA キットを使用して、原尿、3000g、17,000g、160,000g 遠心後の尿 AQP2 濃度を測定した。3000g で沈殿する細胞断片などには原尿の 13%の AQP2 が存在し、17,000g の沈渣には 2%存在し、160,000g では 80%が沈殿した。つまり尿 AQP2 の大部分(80%)は超遠心で落ちるエクソソームに存在しており、17,000g で落ちる ectosome のような heavy membrane 画分には殆ど存在しないことが明らかになった(文献 11)。

(2) 尿 AQP2 エクソソームに共存するタンパクの同定：

AQP2 抗体で免疫沈降したエクソソームの LC-MS/MS 解析を行ったところ、137 個の蛋白質が同定され、そのほとんどが集合管に存在する蛋白であった。Pathway 解析では endocytosis 系の蛋白(TSG101、CHMP4、ALIX、VPS4 など)が主体だった。Western blot では AQP2、TSG101、ALIX、b-actin、CD9、CD63 が認められ、エクソソーム由来であることが確認された(文献 11)。

(3) エクソソームの水透過性の測定：

AQP2 が濃縮されている尿エクソソーム(160,000g 分画)を用いて stopped-flow により水透過性を測定したところ、 $4.75 \pm 0.38 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ と小さいが、温度依存性が少なく水銀で抑制され、サンプル中の AQP2 濃度と相関していた。従って、エクソソームの AQP2 は水チャネル機能を保持していると考えられた(文献 11)。

(4) バソプレシン(VP)の効果：

ヒト AQP2 の安定発現 MDCK 細胞を透過性を有する膜(Transwell)に培養すると、アピカル側の培養液に AQP2 の分泌が認められた(10 倍の濃度較差)。分泌刺激として Forskolin(10nM)あるいは高浸透圧(100mM NaCl)を添加後、3 時間まで AQP2 分泌速度は一定であり、短期効果は認められなかった。内因性に AQP2 を発現する mpkCCD 細胞においても VP は転写活性を介して細胞内 AQP2 量を増やし、それに応じてアピカル液の AQP2 量を増加させた。さらに、この過程において異なる部位のリン酸化が調節に関わっていることを認めた(文献 6)。

中枢性尿崩症患者における VP 投与後の尿中 AQP2 分泌は主に転写活性を介して細胞内 AQP2 量を増やし、それに応じて尿中の AQP2 量を増加させていた。一方、短期的(60 分以内)な endocytosis/exosome 系の関与も認められた。これらの過程において AQP2 の C-末端部の複数の部位のリン酸化が調節に関わっていることを認めた。具体的には、VP により尿中 S256 リン酸化 AQP2 は緩やかに増加し、S261 リン酸化 AQP2 は急激に増加したが、S269 は認められなかった。これらのリン酸化には A-kinase 決定的に大切であることも分かった(文献 6、12)。これらの結果を基にして、腎集合管の水透過性を変化させる薬の創薬につなげる予定である。

<引用文献>

- 1)Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. Nature 361:549-552, 1993.
- 2)Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, Ishikawa S, Fushimi K, Nakanishi S, Bichet DG., Marumo F. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. New Engl. J. Med. 332:1540-1545, 1995.
- 3)Pisitkun T1, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:13368-73,2004. Epub 2004.
- 4) Sasaki S, Saijo Y, Ohmoto Y, Iwata F, Koga D, Katsuragi K. Alkali treatment stabilizes fluctuations of urine AQP2 values measured by ELISA. Clin Exp Nephrol. 20:450-5,2016.
- 5) Asai T, Kuwahara M, Kurihara H, Sakai T, Terada Y, Marumo F, Sasaki S. Pathogenesis of nephrogenic diabetes insipidus by aquaporin-2 C-terminus mutations. Kidney Int. 64:2-10.2003.

- 6) Ando F, Mori S, Yui N, Morimoto T, Nomura N, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Kondo Y, Kagechika H, Uchida S. AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Commun.* 9:1411, 2018.
- 7) Sasaki S, Fushimi K, Saito H, Saito F, Uchida S, Ishibashi K, Kuwahara M, Ikeuchi T, Inui K, Nakajima K, Watanabe TX, Marumo F. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of human collecting duct aquaporin-CD. *J. Clin. Invest.* 93:1250-1256, 1994.
- 8) Sasaki S, Ohmoto Y, Mori T, Iwata F, Muraguchi M. Daily variance of urinary excretion of AQP2 determined by sandwich ELISA method. *Clin. Exp. Nephrol.* 16:406-10, 2012.
- 9) Nameta M, Saijo Y, Ohmoto Y, Katsuragi K, Yamamoto K, Yamamoto T, Ishibashi K, Sasaki S. Disruption of Membranes of Extracellular Vesicles Is Necessary for ELISA Determination of Urine AQP2: Proof of Disruption and Epitopes of AQP2 Antibodies. *Int J Mol Sci.* 17 pii: E1634, 2016.
- 10) Nakanishi H, Kurosaki M, Hosokawa T, Takahashi Y, Itakura J, Suzuki S, Yasui Y, Tamaki N, Nakakuki N, Takada H, Higuchi M, Komiyama Y, Yoshida T, Takaura K, Hayashi T, Kuwabara K, Sasaki S, Izumi N. Urinary excretion of the water channel aquaporin 2 correlated with the pharmacological effect of tolvaptan in cirrhotic patients with ascites. *J Gastroenterol.* 51:620-7, 2016.
- 11) Miyazawa Y, Mikami S, Yamamoto K, Sakai M, Saito T, Yamamoto T, Ishibashi K, Sasaki S. AQP2 in human urine is predominantly localized to exosomes with preserved water channel activities. *Clin Exp Nephrol.* 22:782-788, 2018.
- 12) Yui N, Sasaki S, Uchida S. Aquaporin-2 Ser-261 phosphorylation is regulated in combination with Ser-256 and Ser-269 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 482:524-529, 2017.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

- 1) Sasaki S, Saijo Y, Ohmoto Y, Iwata F, Koga D, Katsuragi K. Alkali treatment stabilizes fluctuations of urine AQP2 values measured by ELISA. *Clin Exp Nephrol.* 20:450-5, 2016.
- 2) Nakanishi H, Kurosaki M, Hosokawa T, Takahashi Y, Itakura J, Suzuki S, Yasui Y, Tamaki N, Nakakuki N, Takada H, Higuchi M, Komiyama Y, Yoshida T, Takaura K, Hayashi T, Kuwabara K, Sasaki S, Izumi N. Urinary excretion of the water channel aquaporin 2 correlated with the pharmacological effect of tolvaptan in cirrhotic patients with ascites. *J Gastroenterol.* 51:620-7, 2016.
- 3) Nameta M, Saijo Y, Ohmoto Y, Katsuragi K, Yamamoto K, Yamamoto T, Ishibashi K, Sasaki S. Disruption of Membranes of Extracellular Vesicles Is Necessary for ELISA Determination of Urine AQP2: Proof of Disruption and Epitopes of AQP2 Antibodies. *Int J Mol Sci.* 17 pii: E1634, 2016.
- 4) Yui N, Sasaki S, Uchida S. Aquaporin-2 Ser-261 phosphorylation is regulated in combination with Ser-256 and Ser-269 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 482:524-529, 2017.
- 5) Miyazawa Y, Mikami S, Yamamoto K, Sakai M, Saito T, Yamamoto T, Ishibashi K, Sasaki S. AQP2 in human urine is predominantly localized to exosomes with preserved water channel activities. *Clin Exp Nephrol.* 22:782-788, 2018.
- 6) Yui N, Sasaki S, Uchida S. Aquaporin-2 Ser-261 phosphorylation is regulated in combination with Ser-256 and Ser-269 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 482:524-529, 2017.

[学会発表](計5件)

- 1) Sasaki S. Key-note Plenary Lecture: Cross-talk between bed and bench of AQP2. Second World Congress on Water Channel Proteins, 2015
- 2) Sasaki S, Saijo Y, Ohmoto Y, Iwata F, Koga D, Shimada T, Sakai M, Takahashi Y, Tanaka Y, Ishibashi K, Katsuragi K. Urine Aquaporin-2: Improvement in ELISA Measurements by Alkali Pre-Treatment and Mechanisms of the Secretion. *アメリカ腎臓学会*, 2015.
- 3) Sasaki S, Sakai M, Mizumura H, Matsumoto T, Noda Y, Yui N, Ishibashi K. Phosphorylation of Ser261 and Dephosphorylation of Ser269 is Important for Urinary Excretion of AQP2. *アメリカ腎臓学会*, 2016.
- 4) Miyazawa Y, Mikami S, Sakai M, Saito T, Ishibashi K, Sasaki S. Proteomics and water channel function of AQP2-rich extracellular vesicles in human urine. *アメリカ腎臓学会*, 2017.
- 5) Sakai M, Saito T, Ishibashi K, Sasaki S. Phosphorylation of Ser261, not Ser269 is important for urinary excretion of AQP2. *アメリカ腎臓学会*, 2018.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://u-lab.my-pharm.ac.jp/~kishiba/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：石橋賢一

ローマ字氏名：Ishibashi Kenichi

所属研究機関名：明治薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80223022

研究分担者氏名：田中靖子

ローマ字氏名：Tanaka Yasuko

所属研究機関名：明治薬科大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：20386452

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。