

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02933

研究課題名(和文) PKA関連疾患の病態解明と治療薬開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathology and drug development for PKA-related diseases

研究代表者

安藤 史顕 (Ando, Fumiaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80804559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓集合管においては、protein kinase A (PKA) が AQP2水チャネルをリン酸化することで尿から水が再吸収され体内の水恒常性が維持される。PKAの活性は、PKAのアンカータンパクであるAKAPにより決定されている。AKAPは50種類以上あるため、AQP2のリン酸化を担うAKAPを同定することは尿濃縮病態の解明に必要である。そこで、PKA/AQP2シグナル活性化作用を有するAKAP-PKA結合阻害剤を利用し、AQP2制御に必須のAKAPとしてLRBAを同定した。LRBAはAQP2と共局在し、Lrbaノックアウトマウスにおいては、AQP2がリン酸化されず多尿の表現型を呈した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AKAPに結合するPKAは尿濃縮薬開発の標的分子として着目されてきたが、数々のAKAPの中で、LRBAが尿濃縮に最も重要であることを明らかにした。LRBAは免疫チェックポイント分子であるCTLA-4などの重要なタンパクの膜輸送にも関わっており、腎臓におけるLRBAの詳細な役割を明らかにできたことで、LRBA研究のさらなる発展につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein kinase A (PKA) directly phosphorylates aquaporin-2 (AQP2) water channels in renal collecting ducts to reabsorb water from urine for the maintenance of systemic water homeostasis. Over 50 functionally distinct PKA-anchoring proteins (AKAPs) respectively create compartmentalized PKA signaling to determine the substrate specificity of PKA. Identification of an AKAP responsible for AQP2 phosphorylation is an essential step toward elucidating the molecular mechanisms of urinary concentration. PKA activation by AKAPs-PKA disruptors is a novel screening strategy to uncover responsible AKAPs for AQP2 phosphorylation. The leading candidate in this assay proved to be an AKAP termed lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein (LRBA). LRBA was colocalized with AQP2 on the same vesicles in vivo, and AQP2 phosphorylation via vasopressin / cAMP / PKA signaling was severely impaired in Lrba knockout mice, leading to the defective AQP2 trafficking to the apical plasma membrane.

研究分野：腎臓内科

キーワード：PKA AKAP LRBA ZNF185 水恒常性 先天性腎性尿崩症 血管透過性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

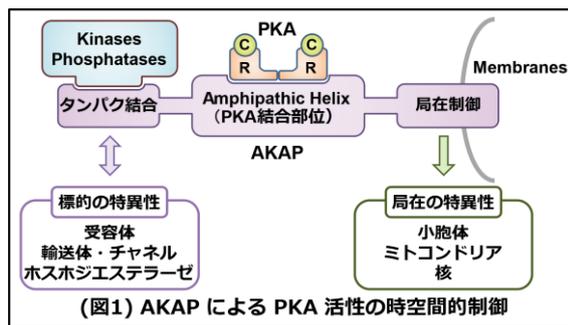
1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、バゾプレシン/cAMP/PKA シグナルが体内の水恒常性維持を担う AQP2 水チャネルを活性化し、尿を濃縮する機構を解明してきた。先天性腎性尿崩症は、バゾプレシン 2 型受容体 (V2R) の機能喪失型変異により尿濃縮機構が破綻し多尿をきたす疾患である。従来の治療戦略は、障害された V2R を介さずに細胞内の cAMP 濃度を増やす方法であり、phosphodiesterase 阻害薬や GPCR アゴニストなどの効果が検証されたが、治療薬の実用化には至っていない。そこで、申請者は PKA の直接活性化に着眼し、腎性尿崩症モデルマウスの尿量を劇的に減少させる低分子化合物 FMP-API-1/27 を発見した。FMP-API-1/27 には、PKA と PKA のアンカータンパクである A-kinase anchoring proteins (AKAPs) との結合を阻害する作用があり、既存の化合物には無い高い AQP2 活性化効果を発揮した。FMP-API-1/27 の標的 AKAP を明らかにできれば、新しい尿濃縮病態を解明できる。

2. 研究の目的

PKA はユビキタスに発現しているが、50 種類以上の AKAPs と 4 種類の PKA サブユニットとの結合の組み合わせは臓器・細胞により異なるため、特定の AKAPs-PKA 結合を切断することで標的組織特異的に PKA 活性を制御可能になる。RNA-Seq やプロテオミクス解析で同定された腎臓集合管に発現する全ての AKAPs-PKA 結合の組み合わせを免疫沈降法により評価し、FMP-API-1/27 が LRBA と PKA-RII subunit との結合を特異的に阻害していることを明らかにした。そこで、*Lrba* のノックアウトマウスを作成したところ、尿浸透圧が低下しておりバゾプレシンへの反応性も失われていた。今まで、数々の AKAP ノックアウトマウスが作成されてきたが、多尿の表現型を有する AKAP は初めてであり、尿濃縮病態における LRBA の役割を解明する意義は大きい。

本研究では PKA 活性化作用を有する化合物の開発を進めるとともに、化合物の生理活性と作用機序の同定を突破口として、PKA 関連疾患の病態解明を行う。AKAPs-PKA 結合阻害剤は、PKA シグナルの病態解析に有用である。AKAP は PKA と結合する一方、PKA の基質となる分子 (輸送体やチャネルを含む) や他のシグナル分子および足場蛋白と結合しており、細胞内 PKA シグナルの時空間的制御の中心をなすアンカータンパクとして知られている (図 1)。AKAPs-PKA の結合の組み合わせは臓器・細胞により異なり PKA 制御の複雑性を生み出していることが、生体内における多様な PKA 基質のリン酸化制御において有利に働く。逆に、病態に関わる PKA シグナルを抽出し同定することは至難であり、リン酸化プロテオミクスなどの網羅的解析を行っても、どの PKA 基質が重要なのか今まで優劣をつけられなかった。我々の化合物は治療薬開発のみならず、例えば腎臓集合管の AQP2 リン酸化に最も重要な LRBA を同定するのに有用であり、病態解明

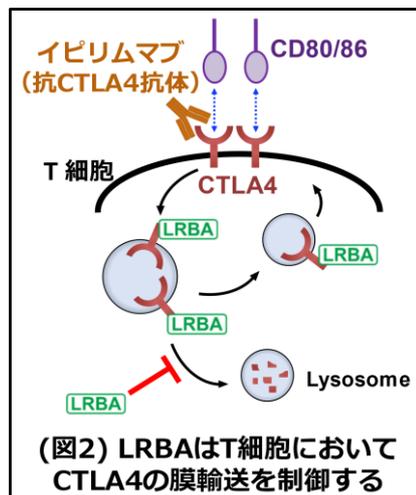


においても独創性の高いツールとして新規研究分野の開拓に貢献することができる。先天性腎性尿崩症、血管透過性亢進、肥満症など治療が困難な PKA 関連疾患は数多く残されており、新たなカテゴリーの PKA 活性制御薬がアンメット・メディカル・ニーズを満たす可能性が強い。

3. 研究の方法

LRBA は分類不能型免疫不全症の原因遺伝子であり、機能喪失により自己免疫性腸炎・自己免疫性血球減少・低ガンマグロブリン血症・リンパ増殖症などの臨床像を呈する。LRBA は T 細胞において CTLA4 受容体へ直接結合し、CTLA4 受容体の細胞膜への輸送に関わる (図 2)。LRBA が欠損すると CTLA4 の vesicle recycling 機構が破綻し、CTLA4 がライソゾームで分解されるため、T 細胞の活性を調節できなくなり自己免疫や免疫不全、リンパ増殖を引き起こす。

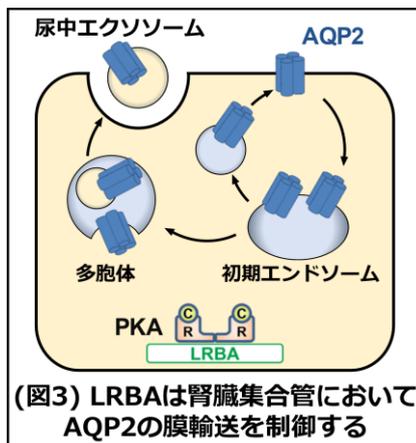
腎臓は、尿中の水や塩を体内へ再吸収することで生体の水・体液恒常性を維持しているが、AQP2 に限らず再吸収に関わる種々の輸送体・チャネルの活性は vesicle recycling によって制御されている。LRBA は、水の出納を調節する集合管だけでなく塩の出納を調節する尿細管セグメント (ヘンレ係蹄の太い上行脚～遠位尿細管) にも発現していたことから、これらの尿細管セグメントにおける LRBA の vesicle recycling 機構を解析する。



(1) LRBA による水制御機構の解明

メタボリックケージを用いて尿浸透圧・尿量・飲水量を測定する。*Lrba*^{-/-}マウスは多尿の表現型を呈していたためV2R アゴニストであるデスモプレシン (dDAVP) の負荷試験を行い、尿濃縮障害の程度を評価する。次に、尿濃縮障害の原因を精査するために、AQP2 水チャネルのリン酸化を評価する。

腎臓尿細管は単層立法上皮で構成されており細胞に極性があることから、細胞内小胞の局在を評価するのに適している。AQP2 は、一部がエキソサイトーシス・エンドサイトーシスによる recycling を受けるが、ライソゾームで分解されるものやエクソソームに含有され尿中に分泌されるものもある (図 3)。LRBA がどのエンドソームからどのエンドソームへ移行するのに必要であるかを検証する。野生型と *Lrba*^{-/-}マウスの腎臓のサンプルを密度勾配超遠心法・構造化照明超解像顕微鏡法 (SIM) を組み合わせることで、AQP2 と LRBA の細胞内局在を定量的かつ超高解像度で解析する。



(2) LRBA による塩制御機構の解明

Lrba^{-/-}マウスにおいては、PKA を介した AQP2 のリン酸化が高度に障害されており、尿濃縮障害の表現型を呈した。通常、AQP2 活性化障害による水利尿がおこると高 Na 血症を認めるが、*Lrba*^{-/-}マウスでは血清 Na の上昇がないことから水だけでなく塩利尿もおきていると考えられた。

そこで、*Lrba*^{-/-}マウスの血液生化学検査 (Na, Cl, K, HCO₃⁻) や利尿剤負荷試験により、障害を受けている塩輸送体・チャネルの組み合わせを絞り込む。野生型および *Lrba*^{-/-}マウスを、通常食群 (0.4%) と低塩食群 (0.01%) に分け低塩食条件下での検査所見も併せて評価する。さらに、免疫染色・ウェスタンブロットを用いて塩制御に関わるシグナル伝達系のどこが障害されているかを詳細に検証する。例えば、NCC 輸送体は WNK キナーゼ-SPAK キナーゼ-NCC シグナルにより塩の再吸収量が制御されている。WNK シグナルの中で障害を受けている分子を同定できれば、LRBA の新規標的をさらに絞り込むことが可能になる。

(3) ZNF185 による血管透過性制御機構の解明

血管内皮細胞は、血管から間質への血漿成分の漏出を防ぐバリアとしての機能を有しており、このバリア機能が破綻した癌や糖尿病、敗血症、アナフィラキシーなどの疾患においては、血管透過性が亢進し組織の浮腫、循環血漿量の減少などが引き起こされる。

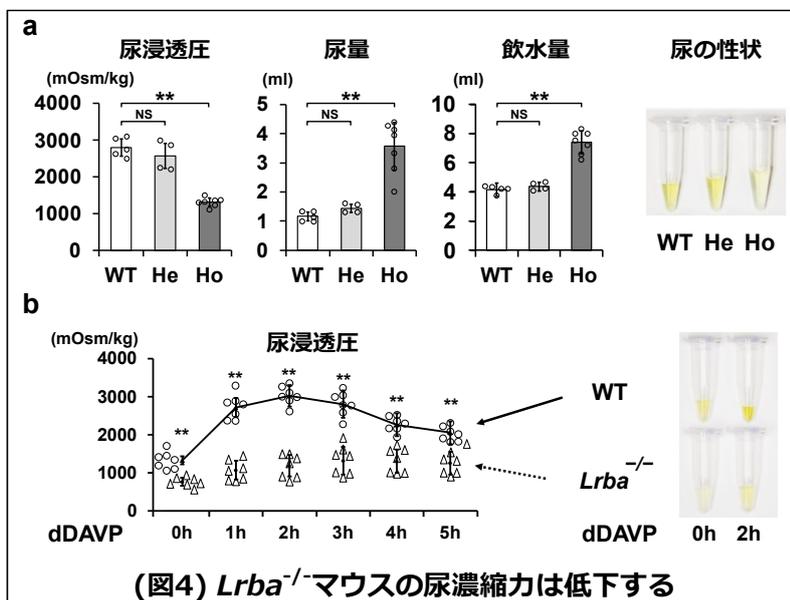
PKA シグナルは血管バリア機能を高める主要な因子として知られており、RhoA 活性を阻害することで細胞間接着を強固にするが、細胞内における PKA の制御分子は不明である。血管内皮細胞の新規 PKA シグナル分子を同定するために、PKA 活性化化合物によってリン酸化されるタンパクを pPKA 基質抗体を用いて免疫沈降し ZNF185 を抽出した。ZNF185 のノックダウン、またはヒト ZNF185 の相同体である Zfp185 のノックアウトマウスを作製し、表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) LRBA による水制御機構の解明

Lrba^{-/-}マウスを作成し、尿濃縮能を評価した。*Lrba*^{-/-}マウスの尿浸透圧は低下しており、尿量・飲水量が増加していた (図 4a)。尿浸透圧の低下はバゾプレシンシグナルへの不応性が原因と考えられたため、dDAVP を投与し、尿浸透圧の変化を観察した。WT マウスでは尿浸透圧が上昇したが、*Lrba*^{-/-}マウスでは、尿浸透圧がわずかにしか上昇しなかった (図 4b)。今まで数々の AKAP ノックアウトマウスが作成されてきたが、尿濃縮障害を起こした AKAP は初めてであり、この結果は、LRBA が AKAP-PKA 結合阻害剤である FMP-API-1/27 の標的分子として矛盾しないことを示している。

PKA によってリン酸化された AQP2 は細胞膜へと輸送され水透過性が上昇す

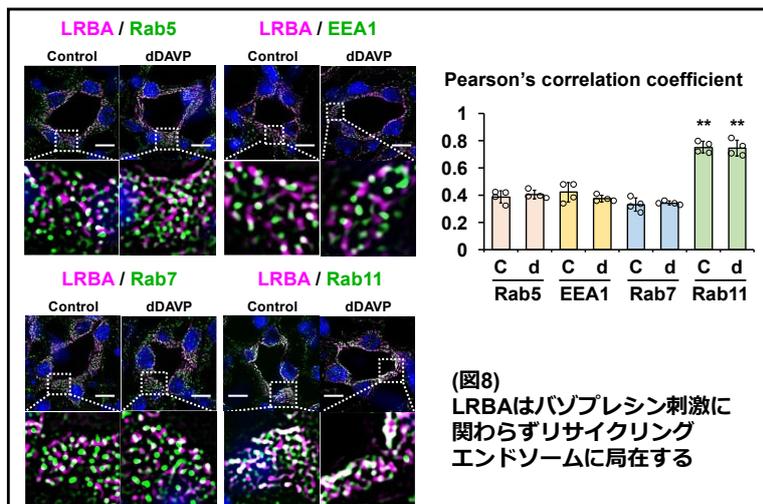
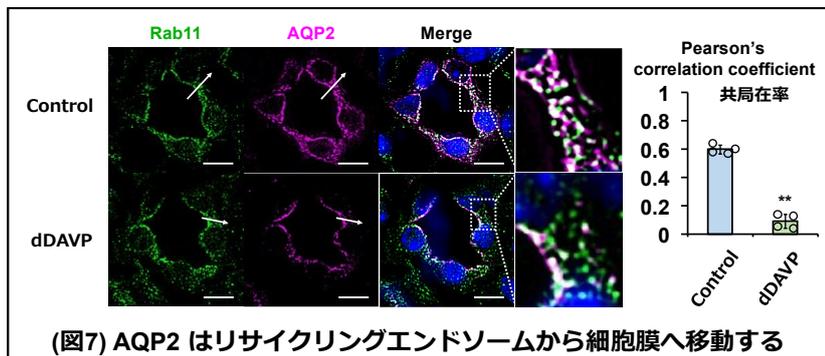
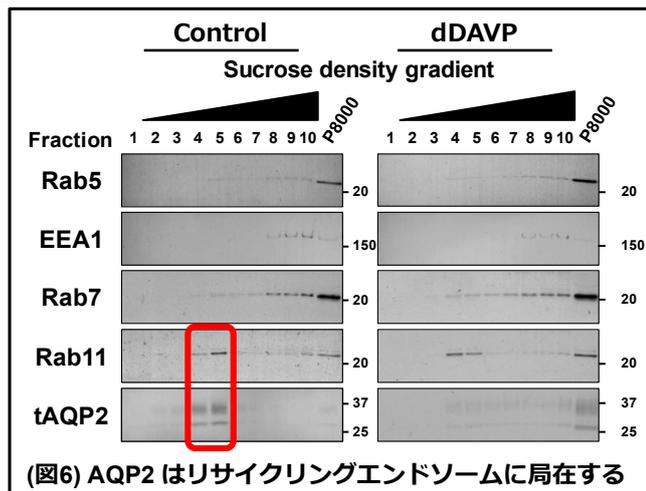
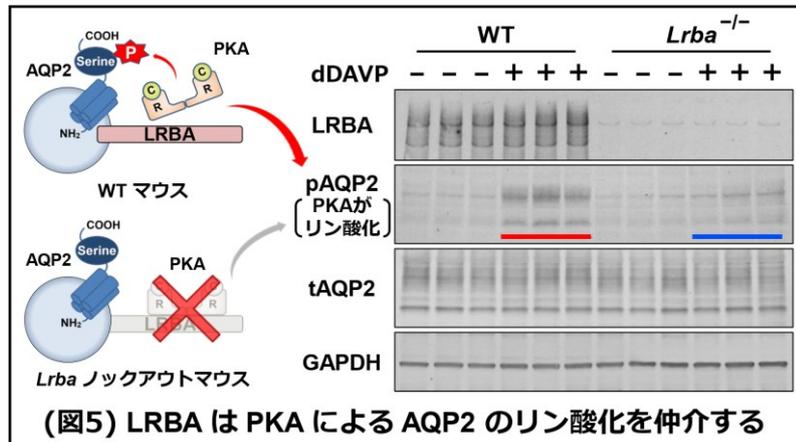


ることが知られているが、*Lrba*^{-/-}マウスにおいては、vesicle 周囲に PKA が存在できないため、dDAVP 投与下における AQP2 のリン酸化が高度に障害され、尿濃縮力が低下したと考えられた (図 5)。今まで、AQP2 のリン酸化に関わる PKA が腎臓集合管においてどのように制御されているか不明であったが、PKA 制御を AKAP 単位に分解し、特定の AKAP 周囲の PKA シグナル伝達系に解析の照準を絞り込むことで、既存の方法では到達できなかった病態に直結する PKA シグナル伝達系の解析が可能になった。

AQP2 の細胞内小胞における局在を定量的に評価するために、既存の密度勾配遠心法を応用し、マウス腎臓の細胞内小胞を取り出して定量的に評価できるようにした。AQP2 はバゾプレシン刺激がない状態においては Rab11+リサイクリングエンドソームに局在していた (図 6)。さらに、超解像顕微鏡を使用して Rab11 と AQP2 の共局在を確認した。dDAVP 刺激により、AQP2 は Rab11+リサイクリングエンドソームから移動し、尿細管側の細胞膜へ集簇した (図 7)。次に、LRBA の局在を超解像顕微鏡を用いて評価した。LRBA はバゾプレシン刺激の有無にかかわらず、常に Rab11+リサイクリングエンドソームに局在していた (図 8)。

よって、LRBA-PKA 複合体がリサイクリングエンドソームにおいて AQP2 をリン酸化することで、AQP2 は細胞膜に移動すると考えられた。そこで、*Lrba*^{-/-}マウスを用いて AQP2 の動態を確認した。LRBA をノックアウトすると、AQP2 はリサイクリングエンドソームに留まり、リサイクリングエンドソームに局在する AQP2 のリン酸化が障害されることが明らかになった。

以上の結果から、LRBA-PKA 複合体はリサイクリングエンドソームにおいて、バゾプレシンの刺激を受け取り、瞬時に AQP2 をリン酸化することで、AQP2 は細胞膜へ輸送され、体内の水恒常性を維持していると考えられた。免疫細胞は極性がなく細胞のサイズが小さいため、LRBA の正確な局在評価が不可能であったが、腎臓集合管を使用することで詳細な役割を明らかにすることができた。



(2) LRBA による血圧制御機構の解明

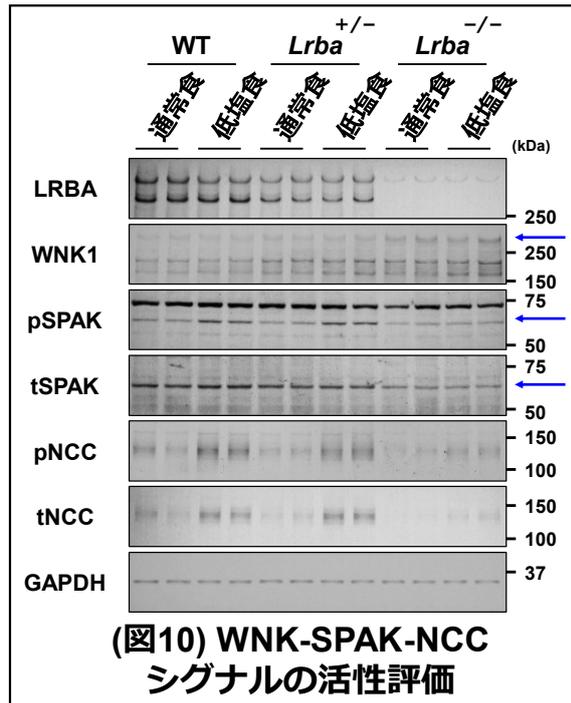
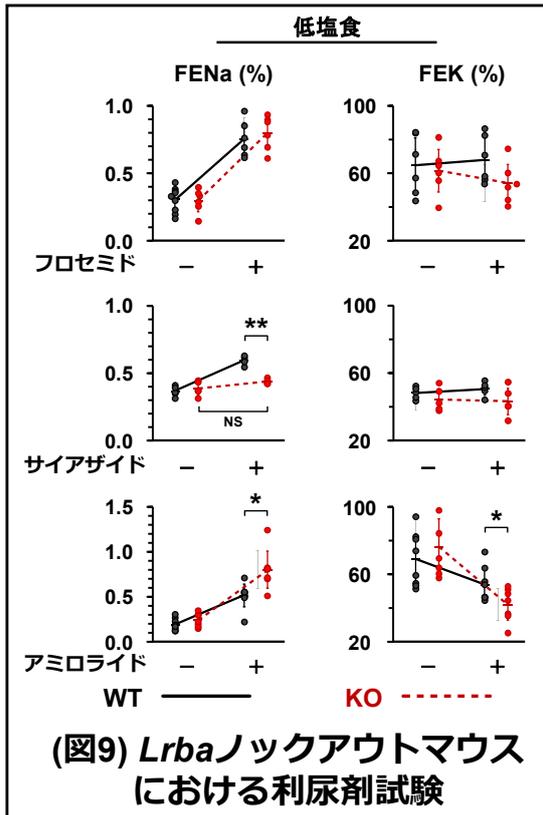
Lrba^{-/-}マウスに低塩食・通常食・高塩食を振り、採血検査を実施した。*Lrba*^{-/-}マウスの血清 Na・

C1は低塩食群において低下しており、Na (WT:146.5 mEq/L, *Lrba*^{-/-}:143.6 mEq/L, p = 0.0014)、Cl (WT:110.1 mEq/L, *Lrba*^{-/-}:105.9 mEq/L, p = 0.0012)であった。さらに、静脈血 HCO₃⁻高値 (WT:27.4 mmol/L, *Lrba*^{-/-}:31.4 mmol/L, p = 0.023)を伴っていた。

次に、利尿剤試験を実施した。NKCC2輸送体を阻害するフロセミドを投与してもWTと*Lrba*^{-/-}マウスのFENa(尿中塩分排泄率)の上昇率に差は認められなかった。しかし、NCC輸送体を阻害するサイアザイドを投与すると、*Lrba*^{-/-}マウスのFENaの上昇が消失していた(図9)。逆にENaCチャネルを阻害するアミロライドを使用するとWTマウスと比較し*Lrba*^{-/-}マウスにおいてFENaが上昇・FEKが低下したことから、NCCの機能低下を受けてENaCの活性が代償的に上昇していることが明らかになった。以上より、腎臓尿細管において塩の輸送に関わる輸送体・チャネルの内、LRBAはNCCの活性を制御することが明らかになった。

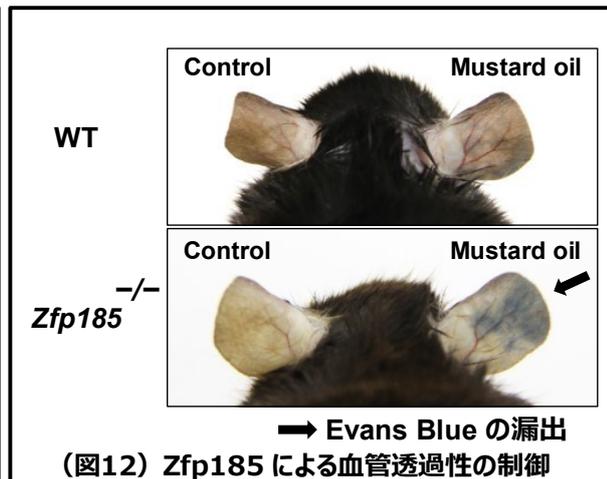
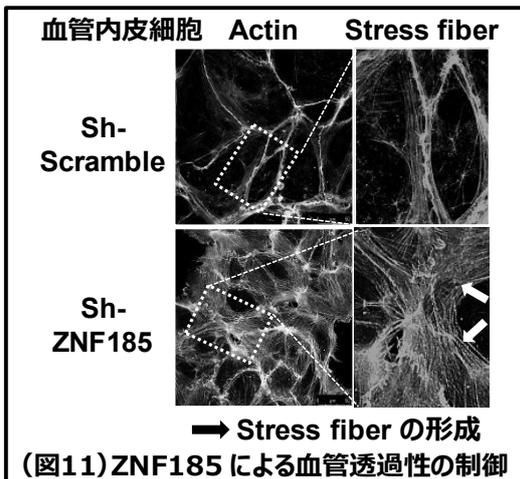
NCCの活性は、WNK-SPAK-NCCシグナルによって制御されているため、WNKとSPAKの活性を評価した。*Lrba*^{-/-}マウスでは、SPAKの発現量が低下し低塩食下においてもSPAKのリン酸化を認めなかった(図10)。WNK1の発現量は代償的に上昇していたことから、SPAKの機能低下がNCCの不活性化の原因と考えられた。

今後、LRBAがSPAKを制御する機構の詳細を検討していく。



(3) ZNF185による血管透過性制御機構の解明

PKA活性化化合物の開発は、血管内皮細胞においてはZNF185/PKA/actin複合体を発見するのに有効であった。ZNF185に結合するPKAの活性が低下するとactinの重合が促進され、細胞を収縮させるstress fiberが発生し血管透過性が亢進した(図11)。ヒトZNF185のホモログであるZfp185をノックアウトしたマウスの解析でも、皮膚炎の惹起により容易に血管透過性が亢進しアルブミンの漏出が起きた(図12)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yanagawa Hideki, Hara Yu, Ando Fumiaki, Suzuki Soichiro, Fujiki Tamami, Oikawa Daisuke, Yui Naofumi, Mandai Shintaro, Mori Yutaro, Susa Koichiro, Mori Takayasu, Sohara Eisei, Tokunaga Fuminori, Uchida Shinichi	4. 巻 601
2. 論文標題 LRBA signalosomes activate vasopressin induced AQP2 trafficking at recycling endosomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 5437 ~ 5451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP285188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ando Fumiaki, Hara Yu, Uchida Shinichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of protein kinase A signalling molecules in renal collecting ducts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP284178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Soichiro, Ando Fumiaki, Kitagawa Sae, Hara Yu, Fujiki Tamami, Mandai Shintaro, Susa Koichiro, Mori Takayasu, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 6
2. 論文標題 ZNF185 prevents stress fiber formation through the inhibition of RhoA in endothelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04416-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara Yu, Ando Fumiaki, Oikawa Daisuke, et al.	4. 巻 119
2. 論文標題 LRBA is essential for urinary concentration and body water homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2202125119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ando Fumiaki	4. 巻 25
2. 論文標題 Activation of AQP2 water channels by protein kinase A: therapeutic strategies for congenital nephrogenic diabetes insipidus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1051 ~ 1056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02108-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nanamatsu Azuma, Mori Takayasu, Ando Fumiaki, Furusho Taisuke, Mandai Shintaro, Susa Koichiro, Sahara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 77
2. 論文標題 Vasopressin Induces Urinary Uromodulin Secretion By Activating PKA (Protein Kinase A)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 1953 ~ 1963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17127	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 原悠、安藤 史顕、内田信一	4. 巻 601
2. 論文標題 体液異常の病態と治療 細胞外液量が低下する病態と治療 多尿、尿崩症	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 5437 ~ 5451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 柳川英輝、安藤史顕	4. 巻 90
2. 論文標題 先天性腎性尿崩症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 830-834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安藤史顕	4. 巻 91
2. 論文標題 尿細管・間質疾患・尿路異常 AKAPに着眼したPKAシグナルの解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 119-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 安藤史顕、内田信一
2. 発表標題 水・電解質・骨ミネラル代謝の最新知見 集合管におけるPKA研究の進展
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤史顕、内田信一
2. 発表標題 遺伝性尿細管機能異常症up to date先天性腎性尿崩症
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤史顕
2. 発表標題 尿濃縮機構におけるPKAシグナルの解析法
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fumiaki Ando
2. 発表標題 Identification of therapeutic targets for congenital nephrogenic diabetes insipidus
3. 学会等名 BENZON SYMPOSIUM No.66
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤 史顕、内田 信一
2. 発表標題 尿濃縮のバソプレシン応答性を制御するアンカータンパクの発見
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤 史顕、内田 信一
2. 発表標題 AKAP-PKA結合は尿量調節の創薬標的として有望である
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumiaki Ando
2. 発表標題 Identification of an A-Kinase Anchor Protein Essential for Urinary Concentration.
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Korean Society of Nephrology, Basic Science Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤史顕
2. 発表標題 AQP2水チャネルの制御メカニズムと治療標的としての有用性
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤木珠美、安藤史顕、萬代新太郎、須佐紘一郎、森崇寧、蘇原映誠、頼建光、内田信一
2. 発表標題 PKA活性化薬は白色脂肪のベージュ化を促進し、高脂肪食負荷マウスで体重増加を抑制する
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 七松東、森崇寧、安藤史顕、古莊泰佑、萬代新太郎、須佐紘一郎、蘇原映誠、頼建光、内田信一
2. 発表標題 バソプレシンはPKA活性化を介してuromodulin尿中分泌を促進する
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------