

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893064

研究課題名(和文)化合物ライブラリーを用いたExocytosisアッセイによる新規降圧利尿薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel antihypertensive drugs and diuretics with exocytosis assay using chemical library

研究代表者

野村 尚弘 (Nomura, Naohiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50735800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：アクアポリン2(AQP2)は腎臓の集合管の管腔膜側に発現しており、その異常は腎臓で水を再吸収することができず腎性尿崩症の原因となる。エクソサイトーシスアッセイを用いたスクリーニングにより、AQP2の機能を制御する経路としてepidermal growth factor receptor(EGFR)の関わりが示唆されている。今回我々の研究により、EGFR阻害剤であるErlotinibがAQP2の細胞膜上の発現量を増やし、尿崩症モデルラットの尿濃縮力を改善することを示した。また、このメカニズムにcAMPやPKAとは独立したAQP2のリン酸化機構が関わっていることを示した。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin 2 (AQP2) is expressed on apical membrane in renal collecting ducts, and it plays an important role in regulation of urine concentration. The mutation of AQP2 causes nephrogenic diabetes insipidus. In the previous study of exocytosis screening assay of AQP2, epidermal growth factor receptor (EGFR) was identified to be involved in the regulation of AQP2 trafficking. In this study, we used Erlotinib, a EGFR inhibitor, and showed that Erlotinib increased in the apical membrane accumulation of AQP2, which improved the urine volume and osmolarity of the NDI model rats. We also showed the phosphorylation of AQP2 was involved in the mechanism of the EGFR inhibitor, which was independent of cAMP and PKA activity.

研究分野：腎臓内科

キーワード：アクアポリン2 EGFR

1. 研究開始当初の背景

アクアポリン2水チャネル(AQP2)は腎臓集合管に存在し、体内の水分バランス調節に重要な役割を担っている。腎性尿崩症は多飲・多尿を主な症状とする遺伝性疾患であり、その原因としてバソプレッシンタイプ2受容体(V2R)とAQP2の異常が知られている。AQP2は管腔膜側の発現量が多いほど水の透過性が上がるため、AQP2の膜発現を増やすことは腎性尿崩症の治療として有効である。AQP2の膜の発現量はexocytosisとendocytosisのバランスによって規定されることが知られている。本研究代表者の野村は化合物スクリーニングの結果より、AQP2のexocytosisを亢進させる化合物を発見し、その結果よりEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR)がAQP2のexocytosisに関わっていると考えられる結果を報告している。また、AQP2以外のナトリウム輸送体などについても、一部AQP2と共通の制御機構が存在することが示唆されており、新たに発見したEGFRの経路がAQP2のみならず他の電解質輸送体の制御にも関わる可能性も考えられる。

2. 研究の目的

EGFRがAQP2のexocytosisに関わるメカニズムを解明し、EGFRが腎性尿崩症の治療のターゲットとなるかを検討する。さらに、AQP2以外の電解質輸送体の制御についてもEGFR関わっているかを検討する。さらにこの経路が新たな利尿剤、降圧剤の開発のターゲットとなることを動物モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

EGFR阻害剤としてすでに臨床で使用されているGefitinib, Erlotinibを利用する。AQP2を発現した培養細胞(LLCPK1細胞)と尿崩症モデル動物(リチウム誘発尿崩症マウス)にEGFR阻害剤を投与してEGFRシグナル伝達経

路の遮断実験をおこなう。アウトプットとしてAQP2のexocytosis, endocytosis, 膜上への集積、尿量、尿浸透圧などを評価する。また、既知のバソプレッシンによるAQP2制御メカニズムであるcAMPやProtein Kinase A (PKA)の関わりについても検討を行う。

4. 研究成果

複数のEGFR阻害剤(Erlotinib, Gefitinib)がLLCPK1細胞、およびリチウム誘発性尿崩症モデルラットの集合管においてAQP2の細胞膜表面における発現を増加させることが確認された。さらにリチウム誘発性尿崩症モデルラットにErlotinibを投与することで、わずかではあるが尿量減少、尿浸透圧亢進の効果を認めることができ生体での有効性を確認できた。さらに、EGFR阻害剤がAQP2のexocytosisを促進するのみならず、endocytosisを抑制することで、AQP2の細胞膜での発現量を増やすことを明らかとした。AQP2のリン酸化を評価したところ、Erlotinibはバソプレッシンと同様にAQP2をリン酸化することが示されたが、バソプレッシンとは異なりcAMPの上昇や、PKAの活性は起こらず、既知のAQP2の制御に関わるcAMP-PKAとは独立した作用機序を持つことが示唆された。このことから、EGFRはバソプレッシン受容体(V2R)やPKA経路を介することなくAQP2を活性化することができるため、腎性尿崩症の大半を占めるV2Rの変異を持つ患者さんの治療にも効果が期待できる。

AQP2以外の電解質輸送体(NCC, NKCC, ENaCなど)との関わりについては十分検討できていないが、尿崩症モデルラットの実験においては、ケミカルスクリーニングで得られたAQP2 exocytosis亢進効果のあるAG-490を投与してもNCCの局在に明らかな違いは認められず、尿崩症モデル以外のモデル(塩分負荷、塩分制限)で検証し直す必要があると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4件)

1. Cheung PW, Nomura N, Nair AV, Pathomthongtaweetchai N, Ueberdiek L, Jenny Lu HA, Brown D, Bouley R. EGF Receptor Inhibition by Erlotinib Increases Aquaporin 2-Mediated Renal Water Reabsorption. J Am Soc Nephrol. 査読あり, 2016 Mar 9, pii: ASN.2015080903. [Epub ahead of print]
2. Yoshizaki Y, Mori Y, Tsuzaki Y, Mori T, Nomura N, Wakabayashi M, Takahashi D, Zeniya M, Kikuchi E, Araki Y, Ando F, Isobe K, Nishida H, Ohta A, Susa K, Inoue Y, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S, Sohara E. Impaired degradation of WNK by Akt and PKA phosphorylation of KLHL3. Biochem Biophys Res Commun. 査読あり. 2015 Nov 13;467(2):229-34. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.184.
3. Arthur J, Huang J, Nomura N, Jin WW, Li W, Cheng X, Brown D, Lu HJ. Characterization of the putative phosphorylation sites of the AQP2 C terminus and their role in AQP2 trafficking in LLC-PK1 cells. 査読あり. Am J Physiol Renal Physiol. 2015 Oct 15;309(8):F673-9. doi: 10.1152/ajprenal.00152.2015
4. Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Isobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Kelch-Like Protein 2 Mediates Angiotensin II-With No Lysine 3 Signaling in the Regulation of Vascular Tonus. J Am Soc Nephrol. 査読あり. 2015 Sep;26(9):2129-38. doi: 10.1681/ASN.2014070639.

〔学会発表〕(計 2件)

1. Nomura N, Shoda W, Sohara E, Rai T, Uchida S. Potassium induced dephosphorylation of renal sodium chloride cotransporter is NOT dependent on the anions. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2015. Nov. San Diego.
2. Pui Cheung, Naohiro Nomura, Anil V. Nair, Hua Ann Jenny Lu, Richard Bouley, Dennis Brown. Inhibition of EGFR activity induces aquaporin 2 phosphorylation and increases water reabsorption in lithium treated mice. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2015. Nov. San Diego.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野村 尚弘 (NOMURA, Naohiro)

東京医科歯科大学・腎臓内科・助教

研究者番号：50735800

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：