

第 39 回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞記念講演 1

Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway

安藤 史顕

Fumiaki ANDO

はじめに

先天性腎性尿崩症は腎臓の尿濃縮力が低下し多尿となる疾患である。昼夜を問わない多尿と脱水症の回避に必要な多量の飲水は、著しい QOL の低下や社会活動の制限を招く。さらに、多尿は精神発達遅滞や腎機能低下などの重篤な合併症を引き起こす危険性があり、根治的治療法の開発が望まれている。われわれは、Wnt5a がカルシニューリンを介し、既存のバゾプレシン経路とは異なる機序で尿濃縮力を上昇させることを発見した。

先天性腎性尿崩症の治療戦略

AQP2 水チャネルとバゾプレシン 2 型受容体 (V2R) は先天性腎性尿崩症の原因遺伝子として知られており、尿濃縮の中心的役割を担う。脱水時にバゾプレシンが下垂体後葉から分泌され、腎臓集合尿管の V2R に結合すると、cAMP の増加、protein kinase A (PKA) の活性化を介して AQP2 がリン酸化され尿管管腔側膜へ輸送される。尿中の水は AQP2 水チャネルを介して集合管を透過できるようになり、高浸透圧な髄質間質へ水が再吸収される。先天性腎性尿崩症はこの過程のいずれかが障害されて起こるが、原因の約 80 % を V2R の機能喪失型 (loss-of-function) 変異が占めている¹⁾。すなわち、脱水症でバゾプレシンの分泌が亢進しているにもかかわらず V2R が反応できないため、AQP2 が活性化されない。そのため治療戦略上、障害されている V2R を介さずに AQP2 の水透過性を上昇させること

が重要であり、バゾプレシン / V2R シグナル以外の AQP2 制御メカニズムを明らかにする必要があるが、その詳細な機序は不明である。

Wnt5a の特性

細胞内カルシウムの動態は AQP2 の膜輸送にかかわることが知られており、治療の標的となりうる²⁾。そこでわれわれは、古典的に細胞内カルシウムを活性化することで知られる Wnt5a に着目した³⁾。Wnt5a は Frizzled 受容体のリガンドとして知られており、種々の培養細胞でカルシウムシグナルを活性化することが報告されている。遺伝学的解析においては、Wnt5a は常染色体優性 Robinow 症候群の原因遺伝子として知られており、低身長、四肢短縮、短指症、胎児様顔貌などの症状を認める。Wnt5a ノックアウトマウスにおいても同様の表現型が確認されており、さらには心室中隔欠損や呼吸器障害を伴い新生致死に至る。最近、Wnt5a は発生以外にも癌、関節リウマチ、肥満、インスリン抵抗性などの疾患にかかわることが徐々に明らかとなっている。一方で、腎臓における Wnt5a の役割はいまだ不明な点が多い。われわれは、集合管における Wnt5a の AQP2 活性化作用とその分子メカニズムを解析した。

Wnt5a はカルシニューリンを介し AQP2 を活性化する

内因性に AQP2 と Frizzled 受容体を発現する皮質集合管培養細胞 (mpkCCD 細胞) を用いて、Wnt5a の効果を検証した。mpkCCD 細胞をフィルター上で 5 日間培養し、尿管管腔側と血管側が区別できるように細胞極性を持たせた状

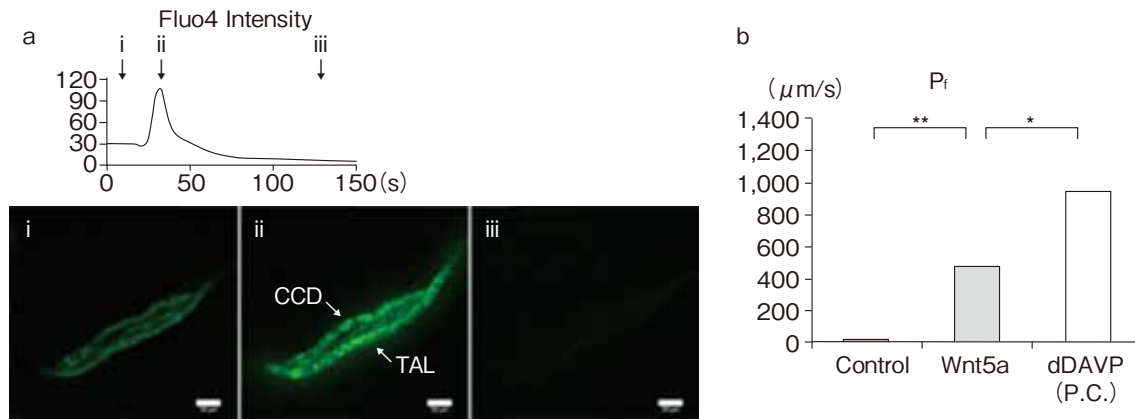


図1 Wnt5aは単離した皮質集合管のカルシウム濃度と水透過性を上昇させる
a: Wnt5aによるFluo4の輝度上昇(CCD:皮質集合管, TAL:ヘンレ係蹄の太い上行脚)
b: Wnt5aによる水透過性(P_f)の上昇(P.C.: positive control) (文献6より引用)

態で実験を行った。まずはじめに、Wnt5aをmpkCCD細胞の血管側へ投与し、AQP2のリン酸化を解析した。AQP2は全長271のアミノ酸で構成されており、C末端に集簇するリン酸化部位はAQP2の尿細管管腔側への膜輸送に直接かわる。特にセリン256(S256), S261, S269のリン酸化が重要であることが知られている^{4,5)}。従来は、リン酸化変異体(S256D)の研究からS256のリン酸化がAQP2の膜輸送に直結する因子と考えられていたが、部位特異的リン酸化抗体の開発により、実際はS256が細胞や生体内で常にリン酸化を受けており、バゾプレシンによるリン酸化の変動も少ないため、他のリン酸化部位の重要性が指摘されるようになった。最近では、S261の脱リン酸化とS269のリン酸化もAQP2の膜輸送にかかわることが指摘されている。Wnt5aは、S256へのリン酸化効果を持たなかったが、バゾプレシンと同様にAQP2のS261を脱リン酸化し、S269をリン酸化した。

カルシウムシグナルとS261脱リン酸化/S269リン酸化との関係は知られていない。そこでWnt5aによるAQP2のリン酸化にカルシウムシグナルが関与しているかどうかを、Fluo4を用いて解析した。mpkCCD細胞へWnt5aを投与するとFluo4の輝度が瞬時に上昇し、細胞内カルシウム濃度が増加したことを確認できた。カルシウムは、細胞内シグナル伝達を担う代表的なセカンドメッセンジャーの一つである。そのため、カルシウムシグナルの阻害薬を用いて、カルシウムが制御する下流の分子とAQP2のリン酸化とのかわりを解析した。その結果、カルモジュリンの阻害薬(W7)とカルシニューリンの阻害薬(シクロスポリンA)はWnt5aによるAQP2のリン酸化を完全に阻害した。一

方で、CAMKIIの阻害薬(KN93)はS261の脱リン酸化をわずかに阻害するのみであった。すなわち、Wnt5aはカルシウム/カルモジュリン/カルシニューリンの活性化を介しAQP2のリン酸化を制御していた。

S269がリン酸化されたAQP2は細胞内局在を変化させ尿細管管腔側膜へ集積することが知られている。Wnt5aによりAQP2の膜輸送が促進するかどうかを免疫染色を用いて解析した。Wnt5aは尿細管管腔側膜のAQP2発現量を増加させ、W7/シクロスポリンAはその効果を阻害した。Wnt5aは、カルシニューリンを介しAQP2のリン酸化だけではなく膜輸送も活性化した。

Wnt5aは、さらにAQP2のmRNAと蛋白発現量も増加させた。AQP2 mRNAの増加もカルシニューリン依存性であり、W7/シクロスポリンAによりWnt5aの効果は完全に抑制された。Wnt5aによるAQP2蛋白発現量の増加は、尿細管管腔側膜のAQP2発現量増加に反映されることをビオチン標識化アッセイや免疫染色を用いて確認した。Wnt5aは、AQP2の膜輸送促進と蛋白発現量増加の双方を介して尿細管管腔側膜のAQP2発現量を増加させた。

以上の結果から、カルシニューリンはAQP2の主要な制御因子と考えられた。カルシニューリンを直接活性化することで知られるアラキドン酸もWnt5aと同様に皮質集合管培養細胞においてバゾプレシン様効果を持ったことから、カルシニューリンの活性化がAQP2制御に重要であることを確認した。次に、Wnt5a/カルシウム/カルモジュリン/カルシニューリン経路と既存のバゾプレシン/V2R/cAMP/PKA経路との関係性を評価するため、cAMP/PKAの活性を評価した。バゾプレシンはcAMP/PKAを活性化したが、

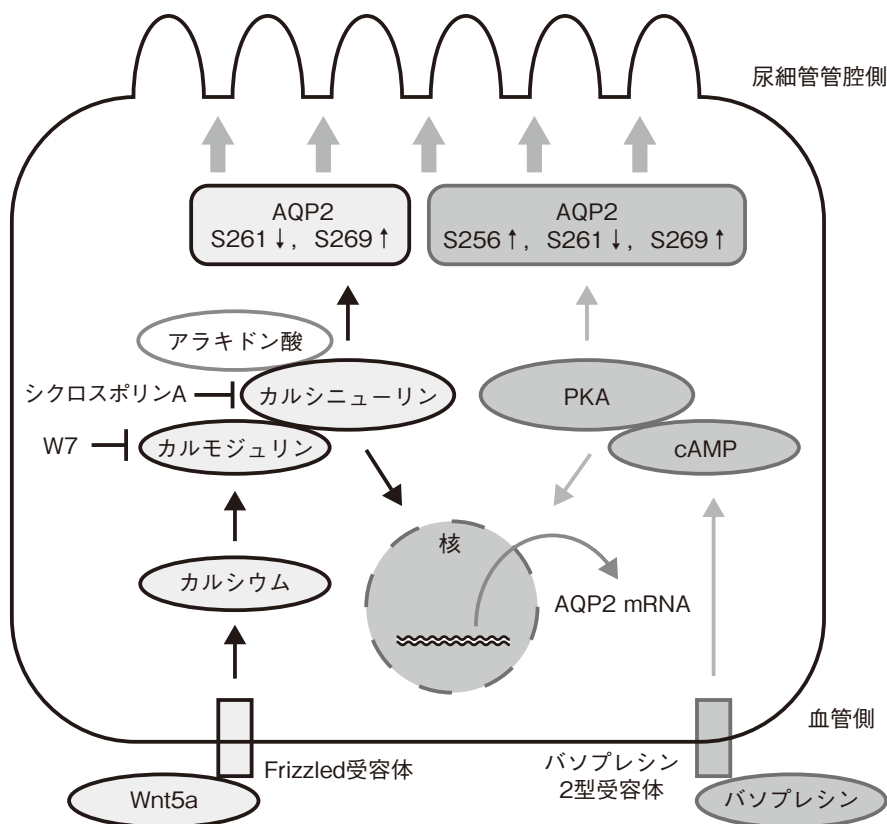


図2 Wnt5によるAQP2活性化の機序(文献6より引用)

Wnt5aは活性化せず、Wnt5aによるAQP2制御メカニズムはバゾプレシンとは異なることが明らかになった。

トルバプタンの効果を有意に減弱させ、尿細管管腔側膜のAQP2発現量を増やし、尿浸透圧を上昇させた。

Wnt5aは尿濃縮力を向上させる

Wnt5aは、V2Rを介さずにAQP2を活性化しており、先天性腎性尿崩症の治療標的となりうる。マウス腎臓におけるWnt5aのAQP2活性化効果を明らかにするため、腎臓から単離した皮質集合管へWnt5aを直接投与し、その作用を評価した(図1)。Fluo4を用いて細胞内カルシウム動態を観察したところ、mpkCCD細胞と同様の変化がマウス腎臓の集合管においても観察され、Wnt5a投与後に集合管のカルシウム濃度は上昇した。さらに、カルシウムシグナルの活性化により、集合管におけるAQP2の水再吸収量が増加するかを解析するため灌流実験を行った。Wnt5aは水透過性を上昇させ、バゾプレシンの約54%もの効果を発揮した。最後に、V2Rを阻害した腎性尿崩症モデルマウスにおけるWnt5aの効果を検証した。V2Rアンタゴニストであるトルバプタンを持続皮下投与すると、尿細管管腔側膜におけるAQP2の発現量は減少し、尿浸透圧は低下した。Wnt5aは

おわりに

本研究により、Wnt5a/カルシウム/カルモジュリン/カルシニューリン経路が既存のバゾプレシン経路とは異なる機序でAQP2の水透過性を増加させることが明らかとなった(図2)⁶⁾。カルシニューリンはAQP2の重要な制御因子であり、腎性尿崩症の新たな治療戦略としてカルシニューリン活性化薬のスクリーニングの有用性が期待される。

謝辞

最後にこの研究を支えてくださった内田 信一 先生、佐々木成先生、根東義明先生をはじめ、すべての関係者の方々に心より感謝致します。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Rai T, Uchida S. Hereditary nephrogenic diabetes insipidus in Japanese patients: analysis of 78 families and report of 22 new mutations in AVPR2 and AQP2. *Clin Exp Nephrol* 2013 ; 17 : 338–344.
2. Yip KP. Epac-mediated Ca(2+) mobilization and exocytosis in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 ; 291 : F882–890.
3. De A. Wnt/Ca2+ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011 ; 43 : 745–756.
4. Fushimi K, Sasaki S, Marumo F. Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 14800–14804.
5. 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* 2017 ; 482 : 524–529.
6. Ando F, et al. Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 13636.