

## 腎臓尿細管における LRBA を介したナトリウム再吸収機構の解明

安藤 史頭

東京医科歯科大学腎臓内科学

### 概要

バゾプレシン/cAMP/Protein Kinase A (PKA)シグナルは、腎臓において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。PKA の細胞内局在は、PKA のアンカータンパクである AKAP により決定されているが、50 種類以上の AKAP のうち、LRBA が AQP2 のリン酸化に必須であることを同定した。LRBA は T 細胞において CTLA4 受容体の膜輸送に関わる。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・リンパ増殖症などを引き起こす。免疫学分野における LRBA 研究の進展を困難にしている要因として、*Lrba* ノックアウトマウスにはヒトと異なり免疫不全の表現型が存在せず、生体内の LRBA 機能を詳細に解析できない現状がある。CTLA4 も AQP2 水チャネルも vesicle recycling によって活性の制御を受けており、尿濃縮と免疫不全症に LRBA を介した共通の制御機構が存在すると考えられた。本研究では、LRBA の解析を腎臓で行うことで水と塩の恒常性維持機構を明らかにする。

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した。LRBA-PKA 複合体は細胞膜直下の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、AQP2 をリン酸化していることが明らかになった。リン酸化された AQP2 は瞬時に細胞膜へ輸送されることで、尿から水を再吸収し体内の水恒常性を維持していると考えられた。

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* ノックアウトマウスでは血清 Na の上昇がないことから塩利尿もおきていたと考えられた。*Lrba* ノックアウトマウスの血清 Na・Cl は低塩食負荷において最も低下し血圧も低下した。利尿剤試験ではサイアザイドを投与しても尿中塩排泄が増加せず、Na-Cl 共輸送体(NCC)の機能不全が明らかになった。そこで、WNK-SPAK-NCC シグナルの解析を行った。*Lrba* ノックアウトマウスの SPAK 発現量は低下し、代償的に WNK1 の発現量が増加していた。LRBA と SPAK は細胞内小胞において共局在し、SPAK のライソゾームにおける分解を LRBA が抑制していた。

LRBA が水と塩の恒常性を同時に制御していることを明らかにした。現在、LRBA 欠損症患者に関する国際共同レジストリ研究を進めている。今後、ヒトにおいてもこれらの表現型が認められるかを検証する。

### 1. 研究目的

バゾプレシン/cAMP/Protein Kinase A (PKA)シグナルは、腎臓において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。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抗利尿ホルモンであるバゾプレシンへ不応性となる希少

疾患であり、尿濃縮機構が破綻し生まれつき多尿をきたす(指定難病 225)。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。多尿による最も重要な合併症として、新生児期・乳児期の高度な脱水と高ナトリウム血症による中枢神経障害があり、精神発達遅滞の原因となる。治療法は

尿量を軽減するための対症療法しか選択できないのが現状であり、病態解明および根治的治療法の開発が望まれている(文献1)。

研究代表者は先天性腎性尿崩症の新規治療戦略の開発に着手し(文献2)、障害された V2R を介さずに PKA を直接活性化し、腎性尿崩症モデルマウスの尿量を減少させる低分子化合物 FMP-API-1/27 を発見した(文献3)。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(Fig. 1)。そこで、FMP-API-1/27 が標的とする AKAP-PKA 結合の探索を始めた。50 種類以上の AKAP と 4 種類の PKA サブユニットのうち、腎臓集合管に発現する AKAP-PKA 結合の組み合わせを RNA-Seq やプロテオミクス解析で絞り込み、免疫沈降法を用いて FMP-API-1/27 が LRBA-PKA 結合を特異的に阻害していることを明らかにした(文献4)。

LRBA と AQP2 は腎臓集合管において同一の細胞内小胞に局在しており、LRBA のノックアウトマウスを作成し、尿濃縮能を評価したところ、AQP2 のリン酸化が障害され尿浸透圧が低下しバゾプレシンへの反応性が失われていた。今まで種々の AKAP を標的とした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 ノックアウトマウスは初めてであり、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。LRBA が PKA のアンカータンパクである生理学的意義は不明であったが、AQP2 水チャネルの制御機構を考えると理解がしやすい。AQP2 は、PKA によってリン酸化されると細胞膜へ輸送されることが知られているが、*Lrba* ノックアウトマウスにおいては PKA が AQP2 周囲に局在できず、AQP2 のリン酸化が障害され多尿になった(Fig. 2)。

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。本研究では、尿濃縮の創薬標的として同定された LRBA の解析を腎臓で進め、免疫不全症の病態理解と治療薬の開発に役立てる。

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。LRBA が

欠損すると CTLA4 の vesicle recycling 機構が破綻し、CTLA4 がライソソ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(Fig. 3)(文献5)。また、CTLA4 は免疫チェックポイント分子として着目を集めており、CTLA4 阻害剤であるイピリマブは癌治療において適応疾患が今なお拡大されている。LRBA はユビキタスに発現しているが、T 細胞以外の組織における役割は今まで不明であった。申請者は腎臓における AQP2 水チャネルの vesicle recycling 機構を研究しており、LRBA が AQP2 の膜輸送に必須であることを同定している。

LRBA 研究最大の障壁は、*Lrba* ノックアウトマウスはヒトの LRBA 欠損症と異なり免疫不全の表現型を持たないことである(文献6)。つまり、免疫学分野において生体内の LRBA 機能を詳細に解析するためのモデル動物が存在しない。一方で、*Lrba* ノックアウトマウスに免疫不全の表現型が無いことは、腎臓の vesicle recycling 機構を解析する上で有利に働く。CRISPR-Cas9 システムを用いて独自に作製した *Lrba* ノックアウトマウスにおいても、腎臓組織にリンパ球浸潤などの明らかな免疫学的異常は無く、腎機能(血清 Cr 上昇)や尿中アルブミン量なども正常であった。よって、腎不全による 2 次的な膜輸送の障害を排除することができる。そこで、LRBA の解析を腎臓で行うことで vesicle recycling 機構の新しい基本原理の解明を進める。

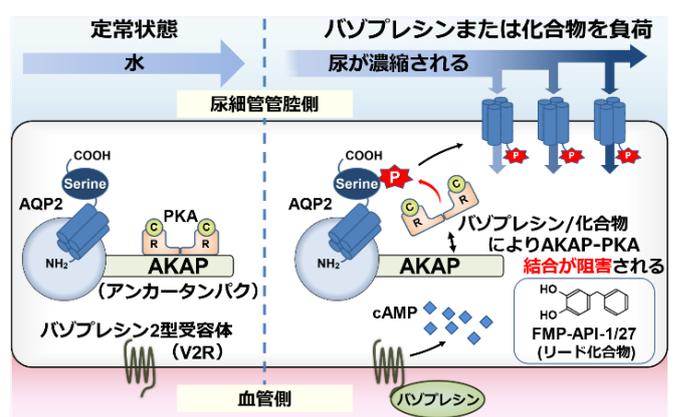


Fig. 1 AKAP-PKA 結合阻害による AQP2 活性化機構

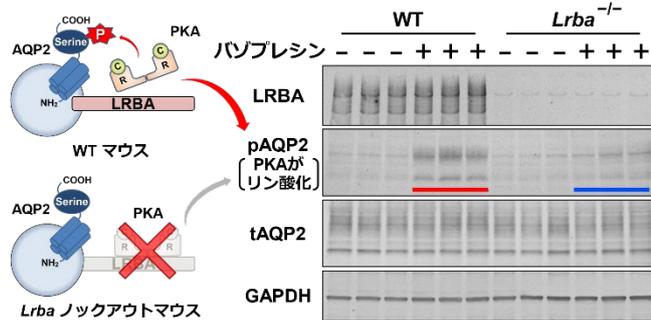


Fig. 2 LRBA は PKA による AQP2 のリン酸化を仲介する

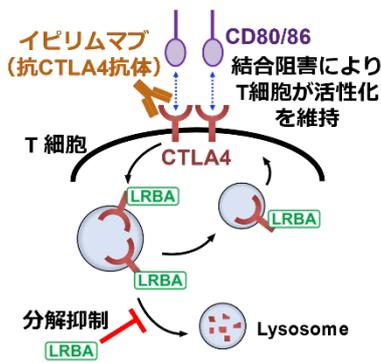


Fig. 3 LRBA による vesicle recycling の制御

## 2. 研究方法

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 (Fig. 4), これらの尿細管セグメントにおける LRBA の vesicle recycling 機構を解析し、塩の再吸収機構や血圧の新規調節機構を明らかにする。

### 2. 1 LRBA による水制御機構の解明

LRBA は腎臓集合管のバゾプレシン/cAMP/PKA/AQP2 シグナルにおいて、PKA による AQP2 のリン酸化反応を仲介しており、LRBA が欠損すると AQP2 のリン酸化および膜輸送が障害される。同様に、LRBA は T 細胞においては CTLA4 受容体の vesicle recycling を促進しており、LRBA が欠損すると vesicle recycling 機構が破綻し、CTLA4 はライゾソームで分解される。AQP2 と CTLA4 の制御機構は一見類似しているが、*Lrba* ノックアウトマウスに

おいて、CTLA4 と異なり AQP2 はライゾソームで分解されず発現量は低下しなかった。そこで、T 細胞と腎臓集合管における vesicle recycling 機構の相違を明確にする。

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、ライゾソ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 (Fig. 5)。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* ノックアウト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分解像度で解析する。

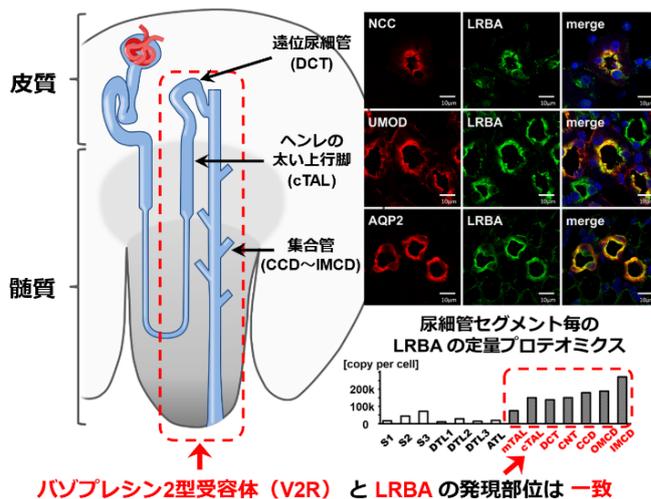


Fig. 4 腎臓尿細管における LRBA の局在

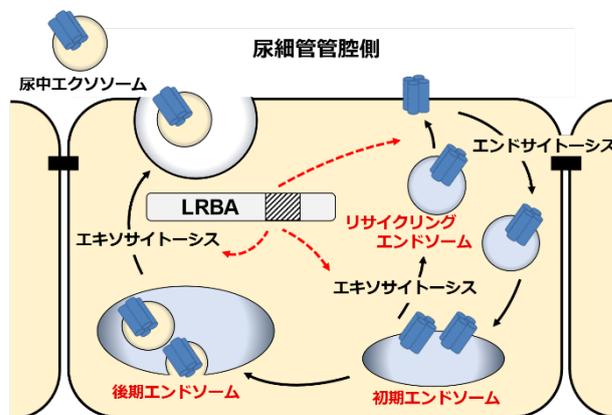


Fig. 5 AQP2 の細胞内輸送機構

## 2. 2 LRBA による塩制御機構の解明

*Lrba* ノックアウトマウスにおいては、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起きると高 Na 血症を認めるが、*Lrba* ノックアウトマウスでは血清 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* ノックアウトマウスの血液生化学検査(Na, Cl, K, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)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*<sup>-/-</sup>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(文献 7)。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。テレメリー法による24時間血圧測定を行い、利尿剤負荷試験と組み合わせることで、LRBA が血圧を制御するメカニズムを解析する。

## 3. 研究結果

### 3. 1 LRBA による水制御機構の解明

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 +リサイクリングサイクリングエンドソームに局在していた(Fig. 6)。さらに、超解像顕微鏡を使用し Rab11とAQP2の共局在を確認した(Fig. 7)。バゾプレシン刺激により、AQP2はRab11+リサイクリング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。

次に、LRBA の局在を確認した。免疫染色で Rabbit Rabs 抗体との共染色を可能にするために、現在保有している rabbit LRBA 抗体の他に goat LRBA 抗体を作成した。*Lrba* ノックアウトマウスを用いて抗体の特異性を検証済みである。次にこの抗体を用いて、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(Fig. 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* ノックアウトマウスを用いて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、AQP2 をリン酸化していることが明らかになった(Fig. 9)。リン酸化された AQP2 は瞬時に細胞膜へ輸送されることで、尿から水を再吸収し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。以上の結果を The Journal of Physiology に発表した(DOI: 10.1113/JP285188)。

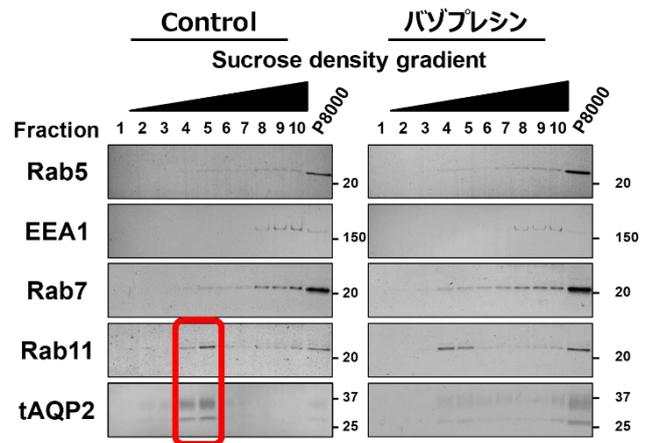


Fig. 6 AQP2 はリサイクリングエンドソームに局在する

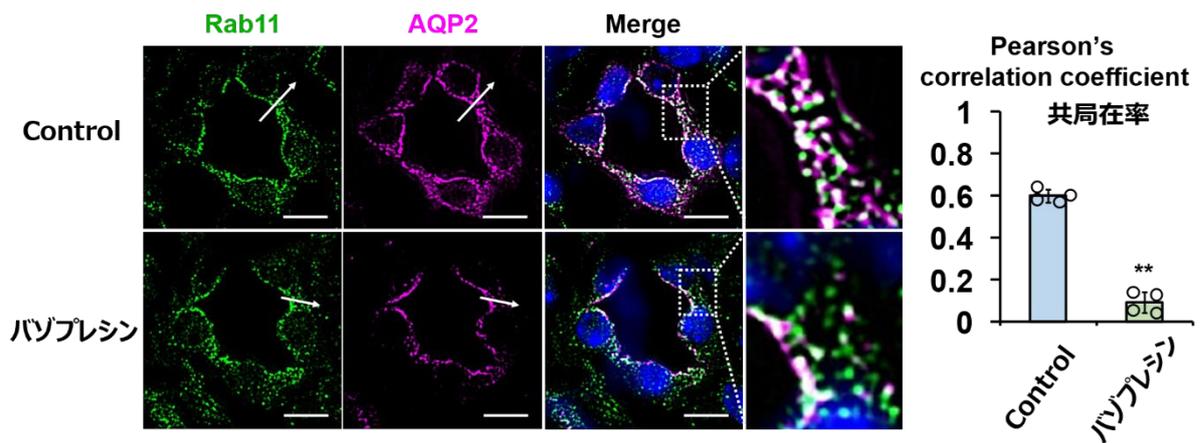


Fig. 7 AQP2 はリサイクリングエンドソームから細胞膜へ移動する

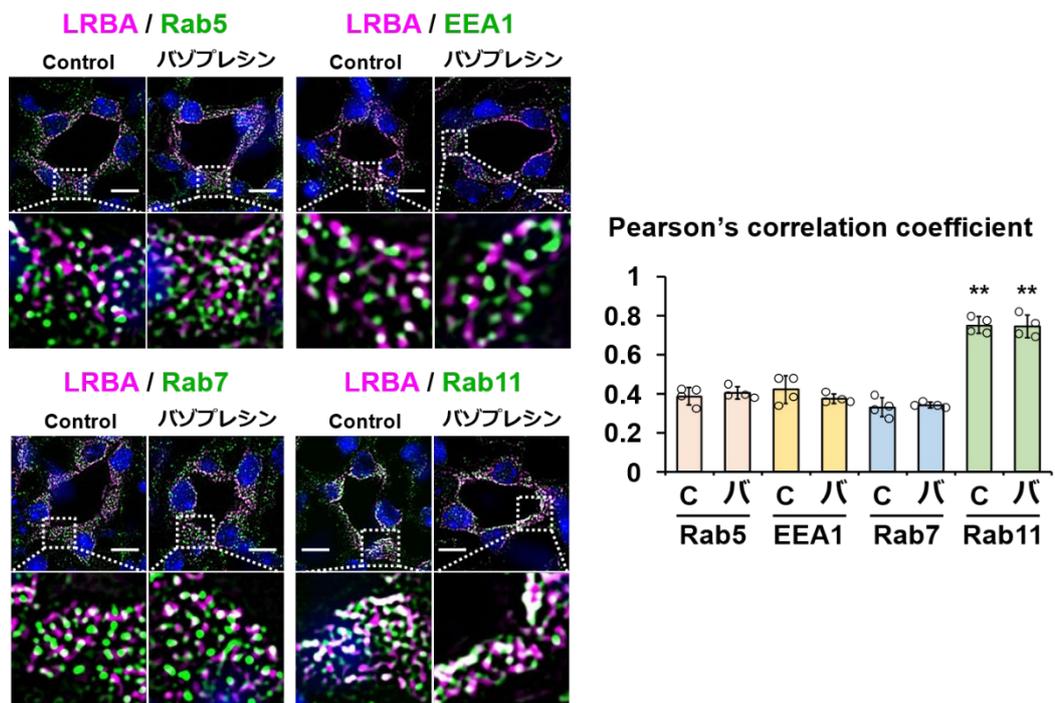


Fig. 8 LRBA はバゾプレシン刺激に関わらずリサイクリングエンドソームに局在する

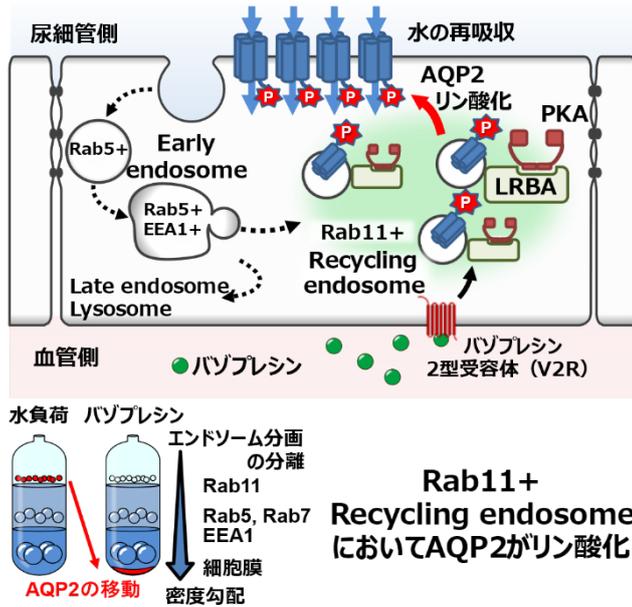


Fig. 9 膜輸送機構におけるLRBAの役割

### 3. 2 LRBAによる血圧制御機構の解明

*Lrba* ノックアウトマウスに低塩食・通常食・高塩食を振り、採血検査を実施した。*Lrba* ノックアウトマウスの血清 Na・Cl は低塩食群において低下しており、Na (WT: 146.5 mEq/L, *Lrba*<sup>-/-</sup>: 143.6 mEq/L,  $p = 0.0014$ ), Cl (WT: 110.1 mEq/L, *Lrba*<sup>-/-</sup>: 105.9 mEq/L,  $p = 0.0012$ )であった。さらに、静脈血 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>高値 (WT: 27.4 mmol/L, *Lrba*<sup>-/-</sup>: 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* ノックアウトマウスの FENa (尿中塩分排泄率) の上昇率に差は認められなかった (Fig. 10)。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* ノックアウトマウスの FENa の上昇が消失していた。NCC 活性が低下しており、採血と矛盾しない結果が得られた。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* ノックアウトマウスにおいて 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。

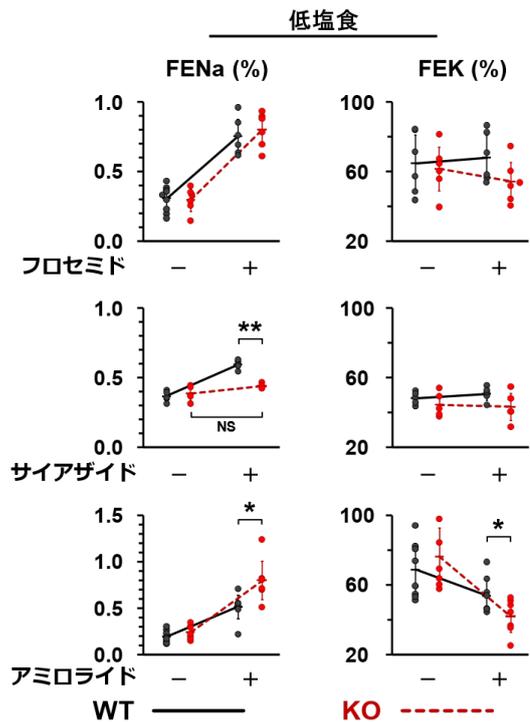


Fig. 10 *Lrba* ノックアウトマウスにおける利尿剤試験

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 (Fig. 11)。 *Lrba* ノックアウトマウスでは、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 (Fig. 12)。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。そこで、WNK-SPAK-NCC シグナル関連分子の内 LRBA と結合する分子を免疫沈降法を用いて調べたところ、SPAK が最も強く結合した (Fig. 13)。免疫電顕を用いてLRBAとSPAKの局在を確認したところ、腎臓の遠位尿細管において両者とも細胞膜直下の細胞内小胞に局在していた (Fig. 14)。

次に、LRBA が SPAK の発現量をどのように制御しているかを検証するために、HEK293T 細胞へ LRBA と SPAK を強制発現させた。SPAK は LRBA と共発現時に発現量が増加した。また、SPAK を単独で発現させた場合にもクロロキンを使用することで、共発現時と同等の発現量へ増加したことから、LRBA は SPAK のライソゾームにおける分解を防いでいると考えられた。

SPAK の機能低下により NCC 活性が低下すると、特に低塩食下において体内に塩分を保持できず、*Lrba* ノックアウトマウスの血圧が低下した (Fig. 15)。 *Lrba* ノックアウトマウスの NCC の活性はほぼ消失しており、サイアザイドを投与しても *Lrba* ノックアウトマウスの血圧は変動しなかった。

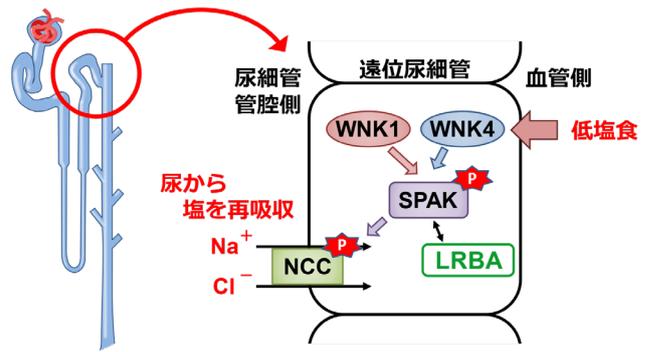


Fig. 11 WNK-SPAK-NCC シグナルによる塩再吸収機構

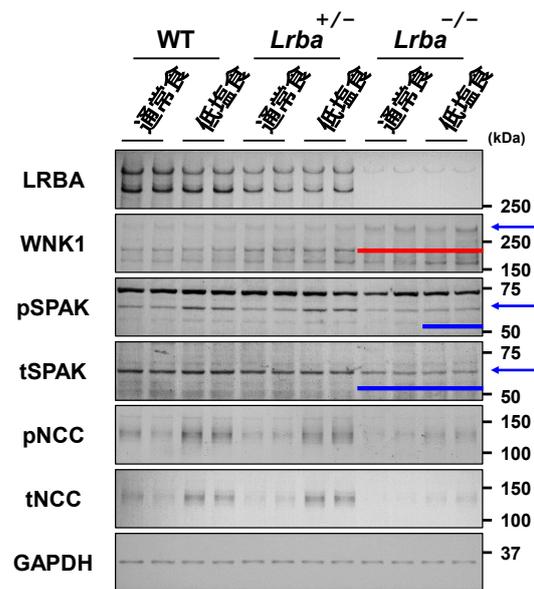


Fig. 12 WNK-SPAK-NCC シグナルによる塩再吸収機構

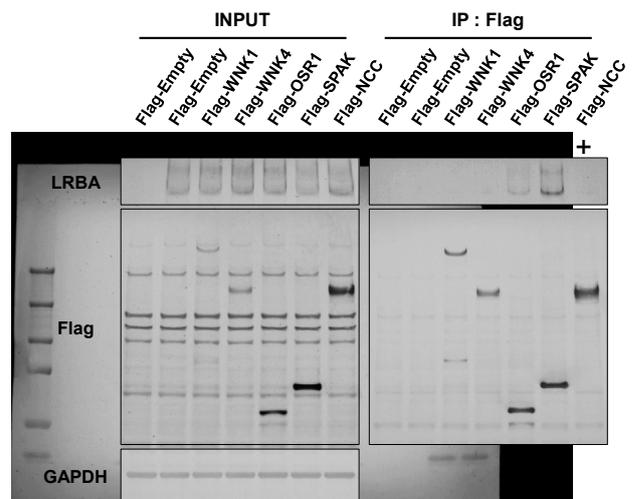


Fig. 13 WNK シグナル関連分子と SPAK の結合評価

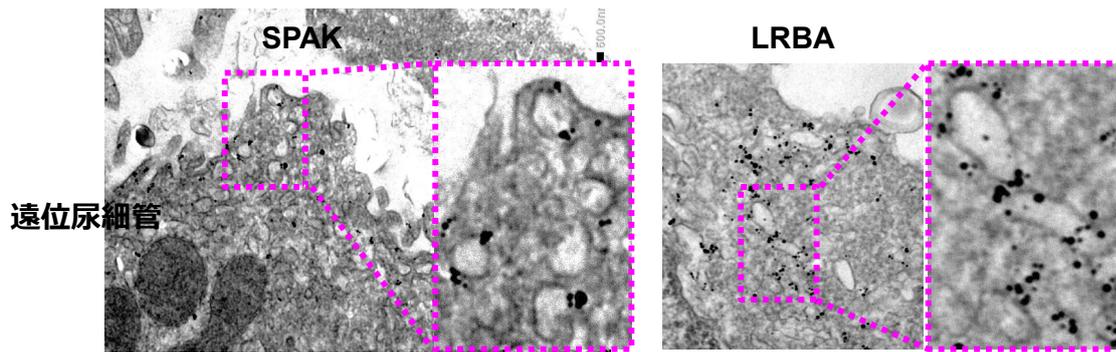


Fig. 14 LRBA と SPAK は細胞膜直下の細胞内小胞に局在する

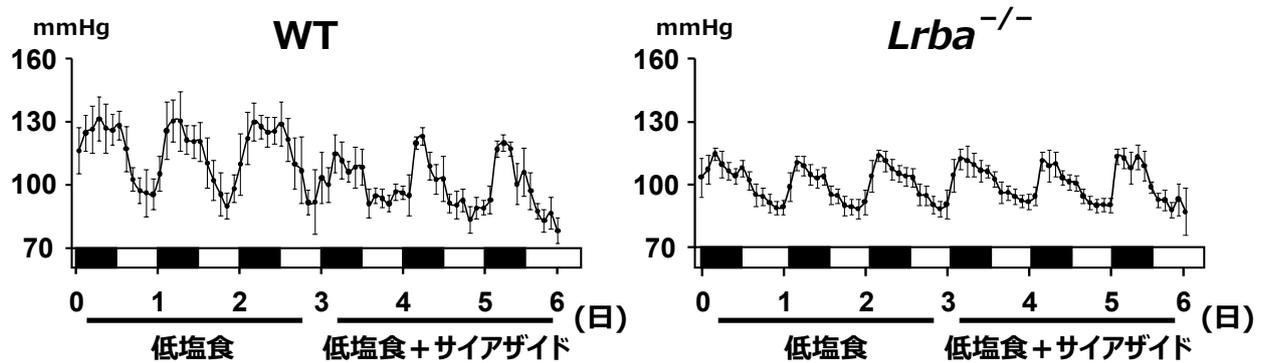


Fig. 15 *Lrba* ノックアウトマウスの血圧は低下する

#### 4. 考察

AQP2 研究の歴史は古く、AQP2 やその制御分子の局在は MDCK 細胞や mpkCCD 細胞など集合管由来の培養細胞を用いて明らかにされてきたが、生体内における AQP2 の正確な局在は不明であった。本研究では、密度勾配遠心法・超解像顕微鏡・免疫電子顕微鏡を組み合わせることで、はじめてマウス腎臓における AQP2 と LRBA の詳細な局在を定量化し、LRBA の新たな AQP2 制御機構を解明した。

体内の水分が充足した状態においては、LRBA-PKA 複合体と AQP2 は腎臓集合管のリサイクリングエンドソームに共局在していた。脱水となりバズプレシンが脳下垂体で分泌されると、LRBA を介して PKA が効率的に AQP2 をリン酸化していた。LRBA はバズプレシンによる尿量調節と体内の水恒常性維持を維持するために必要であった。

今回用いた手法は様々な臓器や組織の研究に用いることができ、AQP2 や LRBA 以外のタンパク質の局在解析

にも応用が可能である。LRBA は免疫チェックポイント分子である CTLA-4 などの輸送にも関わっており、腎臓における LRBA の詳細な役割が明らかになったことで、LRBA 研究のさらなる発展につながることを期待された。

一方で、*Lrba* ノックアウトマウスにおいては、尿濃縮力が障害されているにもかかわらず血清ナトリウムの上昇を認めなかったことから、塩の制御機構も検証した。採血や利尿剤負荷試験の結果から NCC の機能が低下していることが明らかになった。常染色体優性多発性嚢胞腎 ADPKD の治療において、V2R アンタゴニストであるトルバプタンと NCC の阻害剤であるサイアザイドを併用した場合に、トルバプタン単独群と比較し血清ナトリウムが低値になることが知られており、*Lrba* ノックアウトマウスにおいても同様の変化が生じていると考えられた<sup>(文献8)</sup>。

*Lrba* をノックアウトすると腎臓における SPAK の発現量が低下し、NCC の機能が低下していた。AQP2 制御においては、LRBA は PKA の活性を決定しており、AQP2 の

発現量には影響しなかった。SPAK の制御機構は AQP2 よりも CTLA4 に類似していた。CTLA4 も SPAK と同様に LRBA と結合し、LRBA の欠損によりライソゾームで分解され発現量が低下する<sup>(文献<sup>9</sup>)</sup>。今後、SPAK と LRBA の詳細な結合様式や、低塩食や高塩食負荷時に局在や LRBA-SPAK 結合力にどのような変化が生じるかを解析することが、免疫分野における LRBA の役割をより詳細に理解するために役立つと考えられた。

## 5. 今後の課題

LRBA 欠損症患者の 10~20%程度に慢性腎不全を認めるが、検尿異常が無い症例が多く今まで腎不全の原因が不明であった<sup>(文献<sup>10, 11</sup>)</sup>。LRBA 欠損症では、60%以上の患者に自己免疫性腸炎による慢性下痢を認め、さらに70%以上の患者が低ガンマグロブリン血症により感染症を繰り返し頻回にシックデイを経験することから、水や塩が不足しやすい状況にある。*Lrba* ノックアウトマウスの解析から、LRBA の機能が低下すると水と塩の尿中への排泄量が増加することを明らかにしており、脱水症の進行に拍車がかかる可能性が高い。高度の脱水症は、一過性の腎前性腎不全にとどまらず慢性腎不全へ移行する原因になる。そこで、LRBA 欠損症患者の腎臓に関する患者情報を取得するために倫理審査の承認を取得した(LRBA 欠損症に合併する腎機能障害に関する多施設共同後ろ向き観察研究(承認番号:M2022-343))。LRBA 欠損症は、国内においては 20 人程度の希少難病であるが、中東において家系の集積があることが知られている。そこで、テヘラン大学と国際共同研究を実施し 40 名以上の LRBA 欠損症患者に関する臨床情報を取得の上、腎機能障害の原因について解析予定である。

*Lrba* ノックアウトマウスに免疫不全の表現型がないことから、免疫学分野においてヒトと同じ病的変異を有するノックインマウスが作成されることはなかった。そこで、患者で報告されている変異(LRBA-R1445Q)を有するノックインマウスを作成した。まずは T 細胞以外の臓器・組織において、どの程度 LRBA の発現量が低下しているのかを検証する。

LRBA-R1445Q を HEK293T 細胞に強制発現させたところ、LRBA-WT と比較し発現量が著明に減少し LRBA 欠損を再現できた。さらに、R1445Q の発現量は cAMP を産生する forskolin や phosphodiesterase 阻害薬によって改善

したことから、cAMP/PKA シグナルは LRBA 欠損症の治療標的として有望である。我々が保有する cAMP/PKA シグナルを活性化する化合物が LRBA 欠損症の治療候補薬となり得るかを検証するために、LRBA の発現量回復や AQP2 や NCC の活性化を指標として化合物を選定していく。

## 6. 文献

1. Ando F, Uchida S. Activation of AQP2 water channels without vasopressin: therapeutic strategies for congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Clin Exp Nephrol.* 2018 Jun;22(3):501-507. doi: 10.1007/s10157-018-1544-8.
2. Ando F, Sohara E, Morimoto T, Yui N, Nomura N, Kikuchi E, Takahashi D, Mori T, Vandewalle A, Rai T, Sasaki S, Kondo Y, Uchida S. Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway. *Nat Commun.* 2016 Nov 28;7:13636. doi: 10.1038/ncomms 13636.
3. 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.* 2018 Apr 12;9(1):1411. doi: 10.1038/s41467-018-03771-2.
4. Hara Y, Ando F, Oikawa D, Ichimura K, Yanagawa H, Sakamaki Y, Nanamatsu A, Fujiki T, Mori S, Suzuki S, Yui N, Mandai S, Susa K, Mori T, Sohara E, Rai T, Takahashi M, Sasaki S, Kagechika H, Tokunaga F, Uchida S. LRBA is essential for urinary concentration and body water homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022 Jul 26;119(30): e2202125119.
5. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, Zhang Y, Liu Z, Fritz JM, Marsh R, Husami A, Kissell D, Nortman S, Chaturvedi V, Haines H, Young LR, Mo J, Filipovich AH, Bleasing JJ, Mustillo P, Stephens M, Rueda CM, Chougnet CA, Hoebe K, McElwee J, Hughes JD, Karakoc-Aydiner E, Matthews HF, Price S, Su HC, Rao VK, Lenardo MJ, Jordan MB. AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune

- dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*. 2015 Jul 24;349(6246):436-40. doi: 10.1126/science.aaa1663.
6. Gámez-Díaz L, Neumann J, Jäger F, Proietti M, Felber F, Soulas-Sprauel P, Perruzza L, Grassi F, Kögl T, Aichele P, Kilimann M, Grimbacher B, Jung S. Immunological phenotype of the murine *Lrba* knockout. *Immunol Cell Biol*. 2017 Oct;95(9):789-802. doi: 10.1038/icb.2017.52.
  7. Uchida S, Mori T, Susa K, Sohara E. NCC regulation by WNK signal cascade. *Front Physiol*. 2023 Jan 4;13:1081261. doi: 10.3389/fphys.2022.1081261.
  8. Kramers BJ, Koorevaar IW, van Gastel MDA, van Goor H, Hallows KR, Heerspink HL, Li H, Leonhard WN, Peters DJM, Qiu J, Touw DJ, Gansevoort RT, Meijer E. Effects of Hydrochlorothiazide and Metformin on Aquaresis and Nephroprotection by a Vasopressin V2 Receptor Antagonist in ADPKD: A Randomized Crossover Trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2022 ;17(4):507-517. doi: 10.2215/CJN.11260821.
  9. Janman D, Hinze C, Kennedy A, Halliday N, Waters E, Williams C, Rowshanravan B, Hou TZ, Minogue S, Qureshi OS, Sansom DM. Regulation of CTLA-4 recycling by LRBA and Rab11. *Immunology*. 2021 Sep;164(1):106-119. doi: 10.1111/imm.13343.
  10. Tesch VK, Abolhassani H, Shadur B, Zobel J, Mareika Y, Sharapova S, Karakoc-Aydiner E, Rivière JG, Garcia-Prat M, Moes N, Haerynck F, Gonzales-Granado LI, Santos Pérez JL, Mukhina A, Shcherbina A, Aghamohammadi A, Hammarström L, Dogu F, Haskologlu S, İkinçioğulları AI, Köstel Bal S, Baris S, Kilic SS, Karaca NE, Kutukculer N, Girschick H, Kolios A, Keles S, Uygun V, Stepensky P, Worth A, van Montfrans JM, Peters AMJ, Meyts I, Adeli M, Marzollo A, Padem N, Khojah AM, Chavoshzadeh Z, Avbelj Stefanija M, Bakhtiar S, Florkin B, Meeths M, Gamez L, Grimbacher B, Seppänen MRJ, Lankester A, Gennery AR, Seidel MG; Inborn Errors, Clinical, and Registry Working Parties of the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the European Society for Immunodeficiencies. Long-term outcome of LRBA deficiency in 76 patients after various treatment modalities as evaluated by the immune deficiency and dysregulation activity (IDDA) score. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 May;145(5):1452-1463. doi: 10.1016/j.jaci.2019.12.896.
  11. Jamee M, Hosseinzadeh S, Sharifinejad N, Zaki-Dizaji M, Matloubi M, Hasani M, Baris S, Alsabbagh M, Lo B, Azizi G. Comprehensive comparison between 222 CTLA-4 haploinsufficiency and 212 LRBA deficiency patients: a systematic review. *Clin Exp Immunol*. 2021 Jul;205(1):28-43. doi: 10.1111/cei.13600.

# Molecular Mechanisms of LRBA-Mediated Sodium Reabsorption in Renal Tubules

Fumiaki Ando

Tokyo Medical and Dental University

## Summary

Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor protein (LRBA) is a protein kinase A (PKA) anchoring protein that creates compartmentalized PKA signaling in renal collecting ducts which is responsible for aquaporin-2 (AQP2) phosphorylation. *Lrba* knockout mice exhibit a polyuric phenotype with severely impaired AQP2 phosphorylation. However, the molecular mechanisms by which LRBA mediates vasopressin-induced AQP2 phosphorylation remain unknown.

To investigate AQP2 intracellular localization and phosphorylation status *in vivo*, a density gradient ultracentrifugation technique was combined with super-resolution structured illumination microscopy. AQP2 and LRBA were colocalized on the recycling endosome in the absence of vasopressin stimulation. The LRBA-PKA complex created compartmentalized PKA signalling at the recycling endosome, which facilitated AQP2 phosphorylation in response to vasopressin.

Although low urinary concentrating ability usually induces hypernatremia due to free-water diuresis, serum sodium level of *Lrba* knockout mice was low. The diuretic loading test revealed that thiazide diuretics, which is an inhibitor of sodium-chloride cotransporter (NCC), did not increase urinary sodium excretion in *Lrba* knockout mice. As a result of the impairment of NCC activity, baseline blood pressure was low in *Lrba* knockout mice, and their blood pressure was unresponsive to thiazide treatment. We finally examined the molecular mechanisms of LRBA-mediated NCC regulation. WNK-SPAK-NCC signaling is a main trigger to promote sodium reabsorption from urine via NCC. LRBA was colocalized with SPAK at intercellular vesicles in the distal convoluted tubules. In *Lrba* knockout mice, the protein expression level of SPAK was decreased and that of WNK was compensatorily increased. LRBA directly bound to SPAK and inhibited its lysosomal degradation.

In this study, we demonstrated that LRBA is essential for the activation of both NCC and AQP2, thereby ensuring sodium and water homeostasis in renal tubules. We now establish an international observational registry to examine these renal phenotypes in patients with LRBA deficiency.