

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16077

研究課題名(和文) WNK4を介した塩分感受性高血圧とメタボリックシンドロームのクロストークの解明

研究課題名(英文) Investigation of cross-talk between salt-sensitive hypertension and metabolic syndrome via WNK4

研究代表者

高橋 大栄 (TAKAHASHI, Daiei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40759552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：WNK4 KOマウスは野生型マウスに比べ高脂肪食による肥満を呈しにくいことを発見した。未分化な3T3-L1細胞にはWNK4は殆ど発現していないが、脂肪細胞への分化誘導刺激を加えることにより脂肪細胞分化におけるマスターレギュレーターであるPPAR α やC/EBP α の発現に先行して、WNK4が増加していた。WNK4ノックダウンしたところ、脂肪分化は抑制された。さらに、WNK4の発現量の変化は、細胞実験にてWNK4が脂肪細胞分化に必要な細胞分裂制御に関わっていることを、BrdU染色やCyclinの発現を検出することで明らかにした。以上の知見をまとめて論文で報告している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボリックシンドローム(metabolic syndrome, MetS)は、高血圧、インスリン抵抗性、脂質代謝異常、内臓脂肪型肥満からなる症候群である。WNK4はそのキナーゼ機能が活性化することにより、腎での塩分再吸収を促進し塩分感受性高血圧を引き起こすことが知られている。本研究によりWNK4は脂肪細胞でも発現し、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞に分化するのに必要な細胞分裂に重要な働きをしていることが明らかになった。この研究結果によりメタボリックシンドロームのような病態に対し、WNK4が包括的な治療ターゲットとなりえることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In the WNK4 $^{-/-}$ mice, PPAR α and C/EBP α , known as master regulators of adipocyte differentiation, expression levels were decreased in adipose tissues, and the mice exhibited partial resistance to high-fat diet-induced adiposity. WNK4 is induced in the early phase of 3T3-L1 adipocyte differentiation in advance of PPAR α and C/EBP α increase in preadipocytes and is expressed in mouse mature adipose tissues. It is known that preadipocytes grow into mature adipocytes via cell division called mitotic clonal expansion (MCE). We investigated whether WNK4 is important for the MCE using BrdU stain and by the evaluation of cyclin protein abundance. As a result, MCE was markedly decreased in WNK4 knock down preadipocytes. This results indicates WNK4 have an important role for MCE in preadipocytes. We have reported these results on EBioMedicine.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：脂肪分化 WNK4 3T3-L1 メタボリックシンドローム PPAR α C/EBP α

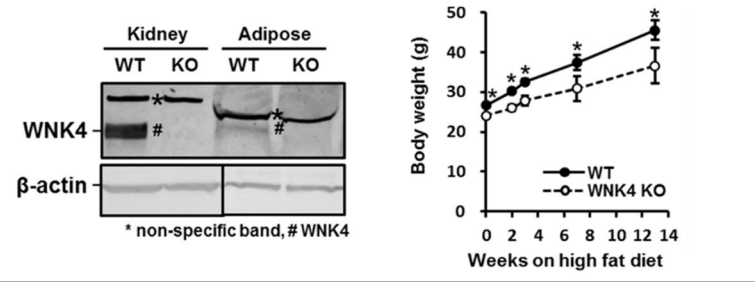
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (metabolic syndrome, MetS) は、高血圧、インスリン抵抗性、脂質代謝異常、内臓脂肪型肥満からなる症候群である。MetS は心血管危険因子が集積した病態であり、近年その重要性が指摘されている。脂肪はエネルギー貯蔵器官であると同時に、種々の液性因子を分泌する内分泌器官でもあり、MetS の病態に深く関わる。このため、脂肪細胞の分子生物学的な制御機構の解明は MetS 研究における中心課題である。

また、临床上最も重要な生活習慣病の一つに高血圧がある。高血圧は MetS の構成因子であり、肥満が塩分感受性高血圧の原因となることは広く知られているが、最近では逆に塩分摂取が肥満の原因となるとも考えられている。例えば血圧制御系であるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン (RAS) 系が、インスリン抵抗性および肥満の病態に関わることが知られる。例えばアンジオテンシン II 受容体 (AT_I、AT_{II}) のノックアウト (KO) マウスがいずれも抗肥満の表現型を示すことや (図 1)、慢性腎臓病 (CKD) モデルマウスにアルドステロン拮抗薬を投与すると CKD に伴う糖代謝異常・肥満の病態が改善されることは、塩分と肥満・糖脂質代謝の間の密な関わりを示唆する知見といえる。しかしながら、その機序は十分に解明されていない。

図1. WNK4はマウス脂肪細胞に発現している。またWNK4 KOマウスは高脂肪食での体重増加が抑制されている。



申請者高橋の所属する東京医科歯科大学腎臓内科学教室では、単一遺伝子の異常で起こる遺伝性高血圧疾患、特に偽性低アルドステロン症 II 型 (pseudohypoaldosteronism type II, PHAII) に着目し研究を行っている。PHAII は高カリウム血症・代謝性アシドーシスを呈する高血圧疾患であり、セリン・スレオニンキナーゼである with-no-lysine kinase (WNK) ファミリーに属する WNK1 および WNK4 がその原因遺伝子として同定されている。申請者は以前、WNK4 の腎における機能解明を目的として WNK4 KO マウスの解析を行い、WNK4 が腎の Na-Cl 共輸送体 (NCC) を制御する主要な WNK であることを報告している (Biosci Rep. 9;34, 2014)。また本マウスの解析過程で、全身における WNK4 の発現プロファイルを検証し、WNK4 が脂肪細胞に発現していることを新たに発見した。そして WNK4 KO マウスは野生型マウスに比べ高脂肪食による肥満を呈しにくいことを見出した。加えて、高脂肪食負荷後の WNK4 KO マウスは、野生型マウスに比べてインスリン感受性に優れていた。

このため、申請者は脂肪組織に着目し、脂肪細胞への分化能を有するマウス 3T3-L1 培養細胞を用いて WNK4 の機能を検証した。細胞実験において、未分化な 3T3-L1 線維芽細胞には WNK4 は殆ど発現していないが、脂肪細胞への分化誘導刺激を加えることによりその mRNA 量は 40 倍以上に増大し、タンパクレベルでも急速な増加が認められた (図 1)。また WNK4 の発現量の変化は、脂肪細胞分化におけるマスターレギュレーターである PPAR や C/EBP の発現に先行しており、WNK4 が脂肪細胞分化シグナルにおいて上流に位置することが示唆された。そこで 3T3-L1 細胞に WNK4 siRNA を作用させたところ、3T3-L1 細胞における脂肪滴の蓄積が著明に抑制された。さらに、WNK4 siRNA は、前述の PPAR や C/EBP の発現を有意に抑制した。一方で WNK4 の強制発現は脂肪滴蓄積の増加、PPAR の発現量増大など、WNK4 の抑制時と逆の結果を示した。以上のように、WNK4 が脂肪細胞分化早期における分化促進因子であることを示唆する知見が得られた。しかし、脂肪細胞蓄積は OSR1/SPAK や NKCC1 阻害薬である bumetanide を用いた実験では障害されなかった。このことから脂肪細胞における WNK4 の働きは既知の WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 シグナルのみでは説明できないと考えられるが、その詳細な機序は未だ明らかではない。また、申請者の検討の結果、WNK4 はインスリン分泌臓器である膵ランゲルハンス島や、主要なインスリン感受性臓器である肝臓にも発現がみられることも判明しているが、これらの臓器における WNK4 の機能についても不明なままである。

2. 研究の目的

塩分感受性高血圧関連遺伝子 WNK4 による脂肪細胞分化制御の分子生物学的機序を解明するとともに、全身の WNK4 を介した塩分感受性高血圧と MetS のクロストークの解明を目的とする。

3. 研究の方法

マウス由来の培養細胞である 3T3-L1 線維芽細胞は、インスリン等の刺激により脂肪細胞への分化を誘導できることから、脂肪細胞のモデルとして広く用いられている。これを用いて、WNK4 が脂肪細胞蓄積を制御する仕組みの解明を試みる。WNK シグナルの各種関連分子のノックダウン実験や、当研究室が保有する各種 WNK 関連遺伝子改変モデルマウスを用いて、脂肪蓄積への影響が WNK4 特異的なものであることを示す。

また、WNK4 をドメイン毎にフラグメント化し、今回みられる脂肪蓄積制御機構がどのドメイン依存に起こっているのかを検討する。WNK4 の機能ドメインの同定と、データベース検索を用いて、シグナル探索のための手掛かりとする。候補となったドメインについては、質量分析や yeast two hybrid 法を用いて結合タンパクを同定する。脂肪細胞における脂肪蓄積には様々なシグナルが関与するため、WNK4 による脂肪蓄積が何らかの既知のシグナルを制御するのか、あるいは全く新規のシグナルを有するのかをインタラクトームを用いて検証していく。(図2) 新たなシグナル関連分子の候補が同定されたら、各種ベクターのクローニングを行い、免疫沈降による結合確認等を行っていく。

4. 研究成果

(1) 脂肪分化において C/EBP と PPAR 発現に対する WNK4 の影響

3T3-L1 培養細胞を用いた実験において WNK4 は C/EBP による PPAR に先んじて蛋白量が増加することがわかった。siRNA を用いた実験により、WNK4 は PPAR や C/EBP 発現を促進する方向に関与していることを明らかにした。一方で C/EBP は WNK4 を KD しても発現量に変化は認められなかった(図3)。C/EBP は脂肪分化において PPAR の発現を促進する転写因子として知られている。我々は WNK4 は C/EBP に影響することで、その下流の遺伝子発現を抑制しているのではないかと考えた。この仮説を検証するため、C/EBP 抗体を用いて ChIP を行い、PPAR 2 のプロモーター領域の PCR をおこなった。その結果、WNK4 を KD した細胞での PPAR 2 のプロモーター領域の PCR 産物の量は著明に減少していた。このことは WNK4 KD により C/EBP が転写領域に結合するのが阻害されたことを示している。(図4)

脂肪細胞は分化刺激を受けたのち Mitotic clonal expansion (MCE) という 1-2 回の細胞分裂を起こしたのちに、成熟脂肪細胞へ分化する。この過程で C/EBP はプロモーター領域への結合能力を獲得するため、成熟脂肪細胞への分化には必須の過程であると考えられている。同じ WNK ファミリーである WNK1 や WNK3 は細胞周期を制御することが報告されており、WNK4 も脂肪細胞分化への細胞分裂制御に関わっていることが考えられた。WNK4 は脂肪分化刺激である MDI (IBMX, Dexamethasone, Insulin) 刺激を行う前は核内には存在していないが、MDI 刺激後は細胞内に局在が移動していることが分かった。過去の報告で WNK は細胞周期を制御する因子であることが報告されており、脂肪細胞分化に必要な MCE の制御にも関わっていることが考えられた。そこで、細胞増殖刺激により発現する Cyclin を調べたところ WNK4 KD では発現が抑制されていた。また、BrdU 染色を用いた免疫蛍光染色でも WNK4 KD では細胞増殖が抑制されていることがわかった(図3)。以上これまでの明らかにした知見をまとめて論文で報告している (EBioMedicine 18:118-127, 2017)。

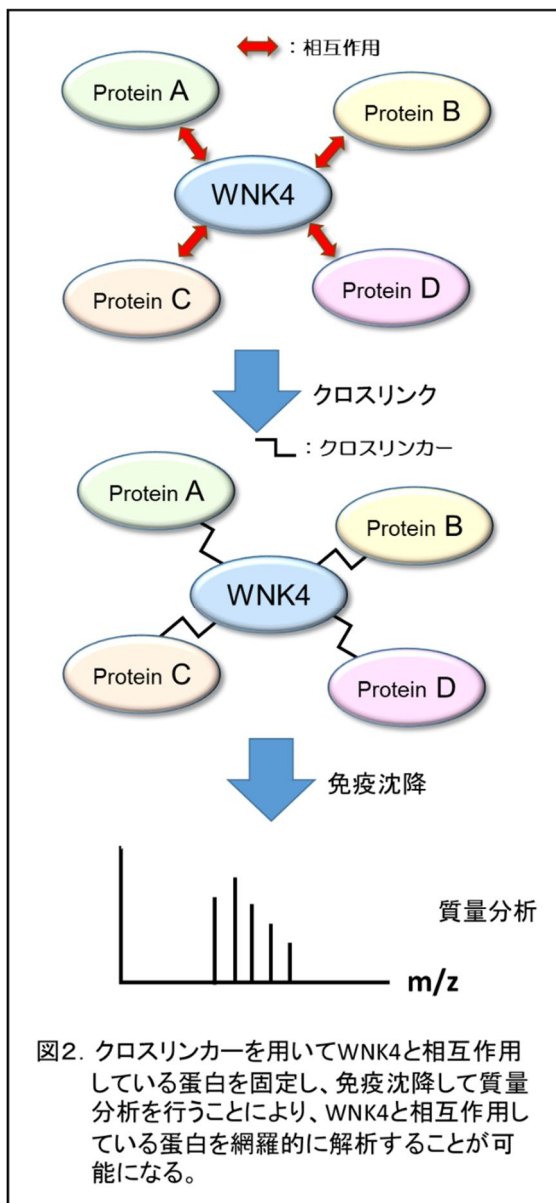


図2. クロスリンカーを用いて WNK4 と相互作用している蛋白を固定し、免疫沈降して質量分析を行うことにより、WNK4 と相互作用している蛋白を網羅的に解析することが可能になる。

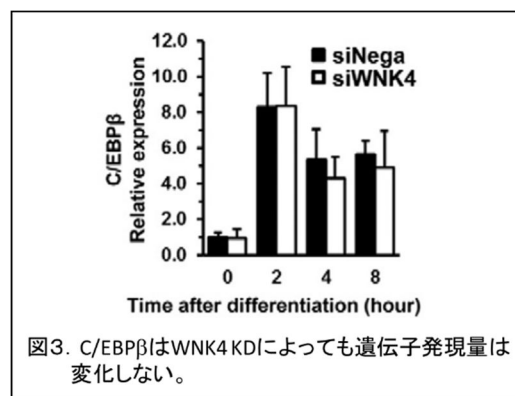


図3. C/EBPβ は WNK4 KD によっても遺伝子発現量は変化しない。

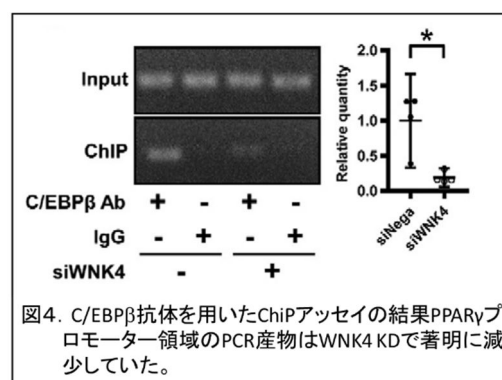


図4. C/EBPβ 抗体を用いた ChIP アッセイの結果 PPAR γ プロモーター領域の PCR 産物は WNK4 KD で著明に減少していた。

(2) WNK4 ドメイン毎の脂肪分化への影響の検討

申請書にも記載した通り、しかし、脂肪細胞蓄積は OSR1/SPAK や、NKCC1 阻害薬である bumetanide を用いた実験では障害されなかった。このことから脂肪細胞における WNK4 の働きは既知の WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 シグナルのみでは説明できないと考えられた。WNK4 の脂肪分化を制御するのに重要なドメインを探るため、WNK4 の各ドメイン毎のフラグメントを発現する発現ベクターを用いて検証した。作成した発現蛋白は Kinase ドメイン、Acidic motif を含んだ WNK4 フラグメント、WNK4 の C-terminal、Kinase dead WNK4, wild-type WNK4 を作成した。作成した各ドメインを発現するベクターを 3T3-L1 細胞に強制発現させて、PPAR や C/EBP の遺伝子発現を調べた。しかし wild-type WNK4 の強制発現でも脂肪分化誘導効果は安定せず、現在条件検討を行っている。

(3) 今後の方針

本研究により、WNK4 が、脂肪組織において脂肪細胞の分化を制御することを発見した。WNK4 は腎において塩分感受性高血圧発症に関与していることがわかっており、今回の研究結果と合わせて、WNK4 はメタボリックシンドロームの治療ターゲットとなりえることが明らかとなった。(図6) 今後 WNK4 のインタラクトームを行い、WNK4 と関連する蛋白を同定する。同定された蛋白を過去の文献と脂肪分化誘導をしていない Negative Control となる結果との比較などで検討し、3T3-L1 培養細胞系で検証を進めていく予定である。また Kinase dependent なシグナル系も同時に検討するため、CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いて WNK4 ノックアウト 3T3-L1 培養細胞の作成にも成功しており、今後 SILAC ラベル下で定量プロテオミクスを行い WNK4 シグナル伝達系の解析も進めていく予定である。

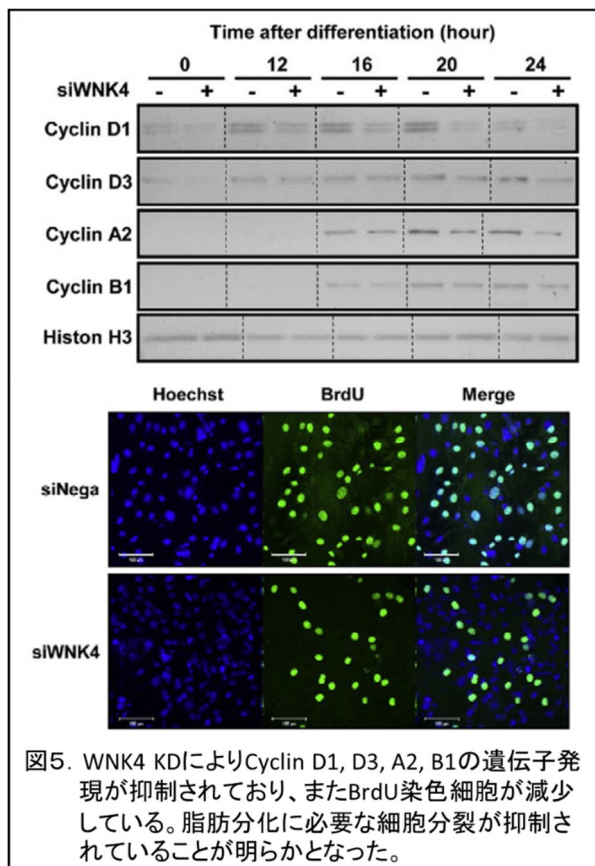


図5. WNK4 KDによりCyclin D1, D3, A2, B1の遺伝子発現が抑制されており、またBrdU染色細胞が減少している。脂肪分化に必要な細胞分裂が抑制されていることが明らかとなった。

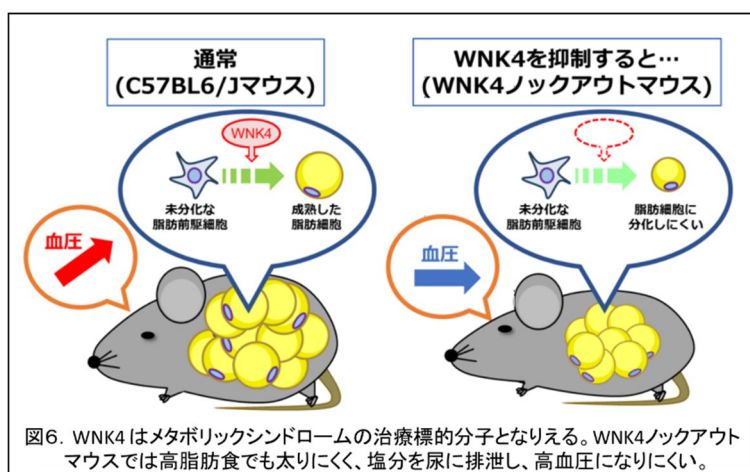


図6. WNK4はメタボリックシンドロームの治療標的分子となりえる。WNK4ノックアウトマウスでは高脂肪食でも太りにくく、塩分を尿に排泄し、高血圧になりにくい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- (1) [Takahashi D](#) (6/10). Role of ClC-K and barttin in low potassium-induced sodium chloride cotransporter activation and hypertension in mouse kidney. *Biosci Rep.*38:BSR20171243, 2018. 査読有
doi: 10.1042/BSR20171243.
- (2) [Takahashi D](#) (3/6). WNK4 is indispensable for the pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II caused by mutant KLHL3. *Biochem Biophys Res Commun.* 491:727-732, 2017. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.121.
- (3) [Takahashi D](#) (5/19). Drug-Repositioning Screening for Keap1-Nrf2 Binding Inhibitors using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Sci Rep.*7:3945, 2017. 査読有
doi: 10.1038/s41598-017-04233-3.
- (4) [Takahashi D](#) (2/12). Salt suppresses IFN inducible chemokines through the IFN - JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells. *Sci Rep.*7:46580, 2017. 査読有
doi: 10.1038/srep46580.

- (5) Takahashi D (2/12). Loop diuretics affect skeletal myoblast differentiation and exercise-induced muscle hypertrophy. Sci Rep.7:46369, 2017. 査読有
doi: 10.1038/srep46369.
- (6) Takahashi D (2/12) Impaired degradation of medullary WNK4 in the kidneys of KLHL2 knockout mice. Biochem Biophys Res Commun. 487:368-374, 2017. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.068.
- (7) Takahashi D (1/13). WNK4 is an Adipogenic Factor and Its Deletion Reduces Diet-Induced Obesity in Mice. EBioMedicine. 18:118-127, 2017. 査読有
doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.011.

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 高橋大栄 WNK4 は脂肪細胞分化の制御因子である 第 60 回日本腎臓学会学術集会 2017 年 . 仙台国際センター . 宮城 .
- (2) Daiei Takahashi. WNK4 Deletion Inhibits Adipogenesis In Vitro and In Vivo. The 50th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2017. New Orleans, USA.

〔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://tmd-kid.jp/wp-content/uploads/2019/04/20170330_Takahashi.pdf

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。