

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15995

研究課題名(和文)カリウムによるナトリウム輸送体を解した血圧調節機構の解明

研究課題名(英文)How does potassium regulate blood pressure through sodium-transporter?

研究代表者

野村 尚弘(Nomura, Naohiro)

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：50735800

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)：野菜や果物に多く含まれているカリウムは、血圧を下げる効果があり心臓血管疾患の予防に役立つ。その一方で、高カリウム血症は致死性不整脈の原因となるため、生体内のカリウム調節機構を明らかとすることは大切である。

今回の研究において、腎臓におけるカリウム調節で重要な役割を担っているナトリウム-クロライド共輸送体の調節機構について、既知のWNK4-SPAKシグナル経路と独立した、NCX1を介したカルシウムとカルシニューリンによる脱リン酸化経路が存在することを明らかとした。また、この結果はNCCの不活性化が原因であるギッテルマン症候群の治療に役立つ可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナトリウムクロライド共輸送体は、腎臓においてナトリウムやカリウムのバランスをとるために主要な役割を担っており、この輸送体のメカニズムを明らかとすることは、血圧管理・体内の水分・電解質バランス調整に役立つと考えられる。

また、ナトリウム輸送体の機能障害が原因であるギッテルマン症候群やバーター症候群の発症にも関わっており、これらの疾患の治療につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：High potassium (K) intake decreases hypertension and associated lower mortality. On the other hand, hyperkalemia causes sudden death with fatal cardiac arrhythmia and is also related to higher mortality.

Renal sodium (Na)-chloride (Cl) cotransporter (NCC), expressed in the distal convoluted tubule, is a key molecule in regulating urinary K excretion. K intake affects the activity of the NCC, which is related to salt-sensitive hypertension. NCC is known to be regulated by WNK-SPAK signal cascade. We discovered that the suppression of NCC by K loading was regulated by another mechanism. We found that calcium signal through sodium-calcium exchanger (NCX) stimulates calcineurin, which dephosphorylates NCC. This finding could lead to novel treatment against Gitelman syndrome, which is caused by loss of function of NCC.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：血圧 電解質 バーター症候群 ギッテルマン症候群 カルシニューリン阻害剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高血圧は食習慣と密接な関わりがあり、食塩摂取が多いほど血圧上昇のリスクが高い。さらに近年では、カリウム(K)摂取が多いことほど血圧が低く、心血管疾患や死亡リスクが低いという報告が複数なされており K 摂取の重要性に関するエビデンスが蓄積されている。

一方、高 K 血症は致死的不整脈の原因となるため、適切な K のコントロールとその詳細な分子メカニズムの解明が必要と考えられる。これまでの研究で、K による血圧低下作用の分子メカニズムにおいて、ナトリウム(Na)-クロライド(Cl)共輸送体 (NCC)が重要な役割を担うことがわかっている。

NCC の活性化の制御因子として、遺伝性に高血圧を呈する偽性低アルドステロン 2 型の原因遺伝子として知られている WNK4-SPAK-NCC 経路による NCC のリン酸化(活性化)と、本申請者が明らかとしたカルシニューリンによる NCC の脱リン酸化(不活化)が知られている。

しかしながら、その詳細な分子メカニズムはまだ不明なところも多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、K による NCC の制御機構を明らかとすることを目的とする。実験仮説として、高 K 刺激による細胞内カルシウム (Ca) 濃度上昇がカルシニューリンを活性化すると考えており、これに関わる Ca 輸送体を明らかとすることを目的とする。

一方で、K の摂取が少ない時には WNK4-SPAK-NCC が活性化し血圧が上昇することが知られている。低 K 時の NCC の活性化のメカニズムとして、細胞外 K 濃度の低下により生じた細胞膜電位を駆動力として Cl が細胞外に流出し、細胞内 Cl 濃度が低下する。細胞内 Cl の低下が WNK4 を活性化して最終的に NCC が活性化されるという制御機構が提唱されているが、この時の Cl の輸送に関わる輸送体はまだ明らかではなく、Cl 輸送体の関わりを明らかとすることを目的とする。

ギッテルマン 症候群の原因となる多くの NCC 変異でリン酸化の低下など NCC の機能異常が報告されており、NCC のリン酸化を亢進することができれば、ギッテルマン 症候群の症状を緩和することができると期待される。本研究により NCC の活性化・不活性化の制御因子が明らかとなれば、ギッテルマン 症候群の新規治療薬につながることも期待できる。

### 3. 研究の方法

高 K による NCC の脱リン酸化について、Flip-In システムを用いた薬剤誘導性 NCC 発現細胞株を使用し、高 K によって NCC が脱リン酸化される実験系を確立する。Flo-4 Ca<sup>2+</sup>蛍光プローブと live cell imaging を用いて、細胞内 Ca 濃度の変化を測定する。これらの実験系を用いて、特異的阻害剤や siRNA ノックダウン法などで高 K による NCC の脱リン酸化に関わる Ca 輸送体を同定する。同定された Ca 輸送体について、動物実験で実際にカリウム調節に関わっているかを確認する。

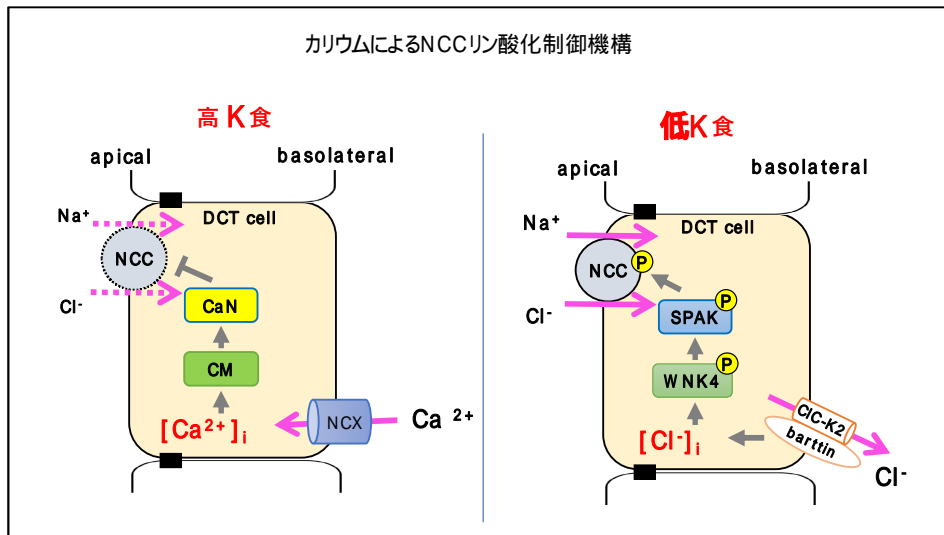
低 K による NCC 制御機構に関わる Cl 輸送体を明らかとするために、候補となる Cl 輸送体である CIC-K クロライドチャネルの低発現マウスを用いて、K と WNK4-SPAK-NCC 経路の活性化を評価する。

カルシニューリン阻害剤であるタクロリムスによって NCC や NKCC2 を活性化することが、パーター症候群の症状を改善することができるか、パーター症候群モデルマウスを用いて検証する。

### 4. 研究成果

(1)高 K 時のカルシニューリンの活性化について、K による細胞内 Ca 輸送機構の解明。まずは、培養細胞を用いた実験で、高 K によって細胞内 Ca 濃度が上昇すること、Ca は細胞外から流入してくること、細胞外 Ca を取り除くと高 K による NCC の脱リン酸化が起こらないことを確認した。次に、細胞外 Ca が細胞内へ入ってくる経路として想定される Ca 輸送体の特異的阻害剤を用いて、ターゲットとなる Ca 輸送体の特定を行った。ナトリウム-カルシウム交換輸送体 (NCX)の特異的阻害剤である SEA0400 と siRNA による NCX1 の抑制によって、高 K 時の細胞内 Ca 濃度の上昇および NCC の脱リン酸化が阻害されることが明らかとなった。さらに、マウスを用いた実験によって、K 負荷による NCC の脱リン酸化及び、尿中 K 排泄の上昇が NCX の阻害により抑制されることを確認した。以上より、高 K による尿中 K 排泄の増加は、NCX を介した細胞内カルシウムの増加-カルシニューリンの活性化-NCC の脱リン酸化という機序によって起こることを明らかとした。この成果は論文投稿中である。

(2) 低 K 時の WNK4 の活性化について、Cl チャネルがどのように関わるかを CIC-K チャネルの低発現マウスを用いた検討。CIC-K チャネルのサブユニットである barttin の hypomorphic マウス (*Bsnd<sup>neo/neo</sup>*)を用いた実験を行った。低 K 食摂取時に NCC は活性化されるが、この機序として、細胞内 Cl 濃度の低下による WNK キナーゼの活性化、さらに WNK4-SPAK-NCC 経路の活性化が知られている。*Bsnd<sup>neo/neo</sup>* マウスでは低 K 時の SPAK 及び NCC のリン酸化亢進に乏しく、低カリウム時の WNK キナーゼの活性化に CIC-K チャネルが関わっていることを明らかとした。(Biosci Rep. 2018 Jan 30;38(1). pii: BSR20171243)



(3) タクロリムスによるバーター症候群の症状改善効果の検証。これまでの研究の成果からカルシニューリンを阻害することで、NCCの脱リン酸が抑制されることが明らかとなり、また、他のグループからもカルシニューリン阻害剤がNCCやNKCC2のリン酸化を増やすことが報告されている。このことから、カルシニューリン阻害剤であるタクロリムスが、ギッテルマン症候群やバーター症候群の症状改善に寄与するか検討を行った。IV型バーター症候群のモデルマウスである *Bsnd<sup>neo/neo</sup>* マウスにタクロリムスの投与を行ったところ、コントロール群と比較し有意にNCCおよびNKCC2のリン酸化の亢進が認められた。また、低K血症の是正、尿中K排泄の低下などの効果が認められ、以上よりカルシニューリン阻害剤が、バーター症候群やギッテルマン症候群の治療に有効である可能性が示唆された。Biochem Biophys Res Commun. 2019 Sep 17;517(2):364-368

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kikuchi Hiroaki, Sasaki Emi, Nomura Naohiro, Mori Takayasu, Minamishima Yoji Andrew, Yoshizaki Yuki, Takahashi Naohiro, Furusho Taisuke, Arai Yohei, Mandai Shintaro, Yamashita Takahiro, Ando Fumiaki, Maejima Yasuhiro, Isobe Kiyoshi, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 95
2. 論文標題 Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 123 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2018.08.030	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 Hashimoto Hiroko, Nomura Naohiro, Shoda Wakana, Isobe Kiyoshi, Kikuchi Hiroaki, Yamamoto Kouhei, Fujimaru Takuya, Ando Fumiaki, Mori Takayasu, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 85
2. 論文標題 Metformin increases urinary sodium excretion by reducing phosphorylation of the sodium-chloride cotransporter	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 23 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2018.02.009	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 Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Nomura Naohiro, Furusho Taisuke, Arai Yohei, Kikuchi Hiroaki, Sasaki Emi, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 8
2. 論文標題 WNK1 regulates skeletal muscle cell hypertrophy by modulating the nuclear localization and transcriptional activity of FOXO4	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27414-0	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 Wang Tse-En J., Liu Hung-Ting, Lai Yu-Hua, Jan Tong-Rong, Nomura Naohiro, Chang Hui-Wen, Chou Chi-Chung, Lee Ya-Jane, Tsai Pei-Shiue J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Honokiol, a Polyphenol Natural Compound, Attenuates Cisplatin-Induced Acute Cytotoxicity in Renal Epithelial Cells Through Cellular Oxidative Stress and Cytoskeleton Modulations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2018.00357	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 該当する

1. 著者名 Ando Fumiaki, Mori Shuichi, Yui Naofumi, Morimoto Tetsuji, Nomura Naohiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Sasaki Sei, Kondo Yoshiaki, Kagechika Hiroyuki, Uchida Shinichi	4. 巻 9
2. 論文標題 AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03771-2	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 Nomura Naohiro, Shoda Wakana, Wang Yuanlong, Mandai Shintaro, Furusho Taisuke, Takahashi Daiei, Zeniya Moko, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 38
2. 論文標題 Role of ClC-K and barttin in low potassium-induced sodium chloride cotransporter activation and hypertension in mouse kidney	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 BSR20171243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BSR20171243	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 Matsuura Yoshiaki, Nomura Naohiro, Shoda Wakana, Mori Takayasu, Isobe Kiyoshi, Susa Koichiro, Ando Fumiaki, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 517
2. 論文標題 Tacrolimus ameliorates the phenotypes of type 4 Bartter syndrome model mice through activation of sodium?potassium?2 chloride cotransporter and sodium?chloride cotransporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 364 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.086	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 Nomura Naohiro, Shoda Wakana, Uchida Shinichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Clinical importance of potassium intake and molecular mechanism of potassium regulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1175 ~ 1180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-019-01766-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 Furusho Taisuke, Sohara Eisei, Mandai Shintaro, Kikuchi Hiroaki, Takahashi Naohiro, Fujimaru Takuya, Hashimoto Hiroko, Arai Yohei, Ando Fumiaki, Zeniya Moko, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Isobe Kiyoshi, Nomura Naohiro, Yamamoto Kohei, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 97
2. 論文標題 Renal TNF activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 713 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.11.021	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野村 尚弘
2. 発表標題 水・電解質輸送体の制御機構解明と新規治療薬の開発
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 正田若菜, 野村尚弘, 安藤史顕, 田頭秀章, 岩本隆宏, 太田哲人, 磯部清志, 森崇寧, 須佐紘一郎, 蘇原映誠, 頼建光, 内田信一
2. 発表標題 NCX1 を介した NCC の脱リン酸化と尿中カリウム排泄機構の解明
3. 学会等名 第 62 回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古庄泰佑, 蘇原映誠, 萬代新太郎, 菊池寛昭, 高橋直宏, 藤丸拓也, 橋本博子, 新井洋平, 安藤史顕, 銭谷慕子, 森崇寧, 須佐紘一郎, 磯部清志, 野村尚弘, 岡戸丈和, 頼建光, 内田信一
2. 発表標題 TNF は腎臓でのWNK1 分解を抑制し慢性腎臓病の塩分感受性を亢進させる
3. 学会等名 第 10 回分子腎臓フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松浦喜明, 野村尚弘, 正田若菜, 蘇原映誠, 頼建光, 内田信一
2. 発表標題 タクロリムスは NCC のリン酸化を亢進し 4 型 Bartter 症候群の症状を改善する.
3. 学会等名 第 62 回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----