

令和 2 年 5 月 29 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：2018～2019

課題番号：18H06194・19K21299

研究課題名(和文)骨格筋WNKキナーゼによる筋肥大制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of WNK kinase signaling in skeletal muscle hypertrophy

研究代表者

萬代 新太郎 (Mandai, Shintaro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50824330

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)：WNK (with no lysine)キナーゼは遺伝性高血圧疾患の原因遺伝子であり、尿細管上皮細胞、血管平滑筋に発現し生理的に血圧を制御する事が知られる。本研究で我々は WNKアイソフォーム1-4の中WNK1のみがマウス骨格筋ないし骨格筋細胞株C2C12に発現しており、各々長期運動、分化誘導刺激によって発現量が増加すること、WNK1が長寿遺伝子としても知られる転写因子forkhead box O (FOXO) 4のリン酸化、筋萎縮関連遺伝子群の転写活性を調節することで筋肥大を正に制御する事を示した。WNK1-FOXO4シグナルという骨格筋肥大を制御する新たな分子シグナルが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニア(加齢、慢性疾患による骨格筋量・筋力の低下)の病態解明は未だに不十分であり、運動療法、食事療法以外の治療戦略の開発が医療経済的観点からも喫緊の課題である。本研究は、慢性腎臓病・サルコペニアモデルマウスの骨格筋におけるWNK1タンパク発現量の低下、筋萎縮関連遺伝子群の転写亢進をも見出し、WNK1-FOXO4シグナルがヒトのサルコペニアの発症機序の一端を担う可能性を示した。本邦でも高齢者の約5人に1人、重症の慢性腎臓病患者においては約2人に1人がサルコペニアを合併することが知られる。今後の研究でWNK1-FOXO4シグナルをターゲットとした新たな治療戦略を創出するを目指したい。

研究成果の概要(英文)：With-no-lysine (K) (WNK) kinases, which are mutated in the inherited form of hypertension pseudohypoaldosteronism type II, are essential regulators of membrane ion transporters. Here, we revealed that WNK1 positively regulates skeletal muscle hypertrophy via modulating the function of the pro-longevity transcription factor forkhead box protein O4 (FOXO4). In C2C12 mouse skeletal muscle cells, small interfering RNA (siRNA)-mediated silencing of WNK1 or a WNK kinase inhibitor WNK463 induced myotube atrophy and remarkable increases in the mRNA expression of the muscle atrophy ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1, by decreasing phosphorylation and increasing nuclear localization of FOXO4. We further showed that WNK1 protein abundance in skeletal muscle was increased by chronic exercise (hypertrophic stimulus) and decreased by adenine-induced chronic kidney disease (atrophic stimulus) in mice. The WNK1-FOXO4 axis may be a potential therapeutic target in human diseases causing sarcopenia.

研究分野：分子細胞生物学、腎臓病学、内科学

キーワード：骨格筋 WNKキナーゼ シグナル伝達 慢性腎臓病 サルコペニア WNK 腎臓 リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的に未踏の超高齢化社会を迎え、サルコペニア(加齢や慢性疾患による骨格筋量・筋力の低下)への注目が高まっている。その予防対策は医療経済的観点からも重要な課題であるが、未だ病態解明が不十分であり、現状運動や食事療法の他に有効な治療法が確立していない。

セリン/スレオニンキナーゼである WNK (with-no-lysine) は遺伝性高血圧疾患の偽性低アルドステロン症 II 型の原因遺伝子として同定され、尿細管上皮細胞、血管平滑筋に発現し血圧・体液量を制御する key moleculeとして従来知られていた(図1左)。WNK は一方で、免疫細胞の機能やオートファジーを制御するなど、生体の恒常性維持のために多様な重要な役割を果たす分子として注目されている。

申請者は最近、WNK シグナル下流の重要なエフェクター分子である SLC12a 輸送体 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ 共輸送体 1 (NKCC1) が骨格筋形成を正に制御しており、その阻害薬であるループ利尿薬が運動性の骨格筋肥大を抑制しサルコペニアの発症に関わることを示唆するデータを示した(図1右)(Mandai et al. *Sci Rep* 2017)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋肥大における WNK キナーゼの生理機能の解明である。さらに、骨格筋 WNK シグナルに影響を与える生理的、病的刺激とその調節機構を明らかにすることである。これらの解明が、サルコペニアの病態解明と新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

- (1) マウス骨格筋培養細胞株 C2C12 を用い、WNK の筋管細胞肥大への作用を検証する。
- (2) さらに WNK が筋管細胞肥大をどのような分子シグナルによって制御するか明らかにする。
- (3) 遺伝子改変動物や WNK 活性阻害薬を用い、マウス生体における骨格筋 WNK シグナルの生理機能を解析する。
- (4) 野生型マウスを用いて骨格筋 WNK シグナルの生理修飾因子、病的刺激を検証する。

4. 研究成果

(1) WNK1 キナーゼによる骨格筋細胞肥大の制御

まずはマウス骨格筋細胞および筋組織を用いた RT-PCR、ウェスタンブロッティングによって、哺乳類が保持する WNK1 ~ 4 の isoform のうち、両者に発現するのは WNK1 のみであり、WNK1 が骨格筋 WNK の major isoform であることを示した。また、C2C12 細胞から筋管細胞への分化誘導刺激によって、WNK1 タンパク発現量が経時的に増加することを示した。

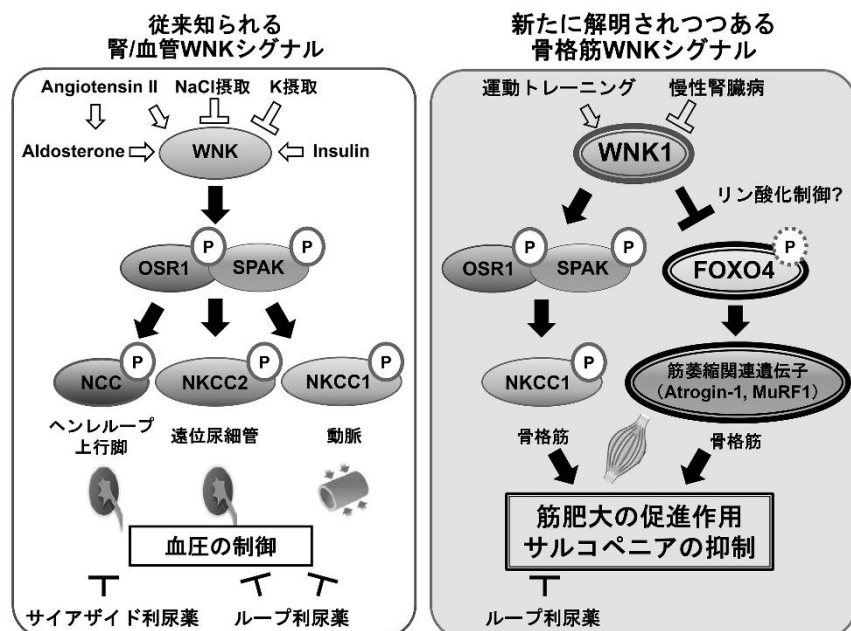
次に siRNA による WNK1 ノックダウンないし WNK のキナーゼ活性阻害剤 WNK463 の投与を行うと、筋管細胞の顕著な萎縮ならびに筋萎縮関連遺伝子 (atrogene) atrogen-1, MuRF1 の転写亢進を認めたと(図2)。

(2) WNK1 キナーゼによる Forkhead box protein O アイソフォーム 4 (FOXO4) の機能調節を介した atrogene の転写制御

C2C12 細胞において WNK1 ノックダウンを行い、atrogene の主たる転写因子群の核内、細胞質発現量を評価した。すると Smad2/3 や FOXO1/3a には変化が見られない一方で、FOXO4 の核内発現量が選択的に増加した。siFOXO4 を同時に行うと筋管細胞萎縮と atrogene 転写増加が完全にキャンセルされた。

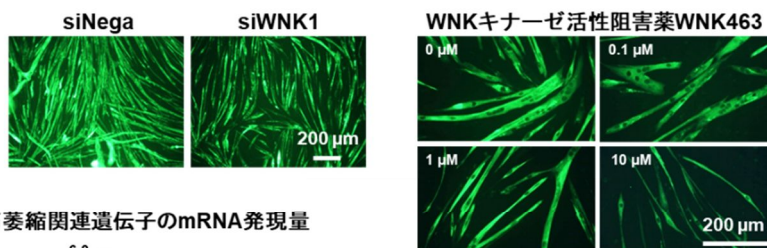
FOXO4 は主にリン酸化による核外移行、不活化によって atrogene 転写活性を調節されている。WNK1 ノックダウンを行った C2C12 細胞において、Akt キナーゼによる既知の FOXO4 リン酸化サイトには変化がなかった一方で、phos-tag SDS-PAGE による検証では全長 FOXO4・特定の領域のフラグメントでリン酸化が减弱した。免疫沈降法で WNK1 と FOXO4 タンパクの直接結合は確認されず、二者の

(図1) WNK1は骨格筋肥大・形成を制御する新たなシグナル分子である可能性



キナーゼアッセイではリン酸化反応が確認されなかった。今後アダプタータンパクふくめた介在分子、そして関与するリン酸化部位の同定を進める必要がある。

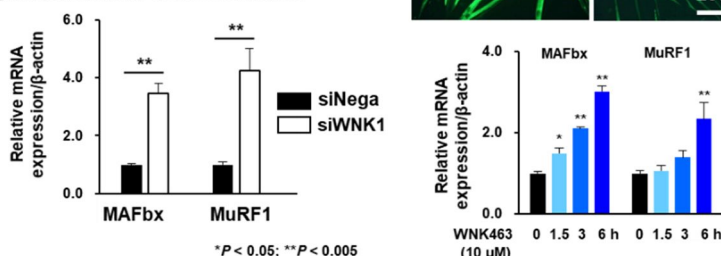
(図2) WNK1の抑制は筋萎縮関連遺伝子の発現を介し筋萎縮を誘導する
抗ミオシン重鎖抗体によるC2C12筋管細胞の免疫染色



(3) WNK1 ノックアウトマウスまたは WNK 阻害薬を用いた WNK1 の骨格筋肥大における生理機能の解析

骨格筋 WNK シグナルの生体での機能を検証するため、まず WNK1 ヘテロノックアウトマウスの骨格筋量、筋線維サイズを解析した結果、野生型と比較し有意な差は認めなかった。Akt キナーゼによる代償機構等の影響が考えられ、臓器・時期特異的な改変操作を要するものと思われた。

筋萎縮関連遺伝子のmRNA発現量



このため野生型マウスに WNK キナーゼ活性阻害剤 WNK463 を経口投与した。従来知られる WNK の基質 SPAK キナーゼ (図1左) のリン酸化は腎臓組織において低下しており薬効が確認された中、骨格筋において時間・用量依存的に atrogen-1, MuRF1 転写が顕著に誘導された (図3右)。

(4) C57BL/6 マウスを用いた骨格筋 WNK シグナルに影響する生理修飾因子、疾患ストレスの検証

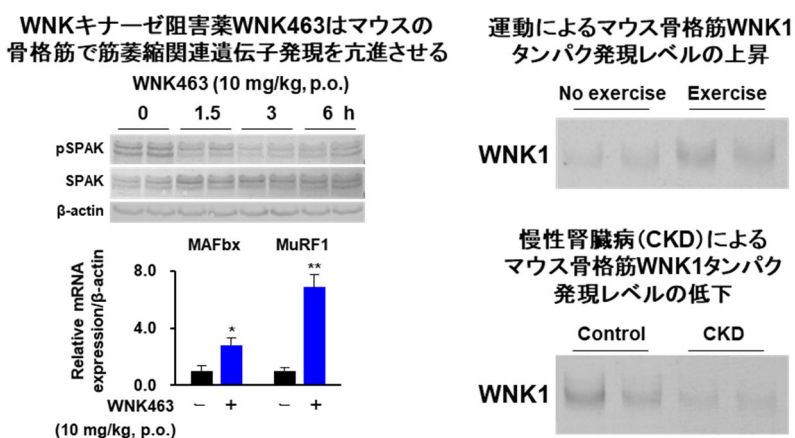
WNK シグナルは、食事の塩分やカリウム, angiotensin II, インスリンなどの多彩な刺激に応じて腎尿細管での塩分排出及び血管トーン調整を行う、生体に重要な血圧制御シグナルであることを当研究室から報告してきた (図1左) (Cell Metab 2007, Cell Rep 2013 など)。

まず生理的な筋肥大刺激である長期運動負荷を検証したところ、回し車による 6 週間の長期運動トレーニングによって WNK1 タンパク発現量が増加することを見出した (図3右)。また、筋萎縮刺激であるアデニン経口摂取による慢性腎臓病モデルマウスを作成すると、骨格筋 WNK1 タンパク発現量の低下および atrogen mRNA 発現量増加を認めた (図3右)。活動量すなわち筋収縮が直接的な刺激となっていないか、除神経、後肢懸垂モデルなど他のマウス筋萎縮モデルにおける骨格筋 WNK シグナルの変容をさらに検証する必要がある。高塩食や絶食刺激によっては骨格筋 WNK1 タンパク発現量に変化を認めなかった。

以上から、WNK1 は FOXO4 のリン酸化・細胞内局在の制御を介して atrogen の発現量ならびに筋量を制御していること、すなわち WNK1-FOXO4-atrogen という骨格筋肥大を生理的に制御する新たな分子シグナルが明らかとなった。

この様に、研究当初の目的・方法に沿って着実に研究成果を報告することが出来たと考えられる。本研究では慢性腎臓病・サルコペニアモデルマウスの骨格筋における WNK1 タンパク発現量の低下、atrogen 転写亢進も見出し、WNK1-FOXO4 シグナルがヒトのサルコペニアの発症機序の一端を担う可能性を示した。本邦でも高齢者の約 5 人に 1 人、重症の慢性腎臓病患者においては約 2 人に 1 人がサルコペニアを合併することが知られる。今後の研究で WNK1-FOXO4 シグナルをターゲットとした新たな治療戦略を創出することを目指したい。

(図3) WNK1は生体における骨格筋肥大/萎縮に関与する



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Nomura Naohiro, Furusho Taisuke, Arai Yohei, Kikuchi Hiroaki, Sasaki Emi, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi
2. 発表標題 Wnk1 Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy by Modulating Phosphorylation, Nuclear Localization, and Transcriptional Activity of FoxO4
3. 学会等名 The 51th Annual Meeting of the American Society of Nephrology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萬代 新太郎, 森 崇寧, 野村 尚弘, 古莊 泰佑, 新井 洋平, 菊池 寛昭, 佐々木 絵美, 蘇原 映誠, 頼 建光, 内田 信一
2. 発表標題 Wnk1キナーゼはFOXO4の細胞核内局在、転写活性を調節し、骨格筋肥大を制御する
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----