

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790836

研究課題名(和文) インスリンと塩分感受性高血圧をつなぐWNKキナーゼ

研究課題名(英文) WNK kinase links insulin with salt-sensitive hypertension

研究代表者

蘇原 映誠 (SOHARA, EISEI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90510355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームdb/dbマウスにおけるWNK-OSR1/SPAK-NCCカスケードの研究においては、高インスリン血症がWNKシグナルを亢進してしまうために、下流のNCCによる塩分再吸収が塩分過多の状態でも抑制されないことで、塩分摂取に反応して血圧が上昇してしまう塩分感受性高血圧を呈することを証明した。また、最近明らかになった、PHAIIの新たな原因遺伝子KLHL3とCull3が複合体を形成し、WNKキナーゼのE3ユビキチンリガーゼとして機能する事を我々は示した。腎臓内でのWNK分解障害によるWNKキナーゼ蛋白増加がWNKシグナルの過剰亢進を起こしてPHAIIとなることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found renal WNK-OSR1/SPAK-NCC cascade activation in the db/db mouse model of hyperinsulinemic metabolic syndrome. In SPAK/OSR1 knock-in db/db mice, increased phosphorylation of NCC and elevated blood pressure were completely corrected, indicating that phosphorylation of SPAK and OSR1 by WNK kinases is required for the increased activation and phosphorylation of NCC. Moreover, we found that increased NCC phosphorylation is regulated by the PI3K/Akt signaling cascade in the kidney in response to hyperinsulinemia. This mechanism may play a role in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension in human hyperinsulinemic conditions such as the metabolic syndrome. We also found that increased protein expression levels of WNK1 and WNK4 kinases cause PHAII by KLHL3 mutation, due to impaired KLHL3-Cullin3 mediated ubiquitination.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：インスリン メタボリック症候群 塩分感受性高血圧 WNKキナーゼ サイアザイド 水・電解質代謝学

1. 研究開始当初の背景

従来、腎臓領域における遺伝性高血圧疾患は腎臓尿細管の Na チャネルやトランスポーター蛋白自身の変異により Na の再吸収が異常に増加するというメカニズムで報告されてきていたが、2001年に遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型(以下 PHAII)患者には WNK キナーゼに変異があることが linkage analysis によって報告された (Science 2001)。この事実は、トランスポーター蛋白単独の異常ではなく、WNK キナーゼを介して血圧をコントロールするネットワークが腎臓に存在することを示唆するという点で非常に興味深く、申請者 蘇原映誠の所属する東京医科歯科大学腎臓内科では近年 WNK キナーゼについての研究が盛んに行われてきており、2007年には PHAII モデルマウスを作成し解析を行った (Cell Metab. 2007)。結果、Na-Cl 共輸送体 (以下 NCC) が WNK4 の基質として同定されていた OSR1/SPAK というキナーゼとともに PHAII 病態モデルマウスでは過度にリン酸化され、リン酸化された NCC は細胞膜上に集積し、NaCl を過度に再吸収し高血圧症を引き起こしていることが明らかになった。さらに最近、OSR1, SPAK の kinase dead knock-in mouse を用いて、WNK4-OSR1/SPAK-NCC というリン酸化カスケードが腎臓での新たな体液調節系として重要な役割を持っていることを当研究室は明らかにした (Hum Mol Genet. 2009, J Cell Sci. 2011)。すなわち、PHAII は WNK4 の過剰な機能亢進により WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが亢進するために、塩分再吸収が過度に起きて発症することを当研究室は明らかにした。

2. 研究の目的

申請者蘇原はインスリン急性負荷が遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型の原因となる WNK4 を介して、腎臓で塩分再吸収を担う Na-Cl 共輸送体のリン酸化を亢進する事を報告した。本研究では、肥満などの高インスリン血症での塩分感受性高血圧において、腎臓と血管平滑筋細胞で血圧を制御する WNK-OSR1/SPAK-NCC/ NKCC1 リン酸化カスケードに対するインスリン制御の重要性を、in vitro (Akt と WNK4 リン酸化の解析) と in vivo (各種遺伝子改変マウスでの検討とヒト尿中の Na-Cl 共輸送体解析) の実験によって証明し、高インスリン血症における塩分感受性高血圧の病態解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究はメタボリックシンドロームや肥満など高インスリン状態における塩分感受性高血圧のメカニズムを腎臓と血管平滑筋に存在する WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1 カスケードの観点から探求するものである。全体としては、以下の3つに大きく分けられる。

(1) インスリンによる WNK4-SPAK/OSR1-NCC

リン酸化カスケード制御の蛋白レベルでの研究:

我々は WNK4 の 1190 Serine (1190S) リン酸化の過剰亢進が、PHAII の発症メカニズムとなり、さらに同部位のリン酸化がインスリンによって亢進することを確認しているが、インスリンから WNK リン酸化亢進に至るまでの詳細なメカニズムは不明である。Insulin によって WNK4 1190S をリン酸化できるキナーゼ候補としては motif 検索によれば SGK1, Akt, S6K などがあり、平成 24 年度は Insulin と WNK4 をつなぐこのシグナル伝達を各々の kinase に特異的な阻害薬実験で検証する。平成 25 年度は有望な kinase の阻害薬を高インスリンモデルマウスに使用し、その kinase による NCC リン酸化制御を生体内で明らかにし、新しい治療ターゲットとして検討する。(2) 遺伝子改変マウスを用いた Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードの研究: 慢性的な高インスリン血症モデルマウスでも同様に WNK4-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが亢進しているかを検討するために、肥満/糖尿病モデルであり高インスリン血症を示す db/db マウスにおける WNK4-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードを検証する。さらに、OSR1/SPAK kinase dead ノックインマウスに db/db マウスを交配して、db と WNK4 または OSR1/SPAK のダブル遺伝子改変マウスを作成し、db/db マウスで WNK4 または OSR1/SPAK が失活すると下流の NCC リン酸化が起きなくなることを証明して、慢性の高インスリン血症モデルでも WNK4-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが関与していることを証明する。

(3) メタボリックシンドローム/肥満患者における尿中 NCC の研究: メタボリックシンドロームや肥満の患者でも Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードの過剰な亢進によって塩分感受性高血圧が起きることを示したい。患者の腎臓を検討するのは困難なので、WNK カスケードの最終段階であるリン酸化 NCC を検出する方法を検討する。リン酸化 NCC は尿細管上皮側に集積して尿中に排泄されることが予想されるので、尿中 NCC の検出量と尿中リン酸化 NCC を患者と健常人または本態性高血圧患者の間で比較することにより、NCC のリン酸化が高インスリン状態で亢進していることを示したい。

4. 研究成果

メタボリックシンドローム db/db マウスにおける WNK-OSR1/SPAK-NCC カスケードの研究
db/db マウスは高インスリン血症を呈するメタボリックシンドロームのモデルと考えられている。肥満やメタボリックシンドロームにおいてはインスリン抵抗性のために高インスリン血症を呈することが知られており、インスリンは腎臓尿細管での塩分再吸収を亢進することが報告されていた。我々はインスリンの急性負荷により OSR1/SPAK-NCC のリ

ン酸化が亢進することを発見したが、これらがメタボリックシンドロームのような慢性的な高インスリン状態においても認めるかを高インスリン血症モデルである db/db マウス腎臓を用いて検討した。

db/db マウスはコントロールと比較して、高血圧を呈するとともに、NCC 阻害薬であるサイアザイド負荷で db/db マウスの Na 排泄は亢進し、これは NCC の機能亢進を示唆した。事実、db/db マウス腎臓では OSR1/SPAK と NCC のリン酸化が亢進していた。db/db マウスは高塩食でコントロールマウスと比較してアルドステロン低値を示しており、通常、低アルドステロン状態において NCC リン酸化は抑制されることが知られているにも関わらず、db/db マウス腎臓では逆に OSR1/SPAK と NCC リン酸化が亢進していた。db/db マウスの NCC リン酸化亢進にはインスリンが寄与していると推定され、PI3K 阻害剤である NVP-BEZ235 の投与により NCC のリン酸化が抑制されたことから、インスリン/PI3K シグナルの下流にあると考えられた。また、高塩食とは逆に高アルドステロン状態となる低塩食においても、NCC のリン酸化がアルドステロンによってすでに亢進しているコントロールと比較して、db/db マウスは OSR1/SPAK-NCC リン酸化のさらなる亢進を認め、インスリンによる制御機構はアルドステロンと一部独立していると考えられた。さらに、このメカニズムが WNK-OSR1/SPAK のカスケードに依存しているかを検討するために、我々は WNK によるリン酸化を受けない OSR1 T185A/+、SPAK T243A/+ ノックインマウスを db/db マウスと交配した。結果、OSR1 と SPAK 各々が WNK によってリン酸化されなくなった事で、SPAK/OSR1 の不活性化ノックイン db/db マウス腎臓での NCC リン酸化は抑制された。実際、コントロールと比較し db/db マウスで認めた高血圧は OSR1 及び SPAK の不活性化により消失した。結果として、db/db マウス腎臓における NCC リン酸化亢進は WNK による OSR1/SPAK のリン酸化を介しており、その亢進にインスリン/PI3K シグナルの亢進が寄与していると考えられた。これらは肥満やメタボリックシンドローム等に見られる塩分感受性高血圧の機序の一因となっている可能性があり、今後の生活習慣病における高血圧治療に対する新しい治療方針を示すものとする。

また尿中 NCC を定量する ELISA の系を立ち上げた。臨床研究が継続中である。

新規 PHAII 原因遺伝子 KLHL3/Cul3 による WNK シグナル制御の研究

最近、PHAII の新たな原因遺伝子として Kelch-like 3 (KLHL3) と Cullin3 (Cul3) が明らかになり、KLHL3 が Cul3 と複合体を形成し、WNK4 の E3 ユビキチンリガーゼとして機能する事を我々は示した (*Cell Reports* 2013)。細胞の強制発現系で、KLHL3 と Cul3 の発現は WNK4 ユビキチン化の増強による

WNK4 蛋白質量の減少をもたらし、PHAII を引き起こす変異 WNK4/KLHL3/Cul3 はこれらを阻害して細胞内 WNK4 量を増加させることを示し、腎臓内での WNK4 分解障害による WNK4 蛋白増加が下流の WNK-OSR1/SPAK-NaCl 共輸送体 (NCC) シグナル系の過剰亢進を起こし、PHAII における高血圧の原因となること、すなわち、WNK4 のユビキチン化障害そしてその結果としての WNK4 分解障害が PHAII 発症の共通の病態であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

すべて査読あり

[雑誌論文](計 19 件)

1. Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Nomura N, Nishida H, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeishi K, Takeda N, Sasaki S, Uchida S. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet.* 2014 (in press) doi: 10.1093/hmg/ddu217
2. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Chiga M, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in an AQP11 Knockout Model. *J Am Soc Nephrol.* 2014 (in press) doi: 10.1681/ASN.2013060614
3. Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4 is the major WNK kinase positively regulating NCC in the mouse kidney. *Biosci Rep.* 2014 (in press) doi:10.1042/BSR20140047
4. Uchida S, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins. *Biol Cell.* 2014; 106(2): 45-56. doi: 10.1111/boc.201300069
5. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. *Hypertension.* 2013; 62(5): 872-878. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01543
6. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep.* 2013; 3(3): 858-68. doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.024

7. Isoke K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement. *Am J Physiol Renal Physiol* **2013**; 305(9): F1374-81, doi: 10.1152/ajprenal.00208.2013
8. Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem J*. **2013**; 455: 339-45. doi: 10.1042/BJ20130597.
9. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Decrease of WNK4 ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**; 439: 30-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.035.
10. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**; 437(3): 457-62. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.06.104
11. Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S. Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. *J Dermatol Sci* **2013**; 70(1): 26-33. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.01.013
12. Nomura N, Kamiya K, Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type IV caused by mutated *Bsnd* in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**; 441: 544-49. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.129
13. Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Beta2-adrenergic receptor, WNK4 and Na-Cl co-transporter signal cascade: Does it exist in the in vivo kidney? *Nat Med*. **2012**; 18(9): 1324-5. doi: 10.1038/nm.2809
14. Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, Rai T, Sasaki S, Uchida S. PI3K/Akt Signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension*. **2012**; 60(4): 981-90. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.201509
15. Hossain-Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isoke K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*. **2012**; 425(2): 456-61. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.124
16. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S. A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo. *Biol Open*. **2012**; 1: 120-127. doi: 10.1242/bio.2011048.
17. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. Effect of heterozygous deletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/ NKCC1 /NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. *Clin Exp Nephrol*. **2012**; 16(4): 530-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.130
18. Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Inoue S, Miyachi Y. Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells. *FASEB J*. **2012**; 26(1):211-8. doi: 10.1096/fj.11-186627
19. Ohta E, Akazawa M, Noda Y, Mandai S, Naito S, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Severe hyperparathyroidism in a pre-dialysis chronic kidney disease patient treated with a very low protein diet. *J Bone Miner Metab*. **2012**; 30(2):238-42. doi: 10.1007/s00774-011-0320-6.

〔学会発表〕(計11件)

1. 蘇原映誠. WNK キナーゼによる血圧調節機構. 第42回新潟腎カンファレンス. 新潟. 2013年2月21日.

2. 蘇原映誠.

Investigation of Pathophysiology of Renal Sodium and Water Transport Disorders. 日本腎臓学会 平成25年度大島賞受賞講演. 東京. 2013年5月10日

3. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in AQP11-Knockout Mice: Renal Week 2013, American Society of Nephrology, Atlanta, 2013年11月7日

4. Susa K, Sohara E, Zeniya M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Low salt intake decreased transcription and protein level of KLHL3 in mouse kidney. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, 2013年11月8日

5. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida

- S. WNK3 Regulates Blood Pressure Through the Regulation of Vascular OSR1/SPAK-NKCC1 Phosphorylation Cascade. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, 2013年11月9日
6. Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Naito S, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. The 45th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, San Diego, California. 2012年11月2日
7. Zeniya M, Sohara E, Oi K, Chiga M, Susa K, Mori T, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake and angiotensin II regulates WNK-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, 2012年11月2日
8. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, 2012年11月2日
9. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Sasaki S, Shinichi U. Impaired trafficking of polycystin-1 may be a key mechanism of cyst formation in the aquaporin-11 knockout mouse. The 45st Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, 2012年11月2日
10. Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of urinary total and phosphorylated Na-Cl cotransporter (NCC) protein. The 45th Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego, 2012年11月2日
11. 蘇原映誠. WNK キナーゼによる塩分調節機構. 第34回腎臓セミナー 2012年8月25日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蘇原 映誠 (Sohara Eisei)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90510355