

令和 3 年 6 月 10 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：2019～2020

課題番号：19K23982

研究課題名(和文)高カリウムによるカルシニューリンを介したNCC制御機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of potassium-induced NCC regulation via Calcineurin

研究代表者

正田 若菜 (SHODA, WAKANA)

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：10846059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：高K摂取時のKバランスの調節にNa-Cl共輸送体(NCC)は重要な役割を果たす。これまでに、高K負荷時のNCCの制御にはカルシニューリン(CaN)が関与することを示してきたが、詳細な分子機構は不明であった。本研究は、Na/Ca共輸送体(NCX1)に注目し、細胞実験および動物実験により、NCX1を阻害すると、細胞内Caの増加が抑制され、K負荷後のNCC脱リン酸化が認められず、マウスにおいては尿中のK排泄が抑制され、高K血症を来すことを示した。本研究の結果から、高K時のCaNの活性およびNCC脱リン酸化には、NCX1を介したCaの流入が重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、血圧低下作用など、K摂取の有用性が報告されているが、一方で腎不全患者では適切なK排泄ができず、致死的な急性高K血症をきたすことがあるため、K摂取には注意を要する。また、免疫抑制剤としてタクロリムスなどのCaN阻害剤が多くの疾患で使用されるが、その有害事象である高K血症と高血圧がしばしば問題となっている。本研究において、KによるCaNを介したNCCの制御機構の詳細を明らかにしたことは、塩分感受性高血圧や高K血症の治療、またNCCの機能異常によって低K血症を呈するギッテルマン症候群などの治療法開発につながるため重要である。

研究成果の概要(英文)：The Na-Cl cotransporter (NCC) expressed in the distal convoluted tubule (DCT) is a key molecule regulating urinary Na and K excretion. We previously reported that high K load rapidly dephosphorylated NCC and promoted urinary K excretion in mouse kidneys. This effect was inhibited by calcineurin (CaN) inhibitors. However, the detailed mechanism through which high K signal results in CaN activation remains unknown. We focused on Na/Ca exchanger (NCX) 1, a bidirectional regulator of cytosolic Ca expressed in DCT. We identified that NCX1 suppression with a specific inhibitor (SEA0400) inhibited K induced increase in intracellular Ca concentration and NCC dephosphorylation in HEK293 cells. In a mouse study, SEA0400 treatment inhibited K induced NCC dephosphorylation. SEA0400 reduced urinary K excretion and induced hyperkalemia. We identified NCX1 as a key molecule in urinary K excretion promoted by CaN activation and NCC dephosphorylation in response to K load.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：Na-Cl共輸送体 Na/Ca共輸送体 カルシニューリン カリウム カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カリウム(K)摂取量が多いと、血圧が下がることや生命予後が良いことが知られている。このメカニズムにおいて、遠位尿細管に存在するナトリウム-クロライド共輸送体 (NCC) が、高K摂取時の血圧調整と尿中K排泄に重要な役割を果たすと考えられている。NCCは腎臓の遠位尿細管に存在し、Naの再吸収を行い、その下流に流入するNaを調整することでK排泄の制御を行っている。NCCは、低K時には、SPAKによりリン酸化(活性化)することが知られていたが、申請者は、高K時にカルシニューリン(CaN; protein phosphatase 2B)が活性化されて、NCCを脱リン酸化(不活性化)することで、K排泄が促進されるという新たなNCC制御の分子機構を報告していった(*Kidney Int.* 2017)。CaNは、カルシウム/カルモジュリン依存性のプロテインホスファターゼである。このため、高K時のNCC脱リン酸化に關与するCaNの活性化にはカルシウム(Ca)が不可欠であるが、Caがどのように輸送されてCaNを活性化しているのか、その詳細な分子機構は未だ不明である。KによるNCCの制御機構を明らかにすることは、塩分感受性高血圧や高K血症の治療、またNCCの機能異常によって低K血症を呈するギッテルマン症候群などの治療開発につながるため重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、KによるCaNを介したNCCの詳細な制御機構を明らかにすることである。申請者はこれまでの研究で、ナトリウム(Na)-クロライド(Cl)共輸送体(NCC)が、Kの排泄と血圧の調節に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。そこで、本研究では、高K時のNCC脱リン酸化に關与するCaNの活性化が、どのようなメカニズムで起こるのか、を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

細胞実験系: Flp-In NCC HEK293細胞を用いた。高K刺激時の細胞内のCaの変化は、Fluo-4を用いたlive cell-imagingで確認した。EGTAを用い、Caをキレートした時の細胞内のCaの変化を確認した。EGTAの投与による高K負荷後のpNCCの変化はWestern blottingで確認した。Caの細胞内への流入経路の検証は、NCX1阻害薬(SEA0400)によるNCX1阻害を行った。また、siRNAによるNCX1ノックダウンを行い、高K負荷時のNCC脱リン酸化の変化を評価した。Ex-vivo実験系: マウス腎臓の薄切組織を緩衝液の中でインキュベートし、EGTAやSEA0400に浸した後、高K溶液で刺激し、NCCの脱リン酸化の変化を確認した。動物実験系: C57BL/6マウスを用い、NCX1阻害薬であるSEA0400を腹腔内投与し、NCX1阻害時のNCC脱リン酸化の変化と尿中Na、K、Cl、Ca排泄量を評価した。またK投与後120分に採血を行った。さらにNCX1ヘテロノックアウトマウス(NCX1^{+/-}KO)を用い、高K負荷時のNCC脱リン酸化の変化と尿中電解質排泄量を評価した。

4. 研究成果

(1)細胞外からのCaの流入がK負荷時のNCCの脱リン酸化に不可欠である

高K時のNCC脱リン酸化にCaNが重要な役割を果たし、CaNの活性化には、細胞内のCa濃度の上昇が不可欠であることが示されている。申請者は、高K時のNCC脱リン酸化にCaNの活性化が重要であることを明確にするため、CaNの活性化に必要なCaNBの変異体をHEK293細胞にトランスフェクションし、高K時のNCCの変化を確認した。CaNBに変異をもつHEK293細胞(CaNが活性化しない)は、高KによるNCCの脱リン酸化を示さず(図1)、高K時のNCC脱リン酸化にはCaNの活性化が重要なことを確認した。続いて、高K刺激時に、CaNの活性化に必要な細胞内のCaが上昇するかを確認した。Fluo-4を用いたlive cell imagingでは、通常、高K刺激をすると細胞内のCaの濃度が上昇するが、EGTAで細胞外Caをキレートすると、細胞内のCaの増加が認められないことが示された(図2)。また、Western blottingにおいても、EGTAの投与により、高K負荷後のpNCCの抑制が阻害されていることを確認した(図3A)。Ex-vivo実験系においても、EGTAを添加した溶液内で予めインキュベートして細胞外Caをキレートしたマウスの腎切片を、高濃度K溶液(10mM)内でインキュベートすると、EGTAでCaがキレートされた腎切片では、K負荷時のNCC脱リン酸化が起こらないことが示された(図3B)。これらの結果から、高K負荷後のNCCの脱リン酸化には、細胞外からのCaの流入が重要であるということが示された。

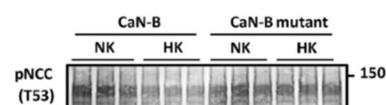


図1. CaNB変異体における高K時のNCCの変化

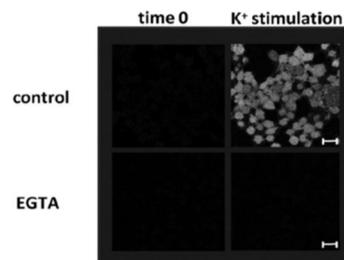


図2. K刺激時の細胞内Caの変化

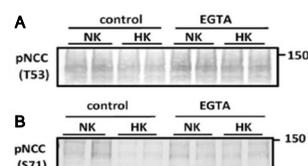


図3. EGTAによる高K刺激時のNCCの変化

2) 高 K 時の細胞内への Ca の流入に、NCX が重要な役割を果たす

高 K 負荷後の NCC の脱リン酸化に、細胞外からの Ca の流入が重要であるということが確認されたため、次に、高 K 時、どのように細胞外から Ca が流入するのか、その流入経路を検証した。遠位尿細管における Ca 輸送に関わる輸送体として、NCX1、L 型 Ca チャンネル、T 型 Ca チャンネルを検討した。NCX1 は、両方向性の輸送体であるが、脱分極時にリバースモードとなることで、細胞外から細胞内へ Ca を輸送する。NCX1 を強制発現した HEK293 細胞に、NCX1 の選択的阻害薬である SEA0400 を投与し、高 K 刺激すると、細胞内 Ca の増加が抑制されることを live cell imaging で確認した(図 4)。この現象は、T 型 Ca チャンネルおよび NCX 療法の阻害薬である NiCl₂ や、T 型 Ca チャンネル選択的阻害薬である mibefradil、L 型 Ca チャンネル選択的阻害薬である nifedipine のいずれでも認められなかった。さらに、SEA0400 は、HEK293 細胞において、高 K 時の NCC 脱リン酸化を阻害することを western blotting で確認した(図 5A)。Ex-vivo においても、薄切した腎切片を SEA0400 を添加した溶液でインキュベートすると、K 負荷による NCC 脱リン酸化が抑制されることを確認した(図 5B)。SEA0400 が、NCX1 に特異的に作用しているかについては、SEA0400 不応性の NCX1-mutant を作成し、これを HEK293 細胞にトランスフェクションし、K 刺激すると、SEA0400 による K 負荷時の NCC 脱リン酸化の抑制の現象は認められないことを確認した。これにより、SEA0400 による NCX1 の阻害が、K 負荷時の NCC 脱リン酸化の抑制に影響していることが示された。さらに、siRNA を用い、NCX1 の発現を抑制したところ、live cell imaging において、K 刺激時の細胞内 Ca 増加が抑制されること(図 6)、高 K 刺激時の NCC 脱リン酸化が抑制されること(図 7)を確認した。これらの結果から、高 K 刺激時の NCC 脱リン酸化の際に働く CaN の活性化に必要な Ca は、NCX1 を介して細胞内に流入することが明らかとなった。

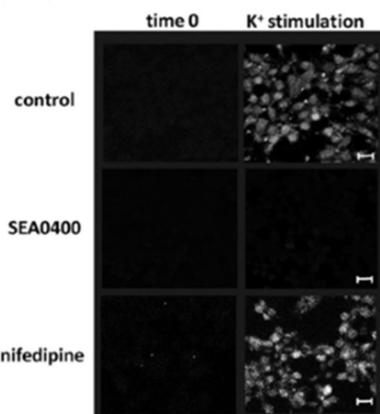


図 4. SEA0400 による高 K 刺激時の細胞内 Ca の変化

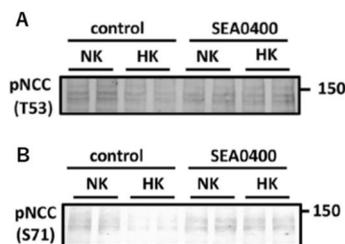


図 5. SEA0400 による高 K 時の NCC の変化

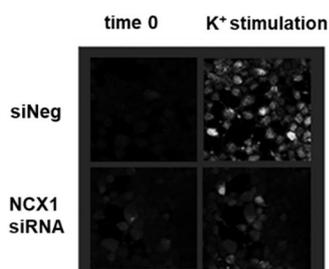


図 6. NCX1 発現抑制による高 K 時の細胞内 Ca の変化

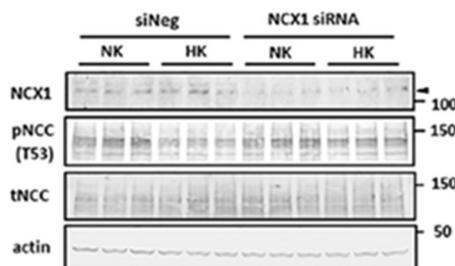


図 7. NCX1 発現抑制による高 K 時の NCC の変化

(3) NCX1 の阻害が K 負荷時の NCC 脱リン酸化を阻害する。

in vivo の結果を動物モデルで確認した。マウスに SEA0400 を腹腔内投与し、1 時間後に 1.7% の高 K 溶液を口腔内投与した。SEA0400 を投与すると、高 K 負荷時の NCC 脱リン酸化が阻害されることが確認された(図 8)。また、NCX1 の発現が正常マウスの約 50% に抑制されている NCX1^{+/-} KO マウスでは、高 K 投与したところ、高 K 負荷時の有意な NCC 脱リン酸化は見られなかった。

続いて、K 負荷時の K 排泄における NCX1 の関与を確認した。SEA0400 投与のマウスでは、K 負荷後 30 分、90 分で K 排泄が抑制されていた(図 9)。Na、Cl 排泄も同様に、排泄抑制を認めた。K 投与後 120 分での血中 K 濃度は、SEA0400 投与マウスで有意に高い結果であった(表 1)。これらの結果は、NCX1 が、K 負荷時の NCC 脱リン酸化および、K 排泄促進に関与していることを動物モデルにおいても示すものである。K 負荷後の尿中 Ca 排泄量は、コントロールマウスとの間で有意差を認めなかった。高 K 負荷時の Ca 排泄については、代償機構が働いたものと考えられる。本研究で明らかになった高 K による NCX1 を介した CaN の活性化と NCC の脱リン酸化のメカニズムを図 10 に示す。



図 8. SEA0400 腹腔内投与による高 K 負荷時の NCC の変化

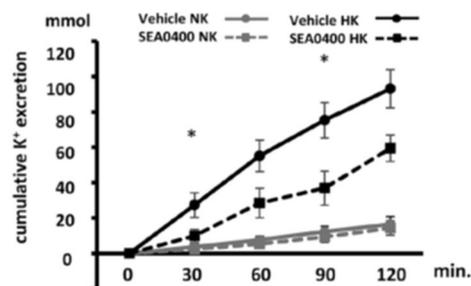


図 9. 高 K 負荷後の積算尿中 K 排泄量

高KによるNCC制御については、近年、国内外の他の研究グループからも多く論文発表されており(Penton et al. *JASN*, 2018, Terker et al. *Cell Metab*, 2015)、また、最近の大規模臨床研究においても (Mente et al, *N Engl J Med*, 2014, O'Donnell et al, *BMJ* 2019)、K摂取による血圧や生命予後への影響の重要性が改めて示され、今、注目されている分野である。

これまでNCCの制御については専らWNKを介したものが考えられてきており、CaNなどの脱リン酸化酵素によってNCCが脱リン酸化されるという報告は少ない。生理的なK濃度変化(高K血症)による、CaNの活性化とNCC制御の詳細な分子機構を明らかにしたのは、本研究が初めてである。

NCX1は、心筋など他の組織にも発現しており、近年、QT延長とNCX1変異(Arking DE et al., *Nat Genet*, 2014) や川崎病とNCX1変異(Shimizu C et al., *Circ Cardioasc Genet*, 2016)との関連性が示されている。今後、本研究で見られた高KによるNCX1を介した細胞内へのCaの流入が他の組織でも見られるのか検証し、また高Kによる不整脈とNCX1との関連性について今後さらなる研究が必要と考えられる。

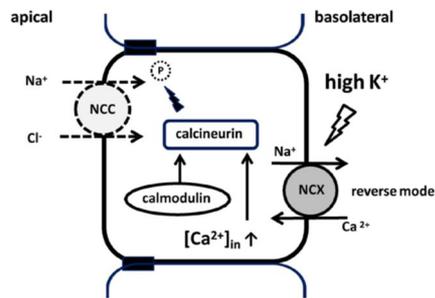


図 10. NCX を介した高 K 時の NCC の制御機構

表 1. K 投与後 120 分のマウス血液検査所見

	control (N = 6)	High-K ⁺ (N = 6)
Na (mmol/l)	vehicle	148 ± 1
	SEA0400	148 ± 1
K (mmol/l)	vehicle	4.8 ± 0.2
	SEA0400	4.7 ± 0.1
Cl (mmol/l)	vehicle	112 ± 1
	SEA0400	110 ± 2
pH	vehicle	7.27 ± 0.02
	SEA0400	7.27 ± 0.03

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shoda Wakana, Nomura Naohiro, Ando Fumiaki, Tagashira Hideaki, Iwamoto Takahiro, Ohta Akihito, Isobe Kiyoshi, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Sodium calcium exchanger 1 is the key molecule for urinary potassium excretion against acute hyperkalemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0235360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0235360	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------