

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 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：2015～2016

課題番号：15H06184

研究課題名(和文) 塩分感受性と糖脂質代謝をつなぐWNK4の機能探究

研究課題名(英文) Investigation of WNK4's function as a novel adipogenic factor

研究代表者

高橋 大栄 (Takahashi, Daiei)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：WNK4は遺伝性高血圧疾患PHAIIの原因遺伝子であり、遠位尿細管でのNaCl再吸収を制御し、PHAIIのみならず塩分感受性高血圧の病態に深く関わる。一方WNK4の腎外での機能は不明であった。我々は脂肪細胞への分化能を有する3T3-L1繊維芽細胞やヒト間葉系胚細胞を分化させ、またWNK4ノックアウト(WNK4KO)マウスを解析しWNK4の機能を解析した。その結果、WNK4は脂肪細胞におけるPPAR $\alpha$ やC/EBP $\alpha$ の発現を制御し、WNK4KOマウスは高脂肪食誘発性肥満に抵抗性でインスリン感受性にも優れていることが分かり、WNK4が脂肪細胞分化を制御することが示された。

研究成果の概要(英文)：The with-no-lysine kinase (WNK) 4 gene is a causative gene in pseudohypoaldosteronism type II. However, WNKs' metabolic functions are not clear. In this study, we found that WNK4 was expressed in mouse adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. In mouse primary preadipocytes and in 3T3-L1 adipocytes, WNK4 was markedly induced in the early phase of adipocyte differentiation. WNK4 expression preceded the expression of key transcriptional factors PPAR $\alpha$  and C/EBP $\alpha$ . WNK4-siRNA-transfected 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells showed reduced expression of PPAR $\alpha$  and C/EBP $\alpha$  and lipid accumulation. WNK4 protein affected the DNA-binding ability of C/EBP $\alpha$  and thereby reduced PPAR $\alpha$  expression. In the WNK4 $^{-/-}$  mice, PPAR $\alpha$  and C/EBP $\alpha$  expression were decreased in adipose tissues, and the mice exhibited partial resistance to high-fat diet-induced adiposity. These data suggest that WNK4 may be a proadipogenic factor, and offer insights into the relationship between WNKs and energy metabolism.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：WNK4 メタボリックシンドローム 高血圧 肥満

## 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、インスリン抵抗性、脂質代謝異常、高血圧、内臓脂肪型肥満を呈する症候群である。MetS は心血管危険因子が集積した病態であり、その重要性が指摘されている。脂肪細胞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あり、MetS の病態に深く関わる。従って、脂肪細胞の制御機構の解明は、肥満および MetS 研究における重要な課題である。

また、臨床もっとも重要な生活習慣病の一つは高血圧である。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など、塩分・高血圧と肥満・糖代謝異常の間には密接な関わりがある。

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、その解析を通じて、腎におけるナトリウム輸送調節と血圧制御機構を解明してきた。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、原因遺伝子としてセリン・スレオニンキナーゼである with-no-lysine kinase (WNK)が知られ、WNK1 および WNK4 が PHAII の原因遺伝子として報告されている。

申請者は過去に、WNK4 の機能解明を目的として WNK4 KO マウスの解析を行い、WNK4 が腎において 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た (*Biosci Rep.* 9;34, 2014)。その過程で、WNK4KO マウスは野生型マウスに比して低体重傾向を示し、また高脂肪食による肥満を呈しにくいことを見出した。しかし、WNK が糖代謝に関わるという報告は過去になく、特に WNK4 においては腎以外の臓器における機能は不明であった。

従って本研究では、塩分感受性高血圧関連遺伝子 WNK4 と脂質代謝との関わりを解明することを目標とし研究を行った。

## 2. 研究の目的

WNK4 KO マウスをはじめとした当研究室の保有する遺伝子改変マウスの解析を通じて、腎外臓器における WNK4 の機能を検証し、WNK4 と脂質代謝の関連を解明する。また、3T3L1 細胞を用いて、WNK4 の脂肪分化における働きを明らかにすることも目的として、研究を進める。

## 3. 研究の方法

WNK4 ノックアウトマウスをはじめとした遺伝子改変マウスの表現型の解析、およびマウス脂肪細胞の primary culture を行う。また、脂肪細胞モデルである 3T3-L1 細胞や、ヒト間葉系胚細胞(human mesenchymal stem cell from adipose tissue; hMSC-AT 細胞)を用いて、WNK4 のノックダウンと強制発現実験をおこない、脂肪分化や分化誘導マーカーを評価し、機能検証を行った。

## 4. 研究成果

まず、各臓器における WNK4 の発現を検討した。その結果、WNK4 は腎以外にも、インスリン感受性臓器である脂肪組織にも発現していることが分かった。マウス脂肪組織の primary culture を行い、脂肪組織を成熟脂肪細胞と未分化な胚細胞を含む分画(stromal vascular fraction; SVF)に分離した。その結果、WNK4 は成熟脂肪細胞に主に発現しており、また SVF に脂肪細胞への分化誘導刺激を加えると、WNK4 の発現量が急増することが分かった。次に、脂肪細胞への分化能を有するマウス 3T3-L1 培養細胞を用いて検討を行った。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に伴いその 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みられることが分かった。

WNK4 の脂肪細胞における機能を検証するため、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。また、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 $\gamma$  や、C/EBP $\alpha$  の発現をも強力に抑制した。これらの表現型はヒト由来細胞である hMSC-AT の解析においても同様であり、ヒトにおける同様の制御機構の存在を示唆するものであった。一方で WNK4 の強制発現は脂肪細胞の脂肪滴蓄積を亢進させ、siRNA の場合とは逆の表現型を示した。

興味深いことに、これらの脂肪細胞分化への作用は、他の WNK カスケード関連分子のノックダウン実験等ではみられず、WNK4 による脂肪細胞の制御は既知の WNK シグナル系とは異なる機序によるものと思われた。

その機序としては、PPAR $\gamma$  の上流の転写因子である C/EBP $\beta$  の機能を部分的に抑制すると考えられた。また、脂肪細胞分化早期における必須過程である mitotic clonal expansion の抑制を介していると推定された。

また、WNK4KO マウスのより詳細な解析により、WNK4 KO マウスが高脂肪食による体重増加・肥満に対して抵抗性を示すこと、脂肪細胞のサイズが野生型よりも小さいこと、糖代謝のパラメータ等が野生型に比べて優れ、インスリン感受性も良好に保たれることなどが明らかとなった(以上論文 1 に発表、東京医科歯科大学からプレスリリースを実施)。

本研究により、これまで主に腎臓における塩分感受性高血圧の制御因子として知られていた WNK4 が、脂肪組織では脂肪細胞の分化を制御し、高脂肪食による肥満の病態にも寄与することが分かった。これは高血圧と肥満の病態を繋ぐ新しい知見であり、MetS の病態解明に役立つと考えらる。また本研究の結

果から、MetS など高血圧と肥満を合併した病態の新規治療戦略として、WNK4 の抑制が有用であると考えられる。

しかしながら、現時点では WNK4 が脂肪細胞分化シグナルを制御する直接の機構や基質は解明できていない。このため、今後 WNK4 の新規基質探索を含め、より詳細な分子生物学的機序の探求を行っていくことが必要と考えられる。

## 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)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Takahashi D, Mori T, Sohara E, Tanaka M, Chiga M, Inoue Y, Nomura N, Zeniya M, Ochi H, Takeda S, Suganami T, Rai T, Uchida S. WNK4 is an Adipogenic Factor and Its Deletion Reduces Diet-Induced Obesity in Mice. EBioMedicine. 18:118-27, 2017. 査読あり doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.011.

[学会発表](計 1 件)

1. Takahashi D, Mori T, Sohara E, Chiga M, Inoue Y, Nomura N, Zeniya M, Rai T, Uchida S. WNK4 regulates adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. The Annual Meeting of American Society of Nephrology, Chicago, November. 2016.

[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

東京医科歯科大学プレスリリース通知資料

<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20170330.pdf>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者 高橋 大栄 ( Daiei Takahashi )  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤  
講師

研究者番号：40759552