

令和元年9月4日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09642

研究課題名(和文) WNKシグナル系の新規機能の探索と制御機構の解明

研究課題名(英文) Novel functions and regulation of WNK signaling cascade

研究代表者

頼 建光 (Rai, Tatemitsu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授

研究者番号：80334431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：(1) KLHL-Cullin3複合体によるWNKキナーゼ分解障害の病態の検討：KLHL3ノックアウトマウスを作製・解析し、PHAII発症の病態生理においては変異型KLHL3によるdominant negative効果が重要であることを明らかにした。(2) KLHL3/Cul3/WNKシグナルの各臓器での働きの解明：WNK4ノックアウトマウスを作製・解析し、WNK4が脂肪細胞の分化誘導の調節因子であることを発見した。また、NKCC1は筋肉の分化・肥大に重要な役割を果たしていることを示し、WNK1-FOXO4シグナルが筋腎関連メカニズムの一端を担うシグナルであることが示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KLHL3とKLHL2によるWNKシグナルの制御メカニズム、慢性腎臓病における塩分感受性高血圧の成立メカニズムについて重要な新知見を得ることができた。この成果は、新たな高血圧治療薬の創薬につながるものである。また腎臓以外の、脂肪組織や筋肉におけるWNKシグナル系の機能についても新規発見を得た。この成果により、WNKシグナル系が肥満やサルコペニアの新しい治療標的となる可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：(1) Pathogenesis of defective degradation of WNK kinases by KLHL-Cullin3 complex: By generation and analysis of KLHL3 knockout mice, the dominant-negative effect of mutant KLHL3 was found to be important for the pathogenesis of PHAII. (2) Function of KLHL3/Cul3/WNK signal in extra-renal organs: By generation and analysis of WNK4 knockout mice, WNK4 was found to be a novel regulating factor of adipocyte differentiation. In addition, NKCC1 was shown to play an important role in muscle differentiation and hypertrophy. Thus, WNK1-FOXO4 signal was identified as a novel signaling system participating in the physiologic and pathogenic association of the muscle and kidney.

研究分野：腎臓内科

キーワード：KLHL3 cullin3 NKCC1 NCC FOXO4 偽性低アルドステロン症II型

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

#### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性的高血圧症、偽性低アルドステロン症 II 型 (pseudo-hypoaldosteronism type II: PHAII) は、WNK キナーゼの遺伝子変異によって引き起こされるが、PHAII の新たな原因遺伝子として Kelch-like 3 (KLHL3) と Cullin3 (Cul3) が発見された。これらの遺伝子変異による WNK4 のユビキチン化障害とその結果としての WNK4 分解障害が PHAII 発症の共通の病態であることを筆者は明らかにしたが、KLHL/Cul3/WNK 分解系と本態性高血圧・肥満・インスリン抵抗性・動脈硬化などのより一般的な病態を結びつける報告はこれまでなかった。

#### 2. 研究の目的

当研究の目的は以下の通りである。

- (1) WNK-OSR1/SPPAK-SLC12A シグナル系と LHL/Cul3/WNK 分解系の制御メカニズムの詳細を明らかにする。
- (2) 本態性高血圧や肥満、インスリン抵抗性、動脈硬化などのより一般的な病態との関係を明らかにし、WNK シグナル系の破綻による疾患発症機序を解明する。
- (3) 以上の知見から新規治療ターゲットを見出し、新たな治療戦略の構築を目指す。

#### 3. 研究の方法

マウス慢性腎臓病 (CKD) モデルを用いて、CKD における KLHL / Cul3 / WNK システムを介した塩分感受性亢進のメカニズムを調べた。WNK 分解障害に関わる病態を生体内で明らかにするためには、PHAII 起因性の変異を持つ KLHL3 と Cullin3 のノックインマウス、KLHL2 ノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスの作製と解析を進めた。WNK4 の抗肥満作用については WNK4 ノックアウトマウスを利用して解析を行った。また、Na-K-Cl 共輸送体 (NKCC) 1 は骨格筋形成を制御し、その阻害剤ループ利尿薬が筋再生を抑制しサルコペニア発症に関与することが判明した。これらの結果を踏まえ、筋肉の分化における WNK キナーゼの関わりについて研究を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 慢性腎臓病における塩分感受性の発症と進展に関わる WNK シグナルの役割の解明

マウス CKD モデルとしてアリストロキア酸腎症 (AAN) を用いて、高塩食摂取による血圧変化と WNK シグナル系分子の発現量を評価した。その結果、AAN マウスは塩分感受性亢進を示し、腎臓における WNK1 の蛋白発現亢進と SPAK/NCC のリン酸化亢進が認められた。高塩食負荷によっても WNK1-SPAK-NCC シグナルカスケードは抑制されず、塩分感受性亢進の原因と考えられた。SPAK ノックアウトマウスでは AAN による WNK1 増加はあるもののリン酸化 NCC の増加は認めなかった。これらの結果から WNK1-SPAK-NCC シグナルの過剰亢進が CKD の塩分感受性亢進に関与すると考えられた (学会発表 No. 2)。

##### (2) KLHL-Cullin3 複合体による WNK キナーゼ分解障害による病態の生体内での検討

遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) において、原因遺伝子である KLHL3 と Cullin3 はユビキチン E3 リガーゼを形成し、腎臓遠位尿細管で WNK1, WNK4 を捉えて分解することで NCC を制御する。KLHL3<sup>-/-</sup>マウスを作成、解析し、KLHL3 の局在と生体内での機能につき検討した。内因性の KLHL3 プロモーターの制御下に  $\beta$  gal を発現する KLHL3<sup>-/-</sup>マウスを作成、解析したところ、 $\beta$  gal の Western blotting において、KLHL3 は腎臓、脳、眼、精巣、心臓で発現していることが明らかになった。特に脳と腎臓において強い発現が認められた。脳では海馬に強く LacZ 染色を認めた。また、KLHL3<sup>-/-</sup>マウスの腎臓では、WNK1 と WNK4 の分解不良による発現増加を認め、PHAII の形質を呈したが、KLHL3<sup>+/-</sup>マウスでは WNK シグナル系の過剰亢進は認めなかった。細胞実験においては、野生型 KLHL3 は互いに結合して二量体を形成するが、野生型 KLHL3 と疾患変

異型KLHL3は結合せず、二量体形成が阻害された。この結果から、KLHL3は生体において多臓器にわたり発現していることが判明した。今回作成したKLHL3<sup>-/-</sup>マウスは、腎臓以外の臓器におけるKLHL3の機能を探るのに有用であると考えられる。また、PHAII発症の病態生理において、KLHL3の変異によるWNKシグナルの制御の異常のメカニズムとしてはKLHL3の発現量ではなく、疾患変異型KLHL3の質的变化によるdominant negative効果が重要であることが明らかになった。KLHL3の二量体形成は、KLHL3の機能における重要なメカニズムの一端である可能性があると考えられた（雑誌論文No. 12）。また、KLHL2ノックアウトマウスの作成、解析も行った。KLHL2<sup>-/-</sup>マウスはPHAII様phenotypeを示さなかった。KLHL2の発現部位は腎臓髄質に限局しており、KLHL2<sup>-/-</sup>マウスでは腎臓髄質においてWNK4の発現が増加していた。このことから、KLHL2は腎臓髄質特異的なWNKシグナル制御因子であることが示された（雑誌論文No. 10）。

### (3) WNK シグナルの各臓器での働きの解明

#### ① 脂肪組織と肥満

WNK4 ノックアウトマウスを作製、解析した。WNK4<sup>-/-</sup>マウスが肥満症に対して抵抗性を有することを見出し、WNK4 が脂肪細胞の分化誘導の調節因子であることを発見した。（雑誌論文 No. 11）。

#### ② 筋肉とサルコペニア

骨格筋細胞の分化の過程でNKCC1 が誘導されること、そしてこの過程はループ利尿薬により阻害されること、さらにはループ利尿薬が運動による筋線維の肥大化を抑制することも示した。このことから、NKCC1 は筋肉の分化、運動誘発性肥大に重要な役割を果たしていることが示された（雑誌論文 No. 9）。さらに、WNK1 が SPAK, OSR1 非依存性に長寿遺伝子 forkhead box O (FOXO) 4 を介し筋肥大を正に制御することを示した。まず、マウス骨格筋細胞 C2C12, マウス骨格筋組織の WNK1 は、それぞれ分化誘導、長期運動刺激によりタンパク発現量が増加した。C2C12 細胞で siRNA による WNK1 ノックダウンを行うと、筋管細胞径の萎縮ならびに筋萎縮関連遺伝子 (atrogene) の転写増加を認めた。Atrogene の主たる転写因子 FOXO1/3a/4 の核内局在を評価すると、siWNK1 により FOXO4 の核内発現が増加しており、siFOXO4 を同時に行うと筋管細胞萎縮と atrogene 転写増加がキャンセルされた。WNK1-FOXO4 シグナルは生理的に筋肥大を制御し、筋腎関連メカニズムの一端を担うシグナルとして新しい治療標的となる可能性があることが示唆された（雑誌論文 9）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 14 件）

- ① Kikuchi H, Sasaki E, Nomura N, Mori T, Minamishima YA, Yoshizaki Y, Takahashi N, Furusho T, Arai Y, Mandai S, Yamashita T, Ando F, Maejima Y, Isobe K, Okado T, Rai T, Uchida S, Sohara E. Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 査読有. 95(1), 2019, 123-137. doi:10.1016/j.kint.2018.08.030.
- ② Yoshida S, Araki Y, Mori T, Sasaki E, Kasagi Y, Isobe K, Susa K, Inoue Y, Bomont P, Okado T, Rai T, Uchida S, Sohara E. Decreased KLHL3 expression is involved in the pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II caused by cullin 3 mutation in vivo. *Clin Exp Nephrol.* 査読有. 22(6), 2018, 1251-1257. doi:10.1007/s10157-018-1593-z.

- ③ Mandai S, Mori T, Nomura N, Furusho T, Arai Y, Kikuchi H, Sasaki E, Sohara E, Rai T, Uchida S. WNK1 regulates skeletal muscle cell hypertrophy by modulating the nuclear localization and transcriptional activity of FOXO4. *Sci Rep.* 査読有. 8(1), 2018, 9101. doi:10.1038/s41598-018-27414-0.
- ④ Ando F, Mori S, Yui N, Morimoto T, Nomura N, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Kondo Y, Kagechika H, Uchida S. AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus. *Nat Commun.* 査読有. 9(1), 2018, 1411. doi:10.1038/s41467-018-03771-2.
- ⑤ Hashimoto H, Nomura N, Shoda W, Isobe K, Kikuchi H, Yamamoto K, Fujimaru T, Ando F, Mori T, Okado T, Rai T, Uchida S, Sohara E. Metformin increases urinary sodium excretion by reducing phosphorylation of the sodium-chloride cotransporter. *Metabolism.* 査読有. 85, 2018, 23-31. doi:10.1016/j.metabol.2018.02.00.
- ⑥ Ishikawa S, Naito S, Iimori S, Takahashi D, Zeniya M, Sato H, Nomura N, Sohara E, Okado T, Uchida S, Rai T. Loop diuretics are associated with greater risk of sarcopenia in patients with non-dialysis-dependent chronic kidney disease. *PLoS One.* 査読有. 13(2), 2018, e0192990. doi:10.1371/journal.pone.0192990.
- ⑦ Susa K, Sohara E, Takahashi D, Okado T, Rai T, Uchida S. WNK4 is indispensable for the pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II caused by mutant KLHL3. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有. 491(3), 2017, 727-732. doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.121.
- ⑧ Arai Y, Takahashi D, Asano K, Tanaka M, Oda M, Ko SBH, Ko MSH, Mandai S, Nomura N, Rai T, Uchida S, Sohara E. Salt suppresses IFN $\gamma$  inducible chemokines through the IFN $\gamma$ -JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells. *Sci Rep.* 査読有. 7, 2017, 46580. doi:10.1038/srep46580.
- ⑨ Mandai S, Furukawa S, Kodaka M, Hata Y, Mori T, Nomura N, Ando F, Mori Y, Takahashi D, Yoshizaki Y, Kasagi Y, Arai Y, Sasaki E, Yoshida S, Furuichi Y, Fujii NL, Sohara E, Rai T, Uchida S. Loop diuretics affect skeletal myoblast differentiation and exercise-induced muscle hypertrophy. *Sci Rep.* 査読有. 7, 2017, 46369. doi:10.1038/srep46369.
- ⑩ Kasagi Y, Takahashi D, Aida T, Nishida H, Nomura N, Zeniya M, Mori T, Sasaki E, Ando F, Rai T, Uchida S, Sohara E. Impaired degradation of medullary WNK4 in the kidneys of KLHL2 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有. 487(2), 2017, 368-374. doi:10.1016/j.bbrc.2017.04.068.
- ⑪ 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.* 査読有. 18, 2017, 118-127. doi:10.1016/j.ebiom.2017.03.011.
- ⑫ Sasaki E, Susa K, Mori T, Isobe K, Araki Y, Inoue Y, Yoshizaki Y, Ando F, Mori Y, Mandai S, Zeniya M, Takahashi D, Nomura N, Rai T, Uchida S, Sohara E. KLHL3 knockout mice reveal the physiological role of KLHL3 and the pathophysiology of PHAII caused by mutant KLHL3. *Mol Cell Biol.* 査読有. 37(7), 2017, pii:e00508-16. doi:10.1128/MCB.00508-16.

- ⑬ 頼建光、内田信一. 腎臓学 この一年の進歩 尿細管生理、日本腎臓学会誌、査読無、Vol. 50 No. 1, 2017, pp. 28-34.
- ⑭ 頼建光. 腎臓医が知っておきたい分子遺伝学の進歩 [疾患編] Bartter/Gitelman 症候群・Liddle 症候群・PHAII、腎と透析、査読無、Vol. 82 No. 3, 2017, pp. 431-439.

[学会発表] (計 33 件)

- ① Ando F, Yui N, Nomura N, Rai T, Sasaki S, Uchida S. AKAPs-PKA disruptors robustly increase AQP2 activity independently of vasopressin. American Society of Nephrology Kidney Week 2018, 2018.
- ② Furusho T, Uchida S, Sohara E, Mandai S, Kikuchi H, Ando F, Zeniya M, Mori T, Nomura N, Rai T. WNK1-SPAK-NCC signaling cascade is involved in salt sensitive hypertension induced by aristolochic acid nephropathy. American Society of Nephrology Kidney Week 2018, 2018.
- ③ Hashimoto H, Okado T, Rai T, Uchida S, Sohara E, Nomura N, Shoda W, Isobe K, Kikuchi H, Yamamoto K, Fujimaru T, Ando F, Mori T. metformin has natriuretic effects through reduction of the sodium-chloride cotransporter phosphorylation. American Society of Nephrology Kidney Week 2018, 2018.
- ④ Shoda W, Nomura N, Ando F, Isobe K, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Molecular mechanism of high-potassium induced Na-Cl cotransporter dephosphorylation. American Society of Nephrology Kidney Week 2018, 2018.
- ⑤ Mandai S, Uchida S, Mori T, Nomura N, Furusho T, Arai Y, Kikuchi H, Sasaki E, Sohara E, Rai T. WNK1 regulates skeletal muscle hypertrophy by modulating phosphorylation, nuclear localization, and transcriptional activity of FoxO4. American Society of Nephrology Kidney Week 2018, 2018.
- ⑥ Takahashi D, Mori T, Sohara E, Miyako Tanaka M, Inoue Y, Nomura N, Chiga M, Zeniya M, Suganami T, Rai T, Uchida S. WNK4 deletion inhibits adipogenesis in vitro and in vivo. American Society of Nephrology Kidney Week 2017, 2017.
- ⑦ Yoshida S, Araki Y, Mori T, Sasaki E, Kasagi Y, Isobe K, Susa K, Inoue Y, Rai T, Uchida S, Sohara E. Decreased protein expression of KLHL3 is involved in the pathogenesis of PHAII caused by CUL3 mutation in vivo. American Society of Nephrology Kidney Week 2017, 2017.
- ⑧ Kasagi Y, Takahashi D, Tomomi Aida T, Nishida H, Nomura N, Zeniya M, Mori T, Sasaki E, Ando F, Rai T, Uchida S, Sohara E. Generation and analysis of KLHL2 knockout mice. American Society of Nephrology Kidney Week 2017, 2017.
- ⑨ Arai Y, Takahashi D, Asano K, Tanaka M, Oda M, Ko SB, Ko MS, Mandai S, Naohiro Nomura N, Rai T, Uchida S, Sohara E. A high salt diet suppressed CXCL9 and CXCL10 in proximal tubules through the IFN $\gamma$ -JAK1-STAT1 signaling pathway. American Society of Nephrology Kidney Week 2017, 2017.
- ⑩ Mori Y, Mandai S, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Generation of p62/SQSTM1 (p62) KO cell lines using CRISPR/Cas9 -The role of p62 on WNK1 regulation by changes of extracellular potassium concentration-. American Society of Nephrology Kidney Week 2016, 2016.

- ⑪ Yoshizaki Y, Sohara E, Mori T, Kikuchi E, Takahashi D, Zeniya M, Araki Y, Mori Y, Ando F, Nomura N, Rai T, Uchida S. Drug repositioning screening for the discovery of inhibitors of Keap1-Nrf2 interaction using fluorescent correlation spectroscopy. American Society of Nephrology Kidney Week 2016, 2016.
- ⑫ Araki Y, Rai T, Sohara E, Mori T, Inoue Y, Mori Y, Uchida S. The pseudohypoaldosteronism type II-causing mutant Cul3 protein forms dimer with KLHL3 and inhibits the degradation of WNK4 with a dominant-negative effect. American Society of Nephrology Kidney Week 2016, 2016.
- ⑬ Sasaki E, Susa K, Mori T, Isobe K, Araki Y, Inoue Y, Rai T, Uchida S, Sohara E. Generation and analysis of KLHL3 knockout mice. American Society of Nephrology Kidney Week 2016, 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

- ① プレスリリース「FMP-API-1が腎臓において尿濃縮に重要な水チャネルを強力に活性化する」  
[http://tmd-kid.jp/wp-content/uploads/2019/04/20180413\\_1-Ando.pdf](http://tmd-kid.jp/wp-content/uploads/2019/04/20180413_1-Ando.pdf)
- ② プレスリリース「慢性腎臓病の新たな治療標的としてエネルギー不全の感知障害を発見」  
[http://tmd-kid.jp/wp-content/uploads/2019/04/20181116\\_1-Kikuchi.pdf](http://tmd-kid.jp/wp-content/uploads/2019/04/20181116_1-Kikuchi.pdf)
- ③ プレスリリース「糖尿病治療薬メトホルミンが、腎臓からの塩分排泄を増加させる」  
[http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20180309\\_1.pdf](http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20180309_1.pdf)
- ④ プレスリリース「保存期腎不全患者におけるループ利尿薬使用はサルコペニア合併と関連する可能性がある」  
[http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20180227\\_1.pdf](http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20180227_1.pdf)
- ⑤ プレスリリース「塩分負荷が腎臓の近位尿細管細胞のインターフェロン $\gamma$ 誘導性の免疫応答を抑制する」  
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20170420.pdf>
- ⑥ プレスリリース「骨格筋の形成・肥大にNa-K-Cl共輸送体（NKCC）が関与」  
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20170418.pdf>
- ⑦ プレスリリース「血圧制御因子WNK4が脂肪組織では脂肪細胞の分化を制御する」  
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20170330.pdf>

## 6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。