

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19478

研究課題名(和文)カリウムによる血圧調整機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of potassium related regulation of blood pressure

研究代表者

野村 尚弘 (NOMURA, Naohiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50735800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カリウム摂取量が不足するほど血圧が高めとなり、心血管疾患や死亡率の危険性が高まることが知られている。カリウム不足による血圧上昇には腎臓の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)が重要な役割を担っている。我々はこの研究を通してカリウムがどのようにNCCの活性を制御しているかを検討した。カリウムが不足している時は、クロライド輸送体からのクロライドの細胞外流出が重要で、カリウム摂取が多い時はカルシニューリンの活性化によるNCCが抑制されるという分子メカニズムを明らかとした。この分子機構によりカリウムがNCCの活性を変化させることがカリウムと血圧に影響を与えらる。

研究成果の概要(英文)：Dietary potassium intake is inversely related to blood pressure and mortality. Moreover, the sodium-chloride cotransporter (NCC) plays an important role in blood pressure regulation and urinary potassium excretion in response to potassium intake. We investigated how potassium regulates NCC activity, and clarified molecular mechanism of NCC regulation by potassium. We found that lower intracellular chloride concentration via ClC-K channel activated NCC, when K intake is low. On the other hand, when K intake is high, calcineurin is activated and suppressed NCC. These molecular mechanism regulates potassium-related hypertension.

研究分野：腎臓内科

キーワード：高血圧 カリウム ナトリウム輸送体

1. 研究開始当初の背景

カリウム摂取が多いほど血圧は低く、さらに心血管イベントが少なく、生命予後がよいことが知られている。カリウム摂取によって血圧が下がる理由のひとつとして、カリウム摂取時にナトリウムクロライド共輸送体(NCC)の活性が低下することが挙げられる。NCCは遠位尿細管において、ナトリウムとクロライドの再吸収を行い循環血漿量の調節に関わっている。WNKキナーゼはNCCなどナトリウム輸送体の制御因子であり、カリウムがWNKの活性に影響を与えることは既知のことである。低カリウム時に細胞外へのカリウム流出に伴い、細胞内クロライドが減少することで、WNKキナーゼが活性化するというメカニズムが推測されているが、そのクロライドの輸送に関わるクロライドチャンネルについては明らかではなかった。また、高カリウム時にはNCCの制御機構としてWNKキナーゼとは独立したタンパク脱リン酸化酵素の関与が示唆されるが、その詳細な分子メカニズムに関してはまだ不明な部分も多かった。

2. 研究の目的

本研究は以下の3点を中心に、カリウムによる血圧低下作用のメカニズムを明らかにすることを目的とする。(1)タンパク脱リン酸化酵素の活性化によるNa-Cl共輸送体(NCC)の脱リン酸化(不活化)。(2)血管平滑筋細胞における選択的オートファジーを介したKLHL2の分解亢進によるWNK3-SPAK-NKCC1経路の抑制。(3)低カリウム時のWNK4の活性化におけるクロライドチャンネルの関わり。

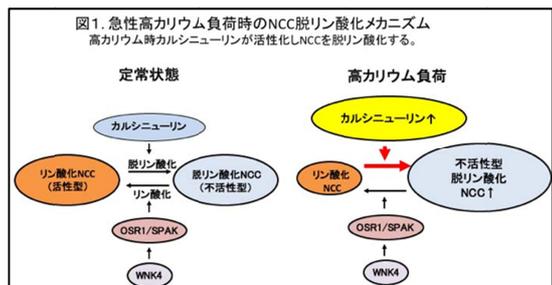
3. 研究の方法

高カリウム時のNCCの脱リン酸化に関わるphosphataseの同定を行う。同定方法として、各種phosphataseの特異的阻害薬を用いた実験、培養細胞を用いたphosphataseの強制発現実験を行う。血管平滑筋におけるカリウムの影響を調べるためにマウス血管平滑筋細胞を用いた実験を行い、オートファジー阻害薬やオートファジー関連タンパクのp62のノックダウン実験によって検証を行う。クロライドチャンネルの関わりに関しては、ClC-Kのサブユニットであるbarttin hypomorphicマウスを用いて検証を行う。

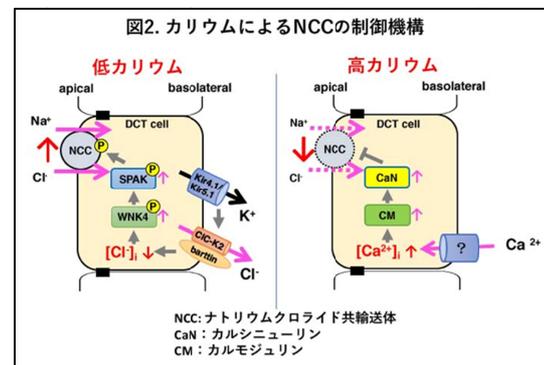
4. 研究成果

(1)カリウムによるカルシニューリンの活性化。マウスに急性カリウム負荷を行った時に起こるナトリウム-クロライド共輸送体(NCC)の脱リン酸化は、カルシニューリン阻害剤であるタクロリムスとその上流の制御因子であるカルモジュリンの阻害剤であるW7によって有意に阻害されるという結果が得られた。また、タクロリムスによりカリウム負荷後の尿中カリウム排泄も抑制された。このことから、カリウム負荷によりカルシニューリ

ンが活性化することがNCCの脱リン酸化と尿中カリウム排泄に重要であると考えられた(Kidney Int.2017)(図1)。現在は、培養細胞を用いてカリウムがどのようにしてカルシニューリンを活性化するかというメカニズムについて検討を行っている。



(2)血管平滑筋におけるカリウムとKLHL2-WNK3-SPAK-NKCC1経路の関わり。マウス血管平滑筋細胞(MOVAS)を高カリウム条件下で培養すると、WNK3-SPAK-NKCC1経路が抑制され、WNK3の上流の制御因子であるKLHL2のタンパク発現量が増加する。また、KLHL2をノックダウンすると高カリウムによるWNK3-SPAKの抑制が認められなくなった。このことから、高カリウムによってKLHL2が増加することでWNK3の分解が促進されると考えられる。この時、KLHL2のmRNAの変化はなくオートファジーなどによる分解系の変化が推察されたが、証明には至っていない。(3)低カリウム時のWNK4の活性化におけるクロライドチャンネルの関わり。ClC-Kチャンネルの必須サブユニットであるbarttinの低発現マウス(*Bsnd^{neo/neo}*マウス)を使ってClC-K2チャンネルの関わりについての検討を行った。野生型マウスでは高食塩低カリウム食を与えるとNCC及びその上流のSPAKのリン酸化が亢進(活性化)し血圧上昇が起こるが、*Bsnd^{neo/neo}*マウスに高食塩低カリウム食を与えてもNCCとSPAKの活性化は乏しく、血圧上昇も認められなかった。このことから低カリウムに伴う血圧上昇にはClC-K2クロライドチャンネルが深く関わっていると考えられた(*Biosci Rep.* 2018)(図2)。



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 8 件)

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. pii: S0026-0495(18), 2018, 30062-3. doi: 10.1016/j.metabol.2018.02.009.

Nomura N, Shoda W, Wang Y, Mandai S, Furusho T, Takahashi D, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Uchida S. Role of CIC-K and barttin in low potassium-induced sodium chloride cotransporter activation and hypertension in mouse kidney. *Biosci Rep*. 査読有. BSR20171243, 2018. doi: 10.1042/BSR20171243.

Wan Y, Nomura N, Zeniya M, Mori Y, Takahashi D, Naito S, Rai T, Uchida S, Sohara E. High potassium concentration regulates the WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade via kelch-like protein 2 in mouse vascular smooth muscle cells. *Journal of Medical and Dental Sciences*. 査読有. 65, 2018, 35-44. <https://doi.org/10.11480/jmds.650105>.

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.

Takahashi D, Mori T, Sohara E, Tanaka M, Chiga M, Inoue Y, Nomura N, Zeniya M, Ochi H, Takeda Shu, 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.

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 Pseudohypoaldosteronism Type II Caused by Mutant KLHL3. *Mol Cell Biol*. 査読有. 04; 37(7), 2017. doi: 10.1128/MCB.00508-16.

Shoda W, Nomura N, Ando F, Mori Y, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Calcineurin inhibitors block

sodium-chloride cotransporter dephosphorylation in response to high potassium intake. *Kidney Int*. 査読有. 91(2), 2017, 402-411. doi: 10.1016/j.kint.2016.09.001.

野村 尚弘. 【食塩感受性高血圧 UPDATE】カリウムによる尿中塩分排泄機構の制御医学のあゆみ. 査読無. 261(8), 2017, 792-796.

<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=aa7ayuma&ye=2017&vo=261&issue=8&UserID=202.242.187.109>.

〔学会発表〕(計 6 件)

Nomura N, Shoda W, Wang Y, Takahashi D, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Uchida S. Role of CIC-K and Barttin in Low-Potassium induced Sodium-Chloride Cotransporter Activation and Hypertension in Mouse Kidney. ISN Frontiers Meetings 2018, Tokyo, 2018.

Nomura N, Shoda W, Wang Y, Takahashi D, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Uchida S. Role of CIC-K and Barttin in Low-Potassium induced Sodium-Chloride Cotransporter Activation and Hypertension in Mouse Kidney. *Kidney Week 2017*. New Orleans, USA, 2017.

Shoda W, Nomura N, Ando F, Mori Y, Mori T, Sohara E, Rai T, Uchida S. Calcineurin Rapidly Dephosphorylates Sodium-Chloride Cotransporter in Response to High Potassium Intake. *Kidney Week 2016*. Chicago, USA, 2016.
野村 尚弘, 正田 若菜, 高橋 大栄, 銭谷 慕子, 蘇原 映誠, 頼 建光, 内田 信一. CIC-K チャネルはカリウム摂取不足時の NCC 活性化と血圧上昇に重要である. 第 60 回日本腎臓学会学術総会. 仙台, 2017.

正田 若菜, 野村 尚弘, 安藤 史顕, 蘇原 映誠, 頼 建光, 内田 信一. 高カリウムはカリシニューリンを活性化し Na-Cl 共輸送体(NCC)を脱リン酸化して尿中カリウム排泄を促進する. 第 27 回バソプレシン研究会. 東京, 2017.

正田 若菜, 野村 尚弘, 安藤 史顕, 蘇原 映誠, 頼 建光, 内田 信一. 急性カリウム負荷はカルシニューリンを活性化し、Na-Cl 共輸送体(NCC)を脱リン酸化して尿中カリウム排泄を促進する. 第 59 回日本腎臓学会学術総会. 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

【プレスリリース】摂りすぎたカリウムを腎臓がすぐに尿に排出する仕組みを発見。高カリウム血症の病態解明と治療法開発への期待 2016 年

http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20161028_2.pdf

【受賞】正田若菜 第27回バソプレシン研究会 奨励賞, バソプレシン研究会, 2017年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 尚弘 (NOMURA, Naohiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50735800

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()