

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16076

研究課題名(和文) KLHL2/3の生体内での機能解析による血圧制御機構の新規解明

研究課題名(英文) Regulation Mechanism of blood pressure through analysis of KLHL2/3 in vivo

研究代表者

銭谷 慕子(三澤)(ZENIYA, Moko)

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：10760283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：WNK-OSR1/SPAK-NCCカスケードは腎臓で塩分の出納を調節したり血管の収縮を調節したりすることで、塩分感受性高血圧に深く関わっている。最近になりWNKがKLHL蛋白によって制御されることが判明したが、その仕組みは詳しくわかっていなかった。そこで本研究では、KLHL2またはKLHL3の遺伝子をノックアウトしたマウスを作製・解析し、これらの蛋白の生体内における局在や働きについての詳細を明らかにした。また、慢性腎臓病において観察される塩分感受性高血圧にもこのカスケードが関わっていることも解明した。慢性腎臓病における線維化に対する新しい治療の候補薬剤も発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧患者は日本に1000万人以上存在し、中でも塩分感受性高血圧は臓器障害を起こしやすく、その対策は大変重要な課題である。今回我々が一連の研究により、KLHL3及びKLHL2の生体・特に腎臓における機能を解明したことで、WNK-OSR1/SPAK-NCCカスケードの上位調節機構について、より詳細な仕組みが明らかになった。このことは、塩分感受性高血圧の今後の病態全容解明や治療法開発に向けた学術的・社会的前進であると考えている。

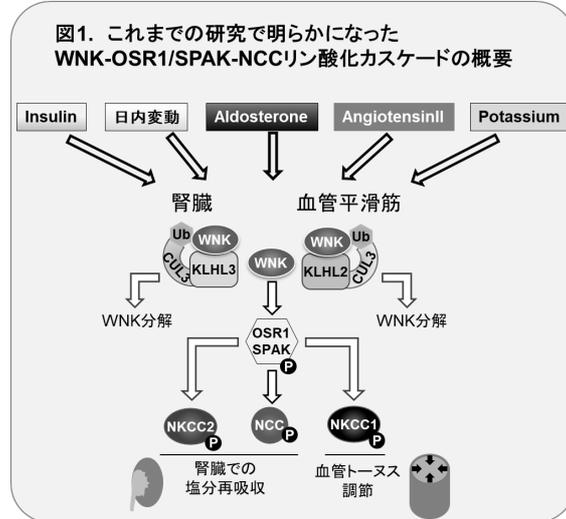
研究成果の概要(英文)：WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade is involved in salt-sensitive hypertension through regulation of renal sodium excretion and vasoconstriction. WNK kinases are mediated by KLHL2 and KLHL3, however, the detailed mechanism remained unknown. In this study, we generated KLHL2 knock-out (KO) and KLHL3 KO mice and analyzed their phenotypes. As a result, we elucidated the localization in vivo of KLHL2 and KLHL3, involvement of KLHL2 and KLHL3 in salt-sensitive hypertension, and the pathophysiological roles of KLHL2 and KLHL3 for the regulation of WNK-OSR1/SPAK-NCC cascade. In addition, we also clarified that the WNK cascade is upregulated in salt-sensitive hypertension observed in chronic kidney disease (CKD). Proteasome inhibitor bortezomib were identified as a novel therapeutic candidate for fibrosis in CKD.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：高血圧 KLHL3 KLHL2 ナトリウム輸送体 塩分感受性

1. 研究開始当初の背景

申請者銭谷の所属する東京医科歯科大学腎臓内科学教室では、遺伝性の塩分感受性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型(PHAI)の原因として報告された WNK キナーゼの変異に注目し、これまで解析を進めてきた。高血圧には数多くの因子が関わっているが、PHAI のような単一遺伝子の異常で起こる高血圧性疾患について詳細を検討することは、腎臓におけるナトリウム調節、血圧調節に関わる多くのメカニズムの解明に有用であると期待される。これまでの当教室の研究の結果、WNK は、腎臓と血管平滑筋において transporter の制御を介して塩分感受性高血圧を制御していることが明らかとなり、WNK の様々な生体内制御因子も判明した(図 1.)。KLHL 蛋白の変異が PHAI を起こすことも近年わかり、KLHL3 が WNK の蛋白分解を制御することも判明した。



しかし、KLHL2 は KLHL3 と相同性が高いため血圧制御との関連が示唆されるものの、GWAS では脳神経系への関与も示唆されている。また、autophagy による KLHL2 を介した WNK シグナル制御機構は細胞実験を中心とした検討であり、血管をはじめ生体内での役割については証明されていない。

申請者銭谷は、腎外臓器での WNK の機能の一つとして、血管平滑筋における angiotensin II による WNK3-SPAK-NKCC1 リン酸化シグナルの亢進が血管を収縮させることを解明した(Hypertension 2013)。さらにこのカスケードにおける WNK3 の制御機構の解明を進めた結果、angiotensin II は SQSTM1/p62 による選択的 autophagy を介して KLHL2 の発現量を低下させ、KLHL2 の減少が WNK3 の分解を抑制し、WNK3-SPAK-NKCC1 のリン酸化カスケードを亢進させるという、angiotensin II による血管収縮における新たな分子機序を解明した(J Am Soc Nephrol. 2015)。

さらに、臨床に目を向けると、塩分感受性高血圧の重要な全身的合併症の一つとして慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)があり、逆に CKD も塩分感受性高血圧をさらに悪化させるという負の連鎖が存在する。しかし、この CKD の塩分感受性に対して WNK カスケードがどのように関わっているかは不明であった。また、CKD では組織の線維化が不可逆的に進行することが観察されるが、その機序も不明な点が多く、強力な治療法も存在しない。そのような状況下、他臓器においてプロテアソーム阻害剤が線維化を抑制するという報告が近年なされており、その一つとして多発性骨髄腫の治療薬であるボルテゾミブが肝臓や皮膚において抗線維化効果を発揮することが報告されていた。しかしボルテゾミブの腎臓における抗線維作用を検証した報告は存在しなかった。

さらに、臨床に目を向けると、塩分感受性高血圧の重要な全身的合併症の一つとして慢性腎臓病(Chronic kidney disease: CKD)があり、逆に CKD も塩分感受性高血圧をさらに悪化させるという負の連鎖が存在する。しかし、この CKD の塩分感受性に対して WNK カスケードがどのように関わっているかは不明であった。また、CKD では組織の線維化が不可逆的に進行することが観察されるが、その機序も不明な点が多く、強力な治療法も存在しない。そのような状況下、他臓器においてプロテアソーム阻害剤が線維化を抑制するという報告が近年なされており、その一つとして多発性骨髄腫の治療薬であるボルテゾミブが肝臓や皮膚において抗線維化効果を発揮することが報告されていた。しかしボルテゾミブの腎臓における抗線維作用を検証した報告は存在しなかった。

2. 研究の目的

前述のように KLHL3 が WNK4 の蛋白分解を制御することは解明されており、また KLHL3 に相同性の高い KLHL2 が血管における WNK3 シグナルを亢進させることも申請者銭谷は報告したが、生体での KLHL2 の役割や生理的意義は依然不明である。さらに KLHL3 についても腎外臓器での制御機構や他の機能については未解明な点が多い。そこで本研究では、KLHL2 および KLHL3 ノックアウトマウス等を用い、これらの疑問を解決することを目標とした。また、CKD における塩分感受性への WNK の関与様式についての解明と、ボルテゾミブの CKD 治療への有用性の評価についても目標とした。

3. 研究の方法

(1) KLHL2 ノックアウトマウスの作製と解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて KLHL2 ノックアウトマウスを作製し、血圧測定や血管トーン測定、さらに血管での WNK3-SPAK-NKCC1 カスケードの変化を western blotting 法などで確認することで、KLHL2 の血管における生体内での生理的意義を検討した。また低塩食や angiotensin II 投与においても同様の検討を行い、これらの刺激下における KLHL2 の役割を調べた。さらに、KLHL2 は血管以外でも WNK 蛋白の制御に関与している可能性があり、KLHL2 ノックアウトマウスの表現型解析により、脳神経系を含めた腎外臓器への発現と機能を解析した。

(2) KLHL3 ノックアウトマウスの作製と解析

KLHL3 の遺伝子改変を行った ES 細胞を用いて、KLHL3 プロモーター下に β -galactosidase を発現する KLHL3 KO マウスを作製した。このマウスの血圧などの表現型を確認し、生体内での KLHL3 の生理的意義を検討した。また腎臓における KLHL3 の発現を確認し、腎臓や他臓器での WNK カスケードの制御の解析を通して KLHL3 の機能について検討した。さらに、KLHL3^{R528H/+} ノックインマウスの解析から変異型 KLHL3^{R528H} の dominant negative 効果が示唆されたが、その機序は不明であったことから、その機序を探るために、HEK293T 細胞に KLHL3 蛋白を強制発現させ、共免疫沈降を行った。

(3) CKD における塩分感受性への WNK の関与様式についての解明と、ボルテゾミブの CKD 治療への有用性の評価

CKD 動物モデルとして、腎毒性薬剤によるアリストロキア酸(AA)腎症、アデニン腎症マウスモデルを利用した。これらのマウスに高塩食を摂取させ、血圧変化と WNK カスケード上の各因子のシグナルを評価した。また、AA 腎症マウスを CKD 線維化モデルとしても利用し、ボルテゾミブの腎線維化改善効果について検証した。C57BL/6J マウスに対し AA およびボルテゾミブを 10 週間投与し、腎機能、腎傷害マーカー、組織学的変化を観察した。

4. 研究成果

(1) KLHL2 ノックアウトマウスの作製と解析

KLHL2 ノックアウトマウスについて、まず、KLHL3-WNK-SPAK/OSR1-NCC という確立された実験方法のある腎臓で KLHL2 が WNK-SPAK/OSR1 カスケードに与える影響を検証した。腎臓での WNK4 蛋白の発現量をウェスタンブロットにより評価したところ、KLHL2 を発現し

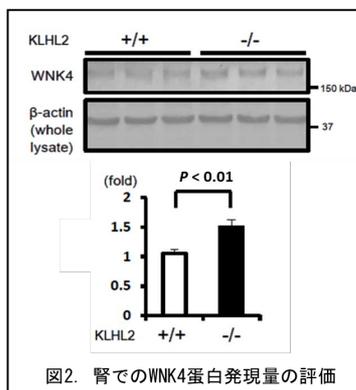


図2. 腎でのWNK4蛋白発現量の評価

ている control マウスと比較して KLHL2 ノックアウトマウスで有意に増加し

ていることが確認できた(図 2)。にもかかわらず、WNK4 の下流にある SPAK、OSR1、NCC のリン酸化の亢進は確認できず(図 3)、後述する KLHL3 ノックアウトマウスのような PHA2 様の表現型(高カリウム血症、代謝性アシドーシス)も示さなかった。KLHL2 の発現部位が腎髄質優位であり、NCC の発現部位である遠位尿細管での発現が少ないためであると考えられた(図 4)。以上の研究成果を論文発表した(Biochem Biophys Res Commun. 2017)。

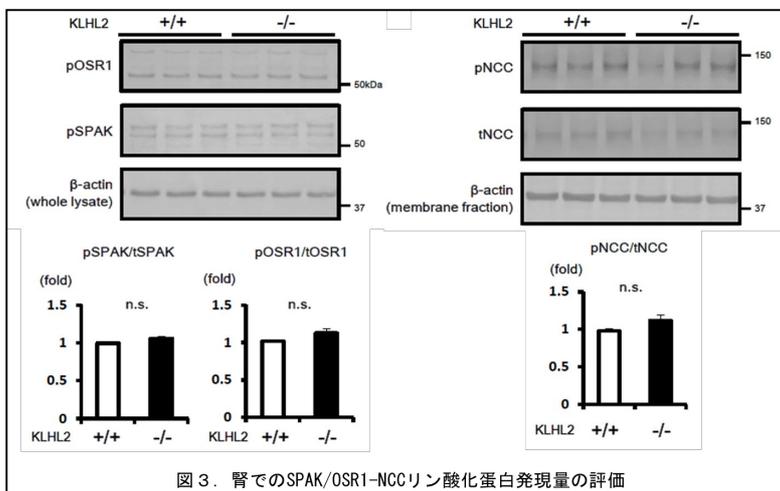


図3. 腎でのSPAK/OSR1-NCCリン酸化蛋白発現量の評価

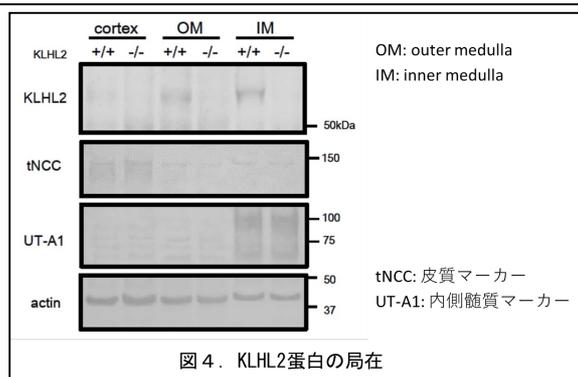


図4. KLHL2蛋白の局在

(2) KLHL3 ノックアウトマウスの作製と解析

作製した KLHL3 ノックアウトを用いて、KLHL3 は腎臓以外にも脳など複数の臓器に発現していることを明らかとした(図 5)。

KLHL3 ノックアウトマウスの腎臓では WNK1 と WNK4 の上昇を認め、高血圧など偽性低アルドステロン症 2 型(PHA2)の表現系を示した(図 6)。しかしながら、腎臓以外の臓器では WNK キナーゼの上昇は認められず、腎臓以外の表現系も認められなかつ

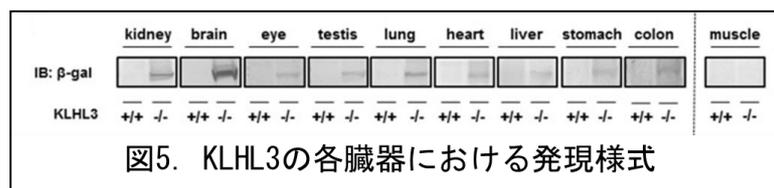
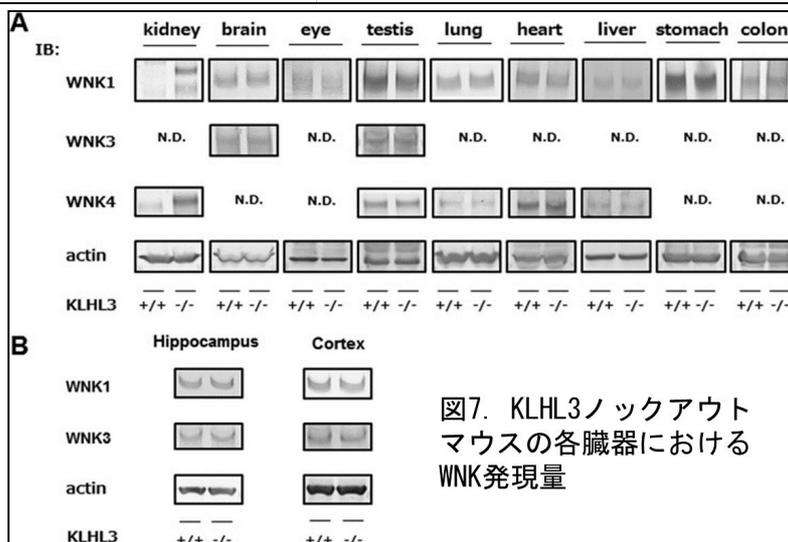
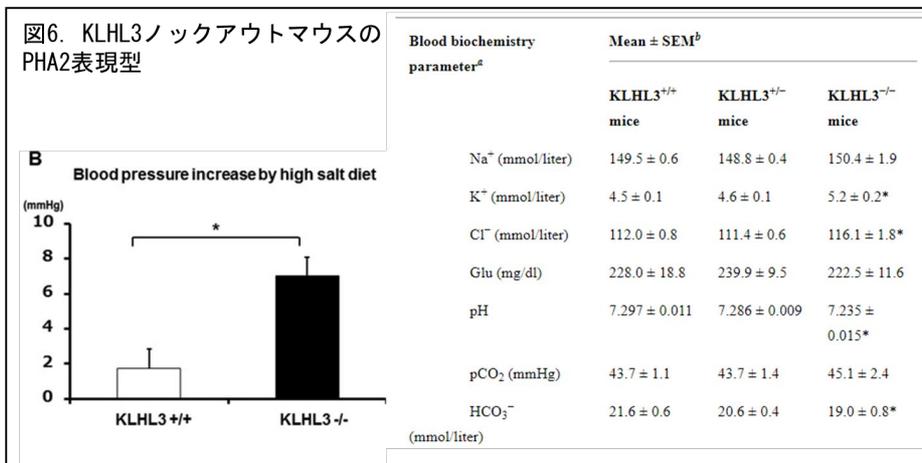


図5. KLHL3の各臓器における発現様式

た(図7)。また、変異 KLHL3 によって起こる PHA2 は変異 KLHL3 のドミナントネガティブ効果であることを明らかとした。以上の研究成果を論文発表した(Mol Cell Biol 2017)。



(3) CKDにおける塩分感受性へのWNKの関与様式についての解明と、ボルテゾミブのCKD治療への有用性の評価

AA腎障害マウスモデルは塩分感受性高血圧を示し、WNK1の蛋白発現亢進とSPAK/NCCのリン酸化亢進が認められた(図8)。これらの変化はアデニン腎症でも同様であった。CKDにおける塩分感受性高血圧にWNKが関与している可能性を示した(米国腎臓学会にて学会発表, 2018)。

また、ボルテゾミブをアリストロキア酸による薬剤性腎障害マウスモデルに投与したところ、腎臓における線維化、炎症、アポトーシスに関わるマーカーの改善(図9)及び、血清クレアチニンや腎組織所見の増悪の抑制が認められた。さらにボルテゾミブは、AA腎症病態の本態として知られるTGF-β1-Smad3シグナルの病的亢進状態を改善することも示し、これが線維化改善効果の機序の一端と推察された。ボルテゾミブは承認薬であるため実用化への問題点も少ないと考えられ、新たな腎障害治療薬となる可能性を示した(Sci Rep. 2017)。

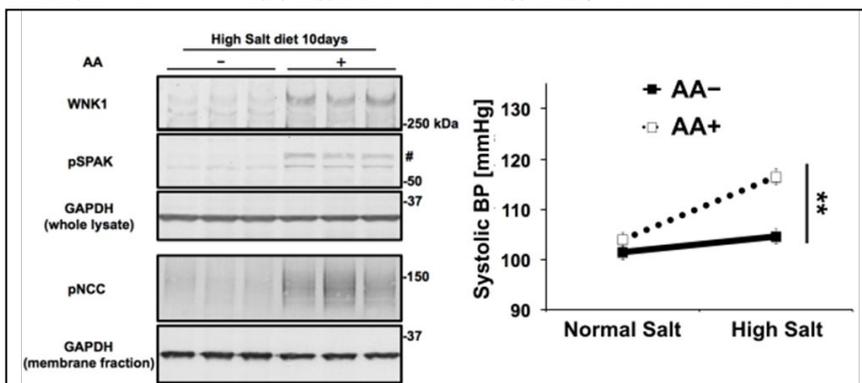


図8. AA腎症CKDマウスにおけるWNKカスケードと塩分感受性高血圧

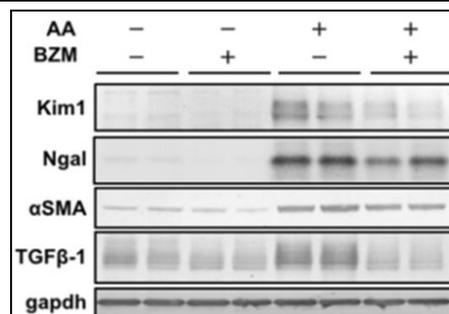


図9. AA腎症マウスにおけるボルテゾミブの保護効果

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. 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. 2018 Jan 30;38(1). pii: BSR20171243. doi: 10.1042/BSR20171243. Print 2018 Feb 28. 査読有 .
2. Zeniya M, Mori T, Yui N, Nomura N, Mandai S, Isobe K, Chiga M, Sohara E, Rai T, Uchida S. The proteasome inhibitor bortezomib attenuates renal fibrosis in mice via the suppression of TGF- β 1. Sci Rep. 2017 Oct 12;7(1):13086. doi: 10.1038/s41598-017-13486-x. 査読有 .
3. 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. 2017, 487:368-374. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.068. 査読有 .
4. 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. 2017, 37(7). doi: 10.1128/MCB.00508-16. 査読有 .
5. 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. 2017, 118-127. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.011. 査読有 .

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Taisuke Furusho, Eisei Sohara, Shintaro Mandai, Hiroaki Kikuchi, Fumiaki Ando, Moko Zeniya, Takayasu Mori, Naohiro Nomura, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida. WNK1-SPAK-NCC Signaling Cascade Is Involved in Salt Sensitive Hypertension Induced by Aristolochic Acid Nephropathy. The 51st Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2018 年 10 月. (San Diego, USA)
2. Yuri Kasagi, Daiei Takahashi, Tomomi Aida, Hidenori Nishida, Naohiro Nomura, Moko Zeniya, Takayasu Mori, Emi Sasaki, Fumiaki Ando, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, Eisei Sohara. Generation and Analysis of KLHL2 Knockout Mice. The 50th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2017 年 11 月. (New Orleans, USA)
3. 銭谷 慕子, 森 崇寧, 油井 直史, 野村 尚弘, 千賀 宗子, 高橋 大栄, 蘇原 映誠, 頼 建光, 内田 信一. 新規腎線維化改善薬としての bortezomib の検討 .第 60 回日本腎臓学会学術集会 2017 年 5 月 仙台国際センター (宮城県仙台市)
4. 笠木 祐里, 蘇原 映誠, 相田 知海, 高橋 大栄, 西田 秀範, 野村 尚弘, 銭谷 慕子, 森 崇寧, 佐々木 絵美, 安藤 史顕, 頼 建光, 内田 信一. KLHL2 は腎臓で WNK4 蛋白の分解を行う . 第 60 回日本腎臓学会学術集会 2017 年 5 月 仙台国際センター (宮城県仙台市)

〔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〕

プレスリリース: 多発性骨髄腫治療薬のボルテゾミブは腎臓の線維化を抑制する-新しい慢性腎臓病治療薬となる可能性-

http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20171017_1.pdf

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※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。