

令和元年6月26日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16097

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症における翻訳後修飾異常の解明

研究課題名(英文) Aberrant post-translational modification in diabetic nephropathy

研究代表者

石澤 健一 (Ishizawa, Kenichi)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：10772684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アンジオテンシンIIの新規エフェクターであるユビキチンリガーゼ構成分子Kelch-like 3(KLHL3)の翻訳後修飾による機能調節に焦点をあて、その異常と糖尿病性腎症の関連を解析した。db/dbマウスの腎臓で、KLHL3のリン酸化とPKC活性が増加し、PKC阻害薬によりIn vitroとIn vivoでKLHL3のリン酸化は抑制された。さらに、SGLT2阻害薬(Ipragliflozin)がKLHL3の機能異常を改善する可能性があることを示した。また、KLHL3のリン酸化が制御されるメカニズムを探索する過程で、CalcineurinがKLHL3を脱リン酸化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はKLHL3のリン酸化の病的意義を解明を目指すものであるが、糖尿病性腎症におけるKLHL3のリン酸化異常を突き止めたことで、病態の分子基盤の一部が解明されることとなり、臨床的有用性が高い。また、CalcineurinがKLHL3-S433を脱リン酸化することを見出したが、Calcineurin阻害薬(CNI)は免疫抑制薬として臨床で頻用されている。CalcineurinがKLHL3の脱リン酸化酵素として働くことは重要な結果であるが、CNIによる高血圧の病態の一部を解明したことは、臨床的にも重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the post-translational modification of ubiquitin ligase component Kelch-like 3 (KLHL3), a novel effector of angiotensin II, and analyzed its association with diabetic nephropathy. Phosphorylation of KLHL3 was increased in the kidney of db/db mice. Renal PKC was also increased, and PKC inhibitor suppressed KLHL3 phosphorylation in vitro and in vivo. We also found that an SGLT2 inhibitor ipragliflozin ameliorated the dysregulation of KLHL3. Moreover, in an effort to dissect the mechanisms that regulate KLHL3 phosphorylation, we found that Ser/Thr phosphatase calcineurin dephosphorylates KLHL3.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 KLHL3 リン酸化 脱リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症の病態にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン(RAA)系の病的活性化が関与することは良く知られているものの、その分子基盤は十分に明らかとなっていない。一方で、遺伝性高血圧の一種である偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAI; 家族性高カリウム性高血圧症) の新たな原因遺伝子として同定された Kelch-like 3 (KLHL3) は RING-E3 コピキチンリガーゼの targeting molecule であり、WNK キナーゼや Claudin といった腎遠位ネフロンにて電解質輸送に関わる分子群の発現をコピキチン-プロテアソーム系を介して制御している (Shibata et al. Proc Natl Acad Sci 2013; Gong Y Proc Natl Acad Sci 2013 など)。興味深いことに、アンジオテンシン II がプロテインキナーゼ C を介して KLHL3 の基質結合領域 (Ser433) をリン酸化することで KLHL3 と基質の会合を抑制し、この機構により遠位ネフロン構成細胞の作用が連動し、食塩の再吸収が最大化されることが明らかとなっている (Shibata et al. Proc Natl Acad Sci 2014)。

我々は、様々な疾患モデルを用いて KLHL3 の関与を検討しており、そのひとつとして、血清カリウムが腎臓の KLHL3 活性を制御することを見出した (Ishizawa K et al. Biochem Biophys Res Commun. 2016)。KLHL3 の腎臓内シグナル伝達分子としての役割の解析により、様々な腎臓疾患の病態が解明される可能性があるが、これらの生理的機構の腎疾患における病理的役割については十分に解明されていない。特に糖尿病性腎症では PHAI と同様に高血圧と高カリウム血症が合併しやすいこと、またその病態に腎臓内 RAA 系の制御異常が想定されることから、KLHL3 の活性異常が関与している可能性も十分に考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では KLHL3 のリン酸化の制御機構を解析し、糖尿病性腎症における病的役割を解明する。さらに、KLHL3 の制御機構として脱リン酸化酵素の探索に取り組む。

### 3. 研究の方法

#### (1) KLHL3 リン酸化の病的役割の解明

糖尿病性腎症モデルにおける腎臓 KLHL3 リン酸化の制御について解析する。KLHL3 特異的リン酸化抗体を用いて、db/db マウスモデルの腎臓内 KLHL3 リン酸化蛋白を Western blotting 法を用いて評価する。さらに様々な阻害薬を用いた薬理介入によりシグナル伝達の詳細を解明する。腎臓内の KLHL3 の存在部位については、免疫染色で評価し、機序の詳細を検討するために、培養細胞を用いて実験を行う。

#### (2) KLHL3 脱リン酸化酵素の探索

PKC は KLHL3-S433 のリン酸化を担う酵素であるが、KLHL3 の脱リン酸化を担う酵素として、各種薬剤を用いて In vivo In vitro で検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 糖尿病性腎症における KLHL3 リン酸化の病的意義

対照群 (db/+) と比較して、db/db の腎臓で PKC 活性化と共に KLHL3 のリン酸化が増加し、NCC の活性化も認められた。免疫染色では NCC とリン酸化 KLHL3 の共局在が確認された。本モデルの KLHL3 リン酸化異常の機序を明らかにするため HEK 細胞と遠位尿細管細胞で検討を行い、培地への糖負荷に伴って KLHL3 のリン酸化を認めた。なお、In vitro と In vivo で PKC 阻害薬により KLHL3 のリン酸化が抑制された。db/db に対して SGLT2 阻害薬 (ipragliflozin; Ipra) と PPAR $\gamma$  アゴニスト (pioglitazone; Pio) の投与を行ったところ、両薬剤で有意な血糖降下を認めたが、Ipra 群でのみ NCC 活性と KLHL3 のリン酸化が抑制された。腎臓の PKC 活性も Pio 群に比して Ipra 群で低値であった。以上の結果より、肥満糖尿病における食塩再吸収亢進に KLHL3 の関与が示され、SGLT2 阻害薬は KLHL3 の機能異常を改善する可能性が考えられた。

#### (2) KLHL3-S433 は calcineurin によって脱リン酸化される

KLHL3 遺伝子を導入した HEK293 細胞と遠位尿細管細胞 (mDCT 細胞) に Ionomycin を添加すると、KLHL3 リン酸化は抑制された。この Ionomycin による KLHL3 リン酸化の抑制は、calcineurin 阻害薬である Tacrolimus によって抑制された。次に、KLHL3 遺伝子を導入した HEK 細胞の calcineurin A のノックダウンしたところ、Ionomycin 投与下で抑制される KLHL3 のリン酸化は、増加に転じた。KLHL3 を脱リン酸化する直接的な証明として、In vitro phosphatase assay を行い、calcineurin が KLHL3-Ser433 を脱リン酸化することを見出した。これらの事実を in vivo で検討するため、C57/BL6 に Tacrolimus を投与し、腎臓の蛋白を解析したところ、KLHL3 リン酸化は増加し、WNK1/4、P-SPAK/OSR1、P-NCC、NCC も増加した。また、野生型 KLHL3 (KLHL3-WT) と WNK4 を導入した HEK 細胞に Tacrolimus を投与すると、WNK4 は増加し、この変化は変異型 KLHL3 (KLHL3-S433A) では生じなかった。WNK4 のコピキチン化の変化を見るため、KLHL3 と WNK4 を導入した HEK 細胞に Vehicle と Tacrolimus を投与し、免疫沈降法で WNK4 を抽出した。Tacrolimus 投与検体では WNK4 のコピキチン化が減少しており、KLHL3/Cul3 複合体を介した WNK4 の結合またはユ

ピキチン化の減少により、WNK4 が増加していることが示唆された。  
HEK 細胞に KLHL3 遺伝子を導入し、培地のカリウム濃度を増加させたところ、KLHL3-S433 のリン酸化は減少した。この高カリウム状態で Tacrolimus を投与すると、KLHL3-S433 の脱リン酸化は抑制された。この結果より、calcineurin による KLHL3-S433 の脱リン酸化はカリウムによって誘導されることが示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Ishizawa K, Wang Q, Li J, Yamazaki O, Tamura Y, Fujigaki Y, Uchida S, Lifton RP, Shibata S. Calcineurin dephosphorylates Kelch-like 3, reversing phosphorylation by angiotensin II and regulating renal electrolyte handling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Feb 19;116(8):3155-3160. doi: 10.1073/pnas.1817281116. (査読有)

Yamazaki O, Ishizawa K, Hirohama D, Fujita T, Shibata S. Electrolyte transport in the renal collecting duct and its regulation by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Jan 8;133(1):75-82. doi: 10.1042/CS20180194 (査読有)

Nemoto Y, Kumagai T, Ishizawa K, Miura Y, Shiraishi T, Morimoto C, Sakai K, Omizo H, Yamazaki O, Tamura Y, Fujigaki Y, Kawachi H, Kuro-O M, Uchida S, Shibata S. Phosphate binding by sucroferic oxyhydroxide ameliorates renal injury in the remnant kidney model. *Scientific Reports* 2019 Feb 11;9(1):1732. doi: 10.1038/s41598-018-38389-3. (査読有)

Shibata S, Ishizawa K, Wang Q, Xu N, Fujita T, Uchida S, Lifton RP. ULK1 Phosphorylates and Regulates Mineralocorticoid Receptor. *Cell Reports* 2018 Jul 17;24(3):569-576. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.072. (査読有)

Toyoki D, Shibata S, Kuribayashi-Okuma E, Xu N, Ishizawa K, Hosoyamada M, Uchida S. Insulin stimulates uric acid reabsorption via regulating urate transporter 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017 Sep 1;313(3):F826-F834. doi: 10.1152/ajprenal.00012.2017 (査読有)

Xu N, Hirohama D, Ishizawa K, Chang WX, Shimosawa T, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Hypokalemia and Pendrin Induction by Aldosterone. *Hypertension* 2017 May;69(5):855-862. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08519 (査読有)

Shibata S, Ishizawa K, Uchida S. Mineralocorticoid receptor as a therapeutic target in chronic kidney disease and hypertension. *Hypertens Res*. 2017 Mar;40(3):221-225. doi: 10.1038/hr.2016.137 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

Ishizawa K, Wang Q, Li J, Xu N, Nemoto Y, Morimoto C, Fujita T, Uchida S, Shibata S. Dysregulation of the ubiquitin ligase component kelch-like 3 causes Na-Cl cotransporter activation and salt retention in obese diabetic mice. American Society of Nephrology Kidney week 2018, SA-PO104, October 27, 2018, San Diego Convention Center, USA

石澤 健一、王 琴、山崎 修、田村 好古、内田 俊也、柴田 茂、肥満糖尿病の病態における KLHL3 リン酸化異常の関与の検討、第 41 回日本高血圧学会総会、OB03-04、2018 年 9 月 15 日 星野リゾート OMO7、旭川

石澤健一、柴田 茂、内田俊也: 食塩感受性高血圧の成因としてのユビキチンリガーゼ KLHL3 の役割; 第 40 回日本高血圧学会総会、SY7-1、2017 年 10 月 21 日、ひめぎんホール、愛媛

Ishizawa K, Uchida S, Shibata S. Pathogenic role of ubiquitin ligase KLHL3 in diabetic nephropathy. AHA Council of Hypertension ,AHA Council on kidney in Cardiovascular Disease ,American Society of Hypertension Joint Scientific Sessions2017 Oral81, New Investigator Award for Japanese Fellow, September 16, 2017, Hyatt Reagency San Francisco,USA

〔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

<http://www2.med.teikyo-u.ac.jp/nephrology/>

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。