

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15970

研究課題名(和文) WNK4の下流シグナルの網羅的解析によるメタボリック症候群新規治療薬の開発

研究課題名(英文) New drug development for metabolic syndrome via WNK4 signaling analysis

研究代表者

磯部 清志 (Isobe, Kiyoshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座助教

研究者番号：80804591

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)：本態性高血圧やメタボリック症候群(MetS)といった生活習慣病は、本邦疫学調査によれば男性の約25%、女性の10%程度が罹患するとされ、心腎血管障害の危険因子として知られている。MetSは臨床的に極めて重要な治療ターゲットである事に疑いはない。生理的にも血圧制御に重要な役割を果たすWith no lysin kinase (WNK)は、白色脂肪細胞において脂肪分化を制御していることを発見した。本研究ではWNK4 KO細胞を作成し、その形質を解析すること、また質量分析を行うことでWNK4シグナルのより詳細なシグナル解析を行うことを目標としたもので、新たなシグナルを発見することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボリック症候群(MetS)は高血圧・肥満・耐糖能異常を三徴とする国民病であり、重大な心血管合併症との強い因果関係をもつ。塩分感受性高血圧発症に重要な働きを示すことが明らかになっているWNKキナーゼシグナルは、これまでの研究と本研究から脂肪細胞分化に関しても重要な働きをしていることが明らかになっている。このWNKキナーゼの細胞内シグナルを詳細に分析することにより新たな治療薬開発へとつながることが期待される。そしてMetSを未然に防ぐことは、健康寿命延長とともに医療費の抑制に大きく貢献することになる。

研究成果の概要(英文)：According to Japan epidemiological investigation, 25% of adult male and 15% of adult female have life-style related disease, such as essential hypertension and obesity. The life-style related diseases are one of the major risk factor of coronary and kidney vascular disorders. WNK kinases, which physiologically plays an important role to control blood pressure levels, regulate white adipose cell differentiation. WNK kinase signaling remains unclear except SPAK/OSR11 kinase. We report that the effect of WNK kinase to adipose cell differentiation is independent of SPAK/OSR1 kinases. Therefore, in this investigation, we focus on WNK4 signaling in renal distal convoluted tubule cell and adipose cell. We analyzed WNK4 signal transduction using WNK4 knock out cell lines. We succeeded to find out novel WNK4 signaling.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：脂肪分化 WNK4 3T3-L1 メタボリックシンドローム PPAR C/EBP 塩分感受性高血圧

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本態性高血圧やメタボリック症候群 (MetS) といった生活習慣病は、本邦疫学調査によれば男性の約 25%、女性の 10% 程度が罹患するとされ、まさに国民病と言える。その上 MetS は心筋梗塞、脳卒中、慢性腎不全などの重大な心腎血管障害の危険因子として知られている。MetS の主要徴候である高血圧症、肥満、耐糖能異常に対する治療は、健康寿命の延長、予防医学的見地からの医療費の抑制という視点で、臨床的に極めて重要な治療ターゲットである事に疑いはない。これまでに申請者は遺伝性高血圧症の解析を通じて、生理的にも血圧制御に重要な役割を果たす With no lysin kinase (WNK) は、白色脂肪細胞において脂肪分化を制御していることを発見した。

申請者の所属する東京医科歯科大学腎臓内科学研究室では、遺伝性塩分感受性高血圧症である偽性程アルドステロン症 II 型 (PHAII) の原因遺伝子である WNK キナーゼの解析を通じて、WNK は腎において OSR1 及び SPAK キナーゼという基質を介して、SLC12A ファミリーに属する各種輸送体を正に制御する WNK-OSR1/SPAK-SLC12A 輸送体シグナルという重要な血圧制御系を発見し報告した (Cell Metab. 2017)。また WNK はインスリンやアルドステロンなどの液性因子によって制御されている事を確認した (J Cell Sci 2011; PNAS 2011; Hypertension 2012, 2013, 2015)。その後、E3 コピキチンリガーゼである Kelch-like protein 3 (KLHL3)、Cullin 3 が新たに PHAII の原因遺伝子として同定され、それらが WNK キナーゼを分解制御し、シグナル制御に重要な役割を果たしている事を、申請者機部を含む我々のグループが解明している (Cell Rep. 2013)。また血管では、WNK は同様に SPAK のリン酸化を経て、SLC12A family に属する Na-K-2Cl 共輸送体 (NKCC) 1 の活性化にも関与し、血管トーンスを制御している事を報告している (J Am Soc Nephrol. 2015)。このように、WNK シグナル伝達系は、腎と血管において生理的な血圧制御に重要な役割を果たしている。

また我々が作成した WNK4 ノックアウトマウスの解析では、高脂肪食に対する肥満耐性、脂肪細胞分化抑制、耐糖能の維持という表現系が観察され、これは脂肪細胞分化のマスタレギュレーターとして知られる PPAR の抑制を伴った現象であることを、世界で初めて明らかにした (EBioMedicine. 2017)。すなわち WNK4 の機能を制御することが出来れば、塩分感受性高血圧の改善のみならず、肥満抑制及び耐糖能改善が期待され、MetS の革新的治療策が見いだせる可能性が高い。

### 2. 研究の目的

上記のような背景から、WNK4 をターゲットとした治療戦略が想起される一方で、脂肪細胞では腎や血管における血圧制御系の維持に重要な SPAK のリン酸化活性に変化がなく、ノックダウン実験でも下流への影響を認めなかった。また NKCC1 阻害薬である bumetanide を用いた実験では障害されなかった。このことから、脂肪細胞における WNK4 の基質は SPAK と異なるかと推測されるが、その詳細な機序は未だ明らかではない (図 1)。脂肪細胞および腎遠位尿細管における WNK シグナル機序を明らかにすることで、WNK4 シグナル阻害薬創薬への基盤を形成することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) WNK4 ノックアウト培養細胞の作成

CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いて WNK4 ノックアウト細胞株の確立を目指す。白色脂肪細胞に分化する 3T3-L1 細胞、腎遠位尿細管培養細胞 (mpkDCT) を用いて、Cas9ヌクレアーゼ、guide RNA、GFP を一塊にコードしたプラスミドベクターを一過性にトランスフェクションする。FACS を用いてシングル GFP 発現培養細胞を単離しクローン化、培養増殖させたのち、ウエスタンブロッティングにより個別のクローンについて WNK4 発現を確認する。続いて Sanger Sequence で配列検証を行う。

#### (2) WNK4 KO 細胞の形質の評価

得られた WNK4 ノックアウト細胞の形質の評価を行う前に、single cell sorting による artifact effect を確認した。Single cell 化すること自体で形質に変化が出ることが知られているためである。WNK4 を活性化する刺激 (低浸透圧刺激・アンジオテンシン II、アルドステロン、Forskolin など) を行い、WNK4 シグナルに変化が生じていることを確認する。

#### (3) WNK4 ノックアウト細胞のリン酸化プロテオミクスの解析

質量分析結果を WNK4 ノックアウト細胞と Control 細胞を比較するため SILAC 法を用いる (図 2)。SILAC によりラベリングされた両者の細胞を同様の条件で培養する。細胞を融解し同質量で混合し、一部をタンパク質総量の解析に使用し、残りをリン酸化ペプチドのみを吸着するカラムを用いてリン酸化ペプチドの抽出を行う。これらの前処理が終了した後、検体を LC-MS/MS 解析を行う。

### 4. 研究成果

WNK4 の脂肪分化への関与また、WNK4 の下流シグナルは SPAK/OSR1 以外にはほとんど知られていないことから、WNK4 自体の機能も不明な点が多い。WNK4 は腎遠位尿細管で塩分出納に関与する Na-Cl 共輸送体 (NCC) の主要な調節因子であり、腎と脂肪での WNK4 シグナルを同時に解析する

ことは、肥満や高血圧といった治療法につながるものと思われる。

(1) WNK4 ノックアウト培養細胞の作成  
 脂肪分化能を有する 3T3-L1 細胞とマウス腎遠位尿細管細胞である mpkDCT 細胞を使用し、CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を利用し WNK4 KO 細胞を複数クローン作製することに成功した。(図 1 ; mpkCCD 細胞を使用した WNK4 KO 細胞のウエスタンブロットティング) WNK4 キナーゼの下流に SPAK があることが知られており、WNK4 が活性化すると低浸透圧刺激で下流の SPAK のリン酸化も増加する。WNK4 KO マウスでは SPAK のリン酸化は著明に減少していた。mpkDCT での WNK4 KO 細胞では、下流の SPAK のリン酸化は低浸透圧刺激に反応してリン酸化の増加が認められた(図 2)。培養細胞はマウスとは異なる形質を示していた。SPAK の上流には WNK4 と同じ WNK ファミリーの WNK1 も発現しており培養細胞では WNK1 によりリン酸化の刺激を受けていることが予想される。さらに WNK4 を活性化することが知られているさまざまな刺激因子で刺激し、SPAK リン酸化の変化を検討した。WNK1 と WNK4 の両方の刺激因子があり WNK4 依存的な刺激因子が何かを調べるためである。用いた刺激因子は浸透圧刺激・アンジオテンシン II、アルドステロン、Insulin、Forskolin、IBMX である。このうち、Forskolin と IBMX では Control では SPAK のリン酸化の亢進は既報と同じように観察することができたが、WNK4 KO では観察されなかった。PKA を介した WNK4 の活性化に関しては、WNK1 を介さず、WNK4 依存性である可能性が示された。WNK1 と WNK4 の役割の違いに関しては、CKD モデルマウスを用いた研究も行っており、TNF が NEDD4-2 の減少させ、その結果 WNK1 の細胞内発現量が増加し、CKD での塩分感受性高血圧発症を誘導していることを明らかにしている。

また同時に 3T3-L1 培養細胞を用いても WNK4 KO 細胞を作成している。3T3-L1 培養細胞は文化刺激を行うため、培養細胞操作は慎重に行う必要があり、手技による影響を受けやすい。また繊細な細胞であるため KO の培養細胞作製に必要な Single cell sorting を行うと形質に影響を与えてしまうことが確認された。そのため、複数の Control 細胞と WNK4 KO 細胞を作成する必要があった。作成したそれぞれの培養細胞を用いて PPAR および C/EBP の発現が WNK4 KO で減少し脂肪分化率に関しても低下していることを確認した。

また WNK4 のインタラクトームの実験系も確立することができ、現在解析を進めている。

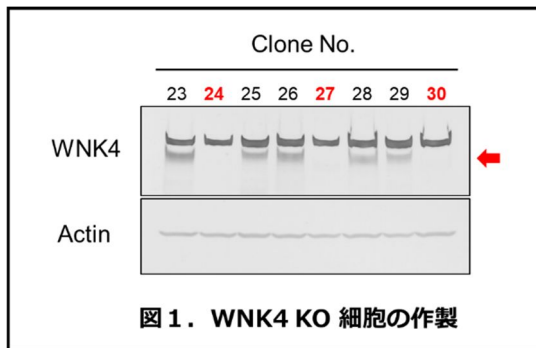
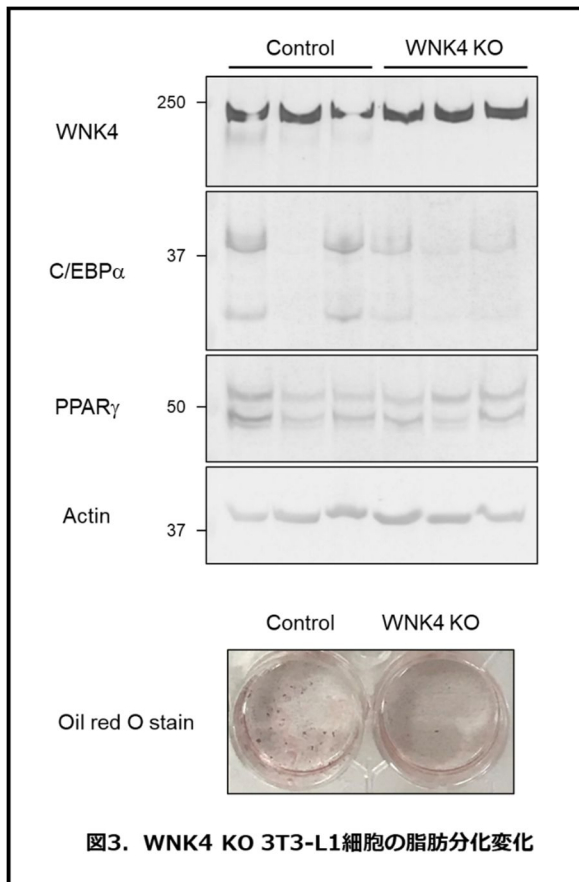
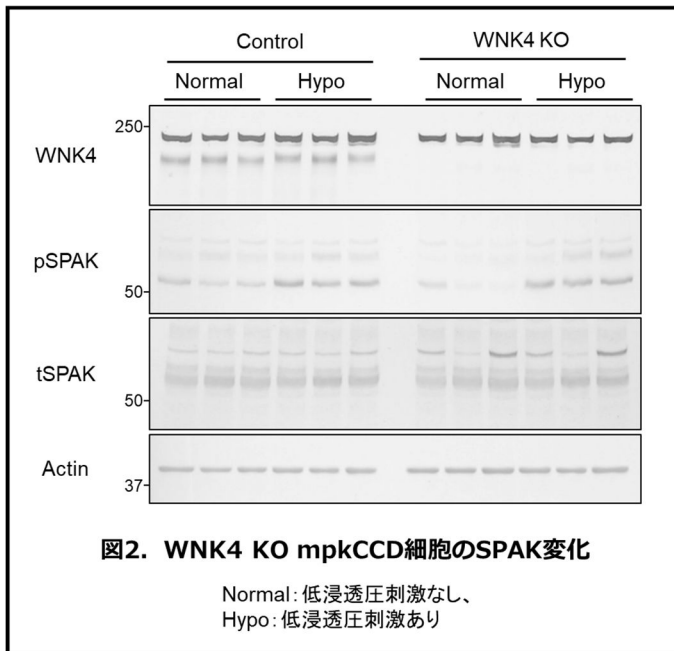


図 1. WNK4 KO 細胞の作製



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Hiroko, Nomura Naohiro, Shoda Wakana, Isobe Kiyoshi, Kikuchi Hiroaki, Yamamoto Kouhei, Fujimaru Takuya, Ando Fumiaki, Mori Takayasu, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 85
2. 論文標題 Metformin increases urinary sodium excretion by reducing phosphorylation of the sodium-chloride cotransporter	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 23 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2018.02.009	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Sayaka, Araki Yuya, Mori Takayasu, Sasaki Emi, Kasagi Yuri, Isobe Kiyoshi, Susa Koichiro, Inoue Yuichi, Bomont Pascale, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 22
2. 論文標題 Decreased KLHL3 expression is involved in the pathogenesis of pseudohypoaldosteronism type II caused by cullin 3 mutation in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1251 ~ 1257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-018-1593-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Hiroaki, Sasaki Emi, Nomura Naohiro, Mori Takayasu, Minamishima Yoji Andrew, Yoshizaki Yuki, Takahashi Naohiro, Furusho Taisuke, Arai Yohei, Mandai Shintaro, Yamashita Takahiro, Ando Fumiaki, Maejima Yasuhiro, Isobe Kiyoshi, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Sohara Eisei	4. 巻 95
2. 論文標題 Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 123 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2018.08.030	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiki Tamami, Ando Fumiaki, Murakami Kana, Isobe Kiyoshi, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Nomura Naohiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Tolvaptan activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway through PERK phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9245-9245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45539-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuura Yoshiaki, Nomura Naohiro, Shoda Wakana, Mori Takayasu, Isobe Kiyoshi, Susa Koichiro, Ando Fumiaki, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 517
2. 論文標題 Tacrolimus ameliorates the phenotypes of type 4 Bartter syndrome model mice through activation of sodium?potassium?2 chloride cotransporter and sodium?chloride cotransporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 364 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.086	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mandai Shintaro, Sato Hidehiko, Imori Soichiro, Naito Shotaro, Tanaka Haruna, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Isobe Kiyoshi, Mori Takayasu, Nomura Naohiro, Sohara Eisei, Okado Tomokazu, Uchida Shinichi, Fushimi Kiyohide, Rai Tatemitsu	4. 巻 130
2. 論文標題 Nationwide in-hospital mortality following major fractures among hemodialysis patients and the general population: An observational cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115122 ~ 115122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115122	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Isobe Kiyoshi, Raghuram Viswanathan, Krishnan Laya, Chou Chung-Lin, Yang Chin-Rang, Knepper Mark A.	4. 巻 318
2. 論文標題 CRISPR-Cas9/phosphoproteomics identifies multiple noncanonical targets of myosin light chain kinase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F600 ~ F616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00431.2019	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furusho Taisuke, Sohara Eisei, Mandai Shintaro, Kikuchi Hiroaki, Takahashi Naohiro, Fujimaru Takuya, Hashimoto Hiroko, Arai Yohei, Ando Fumiaki, Zeniya Moko, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Isobe Kiyoshi, Nomura Naohiro, Yamamoto Kohei, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 97
2. 論文標題 Renal TNF activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 713 ~ 727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.11.021	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----