

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17719

研究課題名(和文) 糖尿病性腎臓病の病態基盤におけるユビキチンリガーゼKLHL3の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of the ubiquitin ligase KLHL3 in the pathogenesis of diabetic kidney disease

研究代表者

石澤 健一 (Ishizawa, Kenichi)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：10772684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アンジオテンシン 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) のリン酸化に焦点を当て、糖尿病性腎臓病との関連を解析した。糖尿病モデルマウス(db/db)の遠位尿細管に加えて、ヘンレ系蹄太い上行脚(TAL)にもKLHL3-Ser433のリン酸化シグナルが認められ、また同部位に発現するNKCC2の発現亢進も認められた。さらに、ヒトにおけるリン酸化KLHL3の存在を検討し、ヒト腎生検検体ならびに尿exosome分画 でリン酸化KLHL3を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、糖尿病性腎臓病におけるKLHL3リン酸化の病的役割について検討し、病態の一端を解明した。また、ヒトにおいて腎臓と尿exosome分画でKLHL3リン酸化を検出したため、今後の臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the phosphorylation of the ubiquitin ligase component Kelch-like 3 (KLHL3), a novel effector of angiotensin II, and analyzed its relationship with diabetic kidney disease. In addition to the distal tubules of diabetic model mice (db/db), KLHL3-Ser433 phosphorylation signals are also observed in the thick ascending limb (TAL) of Henle's loop, and the expression of NKCC2 expressed at the same site is also upregulated. We also investigated the existence of phosphorylated KLHL3 in humans and detected phosphorylated KLHL3 in human renal biopsy specimens and urine exosome fractions.

研究分野：腎臓病学

キーワード：KLHL3 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

本邦における慢性腎臓病 (CKD) 患者は 1000 万人を超えると推定され、中でも新規透析療法導入患者の原疾患として約半数を占める糖尿病性腎臓病の新規治療薬の開発は急務となっている。

ユビキチン・プロテアソーム系は生体内における主要なタンパク質発現調節機構であり、ユビキチン化をシグナルとして標的タンパク質の分解を司っている。Kelch-like 3 (KLHL3) は腎臓尿細管に高発現する Cullin 型 RING-E3 ユビキチンリガーゼの構成分子であり (Boyden et al. Nature 2012)、WNK キナーゼや Claudin といった分子群の発現を制御している (Shibata et al. Proc Natl Acad Sci 2013 など)。申請者らのグループは腎臓におけるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 (RAA 系) の制御機構について一連の研究を行い、KLHL3 が腎臓におけるアンジオテンシン II の effector 分子であることを世界に先駆けて明らかにした (Shibata et al. Proc Natl Acad Sci 2014)。アンジオテンシン II は protein kinase C (PKC) を介して KLHL3 の基質結合領域に存在する Ser433 をリン酸化し、その結果、KLHL3 の基質結合能が失われ、WNK をはじめとする標的分子の分解抑制により尿細管における食塩再吸収などの様々な作用が発揮されるものと考えられる。

申請者は現在、様々な疾患モデルを用いて KLHL3 の関与を精力的に検討しているが、その過程で、糖尿病性腎臓病の病態に KLHL3 の活性異常が関与する可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、KLHL3 のリン酸化機構を解析し、糖尿病性腎臓病における病的役割を解明する。さらに、ヒト腎生検検体を用いて、KLHL3 リン酸化について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病性腎臓病における尿細管 KLHL3 の病的役割の解明

我々のこれまでの検討から、肥満糖尿病モデルマウス (db/db) の遠位尿細管において KLHL3-S433 が過剰リン酸化され、WNK の蓄積と NCC の活性化が認められることが明らかとなっている。KLHL3 の病的役割を解明するため、腎臓尿細管を中心に免疫染色と蛋白解析を行った。これまでの研究で、腎臓の KLHL3-Ser433 のリン酸化が低カリウムや高血糖に関連していることを明らかにしてきており、KLHL3 のリン酸化が全身に及ぼす影響について検討するため、Ser433 を遺伝的に改変したモデル動物 (KLHL3KI) を作成した。

### (2) ヒト腎生検検体を用いたリン酸化KLHL3の検討

これまでの我々の動物モデルでの検討から、糖尿病において KLHL3-Ser433 の過剰リン酸化が示されている。そこで、ヒトにおけるリン酸化KLHL3の存在を検討した。帝京大学腎臓研究室にて採取したヒト腎生検検体ならびに尿exosome分画 (uEV) を用い、KLHL3-Ser433 のリン酸化状態を評価した。uEV分画は超遠心法で単離し、exosomeマーカーであるalixで確認した。本研究は帝京大学倫理委員会の承認を得て行った (帝倫17-149; 19-119)。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖尿病性腎臓病における KLHL3 リン酸化の病的意義

肥満糖尿病モデルである db/db マウスにおいて KLHL3-Ser433 の過剰リン酸化が惹起されており、その結果、遠位尿細管に発現する Na-Cl 共輸送体(NCC)の活性が亢進し、食塩感受性高血圧を誘発しているものと考えられた。本モデルでは血漿レニン活性は抑制されており、また、ARB では KLHL3 リン酸化ならびに NCC 活性は抑制されなかったことから、KLHL3 の活性異常はアンジオテンシン II とは独立のメカニズムで制御されているものと考えられた。

糖尿病による体液異常と高血圧の関連を検討する中で Na-K-2Cl 輸送体 (NKCC2) の制御に関し予想外の結果が得られた。同モデルではヘンレ係蹄太い上行脚(TAL)にも KLHL3-Ser433 のリン酸化シグナルが認められ、また同部位に発現する NKCC2 の発現亢進も認められた。糖尿病モデルマウスにおいて、V2R が NKCC2 を制御していた。昨今、糖尿病性腎臓病において Tubuloglomerular Feedback (TGF) の異常と SGLT2 の関連が注目されているが、NKCC2 は SGLT2 とならんで TGF に関与する分子である。

TAL の NKCC2 活性亢進は distal delivery を減らし、TGF を介して過剰ろ過に関与している可能性があると考えられた。

##### (2) ヒト腎生検検体と尿exosome分画でリン酸化KLHL3を認める

腎組織の免疫染色で遠位尿細管を中心にリン酸化KLHL3の局在が確認された。ヒトuEVを用いた検討では、Western blotでリン酸化KLHL3に合致するシグナルが検出された。これらの結果から、ヒト腎臓とuEVにおいてもKLHL3のリン酸化を認めることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ochiai-Homma Fumika, Kuribayashi-Okuma Emiko, Tsurutani Yuya, Ishizawa Kenichi, Fujii Wataru, Odajima Kohei, Kawagoe Mika, Tomomitsu Yoshihiro, Murakawa Masataka, Asakawa Shinichiro, Hirohama Daigoro, Nagura Michito, Arai Shigeyuki, Yamazaki Osamu, Tamura Yoshifuru, Fujigaki Yoshihide, Nishikawa Tetsuo, Shibata Shigeru	4. 巻 44
2. 論文標題 Characterization of pendrin in urinary extracellular vesicles in a rat model of aldosterone excess and in human primary aldosteronism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 1557 ~ 1567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-021-00710-5	査読の有無 有
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 Wang Qin, Ishizawa Kenichi, Li Jinping, Fujii Wataru, Nemoto Yoshikazu, Yamazaki Osamu, Tamura Yoshifuru, Miura Yutaka, Nie Xuedan, Abe Ryo, Segawa Hiroko, Kuro-O Makoto, Shibata Shigeru	4. 巻 3
2. 論文標題 Urinary phosphate-containing nanoparticle contributes to inflammation and kidney injury in a salt-sensitive hypertension rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01298-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Kazuhiro, Yamazaki Osamu, Ishizawa Kenichi, Tamura Yoshifuru, Wang Qin, Ueno Masaki, Hayama Yuto, Fujigaki Yoshihide, Shibata Shigeru	4. 巻 524
2. 論文標題 Upregulation of renal Na-K-2Cl cotransporter 2 in obese diabetes mellitus via a vasopressin receptor 2-dependent pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 710 ~ 715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.142	査読の有無 有
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 Yamazaki Osamu, Hirohama Daigoro, Ishizawa Kenichi, Shibata Shigeru	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of the Ubiquitin Proteasome System in the Regulation of Blood Pressure: A Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5358 ~ 5358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishizawa Kenichi, Wang Qin, Li Jinping, Xu Ning, Nemoto Yoshikazu, Morimoto Chikayuki, Fujii Wataru, Tamura Yoshifuru, Fujigaki Yoshihide, Tsukamoto Kazuhisa, Fujita Toshiro, Uchida Shunya, Shibata Shigeru	4. 巻 30
2. 論文標題 Inhibition of Sodium Glucose Cotransporter 2 Attenuates the Dysregulation of Kelch-Like 3 and NaCl Cotransporter in Obese Diabetic Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 782 ~ 794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018070703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kenichi Ishizawa, Daigoro Hirohama, Ken Kaseda, Osamu Yamazaki, Shigeru Shibata
2. 発表標題 Creation and characterization of the ubiquitin ligase KLHL3-S433A knock-in mice
3. 学会等名 The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石澤健一、山崎修、田村好古、藤垣嘉秀、鶴谷悠也、西川 哲男、柴田茂
2. 発表標題 ヒト尿中exosome分画と腎免疫染色におけるコピキチンリガーゼKLHL3リン酸化の検討
3. 学会等名 第65回 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertensionの発表では、Best Poster Awardを獲得した。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------