

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08277

研究課題名(和文) 外来患者より見出した、低Mg血症、低K血症、高血圧症を伴う家系の分子遺伝学的解析

研究課題名(英文) molecular genetic analyses of a family with hereditary hypo Mg, hypo K, and hypertension

研究代表者

貝森 淳哉 (Kaimori, Jun-Ya)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授

研究者番号：70527697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：野生型および本症例の変異Ankyrin-3をHEK293細胞に導入すると、野生型に比べ変異型Ankyrin-3の発現量が増加していた。これは、ANK3のユビキチンリガーゼであるCDC20が、変異Ankyrin-3蛋白に結合出来ず、結果的にubiquitin-proteasome系で分解されにくくなることが判明した。また、電気生理学的な検討では、変異型Ankyrin-3がよりKv1.1のKチャンネル電流をより一層抑制し、低Mg血症の原因となる可能性が示唆された。また、この変異ANK3遺伝子変異を持つ、ノックインマウスを作成して病態生理学的な解析をしたところ、本患者と同様の病態を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、日本から全く新しい電解質異常を伴う遺伝性高血圧症の発見に寄与する可能性があり、この疾患の病態生理学的な解析の結果が、高血圧症の新しいメカニズムを提示し、電解質研究を伴う腎臓研究、高血圧研究に新たな病態の考え方を提示する可能性がある。すなわち、今まで本態性高血圧症としてひとくくりに診断されていた一病態が、二次性高血圧症として再分類される可能性がある。一方で、生体の維持に重要な働きを有する、Mgイオンの恒常性維持の新たなメカニズムを提示できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：In in vitro analysis, the enhancement of variant ANK3 protein was confirmed. This is partly because the association between ANK3 and its E3ligase, CDC20 is compromised leading to the variant ANK3 protein stabilization. In patch clamp experiments, variant ANK3 protein suppressed K channel current more than wild type ANK3. Furthermore, variant ANK3 knock-in mice demonstrated almost the same phenotypes of the patients. These data positively suggested that this variant ANK3 caused familial hypertension with electrolyte abnormalities.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：低Mg血症 低K血症 遺伝性高血圧症 ANK3 Kv1.1 EnaC

1. 研究開始当初の背景

低Mg血症・尿中Mg排泄亢進の鑑別

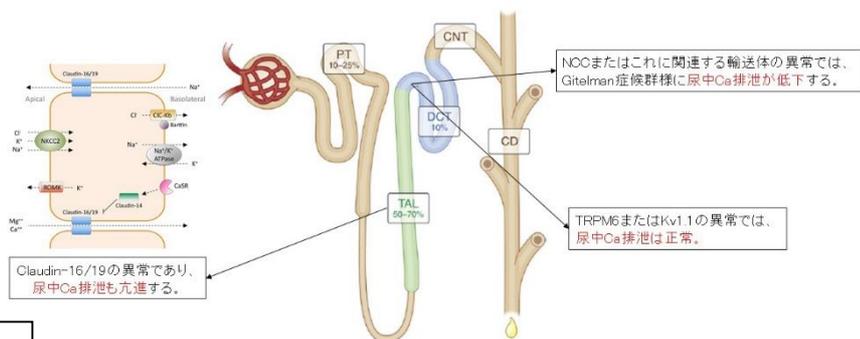


図 1

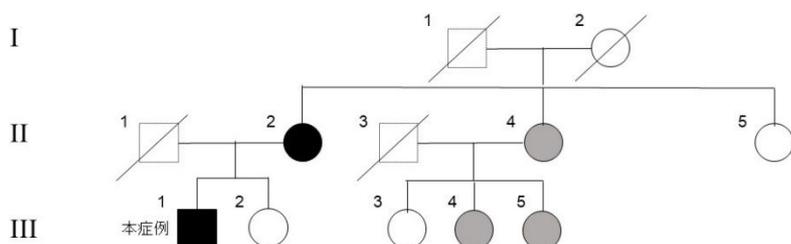


図 2

ニ活性は 1.0 ng/mL/h で、血中アルドステロン濃度は、19.6 pg/ml と低下していた。また、この患者の尿中 Ca 排泄量(尿中 Ca/Cr)を測定すると 0.08 正常であることが判明した。それ故、この患者の低 Mg 血症は、DCT における TRPM6 または *Kv1.1* に関する異常が原因の可能性が高いと思われた。DCT において、TRPM6 の Mg 再吸収の driving force として働く K channel である *Kv1.1* は、その scaffolding 分子である ankyrin-3 (ANK3) によって、細胞膜と spectrin による細胞骨格に固定されており、K channel 電流を抑制する方向の調節を受けている事が知られている (Pedro San-Cristobal. *Kidney Int* 2014)。また、一方で ANK3 が集合管において ENaC を活性化する事も知られている (Klemens C. *J Bio Chem* 2017)。申請者らは、本症例と同じ症状を有する母親並びに健常者としてその妹の genome DNA を用いた whole exome 解析及び Trio 解析を行い、疾患特異的遺伝子変異として 70 個の遺伝子変異を同定した (図 2)。その中に、ANK3, chr10:60166594C>T (rs531162695) (GRCh38.p12) を見出した。この変異は、非常に稀な変異であり (1/250516; gnomAD_exome, 1/118002; ExaAC, 1/5008; 1000G, 0/8380; jMorp) exon 28 に位置していた。

2. 研究の目的

マグネシウム(Mg)は生体に必須の主要元素であり、核酸・蛋白質の合成、ミトコンドリアでのエネルギー産生、血管トーン調節、心筋・骨格筋の活動電位の制御、骨形成など多彩な生命現象に関与している。そのため、血液中の Mg 濃度は極めて狭い範囲 (0.8-1.0 mmol/L) に維持されており、これは主に消化管、腎臓、骨が互いに協調することで成立している。

血中のマグネシウム濃度は、腎臓により複雑にコントロールされている。低 Mg 血症の鑑別においては、尿中 Ca 排泄量により原因が尿細管の何処に起因するか鑑別が可能である (図 1) (坂口ら、日本腎臓学会誌 2020)。本家系患者は、繰り返す低 K 血症 (2.0 mEq/L) と持続的低 Mg 血症 (1.3 mEq/L)、若年齢からの高血圧 (180/100mmHg) を主訴としていた。この患者の尿中 K 排泄量及び FEMg はそれぞれ、46.8 mEq/gCr、3.3% と亢進を認め、血漿レ

Mg の恒常性が破綻し、血清 Mg 濃度が著しく低下すれば不整脈、痙攣、筋力低下などの症状が出現する。しかし、症状を伴わない軽度の低 Mg 血症であっても、それが慢性的に持続すれば高血圧、糖尿病、冠動脈疾患の発症のリスクとなり、Mg 補充による病態の改善も報告されている。近年、CKD 患者でも低 Mg 血症の頻度が意外に高いことが明らかにされ、CKD の発症・進行や生命予後との関連が注目されている。これらの臨床エビデンスを解釈する上で、腎臓での Mg 調節機構の理解は欠かせない。

本研究では、申請者らが腎臓内科外来で診察した、低マグネシウム血症、低カリウム血症、高血圧症の患者家系の遺伝子解析を行い、本疾患の病態メカニズムを解明するとともに、この解析を通して腎臓でのマグネシウム及びカリウムの動態について新たな知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 本患者家系における患者の詳細な症状の検索
- (2) 本 ANK3 の遺伝子変異の分子遺伝学的意義の解析
- (3) 正常及び異常 ANK3 isoform 3 *in vitro* 発現系を用いた、電気生理学的解析
- (4) *Ank3* knock-in mouse の作成とこの mouse を用いた病態生理学的解析

4. 研究成果

- (1) 本患者家系における患者の詳細な症状の検索

発端者の子供をすべて調査したところ、男性の子供に若年性高血圧を呈する例が見つかり、遺伝子解析の結果、この ANK3 遺伝子変異を有していることが判明した。

- (2) 本 ANK3 の遺伝子変異の分子遺伝学的意義の解析

野生型および本症例の変異 ANK3 を HEK293 細胞に導入すると、野生型に比べ変異型 ANK3 の発現量が増加していた。このことから、変異型 ANK3 は発現量の増加によって、作用が増強していることが示唆された。しかし一般に変異遺伝子から産生される蛋白の発現は低下することが多く、これは終始コドンによる mRNA 翻訳前の分解や小胞体での折り畳み不全蛋白の分解に起因する。にもかかわらず、本症例の変異では逆に ANK3 発現が増加していた。野生型と変異型の遺伝子は同一のプロモーター下に存在するため、ANK3 mRNA の産生量は同等であると考えられる。したがって、本変異は ANK3 蛋白の分解を抑制することが予想された。そこで ANK3 蛋白の半減期を評価するため cycloheximide chase assay を実施した。野生型に比して変異型 ANK3 蛋白はより長時間残存していた。このことから、変異型では分解が抑制されていることが明らかになった。

ANK3 蛋白の細胞内分解機構は明らかにされていないが、ANK3 のアミノ酸配列には D-box、KEN-box という配列が含まれている。この配列はユビキチン E3 リガーゼである CDC20 の認識部位である。したがって、ANK3 は CDC20 によりユビキチン化されていると予想した。CDC20 shRNA を用いて CDC20 をノックダウンすると、コントロールに比べ CDC20 は減少し、ANK3 の発現は増加した。このことから、ユビキチンリガーゼである CDC20 が ANK3 の分解に関与していることが示唆された。さらに CDC20 による ANK3 のユビキチン化を免疫沈降法で評価すると、野生型では ANK3 に CDC20 が結合し、ユビキチン化が活発に行われていることが確認できた。一方、変異型 ANK3 は CDC20 との結合が低下し、ユビキチン化も抑制され、分解産物も減少していた。つまり変異型 ANK3 は ubiquitin-proteasome 系で分解されにくくなることで、ANK3 の蛋白発現量が増加すると考えられた。

(3) 正常及び異常ANK3 isoform 3 *in vitro* 発現系を用いた、電気生理学的解析
 ANK3 蛋白は、K channel である Kv1.1 の K channel 電流を抑制することが知られているが、
 本症例の遺伝子変異を含む、変異 ANK3 蛋白がより Kv1.1 の K channel 電流を抑制する
 かを patch clamp 法を用いて電気生理学的に検討を行ったところ、WT ANK3 を発現させ
 た HEK293T 細胞に比較して変異 ANK3 を発現させた細胞では、有意に K channel 電流
 が抑制されていた。(図3)

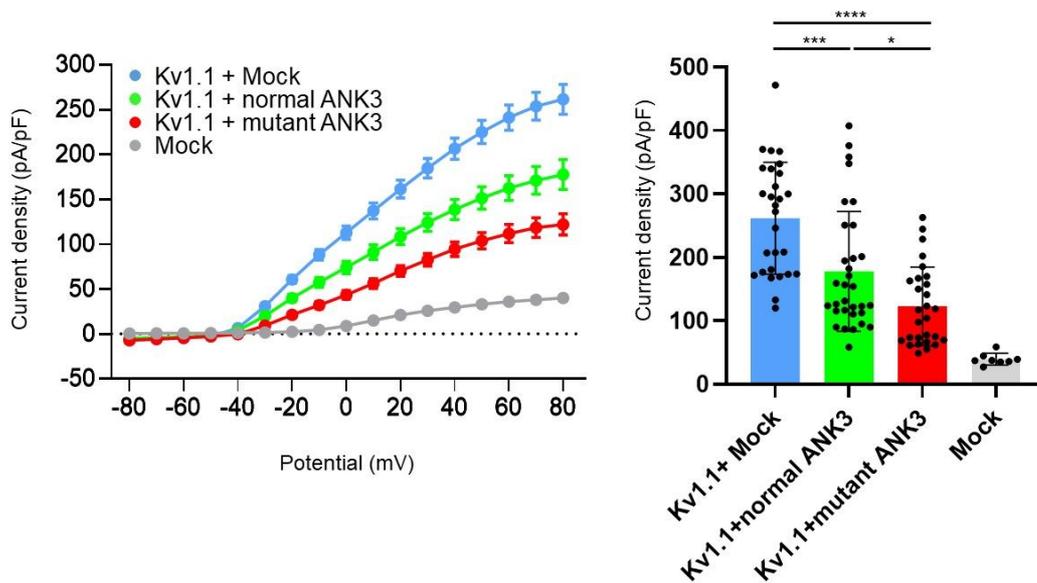


図 3

(4) *Ank3* knock-in mouse の作成とこの mouse を用いた病態生理学的解析
 DNA 編集技術により、*Ank3* knock-in mouse を作成して、病態生理学的検討を行った。
 免疫組織学的検討では、*in vitro* 解析の結果と一致して、hetero *Ank3* knock-in mouse
 の腎臓遠位曲尿細管で ANK3 蛋白の有意な発現上昇をみとめた。一方、Kv1.1 の蛋白
 発現量には変化が認められなかった。ANK3 の下流にある、EnaC については、3 種類
 それぞれ発現上昇が認められた。(図4)

ヘテロKIマウスではAnkyrin-3の発現は増加していた

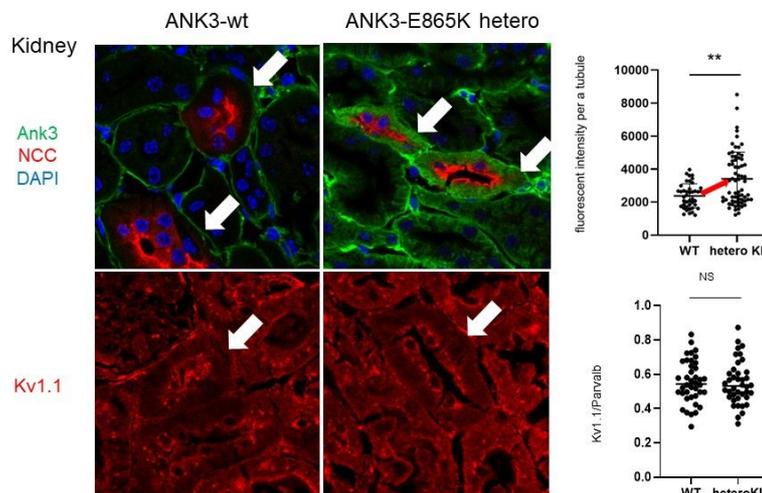


図 4

hetero *Ank3* knock-in mouse の血清 K 及び Mg 濃度を測定したところ、患者の病態に一致して WT mouse に比べて、有意に濃度が減少していた。また、通常食の摂取下において、既に、WT mouse に比べて、有意に血圧が上昇していた。(図5)

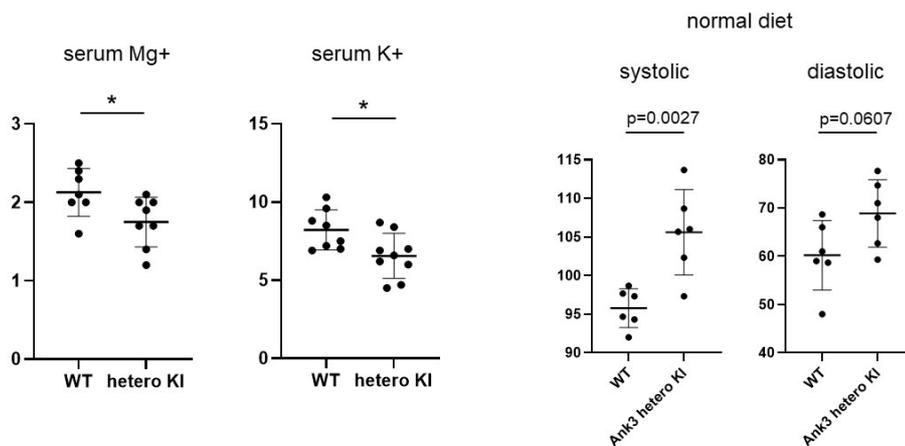


図5

これらの事から、本家系で明らかとなった ANK3 の遺伝子変異が、電解質異常を伴う、家族性高血圧症を引き起こす事が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶本幸男、坂口悠介、貝森淳哉、服部洸輝、朝比奈悠太、土井洋平、岡樹史、高橋篤史、猪阪善隆
2. 発表標題 低Mg・低K血症を伴う遺伝性高血圧の新規責任遺伝子ANK-3の同定とその変異の機能解析
3. 学会等名 臨床体液研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶本幸男、坂口悠介、貝森淳哉、服部洸輝、朝比奈悠太、土井洋平、岡樹史、高橋篤史、猪阪善隆
2. 発表標題 低Mg・低K血症を伴う遺伝性高血圧の新規責任遺伝子ANK-3の同定とその変異の機能解析
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〕

-

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
研究分担者	猪阪 善隆 (Isaka Yoshitaka) (00379166)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	坂口 悠介 (Sakaguchi Yusuke) (80756817)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤) (14401)	

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