

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790783

研究課題名（和文） 肥満患者におけるWNKキナーゼを介した塩分感受性高血圧メカニズムの解明

研究課題名（英文） WNK kinase links salt-sensitive hypertension with obesity

## 研究代表者

蘇原 映誠（SOHARA EISEI）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90510355

## 研究成果の概要（和文）：

近年、WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの存在が明らかになるにつれ、PHAI という特定の疾患だけでなく、この新しいカスケードが腎臓での塩分再吸収をどのように生理的に制御しているかに注目が集まってきている。本研究では、アルドステロンやアンギオテンシン II により OSR1/SPAK と NCC のリン酸化が制御されることから、生理的な生体内の塩分排出制御に重要であることを報告した (J Cell Sci. 2011, BBRC 2010)。2011 年には培養細胞とマウス腎臓において、1：インスリンの急性負荷が NCC を活性化する Thr 53/58 と Ser 71 のリン酸化を亢進すること、2：この急性インスリン負荷による NCC リン酸化に WNK4 と SPAK が関与している事をノックダウン細胞とノックアウトマウスを用いて明らかにした (Sohara E et al. PLoS ONE 2011)。元来、インスリン投与により腎臓での塩分再吸収が亢進する事はよく知られており、メタボリックシンドロームの塩分感受性高血圧の一因とされているが、その詳細なメカニズムは不明であった。申請者 蘇原の発見は高インスリン状態における腎臓尿細管での塩分再吸収亢進のメカニズムの一つを明らかにし、WNK キナーゼが高インスリン血症と塩分感受性高血圧をつなぐ重要な鍵であることを示した。

## 研究成果の概要（英文）：

The NaCl cotransporter (NCC) is essential for sodium reabsorption at the distal convoluted tubules (DCT), and its phosphorylation increases its transport activity and apical membrane localization. Although insulin has been reported to increase sodium reabsorption in the kidney, the linkage between insulin and NCC phosphorylation has not yet been investigated. This study examined whether insulin regulates NCC phosphorylation. In cultured mpkDCT cells, insulin increased phosphorylation of STE20/SPS1-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and NCC in a dose-dependent manner. This insulin-induced phosphorylation of NCC was suppressed in WNK4 and SPAK knockdown cells. In addition, Ly294002, a PI3K inhibitor, decreased the insulin effect on SPAK and NCC phosphorylation, indicating that insulin induces phosphorylation of SPAK and NCC through PI3K and WNK4 in mpkDCT cells. Moreover, acute insulin administration to mice increased phosphorylation of oxidative stress-responsive kinase-1 (OSR1), SPAK and NCC in the kidney. Time-course experiments in mpkDCT cells and mice suggested that SPAK is upstream of NCC in this insulin-induced NCC phosphorylation mechanism, which was confirmed by the lack of insulin-induced NCC phosphorylation in SPAK knockout mice. Moreover, insulin administration to WNK4 hypomorphic mice did not increase phosphorylation of OSR1, SPAK and NCC in the kidney, suggesting that WNK4 is also involved in the insulin-induced OSR1, SPAK and NCC phosphorylation mechanism in vivo. The present results demonstrated that insulin is a potent regulator of NCC phosphorylation in the kidney, and that WNK4 and SPAK are involved in this mechanism of NCC phosphorylation by insulin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1600000	480000	2080000
2011年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学腎臓内科学

キーワード：水電解質

1. 研究開始当初の背景

従来、腎臓領域における遺伝性高血圧疾患は腎臓尿細管の Na チャネルやトランスポーター蛋白自身の変異により Na の再吸収が異常に増加するというメカニズムで報告されてきていたが、2001年に遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型(以下 PHAII)患者には WNK キナーゼに変異があることが linkage analysis によって報告された (Science 2001)。この事実は、トランスポーター蛋白単独の異常ではなく、WNK キナーゼを介して血圧をコントロールするネットワークが腎臓に存在することを示唆するという点で非常に興味深く、申請者 蘇原映誠の所属する東京医科歯科大学腎臓内科では近年 WNK キナーゼについての研究が盛んに行われている。

最近、東京医科歯科大学腎臓内科では PHAII モデルマウスを作成し解析を行った (Cell Metab, 2007)。このモデルマウスの作成と解析により、Na-Cl 共輸送体 (以下 NCC) が OSR1/SPAK というキナーゼとともに病態モデルマウスでは過度にリン酸化され、リン酸化された NCC は細胞膜上に集積し、NaCl を過度に再吸収し高血圧症を引き起こしていることが明らかになった。OSR1/SPAK は in vitro で WNK4 の基質として同定されており、WNK4-OSR1/SPAK-NCC というリン酸化カスケードが腎臓での新たな体液調節系として重要な役割を持っていることが明らかとなり、塩分感受性高血圧の一因を担っていることが示唆されている。さらに、WNK4 hypomorphic mouse の作成も行い、WNK4 が下流の OSR1/SPAK-NCC のリン酸化に対して正のシグナルを送っていることを証明した (Hum Mol Genet, 2009)。すなわち、PHAII は WNK4 の過剰な機能亢進により WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが亢進するために、塩分再吸収が過度に起きるために発症することを当研究室は明らかにしてきた。

2. 研究の目的

偽性低アルドステロン症 II 型 (PHA II) は、遺伝性高血圧疾患であり、WNK4 (With-no-lysine kinase 4) の変異によって発症する。申請者 蘇原映誠は PHA II 変異の一つである変異 WNK4 R1185C の解析を行ったところ、WNK4 の 1190S リン酸化の過剰亢進が原因であることを解明し、このリン酸化はインスリンによって亢進することを発見した。本研究では、肥満などの高インスリン血症における塩分感受性高血圧の機序に、WNK4 1190S のリン酸化が関わっているという仮説を、細胞・マウス・ヒトレベルにおいて証明し、WNK シグナルのアウトプットとなる Na-Cl 共輸送体の過剰なリン酸化亢進が高インスリン血症における治療ターゲットとなることを検証する。

3. 研究の方法

本研究は PHAII/WNK 研究から得られた知見をもとに、メタボリックシンドロームや肥満など高インスリン状態における塩分感受性高血圧のメカニズムを探求するものである。全体としては、以下の3つに大きく分けられる。A：細胞レベルでの新規 Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードの研究：Insulin から WNK リン酸化亢進に至るまでの詳細なメカニズムは不明である。Insulin によって WNK4 1190S をリン酸化できるキナーゼ候補としては SGK1, Akt, S6K などがあり、Insulin と WNK4 をつなぐシグナル伝達を検証する。具体的には PI3K の関与は阻害薬実験、SGK1, Akt, S6K の関与は dominant active form の強制発現実験/阻害薬実験で検証する。

B：マウスにおける Insulin-WNK-NCC リン酸化カスケードの研究：インスリン投与マウス、肥満/糖尿病モデルマウス、OSR1, SPAK 遺伝子改変モデルマウス、WNK4 R1185C トランスジェニックマウス各々における WNK-OSR1/SPAK-NCC 系の検討を行う。

C：メタボリックシンドローム/肥満患者にお

ける尿中NCCの研究:メタボリックシンドロームや肥満の患者でもInsulin-WNK-NCCリン酸化カスケードの異常によって塩分感受性高血圧が起きていることを示したい。患者の腎臓自体を手に入れることは困難なので、WNKのカスケードの最終段階としてのリン酸化NCCを検出する方法としてELISAを立ち上げた。

#### 4. 研究成果

マウス腎臓と培養細胞におけるインスリンによるWNK4を介したOSR1/SPAK-NCCリン酸化を明らかにし、firstかつcorresponding authorとしてPLoS One誌に報告した(Sohara E, et al. PLoS One. 2011)。本論文は早速Carolyn Ecelbarger博士にトップ2%に値する”Must Read”としてF1000に取り上げられた。続けて、高インスリン血症を来す肥満モデルdb/dbマウスにおいてOSR1/SPAK-NCCのリン酸化が亢進している事、不活化SPAK/OSR1ノックインマウスをdb/dbに交配したダブルノックインマウスを解析する事によってWNKからのOSR1/SPAKリン酸化がdb/dbマウスでのNCCリン酸化亢進に必須である事、さらにはインスリンがPI3K-Aktシグナル系を介してOSR1/SPAK-NCCリン酸化を亢進させる事を明らかにした。すなわちPI3K-Akt-WNK-OSR1/SPAK-NCC系が亢進する事がメタボリック症候群や肥満等の高インスリン状態における塩分感受性高血圧の一因である事を論文にしてcorresponding authorとしてHypertension誌に投稿し、現在revise実験を行っている。さらに、WNK3ノックアウトマウス作成と腎臓/血圧における解析をcorresponding authorとして報告した(Oi K, et al. Biology Open 2012)。その他、OSR1ノックアウトマウスの作成/解析(Lin SH, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011)、WNK4/SPAK/OSR1トリプルノックインマウスによる真のPHAI1発症メカニズムの解明(Chiga M, et al. J Cell Sci. 2011)、細胞外カリウムによるWNK1活性化(Naito S, et al. Clin Exp Nephrol. 2011)、WNK1ノックアウトマウスでの腎血管系の解析(Susa K, et al. Clin Exp Nephrol. 2012)などを共著者として報告し、2011年4月から2012年3月までの助成期間中に9報の論文を報告させて頂き、2報の論文(second author, corresponding author)のrevise実験を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. Effect of heterozygous deletion of WNK1

on the WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels. Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S. Clin Exp Nephrol. 2012 Feb 1. [Epub ahead of print]

2. A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo. Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, Alessi DR, Sasaki S, Uchida S. Biology Open 2012 Feb; 1: 120-127.

3. Severe hyperparathyroidism in a pre-dialysis chronic kidney disease patient treated with a very low protein diet. Ohta E, Akazawa M, Noda Y, Mandai S, Naito S, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. J Bone Miner Metab. 2012 Mar;30(2):238-42.

4. Impaired phosphorylation of Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter by oxidative stress-responsive kinase-1 deficiency manifests hypotension and Bartter-like syndrome. Lin SH, Yu IS, Jiang ST, Lin SW, Chu P, Chen A, Sytwu HK, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Yang SS. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Oct 18;108(42):17538-43.

5. Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells. Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Inoue S, Miyachi Y. FASEB J. 2012 Jan;26(1):211-8.

6. Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells and mouse kidney. Sohara E, Rai T, Yang SS, Ohta A, Naito S, Chiga M, Nomura N, Lin SH, Vandewalle A, Ohta E, Sasaki S, Uchida S. PLoS One. 2011;6(8):e24277.

7. Generation and analyses of R8L barttin knockin mouse. Nomura N, Tajima M, Sugawara N, Morimoto T, Kondo Y, Ohno M, Uchida K, Mutig K, Bachmann S, Soleimani M, Ohta E, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Jentsch TJ, Sasaki S, Uchida S. Am J Physiol Renal Physiol. 2011 Aug;301(2):F297-307.

8. Phenotypes of pseudohypoaldosteronism

type II caused by the WNK4 D561A missense mutation are dependent on the WNK-OSR1/SPAK kinase cascade. Chiga M, Rafiqi FH, Alessi DR, Sohara E, Ohta A, Rai T, Sasaki S, Uchida S. J Cell Sci. 2011 May 1;124(Pt 9):1391-5.

9. Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. Naito S, Ohta A, Sohara E, Ohta E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Clin Exp Nephrol. 2011 Apr;15(2):195-202

〔学会発表〕(計4件)

1. 蘇原映誠、楊松昇、太田哲人、林石化、頼建光、内田信一、佐々木成. mpkDCT細胞とマウス腎臓におけるインスリン急性負荷によるNCCリン酸化の亢進. 第54回日本腎臓学会学術総会、横浜、2011年6月

蘇原映誠. 優秀演題賞. 第54回日本腎臓学会学術総会、横浜、2011年6月

2. 蘇原映誠. WNKキナーゼ遺伝子改変マウスによるNa-Cl共輸送体制御機構の解明. 第54回日本腎臓学会学術総会ワークショップ、横浜、2011年6月

3. Sohara E, Rai T, Yang SS, Ohta A, Chiga M, Nomura N, Lin SH, Vandewalle A, Sasaki S, Uchida S. Acute insulin stimulation induces phosphorylation of the Na-Cl cotransporter in cultured distal mpkDCT cells and mouse kidney. The 44th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, November, 2011.

4. 蘇原映誠. インスリンと塩分感受性高血圧症をつなぐ新規インスリン-WNK4-NCCリン酸化カスケードの発見. 第53回日本腎臓学会学術総会ワークショップ、神戸、2010年6月

〔図書〕(計1件)

蘇原映誠. 偽性低アルドステロン症 II 型. BIO Clinica 26: 41-45, 2011.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

蘇原 映誠 (SOHARA EISEI)

研究者番号: 90510355