

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860670

研究課題名(和文)血管トーン調節におけるWNKキナーゼの役割の解明

研究課題名(英文)WNK signal in regulatory mechanisms of vascular tone

研究代表者

大井 克征(Oi, Katsuyuki)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50633765

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)：我々は塩分感受性を制御するWNKシグナルとその分解系であるKLHL2/KLHL3/Cullin3複合体を研究してきた。血管平滑筋において、angiotensin IIがWNK3-SPAK-NKCC1リン酸化シグナルを制御し血管を収縮させる機序を報告した。さらにangiotensin IIは選択的autophagyを介してKLHL2の発現量を低下させることによってWNK3の分解を抑制し、WNK3-SPAK-NKCC1のリン酸化カスケードを亢進させるという、angiotensin IIが血管を収縮させる新しい機序を解明した。これらが今後の新規降圧薬開発のターゲットとなる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：At first, we identified the WNK3-OSR1/SPAK-NKCC1 cascade in vascular smooth muscle cells and found that it constitutes an important mechanism of vascular constriction by angiotensin II (AngII). Recently, the kelch-like protein 3 (KLHL3)/Cullin3 complex was identified as an E3 ubiquitin ligase for with no lysine (WNK) kinases. Therefore, we investigated the involvement of KLHL proteins in AngII-induced WNK3 activation of vascular smooth muscle cells. In the mouse aorta, KLHL3 was not expressed, but KLHL2, the closest homolog of KLHL3, was expressed. Salt depletion and acute infusion of AngII decreased KLHL2 and increased WNK3 levels in the mouse aorta. The AngII-induced decrease in KLHL2 was caused by increased autophagy-mediated degradation. Thus, we identified a novel component of signal transduction in AngII-induced vascular contraction that could be a promising drug target.

研究分野：腎臓内科

キーワード：WNKシグナル 血管平滑筋

1. 研究開始当初の背景

高血圧は脳卒中、心筋梗塞、慢性腎臓病などの強力なリスクファクターであり、生命予後にも深く関与している。本邦の高血圧者数は約 4300 万人、高血圧に起因する死亡者数は年間約 10 万人と推定されており、高血圧はその危険性および頻度の両側面から、注目され続けている疾患である。

申請者大井克征の所属する東京医科歯科大学腎臓内科では遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型(PHAI I)の原因として報告された WNK1 と WNK4 遺伝子の変異に注目し、これまで解析を進めてきており、PHAI I 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、NCC のリン酸化が亢進して膜上に発現が増えるために、塩分再吸収が過度に起きて発症することを我々は明らかにした (Cell Metab., 2007, Hum Mol Genet., 2009, J Cell Sci., 2011)。また、アルドステロンやアンジオテンシン II (AngII) が増える事で、塩分不足の状態では WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードが亢進する事で塩分保持に働き、逆に塩分過剰になると同カスケードも抑制されて塩分を尿中から再吸収しないように働くなど、WNK-OSR1/SPAK-NCC というリン酸化カスケードが、腎臓での塩分排出に関わる生理的な恒常性維持メカニズムとして機能している事も当研究室は明らかにしている (Kidney Int. 2008, Biochem Biophys Res Commun., 2010)。

一方、この WNK-OSR1/SPAK の下流には NCC と同じく SLC12a ファミリーである Na-K-Cl 共輸送体 (NKCC1/2) もあり、特に NKCC1 は血管平滑筋に存在し、WNK-OSR1/SPAK-NKCC リン酸化カスケードとして血管トーンスの調節に関わる。一般的に血管平滑筋ではアンジオテンシン II (AngII) により電位依存性の Ca チャネルが開き、Ca²⁺が流入することで血管平滑筋の収縮が起き血管のトーンスを上昇させる事が知られており、実際にカルシウム拮抗薬や AngII 受容体拮抗薬 (ARB) は降圧薬として広く利用されているが、なぜ AngII が Ca チャネルを開きさせるかは明確なメカニズムは明らかになっていない。実は血管平滑筋細胞が脱分極するためには血管平滑筋に発現する NKCC1 による細胞内 Cl⁻濃度の維持が必要であり、NKCC1 ノックアウトマウスでは細胞内 Cl⁻濃度が維持できないために末梢血管抵抗が低下して低血圧を呈する。さらに WNK1 や SPAK のノックアウトマウスでは NKCC1 のリン酸化の低下と血管トーンスの減少を呈する事、すなわち血管平滑筋において WNK-SPAK-NKCC リン酸化カスケードが血管トーンスを制御する事を我々は報告している (J Am Soc Nephrol., 2010, Clin Exp Nephrol., 2012)。

上記のように腎臓における

WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの制御因子は明らかになってきているが、血管平滑筋のそれは全く報告がない。これらを踏まえ、本研究は、血管平滑筋における WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードの塩分負荷による制御に AngII が深く関わっていること、さらに WNK ファミリーの中で血管平滑筋に発現している WNK1/WNK3 のどちらが(または両方が)このメカニズムに関与しているかを我々の保持するノックアウトマウスを駆使する事によって明らかにし、最終的には ARB の血管平滑筋弛緩作用のメカニズムの一つが、

WNK-OSR1/SPAK-NKCC/NCC リン酸化カスケードの抑制であることを明らかにすることが本研究の目的となる。

2. 研究の目的

偽性低アルドステロン症 II 型(PHAI I)は腎臓遠位尿管での WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードの過剰な亢進によって発症する。我々は以下の事を明らかにしていた。

1. WNK-OSR1/SPAK-NCC/NKCC リン酸化カスケードは腎臓において塩分再吸収に関わる重要なカスケードであり、血管系にも存在することを我々のグループは明らかにしてきた。

2. 塩分負荷により血管平滑筋のトーンスを制御する WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードが制御され、生理的な血管維持に関わっていることを我々は発見した。

3. 予備実験はその制御因子として AngII が WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードを亢進する事で血管平滑筋を収縮させることを示唆している。

4. WNK3 は血管平滑筋に存在し、低塩下で尿中の Na 排泄量に変化を認めないにもかかわらず血圧低下を認めることを報告しており、塩分負荷による WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードに深く関わっている可能性が示されている。

これらを踏まえ、血管系にも WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードが存在しており、WNK キナーゼは体液量の調節だけでなく、血管トーンスの調節も介して血圧調節に関わっていると考えられる。本研究では血管平滑筋培養細胞や WNK1 及び WNK3 ノックアウトマウスを用いて、血管トーンス制御メカニズムにおける WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードの役割とアンジオテンシン II の関与を明らかにするとともに、新しい視点の高血圧治療薬のターゲットを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

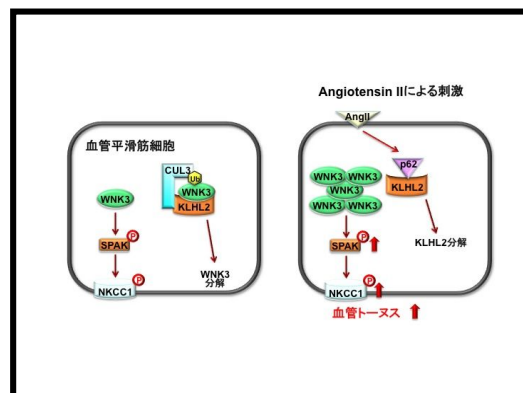
angiotensin II 投与時にマウス血管平滑筋細胞において WNK による SPAK リン酸化と SPAK による NKCC1 リン酸が亢進する事を

リン酸化抗体を用いて検討する。マウスを用いて生体内での証明も行う。angiotensin II の急性 / 慢性投与によって WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードが亢進する事を明らかにし、ARB 投与によってこの作用が減弱または消失する事を確認することにより、angiotensin II の関与を証明する。塩分摂取による血管平滑筋の収縮は angiotensin II を介していると考えられ、WNK3 が angiotensin II からのシグナルを下流の SPAK, NKCC1 に送っていると予想され、WNK3 ノックアウトマウスを用いて明らかにする。具体的には低塩負荷と angiotensin II 投与によっても WNK3 ノックアウトマウスでは WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードの亢進が野生型と比較して十分でない事を確認することにより、このメカニズムに WNK3 が関わっている事を明らかにしたい。また、WNK3 ノックアウトマウスの血管トーンスを測定することにより、WNK3 の血管トーンス維持作用を明らかにする。さらに angiotensin II によって WNK3 がどのように制御されるかを検討するため、血管平滑筋における WNK 分解系の中心となる KLHL2/3 蛋白に注目し、angiotensin II がどのようなメカニズムで WNK3-SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードを血管平滑筋の中で制御しているかを明らかにした。

4. 研究成果

我々は遺伝性高血圧症の原因遺伝子である With-no lysine kinase 4 (WNK4) および WNK1 の腎臓における機能解析を通して塩分感受性高血圧の機序の解明を進めてきた。まず、低塩食で大動脈血管の WNK シグナルが亢進する事を NKCC1, SPAK のリン酸化抗体で明らかにし、それが AngII を介している事を負荷実験と阻害実験で明らかにした。WNK3 は血管平滑筋に存在し、低塩下で尿中の Na 排泄量に変化を認めないにもかかわらず血圧低下を認めることを報告しており、塩分負荷による WNK-OSR1/SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードに深く関わっている可能性が示されていた。そこで、WNK3 ノックアウトマウスに AngII 負荷をしても WNK シグナル下流の NKCC1 リン酸化が亢進しないことを確認し、WNK3 が AngII による血管修飾に重要であることを証明した。さらに抵抗血管でも AngII による血管収縮が WNK3 では少ない事を証明した。この事は、低塩食等による体液減少に対して、WNK3-SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードが亢進する事によって、血管トーンスが維持されやすくなり、血圧を維持するようなメカニズムを形成している事をはじめて明らかにした。以上の結果を Hypertension 誌に報告した。さらに近年、Kelch-like protein 3 (KLHL3) も PHA II の原因遺伝子として同定され、KLHL3-CuIIn3 複合体が E3 ユビキチンリガ

ーゼとして WNK キナーゼを分解し、WNK-SPAK-NCC カスケードを減弱させることが我々の研究から明らかになった。また、KLHL2 も KLHL3 同様 WNK に結合しその分解を促進することも報告した。高血圧の一因として血管抵抗の関与は大きく、angiotensin II は血管収縮を引き起こす強力な因子として知られているため、angiotensin II による血管収縮の機序解明は今後の高血圧の有望な治療ターゲットになる可能性がある。そこで我々は angiotensin II の WNK3 制御機構について、さらなる研究を行った。マウス大動脈と血管平滑筋細胞 (MOVAS) において KLHL の発現を RT-PCR および immunoblotting 法により確認し、KLHL3 の発現はなく KLHL2 のみが発現していることを明らかにした。さらにマウスへの塩分負荷および angiotensin II 投与、MOVAS への angiotensin II 投与での KLHL2 と WNK3 の発現量を調べたところ、低塩および angiotensin II 投与下において血管および血管平滑筋細胞における KLHL2 の減少と WNK3 の増加を認めた。また KLHL2 の knockdown および強制発現実験により KLHL2 が WNK3-SPAK-NKCC1 シグナルを制御していることが解明された。また、種々の分解阻害薬投与や knockdown 実験から、angiotensin II による KLHL2 減少の機序は p62 による選択的 autophagy によるものであることも明らかにした。以上により、マウス血管平滑筋において、angiotensin II は選択的 autophagy を介して KLHL2 の発現量を低下させることによって WNK3 の分解を抑制し、WNK3-SPAK-NKCC1 のリン酸化カスケードを亢進させるという、angiotensin II が血管を収縮させる新しい機序を解明した。今回の研究におけるオートファジーを介した KLHL2-WNK3-SPAK-NKCC1 シグナル伝達系の解明は、新たな血圧調節の分子機構の発見であり、オートファジーという現象や KLHL2 といった新規分子が、今後の新規降圧薬開発のターゲットとなる可能性を示した。以上を J Am Soc Nephrol 誌に報告し、プレスリリースとしても世間に発信。日刊工業新聞に掲載された。



図：血管平滑筋における WNK3-SPAK-NKCC1 リン酸化カスケード制御機構

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 2 件)

1: Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Isobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Kelch-Like Protein 2 Mediates Angiotensin II-With No Lysine 3 Signaling in the Regulation of Vascular Tonus. J Am Soc Nephrol. (In press) 査読有

2: Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. Hypertension. 62(5): 872-878, 2013. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1: Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Ishobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. KLHL2 mediates angiotensin II-WNK3 signaling involved in the regulation of vascular tonus The 47th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Philadelphia, 13th, November. 2014.

2: 銭谷慕子, 蘇原映誠, **大井克征**, 千賀宗子, 須佐紘一郎, 森崇寧, 頼建光, 佐々木成, 内田信一. マウス血管平滑筋における塩分摂取による WNK3-SPAK-NKCC1 カスケードの制御. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013 年 5 月 11 日.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大井 克征 (Oi Katsuyuki)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号 : 50633765