

厚生労働科学研究費補助金（難治疾患克服研究事業（腎疾患対策研究事業））  
（分担）研究報告書

塩分感受性高血圧モデルマウスを用いた塩分ストレスバイオマーカーの探索

研究分担者 蘇原映誠 東京医科歯科大学医学部附属病院腎臓内科 講師

研究要旨：

塩分感受性高血圧モデルマウスを用いた塩分ストレスバイオマーカーの探索を行うために、新たな塩分感受性高血圧モデルマウス作成を行うとともに、既に作成した遺伝性高血圧モデルマウスであるWNK4変異ノックインマウスに高塩食を負荷し、各種臓器におきる反応を網羅的解析により明らかにする。KLHL3はその遺伝子変異が、WNK4と同様に、ヒト遺伝性塩分感受性高血圧症である偽性低アルドステロン症II型を引き起こす事が判明したが、その生体内での病態生理は不明であった。そこで病原性変異であるR528Hミスセンス変異を発現するノックインマウスを作成し解析した。その結果、腎臓でWNK1とWNK4のタンパク発現量が増大し、下流のOSR1/SPAKキナーゼ-NCC輸送体刺激伝導系が活性化されていることが判明した。

A. 研究目的

WNK キナーゼシグナル伝達系の亢進は、塩分感受性高血圧症を引き起こす。我々はすでに偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) を引き起こす WNK4 の変異と同じ変異をもつモデルマウス (WNK4 変異ノックインマウス) を作成し PHAII の病態を明らかにしてきた。最近 WNK キナーゼ以外に新たに KLHL3 と Cullin3 の遺伝子異常が PHAII を引き起こす事が示された。本研究では、WNK4 ノックインマウスにおいて塩分負荷が全身臓器に及ぼす影響を種々の網羅的解析により明らかにすることを目的とする。さらに、KLHL3 変異ノックインマウスを作成し、WNK4 ノックインマウスとの類似点と相違点を明らかにすることで、真の新たな塩分ストレス応答因子を明らかにする。

B. 研究方法

塩分感受性の亢進している WNK4 変異ノックインマウスに、急性ないし慢性の高塩食負荷をかけ、各臓器(主として腎組織、血管系、尿、血液など)における mRNA および蛋白の網羅的解析を行い、塩分負荷で著明に反応する分子の候補を得る。また、そのスクリーニングの特異度をあげるため、WNK4 変異以外で PHAII を引き起こす病態モデルマウスを作成し、同様の解析を行い、両方のモデルで共通してみられる現象を高塩ストレスに応答する因子の有力な候補と判断する。実際には KLHL3 において、ヒト PHAII で発見された変異を導入したノックインマウスを作成する。25 年度はその作成に成功し、解析を行った。

C. 研究結果

網羅的解析による、塩分負荷に応答するマーカーの探索は、腎臓での網羅的なリン酸化プロテオームを共同研究

にて行ったが、実質臓器からのリン酸化蛋白の精製、特に可溶性の問題から検出される蛋白の数に限りが見られた。そこで、方針を変更し、まずは最近その精度と再現性が向上したDNAマイクロアレイにてmRNAレベルで変動する遺伝子の同定を行い、現在候補遺伝子の選別と再現性の有無を検証中である。また、エピジェネティックな変化は、最近の次世代シーケンサーの発達とともに、網羅的解析を行えるようになってきている。今回我々は、まだ実質臓器では難しかった網羅的なチップシーケンス解析を腎臓で行う事に成功した。上記のマイクロアレイ解析の結果やRNAシーケンスの結果とあわせて、次年度に取り組むべきターゲットを明らかにする。

一方、ヒトで PHAII を引き起こす KLHL3 の R528H 変異をもつモデルマウスの作成に成功し、解析を行った。その結果、腎臓での WNK1, WNK4 の蛋白量が著増しており、当初の仮説通り、KLHL3 の変異が WNK の分解を阻害し、細胞内で増加した WNK が下流のシグナル系を活性化して PHAII を引き起こしていると思われた。

#### D. 考察

KLHL3 変異ノックインマウス作成により、PHAII の病態の本質、すなわちユビキチン化障害による WNK 蛋白量の増加、が明らかとなった。今後は、この系の破綻が PHAII のみならず、他の WNK キナーゼの制御においても関わりがないかを探るとともに、KLHL を外的に制御して WNK キナーゼシグナル系を

制御する方策を探索する。

塩分負荷や血圧のバイオマーカー探索は、蛋白レベルでは難しいことも判明し、DNA レベルでの検討を行いデータは既に得られた。解析をすすめて、次年度以降に更なる検討を加える。

#### E. 結論

KLHL3 変異ノックインマウス作成と解析を終了し、WNK キナーゼの新たな分解による制御系を明らかにすることができた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 305: F1374-81, 2013.
2. Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeki H, Sasaki S, Uchida S. Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands. *J Dermatol Sci.* 70: 26-33, 2013.
3. Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem J.* 455: 339-45, 2013.
4. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Decrease of WNK4

- ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 439: 30-4, 2013.
5. Nomura N, Kamiya K, Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type caused by mutated *Bsnd* in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 441: 544-49, 2013.
  6. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 437: 457-62, 2013.
  7. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep.* 3: 858-68, 2013.
  8. 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: 872-878, 2013.
2. 学会発表
1. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in AQP11-Knockout Mice. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
  2. Ishimoto I, Sohara E, Ito E, Chiga M, Iimori S, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S. A case of fibronectin glomerulopathy with rapidly progressive, severe nephrotic syndrome leading to end-stage renal disease. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
  3. Isobe K, Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Clinical Significance of Urinary Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter (NCC) Measurement by Newly Development Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. The 46<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
  4. Mori T, Eriko K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signaling inhibitors by using fluorescent correlation spectroscopy. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
  5. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Analyses of KLHL3 mutants that cause Pseudohypoaldosteronism type II. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.

6. Susa K, Sohara E, Zeniya M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Low salt intake decreased transcription and protein level of KLHL3 in mouse kidney. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
7. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
8. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 activates OSR1 and SPAK kinases-NaCl cotransporter (NCC) signaling and causes hypertension. The 46<sup>st</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
9. 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. WNK3 Regulates Blood Pressure Through the Regulation of Vascular OSR1/SPAK-NKCC1 Phosphorylation Cascade. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し。